

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT
Biofizikai és Biokémiai Intézetei

XXXI. OTDK Biológia Szekció

**Vér-agy gát változások L-ornitinnel kiváltott akut
hasnyálmirigy-gyulladásban**

Készítette: Harazin András
biológus MSc, II. évfolyam

Témavezetők: Dr. Deli Mária
Dr. Tubak Vilmos
MTA SZBK Biofizikai és Biokémiai Intézet

Belső konzulens: Dr. Rákhely Gábor
SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék

2012

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék	2
1. Bevezetés	5
1.1. Az akut hasnyálmirigy-gyulladás jellemzői	5
1.2. A pancreaticus encephalopathia jellemzése	6
1.3. A vér-agy gát szerkezete és működése	7
1.4. A Cat-1 kationos aminosav transzporter	9
1.5. Az akut hasnyálmirigy-gyulladás modellezése	10
1.6. Az L-ornitin hatás <i>in vivo</i> vizsgálata.....	12
1.7. Célkitűzéseink	14
2. Anyagok és módszerek	15
2.1. Vegyszerek	15
2.2. Sejtenyésztés, a vér-agy gát <i>in vitro</i> modellezése	15
2.2.1. Agyi endotélsejt tenyésztés	15
2.2.2. Pericita tenyésztés.....	16
2.2.3. Gliasejt tenyésztés	16
2.2.4. Háromsejtes vér-agy gát modell	16
2.2.5. Humán agyi endotélsejt tenyészet	17
2.3. Tenyészetek kezelése.....	17
2.4. Toxicitási vizsgálat valós idejű sejtanalízissel	17
2.5. Transzendoteliális elektromos ellenállás mérése.....	18
2.6. Permeabilitási vizsgálat	19
2.7. Agyi mikroér izolálás	20
2.8. TaqMan array vizsgálatok	20
2.9. Patkány szervekből történő RNS izolálás és cDNS-szintézis	21
2.10. Real-time PCR.....	22
2.11. Statisztikai kiértékelés	23
3. Eredmények	24
3.1. L-ornitin hatása a sejtek életképességére	24
3.2. L-ornitin hatása a transzendoteliális rezisztenciára	24
3.3. L-ornitin hatása agyi endotélsejt tenyészetek permeabilitására	25
3.4. Agyi endotélsejtek Cat-1 expressziója TaqMan arraykísérletekben	25
3.5. RNS izolálás	26
3.6. Real-time PCR.....	28
4. Megbeszélés.....	30
4.1. L-ornitin hatása agyi endotélsejtek életképességére	30
4.2. L-ornitin hatása agyi endotélsejtek barrier funkciójára	30
4.3. A hasnyálmirigyből történő RNS izolálás optimalizálása	30
4.4. Agyi mikroerek és tenyésztett agyi endotélsejtek Cat-1 kationos aminosav transzporter expressziója	31
4.5. Összegzés és további kutatási lehetőségek.....	32
5. Irodalomjegyzék	33
6. Köszönetnyilvánítás	36

A DOLGOZATBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK

ASAT – aszpariginsav-aminotranszferáz

BSA – borjú szérum albumin

Cat-1 – kationos aminosav transzporter-1

cDNS – RNS-ről készült DNS-másolat

cm² - négyzetcentiméter

CO₂ – szén-dioxid

D3 – humán agyi endotél sejtvonala

Da – dalton

DME médium – Dulbecco's modified Eagle's médium

EPA – endotélsejtek, periciták és asztroglia sejtek hármaskultúrája

FBS – magzati borjúserum

GLUT-1 – glükóz-transzporter-1

Hprt1 – hipoxantin foszforiboziltranszferáz-1

IFN γ – interferon- γ

IL-1 β – interleukin-1 β

IL-6 – interleukin-6

IL-8 – interleukin-8

Lat-1 – L-típusú aminosav transzporter-1

LiCl – lítium-klorid

MCP-1 – monocita kemoattraktáns fehérje-1

ml – milliliter

mM – millimól

MRI – mágneses magrezonancia képalkotás

MRP – multidrog rezisztencia fehérje

Ms – mólsúly

MV – agyi mikroér

nm - nanométer

PBS – foszfát puffer oldat

PCR – polimeráz láncreakció

Pe – permeabilitási együttható

PS – adott felszínre vonatkozó clearance sebessége

R_b – háttér impedancia

R_n – mért impedancia

SF – nátrium-fluoreszcein

SLC (solute carrier) – oldott anyagot szállító fehérjecsald

TEER – transzendoteliális elektromos ellenállás

TJ – sejtközötti szoros kapcsolat, tight junction, *zonula occludens*

TNF α – tumor nekrosis faktor- α

$\Delta\Delta C_t$ – real time PCR küszöbciklusából származtatott mértékegység nélküli arányszám

μg – mikrogramm

μl – mikroliter

Ω – ohm

1. BEVEZETÉS

1.1. Az akut hasnyálmirigy-gyulladás jellemzői

A hasnyálmirigy gyulladásos rendellenessége évente 100 000 emberből 10-40 embernél jelentkező megbetegedés, ami az Egyesült Államokban minden évben 220 000 új regisztrált beteget jelent. A gyulladás eredményeként olyan tünetek jelentkeznek, mint a has felső részén fellépő hirtelen fájdalom, a láz, a gyorsabb szívverés, továbbá olyan laborértékek megemelkedése, mint a fehérvérsejtek száma (leukocitózis), illetve a hasnyálmirigy által termelt enzimek (pl. tripszin, amiláz) szérumszintje (Baron & Morgan, 1999; Whitcomb, 2006).

A betegség lefolyása szerint két nagyobb csoportba sorolható. Az enyhe akut hasnyálmirigy-gyulladás a megbetegedések 80%-át jelenti, és megfelelő gyógykezelés hatására 3-5 nap alatt, komolyabb komplikációk nélkül gyógyul. A súlyos akut pancreatitis a betegek 20%-át érinti, és a nekrotizáló sejtek okozta szervi diszfunkció később a környező szervekre is kiterjedhet. A hasnyálmirigy-gyulladás súlyos formája 30%-os mortalitást mutat, ami az összes megbetegedés 6%-át jelenti. Az elhalálozások közvetlen hátterében több tényező is szerepet játszhat, melyeket a pancreas gyulladásos megbetegedése indukál. A két hét alatt bekövetkező gyors, korai halált legtöbbször a hirtelen felszabaduló, nagymennyiségű citokin, elsősorban TNF α és IL-1 β okozza, mely szisztémás gyulladásos választ indít be és több szerv elégtelen működését eredményezi. Míg a későbbi halál hátterében egyértelműen olyan mikrobiális fertőzések, illetve szisztémás szepszis áll, melyek a szisztémás gyulladásos válasz szövődményeiként foghatók fel (Ueda és mtsai, 1999; Carnovale és mtsai, 2005).

Az akut hasnyálmirigy-gyulladás kórfolyamata során különböző, eddig közelebbről nem meghatározott hatások következtében a pancreasban zimogén előalak formájában termelődő emésztőenzimek, különösképpen a tripszinogén, nem ürülnek megfelelőképpen, a szervben belül felhalmozódnak és aktiválódnak (Sah és mtsai, 2012). Az elsősorban az exokrin elválasztású mirigyeket érintő változás eredményeként a sejtek megduzzadnak, vakuolizálódnak, lokális ödéma alakul ki. A kiszabaduló enzimek szétemésztik a hasnyálmirigy sejtjeit, és sejthalált indukálnak. A nagymennyiségű szöveti nekrosis olyan komoly gyulladásos folyamatot eredményez, ami később a gasztrointesztinális rendszer többi szervére is áterjedhet, és hosszútávú szisztémás hatása is lehet (pl. encephalopathia).

Az akut hasnyálmirigy-gyulladásnak olyan rizikófaktorai ismeretesek, mint az epekő, a túlzott alkoholfogyasztás, metabolikus problémák, a bélelzáródás, bizonyos gyógyszerek szedése, illetve a szervezetet érő traumák. Ezek mind-mind hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a pancreas kivezetőcsövén keresztül nem ürülnek a szekretált enzimek beindítva a kórfolyamatot. Ugyanakkor a megbetegedések 20%-a idiopátiás, ismeretlen eredetű (Whitcomb, 2006).

1.2. A pancreaticus encephalopathia jellemzése

Már korán megfigyelték, hogy egyes akut hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő betegek komoly központi idegrendszeri panaszokkal élnek (Rothermich & Von Haam, 1941). Mégis mai napig nem sikerült kideríteni, hogy a súlyos akut pancreatitisben szenvedők 18,2%-ánál, minden gyógykezelés ellenére, miért alakul ki encephalopathia, amiben a betegek 67%-a meg is hal (Ding és mtsai, 2004).

A hasnyálmirigy-gyulladás korai szakaszában fellépő agyi elváltozást mind a mai napig elsősorban olyan neuropszichiátriai tünetek alapján diagnosztizálják, mint dezorientáció, nyugtalanság, hallucinációk, bizonytalanság vagy lassú reakcióidő, apátia, ill. depresszió. A patológiai vizsgálatok során diffúz agyi demielinizáció, a neuronok toxikus ödémában történő elhalása, illetve agyi vérzés figyelhető meg. Míg az MRI-vizsgálatok rámutattak a fehérállomány léziójára (Ohkubo és mtsai, 2004).

Intenzív vizsgálatok folynak arra vonatkozóan, hogy a hasnyálmirigy-gyulladás miként befolyásolja a vér-agy gát permeabilitását, mint az encephalopathia kialakulásának egyik lehetséges kiváltóját.

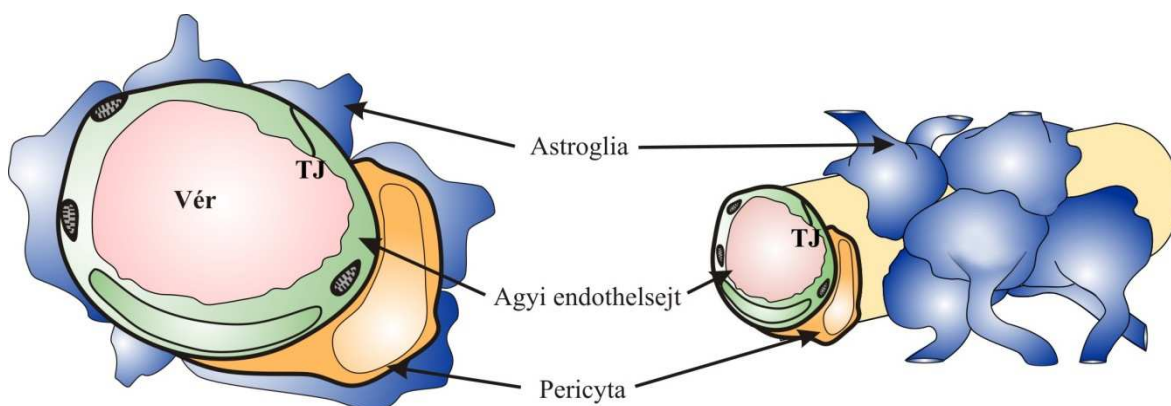
A hasnyálmirigy-gyulladás korai fázisában robbanásszerűen megjelennek olyan gyulladásos citokinek, így a $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-8 és IL- 1β , melyek a vérárammal együtt az agyba jutva fokozhatják a vér-agy gát áteresztőképességét. *In vitro* kísérletek már bizonyították, hogy a makrofágok és monociták aggregálódásáért, valamint a limfociták aktiválásért felelős monocita kemoattraktáns fehérje-1 (MCP-1) expressziója is megemelkedik a vér-agy gátat alkotó endotélsejtekben ill. asztrocitákban gyulladásos citokinek, $\text{TNF}\alpha$, IL- 1β , $\text{IFN}\gamma$ hatására (Ding és mtsai, 2012).

Ugyanakkor a nekrotizáló hasnyálmirigyből a véráramba jutó enzimek átjutnak a vér-agy gáton és komoly problémákat okoznak a központi idegrendszerben. Az emelkedett mennyiségű foszfolipáz A_2 az agyban található enkefalint és lecitint citotoxikus formává alakítja, de károsítja a vér-agy gát ill. a mitokondriumok membránjainak integritását is. A

foszfolipáz A_2 által aktivált hemolitikus lecitin kiemelt szerepet játszik az idegsejtek demielinizációjában, ami egyértelműen magyarázza a betegek viselkedésében megfigyelhető tüneteket. Mindezekhez hozzájárul még a pancreas által kiválasztott lipáz, tripszin, elasztin és amiláz enzimek aktivitásainak emelkedése is, melyek elősegítik az ödéma kialakulását (Zhang & Tian, 2007).

1.3. A vér-agy gát szerkezete és működése

A vér-agy gát a központi idegrendszert a szisztémás keringéstől elválasztó dinamikus határfelület. A vér-agy gát morfológiai alapját képező agyi mikroereket felépítő endotélsejtek közös bazális membránon helyezkednek el a pericitákkal (1. ábra; Abbott és mtsai, 2010), melyek összehúzódásuk és elernyedésük révén képesek szabályozni a mikroerekben történő véráramlást, továbbá regulálják a véredények növekedését és az erek stabilitását. Az endotélsejteket és pericitákat beborítják az asztrociták disztális nyúlványai, a végtalpak, melyek a transzportfolyamatokat és a sejtek közötti kommunikációt segítik. Emellett részt vesznek a vér-agy gát működésében a mikroglia és az idegsejtek is.

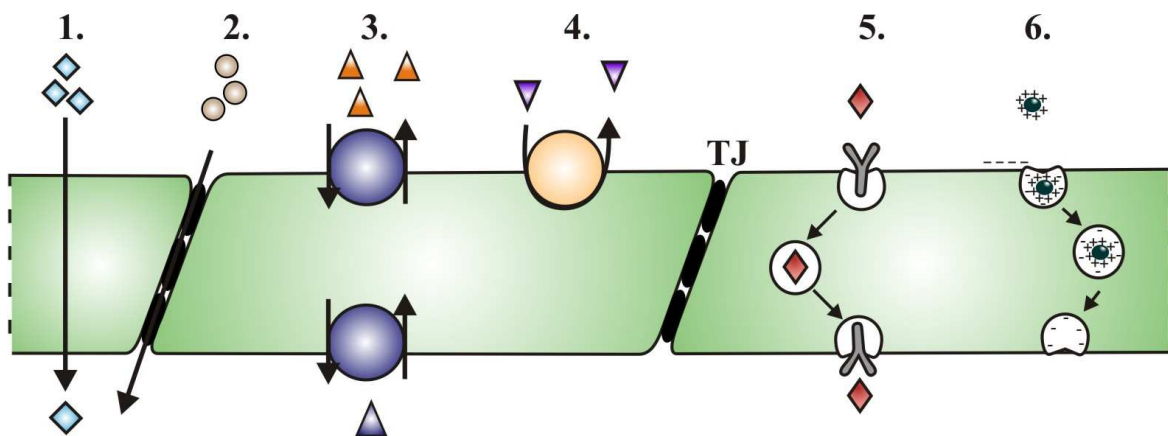


1. ábra. A vér-agy gát szerkezete sematikus ábrán (Deli, 2011)

A vér-agy gát elsődleges funkciója az agyi folyamatokhoz szükséges homeosztázis fenntartása, a megfelelő tápanyagok bejuttatása, ugyanakkor a káros anyagok kizárása (Deli, 2011). Mindezeket egy igen jól szabályozott és harmonikusan felépített transzportrendszer látja el. A sejteket összekötő szoros kapcsolatoknak (tight junctions, vagy *zonula occludentes*) köszönhetően a vér-agy gátat alkotó agyi mikroerek endotélsejtjeinek agy felőli (abluminális) és vér felőli (luminális) sejtmembránján különböző receptorok, ioncsatornák, transzporterek fejeződnek ki, azaz a sejtek

polarizáltak. Ennek fenntartása a sejtek részéről igen nagy munka, a transzkriptom 11%-át ezek a szállítófehérjék teszik ki (Enerson & Drewes, 2006). A különböző agyi metabolitok ürítését és a káros anyagok kívül tartását speciális efflux pumpák végzik, mint például a P-glikoprotein, vagy a multidrog rezisztencia fehérjék (MRP). A szükséges tápanyagok, a glükóz, aminosavak, purinok, kolin, vas, lipidek, vitaminok bejutása speciális transzportrendszereken keresztül történik, mint például a glükóz-transzporter-1 (GLUT-1). Mindezekhez kapcsolódik egy metabolikus vér-agy gát is, mely specifikus enzimek, mint a monoamino oxidázok, endopeptidázok, γ -glutamil-transzpeptidáz, aromás aminosav dekarboxiláz segítségével eliminálják a káros, vagy felesleges anyagokat az agyból.

A vér-agy gáton többféle módon juthatnak át a megfelelő anyagok. A lipofil molekulák, például az alkohol vagy a koffein *passzív lipid-mediálta diffúzió* révén kerülnek az agyba (2. ábra, Deli, 2011). Ugyanakkor élettani körülmények között a szoros kapcsolatok megakadályozzák a sejtek között *passzív paracelluláris transzport* révén hidrofil molekulák átjutását a vér-agy gáton.



2. ábra. A vér-agy gáton keresztüli transzportutak.

Élettani körülmények között aktív transzportutak: 1. passzív diffúzió a lipidmembránon át (zsíroldékony vegyületek); 3. karrierfehérje közvetítette transzport (tápanyagok: glükóz, aminosavak, tejsav, nyomelemek); 5. adszorpció-mediált transzcitózis (szérumfehérjék: albumin). Élettani körülmények között akadályozott transzportutak: 2. paracelluláris transzport (vízoldékony molekulák); 4. efflux transzporterek (xenobiotikumok, gyógyszerek); 6. receptor-mediált transzcitózis (peptidek, fehérjék, lipoproteinek: inzulin, transferrin, leptin).

A tápanyagok, mint a monokarbonsavak kétirányú, *karrierfehérje közvetítette transzport* révén jutnak be az idegrendszerbe. A vér-agy gát SLC transzporterei közé tartoznak az aminosavak szállítófehérjéi, mint például a kationos aminosavakat szállító Cat-1 transzporter, vagy a nagy, semleges töltésű aminosavakat bejuttató Lat-1 transzporter.

Az ABC transzporter családba tartozó P-glikoprotein és MRP-fehérjék az *aktív efflux transzportot* végzik a vér irányába, ezzel tartják távol nem csak a toxikus metabolitokat, de a gyógyszer-hatóanyagokat is. Bizonyos peptidek és fehérjék, így az inzulin, a transferrin vagy a leptin egy- vagy kétirányú, *receptor-mediált transzcitózis* révén jutnak be a központi idegrendszerbe. Az *adszorptív transzcitózis* által pedig nem specifikus módon a szérumfehérjék, mint az albumin jutnak át a perifériás endotélsejteken, de fiziológias esetben a paracelluláris úthoz hasonlóan ez is gátolt transzportút a vér-agy gáton. Ugyanakkor patológias esetekben, mint amilyen a hasnyálmirigy-gyulladás is, ezek a transzportfolyamatok aktiválódhatnak (2. ábra; Deli, 2011).

1.4. A Cat-1 kationos aminosav transzporter

Az agy metabolikus folyamataihoz szükséges aminosavak specifikus karrierfehérjék révén jutnak a központi idegrendszerbe. Ezeket a karriereket két nagyobb csoportra oszthatjuk attól függően, hogy Na^+ -ionnal együtt, kotranszportban történik-e az aminosavak szállítása, vagy sem (1. táblázat; Kakuda & MacLeod, 1994; Mann és mtsai, 2003).

Transzportrendszer	Szállítófehérje	Szubsztrát
Na^+-függő		
$B^{0,+}$ -rendszer	ATB	Ala, Lys, Arg
A-rendszer	SAAT1	Ala, Gly
ASC-rendszer	ASCT 1	Ala, Ser, Cys
N-rendszer	SN 1	Gln, His
y^+L -rendszer	y^+LAT1	Leu, Met
Na^+-független		
$b^{0,+}$ -rendszer	$b^{0,+}$ -AT	Lys, Leu, Trp, Met és cisztin
asc rendszer	Asc-1	Ala, Ser, Cys, Gly, Thr
x_c^- -rendszer	xCT	Glu, cisztin
L-rendszer	LAT1	Leu, Ile, Val, Phe
y^+L -rendszer	y^+LAT1	Lys, Arg
y^+ -rendszer	CAT1	Arg, Lys, Orn

1. táblázat. Az aminosavtranszportért felelős fehérjék családjaik

Na^+ -függő karrierfehérje a pozitív és semleges töltésű aminosavakat (Ala, Lys, Arg) szállító $B^{0,+}$ -rendszer. Semleges töltésű vagy egyenes szénláncú, N-metilált aminosavak (Ala, Gly) szállításáért felelős az A-rendszer. Az ASC-rendszer elsősorban

semleges töltésű aminosavakat (Ala, Ser, Cys) transzportál, míg az *N-rendszer* glutamint és hisztidint szállít az agyba. Az y^+L -rendszer Na^+ -függő módon transzportálja a semleges töltésű leucin és metionin aminosavakat, míg a kationos tulajdonságú lizin és arginin aminosavakat Na^+ -függetlenül.

A Na^+ -független karrierfehérjék közé tartozik a semleges és pozitív töltésű aminosavakat (Lys, Leu, Trp, Met és cisztin) szállító $b^{0,+}$ -rendszer. A kisméretű semleges töltésű aminosavak (Ala, Ser, Cys, Gly, Thr) transzportjért az *asc rendszer* felelős, míg az x_c^- -rendszer egy glutamát-cisztin antiportért. A Na^+ -független *L-rendszer* elágazó láncú és aromás, semleges töltésű aminosavak (Leu, Ile, Val, Phe) transzportjért felelős.

Az egyik legjobban ismert csoport a szintén Na^+ -független y^+ -rendszer, mely a többi rendszerrel ellentétben kizárólag kationos tulajdonságú, azaz pozitív töltésű aminosavak (Arg, Lys, Orn) transzportjért felelős. A membránba ágyazott karrierfehérje 14 transzmembrán-doménnel rendelkezik, és mind a C-, mind az N-terminális vége sejten belül helyezkedik el. A fehérje pH-ra nem, de membránpotenciál-változásra igen érzékeny (Mann és mtsai, 2003). Ennek a csoportnak egyik jeles képviselője a kationos aminosavtranszporter-1 (Cat-1) fehérje is, mely közelebbi vizsgálódásaink tárgyát képezi. A karrierfehérje működése, kinetikai viselkedése jól definiált, mégis génkifejeződési sajátosságai, szabályozása kevésbé ismertek. A Cat-1 fehérje a legtöbb sejtféleség által expresszált molekula, kivéve a felnőtt szervezet hepatocitáit (Closs és mtsai, 2004). A karrier mRNS-ének stabilitása például rosszul hajtogatódott fehérje okozta stressz esetén, valamint aminosav-éhezéskor megemelkedik (Fernandez és mtsai, 2003).

A lizin, arginin és ornitin aminosavak transzportját több transzporter család is végzi (y^+ , y^+L , $B^{0,+}$, $b^{0,+}$), mégis a már igen jól ismert y^+ -rendszer az, amely kifejezetten és egyedül azokat az aminosavakat szállítja, melyekkel eredményesen lehet akut hasnyálmirigy-gyulladást indukálni kísérleti állatokban.

1.5. Az akut hasnyálmirigy-gyulladás modellezése

Az akut nekrotizáló hasnyálmirigy-gyulladásról egyre több adat áll rendelkezésünkre, ugyanakkor mind a mai napig ismeretlen a megbetegedés hátterében álló pontos folyamat, különös tekintettel a korai eseményekre. Az orvosi biológiai kutatások során elsősorban patkány állatmodelleken végeztek és végeznek ma is kísérleteket.

Először a betegség patomechanizmusához hasonlóan különböző műtéti eljárások révén próbálták mimikálni az epeköves megbetegedést, vagy megakadályozni az enzimek

ürülését a hasnyálmirigyből. Így az egyik modellben egyszerűen elköötték a hasnyálmirigy vékonybélbe vezető kivezetőcsövét, amely enzimek felhalmozódást okozott a pancreasban és gyulladást eredményezett (Nevalainen & Seppä, 1975). Hasonló tüneteket okozott a hasnyálmirigy műtéti úton elzárt kivezetőcsövébe fecskendezett taurokolsav is, mellyel az epekő okozta elzáródást utánozták (Chetty és mtsai, 1980; Aho és mtsai, 1980). A kutatócsoport korábbi kísérletekben ezt a modellt tanulmányozta (Farkas és mtsai, 1998). A műtét után néhány órán belül kialakult a pancreas ödémás elváltozása, a vérben megemelkedett a hasnyálmirigy által szekretált amiláz és a gyulladáshoz vezető folyamatokra utaló TNF α , ill. IL-6 szintje. Elsőként írták le, hogy ezekkel a változásokkal egy időben a vér-agy gát permeabilitása is megnőtt (Farkas és mtsai, 1998). Mindkét eljárásban a kísérleti állatok mortalitása is megnőtt a kontroll csoporthoz képest. Az invazív pancreatitis modellek hátránya, hogy komoly műtéti beavatkozást igényelnek, a műtéti eljárás miatt a reprodukálhatóság kisebb, és a pancreas okozott ödémás elváltozások sem annyira homogének.

Az 1980-as években Mizunuma és munkatársai az arginin tumornövekedést gátló hatását vizsgálták patkányok több szervében is. Ekkor fedezték fel, hogy az intraperitoneálisan beadott nagymennyiségű L-arginin akut hasnyálmirigy-gyulladást vált ki (Mizunuma és mtsai, 1984). Az arginin több metabolikus útvonalban is részt vesz, de elsősorban az urea-ciklusban és a nitrogén-monoxid szintézisében fontos a szerepe, ezért további metabolitokkal is elvégezték az indukciós kísérleteket. Amíg L-argininből 3,5 g/kg mennyiséget fecskendeztek az állatok hashártyája alá a betegség kiváltásához, addig az urea-ciklus következő tagja, az L-ornitin már 3 g/kg mennyiségben is képes volt hasnyálmirigy-gyulladást indukálni. Az így kialakult gyulladás következtében csökkent a testtömeg, míg a testtömeg-hasnyálmirigy-tömeg arány a kialakuló ödéma következtében megemelkedett. A pancreasban az amiláz, a tripszin és a gyulladáshoz vezető sejtek szöveti migrációjának eredményeként termelődő mieloperoxidáz szintje nőtt meg, a vérben pedig az amiláz, a lipáz, az aszparaginsav-aminotranszferáz (ASAT) szintje lett magasabb (Rakonczay és mtsai, 2008). A harmadik kationos tulajdonságú aminosavból, az L-lizinből 2 g/kg injektálása révén sikerült indukálni a hasnyálmirigy akut gyulladáshoz vezető elváltozását (Biczó és mtsai, 2011).

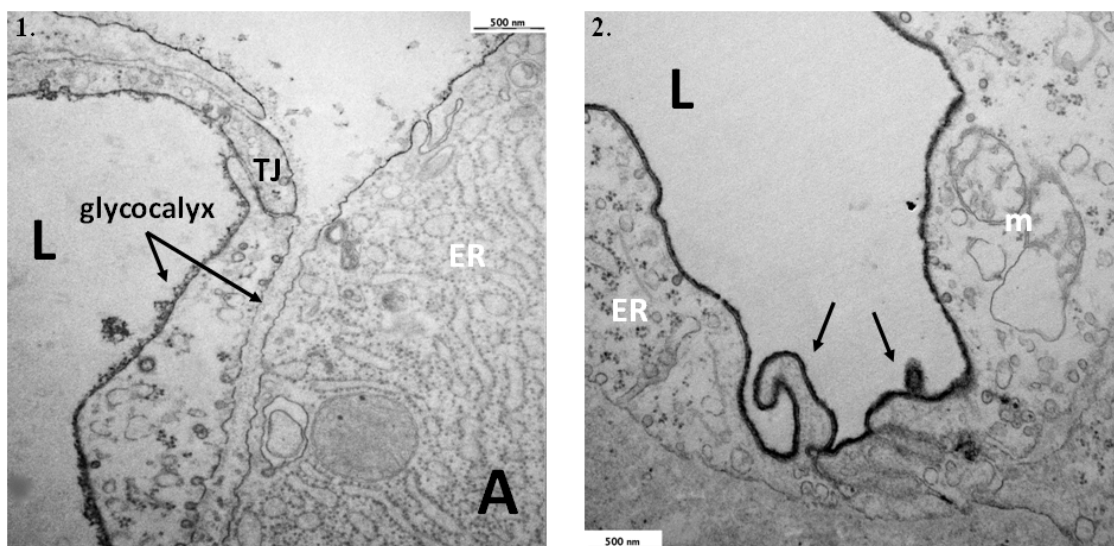
Érdekes módon az urea-ciklus további intermediereivel, L-citrullinnal (Rakonczay és mtsai, 2008), valamint a szintén kationos tulajdonságú, de aromás funkciók csoportjához tartozó hisztidinnel (Biczó és mtsai, 2011) nem sikerült a kívánt hatást kiváltani. Összefoglalva, a legsúlyosabb nekrozis az L-ornitin indukálta akut hasnyálmirigy-

gyulladásban volt megfigyelhető, mellyel egy noninvazív, könnyen reprodukálható, homogén pathológiai képet mutató pancreatitis modell áll a kutatók rendelkezésére.

1.6. Az L-ornitin hatás *in vivo* vizsgálata

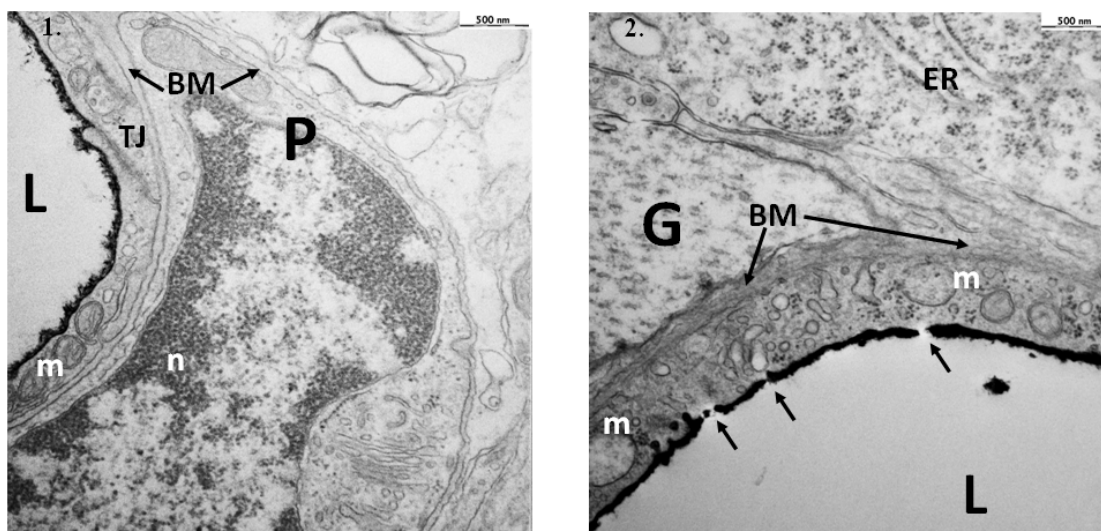
Együttműködésben az SZTE Pancreas munkacsoportjával és az MTA Kísérletes Orvostudományi Kutató Intézetével munkacsoportunk az L-ornitin indukált akut nekrotizáló hasnyálmirigy-gyulladás vér-agy gátja és más szervekre kifejtett hatását patkányokon végzett *in vivo* permeabilitási és elektronmikroszkópos morfológiai kísérletekkel vizsgálta.

A párhuzamosan két jelzőanyaggal, fluoreszceinnel és Evans-kék festékekkel végzett *in vivo* permeabilitási kísérletek eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a pancreatitises patkányok májában, tüdejében nem volt szignifikánsan megnövekedett festékátjutás a kontroll állatokhoz képest. Ezzel szemben a pancreasban és az agykéregben jelentősen megnőtt mind a paracelluláris fluoreszcein-, mind a transzcelluláris albumin-transzport. Az eredmények arra utalnak, hogy az agykéregben a mikroereket alkotó agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok kevésbé nyíltak meg (paracelluláris transzport), míg a sejteken keresztüli (transzcelluláris) anyagszállítás fokozódott.



3. ábra. Patkány hasnyálmirigy transzmissziós elektronmikroszkópos képe 24 órával fiziológias só (1., kontroll), illetve L-ornitin (2.) intraperitoneális beadását követően. Az erek luminális és abluminális plazmamembránját borító negatív töltésű glikokalixot Alcian-kék festékekkel tettük láthatóvá; A – acinussejt, ER – endoplazmatikus retikulum, L – ér lumen, m – mitokondrium, TJ – szoros kapcsolat (tight junction), fekete nyilak a 2. ábrán – endotélsejt deformítások a luminális sejtmembránon. (Kittel Ágnes felvételei: MTA-KOKI, Budapest)

Az L-ornitin beadását követő 24 óra után a hasnyálmirigy mintákból készült elektronmikroszkópos felvételek jól mutatják, hogy az acinus sejtek közötti térben található vérereket felépítő endotélsejteket borító glikokalix réteg festődése nem egyenletes, a luminális membránon deformitások, nyúlványok jelennek meg (3/2. ábra, nyilak). Az endotélsejtek erősen sérülnek, mitokondrium duzzadás és pusztulás, sejtödéma, bazális membrán emésztődés figyelhető meg (3. ábra).



4. ábra. Patkány agyi mikroér transzmissziós elektronmikroszkópos képe 24 órával fiziológias só (1., kontroll), illetve L-ornitin (2.) intraperitoneális beadását követően. BM – bazális membrán, ER – endoplazmatikus retikulum, G – mikroglia, L – lumen, m – mitokondrium, n – sejtmag, P – pericita, TJ – szoros kapcsolat (tight junction), fekete nyilak a 2. ábrán – endotélsejtek luminális sejtmembránján a glikokalix festődés megszakadását és vezikulák lefűződését mutatják. (Kittel Ágnes felvételei: MTA-KOKI, Budapest)

Az L-ornitin kezelés után 24 órával a vér-agy gát permeabilitásáért felelős endotélsejtek elektronmikroszkópos képén szembetűnő, hogy a sejtek luminális felszínét borító glikokalix festődése egyenetlen, membrándefektusok alakultak ki (4. ábra). A pancreas ereinek endotélsejtjeihez hasonlóan mitokondrium és bazális membrán károsodás jött létre. A bazális membrán kiszélesedett, egyenetlenné vált, a glia-végtalpak ödémások lettek. A lument körülvevő endotélsejtekben megnőtt a vezikulumok száma (4. ábra).

Összefoglalva munkacsoportunk állatkísérleteinek adatait, először mutattuk ki, hogy L-ornitin hatására létrejövő akut hasnyálmirigy-gyulladásban mind a hasnyálmirigy, mind a vér-agy gát mikroereinek endotélsejtjeiben hasonló sejtszerkezeti változások, károsodások következnek be patkányokban, melyek a kórfolyamatok lefolyásában szerepet játszhatnak (Kittel és mtsai, 2013 – kézirat összeállítás alatt).

1.7. Célkitűzéseink

Az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyos gyulladásos megbetegedés, mely különböző szisztémás hatásai mellett encephalopathia kialakulásában is szerepet játszik. Az utóbbi években kidolgozott noninvazív, L-ornitin kiváltotta akut hasnyálmirigy-gyulladás modell segít a betegség kialakulásának pontosabb megértésében különös tekintettel a korai állapotokra. A munkacsoportunk által végzett állatkísérletek is kimutatták, hogy a betegséggel egy időben a vér-agy gát permeabilitása is megnő. Ennek hátterében egyrészt a gyulladás következtében termelt citokinek és a pancreasból kiszabaduló enzimek, másrészt a betegség indukálásához használt kationos aminosav, az L-ornitin állhat. Mivel a sejtekbe az ornitint az Slc karrierfehérje családba tartozó Cat-1 (Slc7a1) juttatja be, felmerült, hogy ez a fehérje részt vehet a hatás kialakulásában. Hipotézisünk szerint a heterogén szöveti Cat-1 génkifejeződés állhat a heterogén szöveti érzékenység és festék-kiáramlás hátterében.

Ezért kutatásaink középpontjában az a kérdés állt, hogy az L-ornitin indukált akut pancreatitis modellben az indukálószer milyen közvetlen hatással lehet a vér-agy gát endotélsejtjeinek permeabilitására, morfológiájára. Továbbá milyen expressziós szintváltozás figyelhető meg a kationos aminosavak transzportjáért elsődlegesen felelős Cat-1 fehérje esetében a különböző permeabilitást mutató szövetekben.

Munkáink során a következő kérdésekre keressük a válaszokat:

1. Milyen közvetlen hatással van agyi endotélsejt tenyészetek életképességére és permeabilitására az L-ornitin?
2. Milyen módszerrel lehet eredményesen RNS-t izolálni a hasnyálmirigyből?
3. Milyen alap génkifejeződési mintázat figyelhető meg patkány agykéreg, agyi mikroér, pancreas, máj és tüdő szövetmintákon, valamint tenyésztett patkány és humán agyi endotélsejteken a Cat-1 fehérjére vonatkozóan?

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Vegyszerek

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

2.2. Sejtenyésztés, a vér-agy gát *in vitro* modellezése

Kísérleteinkhez primer patkány agyi endotélsejtekből, pericitákból és gliasejtekből álló *in vitro* ko-kultúra modellt használtunk (Nakagawa és mtsai, 2009).

2.2.1. Agyi endotélsejt tenyésztés

Az agyi endotélsejt tenyésztés több mint húsz éves múltra tekint vissza a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriumában, ahol a tenyésztési módszert mind a mai napig tökéletesítik (Deli és mtsai, 1996 és 1997). Primer patkány agyi endotélsejtek izolálása a korábban leírt protokoll szerint történt (Veszeka és mtsai, 2007). Két-három hetes Wistar patkányok szárazjéggel történő altatását követően az agyakat sterilen eltávolítottuk és jéghideg foszfát pufferbe (PBS) helyeztük. Steril szűrőpapíron görgetve eltávolítottuk az agyhártyákat, a kisagyat, a fehérállomány nagy részét, valamint a plexus chorioideust.

A megmaradt szürkeállományt Dulbecco's modified Eagle's medium (DME médium) oldatba helyeztük, szikével apróra daraboltuk, majd 37 °C-on 1,5 órán át síkrázó készüléken (OS10 orbital shaker, BioSan, Lettország) rázatva kollagenáz és DNáz enzimmel kezeltük. Ezt követően 20%-os szérum albumin (BSA) grádiens segítségével elválasztottuk a nagyobb sűrűségű mikroereket az ideg- és gliasejteket tartalmazó, mielingazdag rétegtől. A második emésztés során 37 °C-on rázatva 1 óra hosszan kollagenáz-diszpáz és DNáz enzimekkel kezeltük a mintákat, így a mikroereket határoló bazális membrán felbomlik, a periciták kiszabadulnak a mikroérfragmensekből. Végül percoll grádiens segítségével a periciták nagy részétől és a vörösvérsejtektől elválasztottuk a mikroérfrakciót, és a sejteket DME médiumos mosással tisztítottuk.

Az endotélsejteket tenyésztő médiumban vettük fel, amely 85% DME médium/F12 oldatot, 15 % borjúplazmából készített savót (First Link Ltd., Nagy-Britannia), 1 ng/ml bázikus fibroblaszt növekedési faktort (Roche), 100 µg/ml heparint és 100x-os hígításban inzulin-transzferrin-szelenit médium kiegészítőt tartalmaz. Mivel a tisztított

endotélfrakcióban kis számban más típusú sejtek is találhatók (pl. pericita, simaizomsejt, fibroblaszt), ezért az endotélsejt tenyésztés első három napjában 4 µg/ml puromicint adtunk a tápfolyadékhoz. A puromicint a sejtől hatékonyan eltávolító P-glikoprotein efflux transzporter csak az endotélsejteken fejeződik ki magas szinten, így tenyészetünkben hatékony endotél szelekciós antibiotikum (Perriere és mtsai, 2005). A sejteket fibronektinnel és IV. típusú kollagénnel bevont Petri-csészékbe szélesztettük és CO₂ inkubátorba tettük. A harmadik tenyésztési napot követően permeábilis poliészter filterekre (0,4 µm pórusméret, 1 cm² felszín; Transwell clear, Costar) vagy 96 lyukú tenyésztő lemezekbe passzáltuk őket (Orange Scientific).

2.2.2. *Pericita tenyésztés*

A periciták izolálása az endotélsejtekkel együtt a 2.2.1. pontban leírtak alapján történt. Az utolsó lépésben a sejtuszuspenzió egy részét 6 cm átmérőjű Petri csészébe szélesztettük 90 % alacsony glükóz tartalmú DME médiumot és 10% borjúsavót tartalmazó tápfolyadékba. A pericitákat háromszori passzálást követően használhattuk fel, amikor a tenyészet eléri a kívánt tisztaságot (Nakagawa és mtsai, 2009).

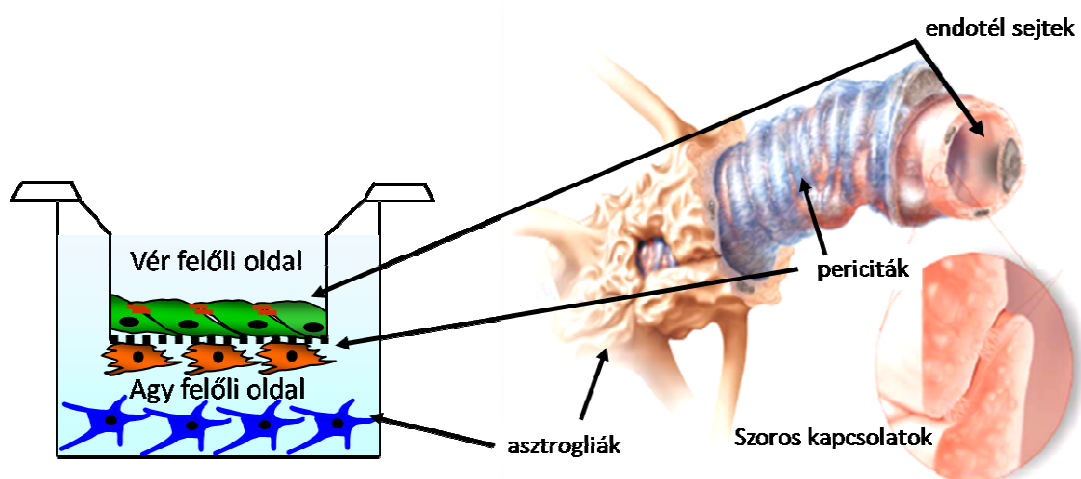
2.2.3. *Gliasejt tenyésztés*

A vegyes gliatenyésztéshez újszülött (1-2 napos) Wistar patkányokat használtunk. Az endotél-tenyésztésnél ismertetett eljáráshoz hasonlóan az agyakat jéghideg PBS-be helyeztük, majd csipeszek segítségével eltávolítottuk az agyhártyát. Az agykéreg szürkeállományát 90 % DME médiumot és 10% borjúsavót tartalmazó tápfolyadékba gyűjtöttük, majd apró darabokra vágtuk. A szövetdarabokat steril, 40 µm pórusméretű nyílászűrőn (Millipore) préseltük át, elősegítve a szöveti disszociációt. Az így kapott sejteket poli-L-lizinnel bevont 12-lyukú tenyésztőedényekbe (Corning, Costar) szétosztottuk. A gliatenyészetek átlagosan 2 hét múlva konfluenssé váltak, és a 3. hét után már felhasználhatók voltak a ko-kultúrához (Nakagawa és mtsai, 2009).

2.2.4. *Háromsejtes vér-agy gát modell*

Az *in vitro* vér-agy gát modellezés során a permeábilis Transwell filtereket használtunk. A filter felső, luminális oldalán endotélsejteket, alsó, abluminális részén pedig

pericitákat tenyésztettünk, az inszertet a 12-lyukú lemezekben található gliasejtekre helyeztük. A három sejt együttes tenyésztése során az agyi endotélsejtek vér-agy gát tulajdonságai kifejezettebbekké válnak, a sejtek közötti zárókapcsolatok szorosabbak lesznek, a paracelluláris barrier erősödik (Deli és mtsai, 2005). Az így kapott modellen az endotél egysejtrétegek elektromos ellenállásának és permeabilitásának mérése lehetővé válik (5. ábra).



5. ábra. *In vitro* vér-agy gát modellezés: agyi endotélsejtek, periciták és asztroglia sejtek kultúrában.

2.2.5. Humán agyi endotélsejt tenyészet

Génexpressziós vizsgálatainkhoz humán agyi endotélsejt vonalat (D3; Weksler és mtsai, 2005) használtunk a primer patkány endotélsejtekkel történő összehasonlításhoz.

2.3. Tenyészetek kezelése

A kísérleteink során primer sejtenyészeteinket biológiailag aktív L-, illetve negatív kontrollnak használt, biológiailag kevésbé aktív D-ornitinnel (Fluka, Sigma) 1-40 mM koncentrációtartományban kezeltük. A kontroll csoport általánosan használt tenyésztőműködiumot kapott, ornitinnel nem volt kezelve, azonban minden más körülményben azonosan tenyésztett és vizsgált sejteket tartalmazta.

2.4. Toxicitási vizsgálat valós idejű sejtanalízissel

Az xCELLigence rendszer (Roche Applied Science, Magyarország) a különböző sejtenyészetek biológiai állapotának (növekedés, életképesség, adherencia) jelzőanyag

nélküli, valósidejű nyomon követésére alkalmas (6.ábra). A műszer nem invazív, a sejtek vizsgálata fiziológias körülmények között zajlik. A sejteket egy speciális 96-lyukú steril tenyésztőlemezbe (E-plate, Roche) szélesztettük, amelynek alján arany mikroelektromos szenzorok, mikroelektrodák vannak, melyek impedancia mérésére alkalmasak. Először a háttér meghatározása történik, ehhez üres, sejtmentes tápfolyadékot használunk. A sejtek szélesztése után a mérés során a sejtek növekedésével és letapadásával arányosan emelkedik a mért impedancia is, amit a sejtindex értékével fejezünk ki. Az xCELLigence rendszer ezt az értéket az $(R_n - R_b)/15$ formula segítségével határozza meg, ahol R_n a sejtek és az elektród között mért impedancia, az R_b pedig a háttér impedancia.



6. ábra. Impedancia mérés xCELLigence rendszerrel és a méréshez szükséges speciális, elektródákat tartalmazó 96-lyukú steril lemez.

Az impedancia méréséhez a speciális 96 lyukú lemezeket fibronektinnel és IV. típusú kollagénnel vontuk be, majd 100 μ l/lyuk sejtmentes tápfolyadékkal megmértük a háttér impedanciát. Ezt követően 100 μ l sejtszuszpenziót adtunk lyukanként (8×10^3 sejt/lyuk) és a lemezt 37 °C-os inkubátorba helyeztük. Az izolált agyi endotélsejteket a kirakást követő harmadik napon 1-40 mM L- és D-ornitinnel kezeltük. A műszer a sejtindexet a sejtek kezeléséig 5 percenként, a kezeléseket követően pedig 48 órán keresztül 2 percenként regisztrálta.

2.5. Transzendoteliális elektromos ellenállás mérése

Az agyi endotélsejteket szoros kapcsolatok (TJ) kötik össze, amelyek gátolják anyagok paracelluláris, sejtek közötti transzportját, így a sejtek között nincs szabad anyagátjutás. Az agyi endotélsejtek szoros kapcsolatainak nátrium ionnal (a tenyésztő és pufferoldatokban a legnagyobb, 150 mM koncentrációban jelen lévő kation) szembeni

áteresztőképességét tükrözi az *in vitro* mért transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER) értéke. Az elektromos ellenállást primer patkány agyi endotélsejt, pericita és primer patkány glia *in vitro* ko-kultúra modellen EVOM rezisztencia mérővel és STX elektróddal (WPI Inc., USA) vizsgáltuk.

A TEER értékeket ($\Omega \times \text{cm}^2$) átlagoltuk, és az üres filteren mért értékek átlagát ($90\text{--}100 \Omega \times \text{cm}^2$) levontuk belőle. A konfluens egysejtrétegek ellenállása $260\text{--}300 \Omega \times \text{cm}^2$ között mozgott.

2.6. Permeabilitási vizsgálat

Az agyi endotél egysejtréteg permeabilitásának meghatározásához nátrium fluoreszcein (SF, Ms. 376 Da) és szérum albuminhoz kötött Evans-kék festék (Ms. 67 kDa) markereket használtunk (Kis és mtsai, 2001). A fluoreszcein paracelluláris marker, tehát a sejtek közötti szoros kapcsolatokon keresztüli permeabilitást mutatja, míg az albumin a transzendoteliális, vagy transzcelluláris transzportot jelöli (Deli és mtsai, 2005). A vér-agy gát áteresztőképessége fiziológiás körülmények között mindkét jelzőanyagra igen alacsony.

A 24 órás 20 mM L- és D-ornitinnel történt kezeléseket követően a filtereket 12-lyukú steril tenyésztőlemezekbe helyeztük, amely lyukanként 1,5 ml steril 37 °C-os Ringer-Hepes oldatot tartalmazott. A filter felső oldalán lévő endotélsejtekről a kezelő médiumot lecseréltük a mindkét markert tartalmazó Ringer-Hepes oldatra (10 $\mu\text{g/ml}$ SF, 167,5 $\mu\text{g/ml}$ Evans kék, 1 mg/ml BSA). A filtereket a 20., 40. és 60. percben átraktuk a lemez következő lyukába. A permeabilitás mérése alatt a lemezeket 37 °C-on CO_2 inkubátorban tartottuk, síkrázó készüléken (100 fordulat/perc). Ezzel biztosítottuk az oldatok folyamatos, nagyon enyhe mozgását, ami a permeabilitás méréséhez szükséges.

A markerek koncentrációját a lemez lyukaiban maradt oldatokból (20., 40., 60. perces minták) határoztuk meg mikroplate leolvasóval (BMG Fluostar Optima, BMG Labtech, Németország). Az Evans-kék elnyelését 680 nm-en vettük fel 584 nm-en történt gerjesztés után, míg a fluoreszcein emisszióját 520 nm-en határoztuk meg 485 nm hullámhosszon történő excitációt követően.

Az endotélsejtréteg permeabilitási koefficiense, P_e , egy felszíntől és koncentrációktól független adat (Deli és mtsai, 2005), amelyet Fick törvénye alapján a vese clearance analógiájára határozzunk meg. Ezt az értéket úgy kapjuk meg, hogy a mért koncentrációk és az ismert adatok (térfogatok, lumenális koncentrációk) birtokában, először clearance értékeket számolunk, amelyek azt a felső térfogatot adják meg mikroliter

mértékegységben, amelyből a marker az adott időegység alatt teljesen kiürül (7. ábra, 1. képlet). Ezután az összesített clearance adatokat az idő függvényében ábrázoljuk, és megállapítjuk az egyenesek meredekségét, amely egyenlő az adott felszínre vonatkozó clearance sebességével (mértékegysége $\mu\text{l}/\text{perc}$). Ezt az értéket "permeability surface area product", adott felszínre vonatkozó clearance sebessége (PSe) néven is hívják, ezért a 7. ábra 2. képletében PSe-nek jelöljük. Az endotélsejtekre jutó clearance sebességet úgy kapjuk meg, ha a teljes PS értékből kivonjuk az üres filterre vonatkozó PS értéket. Az így kapott PS értéket elosztottuk a filter felszínével, ami kísérleteinkben 1 cm^2 volt. Minél kisebb a Pe érték a permeabilitási markerekre, annál szorosabbak a TJ struktúrák, annál jobb az endotélsejt rétegek barrier funkciója (Deli és mtsai, 2005).

1

$$\text{clearance } (\mu\text{l}) = \frac{[C]_A \times V_A}{[C]_L}$$

2

$$\frac{1}{\text{PSe}} = \frac{1}{\text{PSt}} - \frac{1}{\text{PSf}}$$

3

$$\text{Pe (cm/s)} = \frac{\text{PSe}}{A}$$

7. ábra. Az endotélsejtréteg permeabilitási koefficiensének számolásához használt matematikai képletek (Deli és mtsai, 2005) $[C]_A$, abluminális koncentráció; V_A , abluminális térfogat; $[C]_L$, luminális koncentráció; PSe, adott endoteliális felszínre vonatkozó clearance sebessége; PSt, totál PS (filter + sejtréteg), PSf, üres filterre vonatkozó PS; Pe, permeabilitási koefficiens; A, felszín.

2.7. Agyi mikroér izolálás

A génexpressziós mérésekhez felnőtt Wistar patkányokból agyi mikroereket izoláltunk. Az állatok cervikális diszlokációját követően agyukat steril körülmények között eltávolítottuk. A kisagy, a fehérállomány és a bulbusok leválasztása után az agyhártyát szűrőpapíron való görgetéssel eltávolítottuk, majd a szürkeállományt apró darabokra vágtuk. Szukróz pufferben történő sorozatos szöveti homogenizálási és centrifugálási lépésekkel elválasztottuk a mikroereket, amely mintákat RNS-izolálásig -70°C -on tároltuk (Tontsch és Bauer, 1989).

2.8. TaqMan array vizsgálatok

Génexpressziós vizsgálatokhoz totál RNS-t izoláltunk patkány agyi mikroérből, primer patkány endotélsejt tenyészetből és humán D3 agyi endotélsejt tenyészetből

RNAqueous-4PCR Kit (Ambion, Applied Biosystems) segítségével. A sejtenyészetekről a tenyésztő médiumot eltávolítva gyors jéghideg PBS-es mosás után steril sejtkaparókkal összegyűjtöttük a sejteket és 13 000 g-n, 10 percig centrifugáltuk 4 °C-on. Az így kapott sejtpelletről a PBS-t eltávolítottuk és -70 °C-on tároltuk az RNS izolálásig. A tisztított RNS mintáink koncentrációját és tisztaságát 30 perc 37 °C-on történő DNase1 (RNase-free, Ambion) kezelést követően Nanodrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies) mértük meg. Az RNS-minták épségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

A teljes RNS-mintákból cDNS-szintézishez 20 µl-es reakciókat mértünk össze High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) segítségével. A reakció random hexamer primereket, MultiScribe reverz transzkriptázt és RNáz gátlószert tartalmazott. A cDNS szintézis két lépésben, 25 °C-on 10 percig, 37 °C-on 120 percig tartott, majd 85 °C-on 5 percig inaktiváltuk a reverz transzkriptázt.

A génexpressziót kvantitatív PCR műszerrel mértük meg TaqMan Low Density Array (Applied Biosystems) segítségével. A 384-lyukú mikrofluid lapok előre tartalmaztak patkány ill. humán génekre specifikus próbákat a TaqMan Gene Expression Assay-ból. A real-time PCR pedig ABI TaqMan Universal Master mix összemérésével futott ABI Prism 7900 rendszerben. Az adatok ABI SDS 2.0 szoftverrel (Applied Biosystems) lettek feldolgozva. A real-time PCR $\Delta\Delta C_t$ adatai a 18S riboszomális génre normalizáltuk, majd az így kapott relatív expressziós adatok közül a legkisebb expressziójú génre normalizáltuk a többi gén kifejeződésének mértékét.

2.9. Patkány szervekből történő RNS izolálás és cDNS-szintézis

További génexpressziós vizsgálatainkhoz három független kísérletben megközelítőleg 250 grammos egészséges, kontroll hím Wistar patkányokból agy, tüdő, máj és hasnyálmirigy szerveket különítettünk el RNS-izolálás céljából. Az állatok cervikális diszlokációját követően a hasüreget azonnal felnyitva a hasnyálmirigyből vágunk ki kb. 100 mg-os darabokat. Ezután a májból és tüdőből hasítottunk ki szövetmintákat. A koponya kibontását követően a kisagy és a fehérállomány eltávolítása után a szürkeállományból vágunk kisebb szövetdarabokat. A cervikális diszlokáció és az agy kiemelése közti időt stopperórával mértük és rögzítettük.

Az agykérgből, a tüdőből és a májból származó szövetdarabokat folyékony nitrogénben történő azonnal fagyasztást követően homogenizáltuk. Míg a proteázokban,

DNázokban, RNázokban gazdag hasnyálmirigy esetén több kísérleti elrendezést is kipróbáltunk az egyes állatok esetében: (1) egyes mintákat azonnal 75 °C-os TRI reagensben (Molecular Research Center, Inc.) homogenizáltuk, (2) más mintákat jéghideg TRI reagensben dolgoztuk fel, és (3) voltak minták, melyeket a többi szövethez hasonlóan azonnal folyékony nitrogénben fagyasztottuk. A fagyasztást követően az összes fehérjét, így az RNázokat is denaturáló TRI reagenst hozzámértük és motoros homogenizátorral (T8.01, IKA Labortechnik, Stauffen, Germany) a szöveteket feldolgoztuk. Az izolált agyi mikroereket TRI reagensben üveg homogenizátorral dolgoztuk fel.

Az egyes szövetekből TRI reagens hozzáadásával a gyártó által megadott protokoll szerint RNS-t tisztítottunk. Az RNS izopropanollal történő kicsapását követően beiktattunk egy lítium-kloriddal (LiCl) történő tisztító lépést is. A kicsapott RNS centrifugával való ülepítése után 200 µl steril vízben visszaoldottuk az RNS-eket és 60 µl 8M LiCl-ot hozzámérve 30 percet jégen inkubáltuk. A LiCl kizárólag az RNS-ekkel lép kölcsönhatásba, azok precipitációját végzi. A LiCl-dal történő kicsapás után szintén centrifugáltunk, és kétszer 80% etanollal mostuk a mintákat. Szobahőn történő szárítást követően az RNS-eket 40 µl steril vízben feloldottuk, és NanoDrop 1000 spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific, Inc.) használatával megmértük a minták koncentrációját és ellenőriztük tisztaságukat. Az RNS-minták épségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

A teljes RNS-mintákból cDNS-szintézishez 20 µl-es reakciókat mértünk össze Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentes Life Sciences) használatával. A reakciópuffer random hexamer és oligo (dT)₁₈ primereket, valamint hozzáadott RiboLock RNáz gátlószert (Fermentes Life Sciences) tartalmazott. A cDNS szintézis két lépésben, 25 °C-on 10 percig, 60 °C-on 60 percig tartott, majd a reverz transzkriptázt 85 °C-on 5 percig inaktiváltuk.

2.10. Real-time PCR

A különböző szövetekből származó minták kvantitatív PCR alapú analízise CFX96 Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratoires Inc.) segítségével történt. A detektáláshoz a Roche Applied Science próbakönyvtárából (UPL) rendeltünk specifikus, exon-exon határra tervezett próbákat, egyrészt a vizsgált Cat-1 transzporterre (próbaszám #20), valamint a referenciagénként szolgáló hipoxantin foszforiboziltranszferáz-1-re (Hprt1; próbaszám #95). A PCR-reakciók iQ supermix (Bio-Rad Laboratoires Inc.) és

Roche Universal ProbeLibrary próbáival és primereivel lettek összemérve 96 lyukú platen 20-20 μ l-re, amiből 1 μ l a templát. A reakciókkal párhuzamosan mindegyik minta mellé helyeztünk RNS-kontrollt, illetve génekként egy-egy templát nélküli kontrollt.

A detektáláshoz a következő PCR-programot futtattuk: 95 °C 3 perc, majd a 93 °C 30 másodperc, 60 °C 1 perc ciklust ismételtük 49-szer. Minden mintából minden génre három-három párhuzamost futtattunk.

Az adatok CFX Manager szoftverrel (Bio-Rad Laboratoires Inc.) lettek feldolgozva. A real-time PCR $\Delta\Delta C_t$ adatai a Hprt1 génre lettek normalizálva, majd az így kapott relatív expressziós adatok közül a legkisebb expressziójú máj mintára normalizáltuk a többi szövet Cat-1 expressziós szintjét.

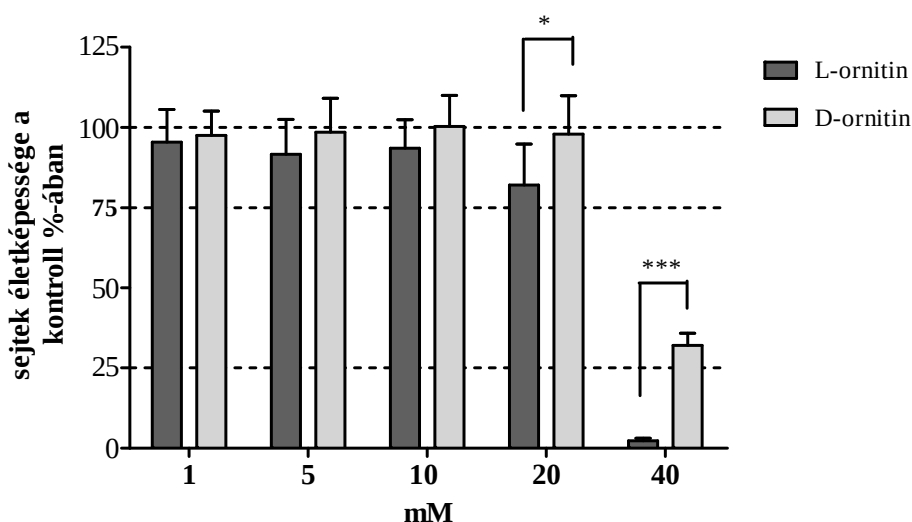
2.11. Statisztikai kiértékelés

Minden adatot átlag $\pm$ S.E.M. értéként adtunk meg. A különböző adatsorokon variancia analízist követően Dunnett és Bonferroni teszteket végeztünk Graphpad Prism program (GraphPad Software Inc., USA) segítségével. A $P < 0.05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A párhuzamos minták száma 3-8 volt kísérletenként. Minden kísérletet külön izolált primer tenyészetből legalább háromszor megismételtünk.

3. EREDMÉNYEK

3.1. L-ornitin hatása a sejtek életképességére

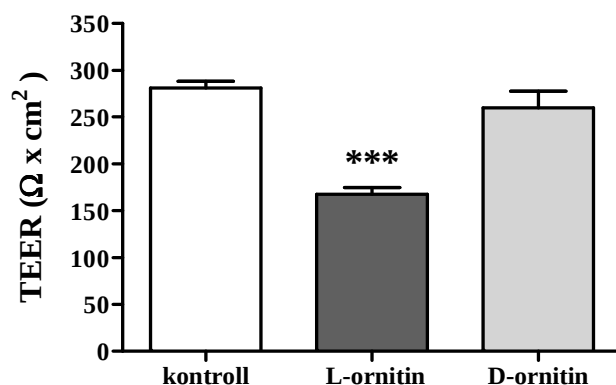
Primer agyi endotélsejteken xCELLigence rendszerrel rögzített sejttindexekből számolt életképesség alapján kijelenthetjük, hogy alacsonyabb koncentrációban az L- és D-ornitin nem volt toxikus a sejtekre a kontrollhoz képest. Azonban az L-ornitin a pancreatitisben releváns 20 mM koncentrációban szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét a kontrollként használt biológiailag kevésbé aktív D-ornitinhez képest. A legnagyobb kezelési koncentrációban azonban mindkét esetben jelentős sejtkárosító hatást figyeltünk meg, és a két enantiomer közötti különbség itt is szignifikáns (8. ábra).



8. ábra. L- és D-ornitin dóziszfüggő hatása tenyésztett agyi endotélsejtek életképességére. (átlag $\pm$ S.E.M.; n=6-8; * $P<0,05$; *** $P<0,001$)

3.2. L-ornitin hatása a transzendoteliális rezisztenciára

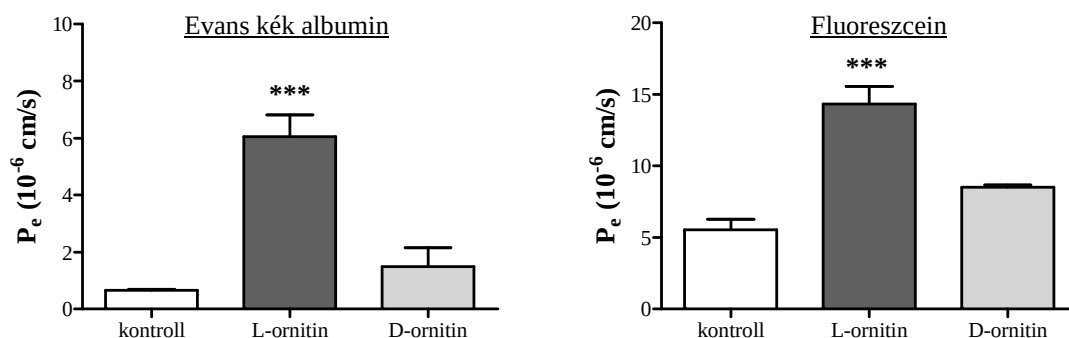
Az *in vitro* vér-agy gát háromsejtes modelljén 20 mM-os L-ornitin kezelés hatására 155-179 $\Omega \times \text{cm}^2$ transzendoteliális elektromos ellenállást mértünk. Ez az érték jóval alacsonyabb, mint a kontroll 273-295 $\Omega \times \text{cm}^2$, illetve a 20 mM D-ornitin kezelés hatására mért 224-280 $\Omega \times \text{cm}^2$ értékek. Tehát L-ornitin kezelés hatására a sejtek transzendoteliális rezisztenciája lecsökken (9. ábra).



9. ábra. L- és D-ornitin hatása tenyésztett agyi endotélsejtek transzendenteliális rezisztenciájára (átlag±S.E.M.; n=3; *** $P<0,001$)

3.3. L-ornitin hatása agyi endotélsejt tenyészetek permeabilitására

A transzendenteliális ellenállás mérése után fluoreszcein és Evans-kék konjugált albumin markerekkel az agyi endotélsejtek közötti és a sejteken keresztüli transzportutak változását vizsgáltuk. Kezeletlen kontrollhoz viszonyítva 24 órás 20 mM L- és D-ornitin kezelés hatását vizsgáltuk permeabilitási koefficiens meghatározásával. L-ornitin hatására a paracelluláris és a transzendenteliális marker molekulák permeabilitása többszörösére, a kontrollhoz képest szignifikánsan megnőtt (10. ábra). Sem az albumin, sem a fluoreszcein esetén a D-ornitin kezelés nem változtatja meg a jelzőanyagok egysejtrétegeken való átjutását (10. ábra).



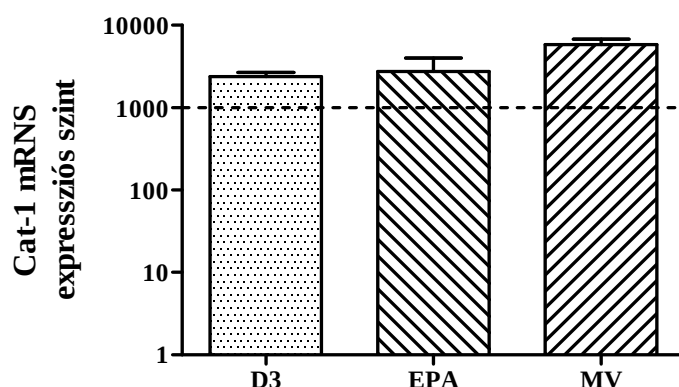
10. ábra. 20mM L- és D-ornitin hatása tenyésztett agyi endotélsejtek Evans kék-albumin (transzcelluláris transzport) és fluoreszcein (paracelluláris transzport) markerekre vonatkozó permeabilitására (átlag±S.E.M.; n=3; *** $P<0,001$)

3.4. Agyi endotélsejtek Cat-1 expressziója TaqMan arraykísérletekben

Frissen izolált patkány agyi mikroérből (MV), primer endotél, pericita és asztrocita hármas ko-kultúrában tenyésztett patkány agyi endotélsejtből (EPA) és D3 humán agyi

endotélsejt vonalból RNS-izolálást és cDNS-szintézist követően TaqMan array kísérletben vizsgáltuk több szállítófehérje expresszióját, köztük a kationos aminosavak transzportjárt felelős Cat-1 (Slc7a1) fehérjét is.

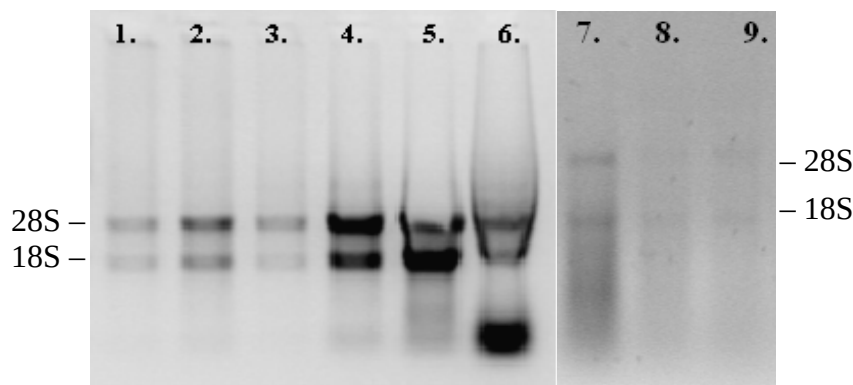
A relatív expressziós szintekből a legkisebb expressziójú génre normalizált expressziós szintek alapján az 1000-szeres expressziós szintet magasszintű expressziónak tekintettük. A háromféle minta Cat-1 expresszióját összehasonlítva szembetűnő, hogy a transzporter magasan expresszált az összes mintánkban, és jelentős eltérés nem mutatható ki a csoportok között (11. ábra).



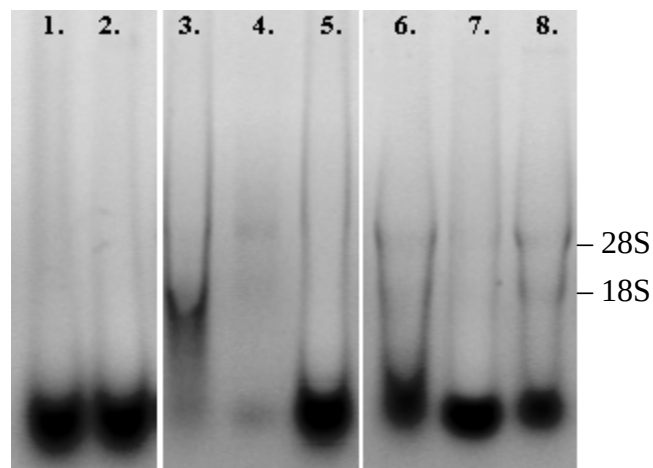
11. ábra. Tenyésztett humán agyi endotélsejtvonal (D3), tenyésztett primer patkány agyi endotélsejt (EPA) és izolált patkány mikroér (MV) Cat-1 expressziója TaqMan array kísérletben. (átlag $\pm$ S.E.M.; n=3)

3.5. RNS izolálás

A különböző patkányszervekből történt RNS izolálást követően a minták épségét gélelektroforézissel (12., 13. ábra), tisztaságát és koncentrációját NanoDrop segítségével határoztuk meg (2. táblázat).



12. ábra. Patkány agykéregből (1,2), tüdőből (3,4), májból (5,6), agyi mikroérből (7,8,9) izolált RNS minták 1% agaróz gélen futtatva.



13. ábra. Patkány hasnyálmirigyből izolált RNS minták 1% agaróz gélen futtatva. 75°C TRI reagensben (1,2), jéghideg TRI reagensben (3,4,5) és folyékony nitrogénben történt hirtelen fagyasztást (6,7,8) követő homogenizálás esetén.

minta	RNS koncentráció (ng/μl)	OD260/280	OD260/230
agykéreg/1.	181,84	1,95	2,50
agykéreg/2.	250,22	1,92	2,45
tüdő/3.	117,11	1,88	2,41
tüdő/4.	539,37	1,93	2,39
máj/5.	2345,95	1,97	2,39
máj/6.	4580,65	1,31	1,22
mikroér/7.	57,9	1,75	2,05
mikroér/8.	20,8	1,80	0,36
mikroér/9.	12,6	1,86	2,38
pancreas/6.	3886,58	1,90	1,84
pancreas/8.	4632,58	1,55	1,51

2. táblázat. A különböző szervekből tisztított RNS-ek NanoDrop 1000-rel mért adatai

Nem degradálódott RNS-ek esetén a 18S és 28S riboszómális RNS-eket a gélelektroforézisen két határozott sávban kell látnunk. A 260/280 abszorbancia-hányados az RNS tisztaságát mutatja. Ha 2,0 körüli, akkor a minta mentes minden fehérje, vagy DNS szennyeződéstől. A 260/230 abszorbancia-hányados azt jelzi, hogy a mintánk mennyi szerves oldószermaradványt tartalmaz, ami a későbbi enzimreakciókat befolyásolhatja (2,0-2,2 érték között tisztának tekinthetjük a mintát). A gélképek, a mért koncentrációk és abszorbancia-hányadosok megerősítették, hogy az agykéregből és a tüdőből jó minőségű, tiszta RNS-eket tudtunk izolálni. Az agyi mikroerekből kis mennyiségű, szennyezett RNS-t sikerült kitisztítani. A májból származó mintákon már a gélképen is látható RNS-

degradáció, amit a mért adatok is visszaigazolnak, ugyanakkor a degradáció nem olyan szintű, hogy a további munkát hátráltatná. Továbbá szembetűnő, hogy az ugyanabból a szövetből származó különböző minták között jelentős eltérés lehet.

A hasnyálmirigyből történő RNS-izolálás során többféle módon próbáltuk a mintákat feldolgozni (3. táblázat).

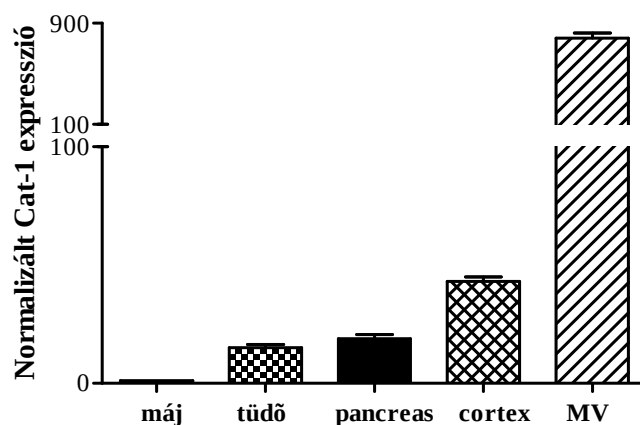
	75°C TRI reagens	jéghideg TRI reagens	folyékony nitrogénben való fagyasztás
cervikális diszlokáció	0 s	0 s	0 s
pancreas kivéve	98 s	104 s	86 s
homogenizálás vége	260 s	193 s	-
agy kivéve	340 s	306 s	334 s

3. táblázat. A hasnyálmirigy-minták különböző izolálási körülményeinek időtartamai

A 75°C-os TRI reagenssel való azonnali homogenizálást elsősorban sejtfallal rendelkező élőlények esetén alkalmazzák. Hasnyálmirigy esetén nem tűnt célra vezetőnek a módszer alkalmazása. A gélkép is jól mutatja, hogy nem maradt ép RNS. Mivel a guanidium-hidrokloridot és fenolt tartalmazó TRI reagens a sejtbe jutva azonnal denaturálja az összes enzimet, ezért kézenfekvőnek tűnt a jéghideg TRI reagenssel történő azonnali homogenizálás. Azonban ezzel a módszerrel sem sikerült ép RNS-eket kinyernünk. A szövetek folyékony nitrogénben való azonnali fagyasztása ellenben hatékony cDNS-szintézisre használható preparátum készítéséhez. A szövetminta kivételének ideje kulcsfontosságúnak bizonyult. A másfél perces időtartam bizonyult kritikusnak, az ennél hosszabb ideig tartó kivétel nem eredményezett sikeres RNS izolálást.

3.6. Real-time PCR

A real time PCR adatai alapján a CFX Manager program relatív expressziót számított a referenciagénként használt Hprt1-re. Mivel érett felnőtt hepatocitákban a Cat-1 fehérje nem expresszálódik (Closs és mtsai, 2004), ezért ehhez viszonyítva tüntettük fel a többi szövet expressziós szintjét (14. ábra).



14. ábra. Real-time PCR eredménye: rCat-1 (Slc7a1) gén expressziójára vonatkoztatva különböző patkány szövetekben. (átlag $\pm$ S.E.M.; n=3)

A real-time PCR során kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a Cat-1 fehérje a májban alulexpresszált, míg a tüdőben, pancreasban jelen van. Normál körülmények között a patkány agykérgében az előbbi szövetekhez képest kétszeres a transzporter expressziós szintje, míg a vér-agy gát barrier funkciójáért felelős mikroerekben a többi szövet kifejeződési szintjének sokszorosát figyeltük meg.

4. MEGBESZÉLÉS

4.1. L-ornitin hatása agyi endotélsejtek életképességére

Elvárásainknak megfelelően a vizsgálatok során megfigyelhető volt, hogy az L-ornitin jobban befolyásolja a sejtek életképességét, biológiailag aktívabb, mint a tükörképi párja. Sem az L-, sem a D-ornitin nem toxikus a sejtekre egészen a 20 mM koncentrációig. Efelőtt a dózis fölött azonban az L-ornitin jelentős sejtpusztulást okozott agyi endotélsejt tenyészetekben, ami közvetlen toxikus hatást jelent. A hatás mechanizmusának tisztázására további kísérleteket végzünk. A folyamatban lévő munkák során nitrogén-monoxid és szabad oxigéngyök felszabadulást, intracelluláris kalcium választ és mitokondrionális változásokat vizsgálunk.

4.2. L-ornitin hatása agyi endotélsejtek barrier funkciójára

A kísérleteink során használt agyi endotélsejt rétegek magas transzendoteliális ellenállása és alacsony permeabilitása a paracelluláris markerként használt fluoreszceinre és transzcelluláris jelzőanyagként használt Evans kék-albuminra (Deli és mtsai, 2005; Abbott és mtsai 2006) azt jelzi, hogy a sejtek közötti szoros kapcsolatok épek, jól zárnak. Adataink jól egyeznek a korábbi közleményekben leírt eredményekkel (Veszélka és mtsai, 2007), és alátámasztják, hogy a tenyészetes modell jól használható a vér-agy gát barrier funkciójának tanulmányozására.

Elsőként mutattuk ki, hogy a súlyos akut pancreatitist előidéző L-ornitin az endotélsejtek transzendoteliális rezisztenciáját közvetlenül csökkenti, permeabilitásukat fokozza: többszörösére nő mind a transzcelluláris, mind a paracelluláris transzport. Az L-ornitin hatására a vér-agy gát funkciók sérülnek, vagyis az endotélsejtek átjárhatóbbá válhatnak patogenetikus faktorok, így gyulladásos mediátorok és pancreas enzimek számára, melyek addig nem tudtak átjutni. Az agyszövetbe bejutott citokinek és enzimek hozzájárulhatnak a munkacsoport által korábban pancreatitisben leírt agyödéma súlyosbodásához (Farkas és mtsai, 1998), és a pancreaticus encephalopathia kialakulásához.

4.3. A hasnyálmirigyből történő RNS izolálás optimalizálása

A modellként használt patkány különböző szerveiből sikeresen izoláltunk RNS-t. A hasnyálmirigy esetében a proteázokban, DNázokban és RNázokban gazdag szervből igen

nehéz ép RNS-preparátumot készíteni. A mintakészítés során használt guanídium-hidrokloridot és fenolt tartalmazó TRI reagens különböző hőmérsékletű változataiban történő azonnali szövethomogenizálás nem volt sikeres. A reagens nem könnyen jut át a szövetdarab mélyebb rétegeibe és a sejtek aprításakor a zimogén granulumban lévő enzimek elszabadulnak és lebontják az RNS-eket.

Az izolálás kulcslépése a hasnyálmirigy hasüregből történő minél gyorsabb kiemelése és folyékony nitrogénben való lefagyasztása. A -195,8 °C-os folyékony nitrogén megállítja az enzimaktivitást a sejtekben, majd a még fagyott, szilárd szövetet homogenizálva a hőmérséklet emelkedésével nincs ideje aktiválódni annyi RNÁznak, hogy teljes degradáció történjen. Az általunk alkalmazott módszer sarkalatos pontjai tehát a minél előbbi szervkivétel, a folyékony nitrogénben történő szövetfagyasztás és fagyott állapotban történő homogenizálás. Kísérleteink alapján kritikus időnek az állat halálát követő 1,5 percet találtuk: ezen az időn belül kell fagyasztani a pancreas szövetdarabokat, és a folyékony nitrogénből kivéve a TRI reagens hozzáadását követően azonnal el kell kezdeni a szövet aprítását az RNS izoláláshoz.

4.4. Agyi mikroerek és tenyésztett agyi endotélsejtek Cat-1 kationos aminosav transzporter expressziója

Mivel az ornitint főképpen a Cat-1 karrier szállítja, ezt az aminosav-transzportert vizsgáltuk modellünkön, tenyésztett agyi endotélsejteken. Összehasonlításképpen frissen izolált agyi mikroér frakciót, és egy humán agyi endotélsejtvonalat használtunk. Szakirodalmi adatoknak megfelelően (Enerson és Drewes, 2006) frissen izolált patkány agyi mikroérből, primer patkány agyi endotélsejtekből és D3 humán agyi endotélsejtvonalból magas Cat-1 expressziót mutattunk ki TaqMan array segítségével. Nem találtunk eltérést a patkány és humán agyi endotélsejtek között, ami azt jelenti, hogy nincs fajspecifikus expressziós különbség ennél a karriernél. Fontos megerősítése volt a primer tenyészetek kísérleti alkalmasságának, hogy a frissen izolált agyi mikroerekkel azonos expressziós szintet mértünk. Feltételezzük, hogy az L-ornitin által közvetlenül kiváltott vér-agy gát permeabilitás-fokozódásban szerepe lehet az általunk vizsgált Cat-1 transzporternek.

A különböző patkány szöveteken végzett Cat-1 expressziós vizsgálat megerősítette, hogy az agykéreggel, a tüdővel, a májjal és a pancreasszal szemben az agyi mikroereken

nagyságrendekkel magasabb a Cat-1 alapexpresszió. Ennek funkcionális jelentőségét tovább vizsgáljuk.

4.5. Összegzés és további kutatási lehetőségek

Eddigi kutatási eredményeink azt igazolják, hogy patkányokban az akut hasnyálmirigy-gyulladás kiváltásához használt L-ornitin közvetlenül is képes jelentős mértékben befolyásolni a vér-agy gát barrier funkcióját. Kísérleteinkben romlott a barrier működése: megemelkedett a transz- és a paracelluláris transzport szintje, csökkent a rezisztencia.

A hasnyálmirigyből történő RNS-izolálás körülményeit vizsgálva megállapítottuk: a szerv kivételének, darabolásának gyorsasága, és a folyékony nitrogénben való azonnali fagyasztása, fagyott állapotban való homogenizálása kulcsfontosságú a sikeres izoláláshoz.

Igazoltuk, hogy a vér-agy gát barrier funkciójáért felelős agyi mikroerek falát felépítő endotélsejtek magasszintű Cat-1 expressziót mutatnak, mely transzporter elsődlegesen felelős a kationos tulajdonságú aminosavak, így az L-ornitin transzportjáért is.

További vizsgálatainkban szeretnénk feltárni, hogy az L-ornitinnel kiváltott akut hasnyálmirigy-gyulladás során az érintett szövetekben vajon miként változik a Cat-1 expreszió. Emellett további permeabilitási vizsgálatokat folytatunk *in vitro* vér-agy gát modellünkön: hogy komplexebb képet kapjunk a patológiai változásokról, teszteljük, hogy akut hasnyálmirigy-gyulladásos állatok vérszérumának milyen hatása van az agyi endotélsejtek barrier funkciójára.

Kísérleteinkkel reményeink szerint hozzájárulhatunk a betegség során kialakuló vér-agy gát változások és a pancreaticus encephalopathia jobb megértéséhez, és a jövőbeli sikeresebb kezeléséhez.

5. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbott NJ, Romero IA (1996) Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Mol Med Today*. 2: 106-13.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Rev. Neurosci.* 7: 41-53.
- Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ (1980) Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol.* 15: 411-6.
- Baron TH, Morgan DE (1999) Acute necrotizing pancreatitis. *N Engl J Med.* 340: 1412-7.
- Biczó G, Hegyi P, Dósa S, Balla Z, Venglovecz V, Iványi B, Wittmann T, Takács T, Rakonczay Z Jr (2011) Aliphatic, but not imidazole, basic amino acids cause severe acute necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas.* 40: 486-7.
- Biczó G, Hegyi P, Dósa S, Shalbuyeva N, Berczi S, Sinervirta R, Hracskó Z, Siska A, Kukor Z, Venglovecz V, Varga IS, Iványi B, Alhonen L, Wittmann T, Gukovskaya A, Takács T, Rakonczay Z Jr (2011) The crucial role of early mitochondrial injury in L-lysine-induced acute pancreatitis. *Antioxid Redox Signal.* 15: 2669-81.
- Carnovale A, Rabitti PG, Manes G, Esposito P, Pacelli L, Uomo G (2005) Mortality in acute pancreatitis: is it an early or a late event? *JOP*, 6: 438-44.
- Chetty U, Gilmour HM, Taylor TV (1980) Experimental acute pancreatitis in the rat – a new model. *Gut.* 21: 115-7.
- Closs EI, Simon A, Vékony N, Rotmann A (2004) Plasma membrane transporters for arginine. *J Nutr.* 134: 2752-9.
- Deli MA Blood-brain barrier models. In: *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, Neural Membranes and Transport*, Vol. 11, Lajtha A (Ed.), Springer, New York, pp. 29-56, 2007.
- Deli MA Drug transport and the blood-brain barrier. In: *Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug Candidates*. Tihanyi K, Vastag M. (Eds), Bentham Science Publishers Ltd., pp. 144-165, 2011.
- Deli MA, Ábrahám CS, Kataoka Y, Niwa M (2005) Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol.* 25:59-127.
- Deli MA, Joó F (1996) Cultured vascular endothelial cells of the brain. *Keio J Med.* 45:198-9.
- Ding X, Liu CA, Gong JP, Li SW (2004) Pancreatic encephalopathy in 24 patients with severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 3: 608-11.

- Ding Z, Liu J, Lin R, Hou XH (2012) Experimental pancreatitis results in increased blood-brain barrier permeability in rats: a potential role of MCP-1. *J Dig Dis.* 13: 179-85.
- Enerson BE, Drewes LR (2006) The rat blood-brain barrier transcriptome. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26: 959-973.
- Farkas G, Márton J, Nagy Z, Mándi Y, Takács T, Deli MA, Ábrahám Cs (1998) 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.* 242:147-50.
- Fernandez J, Lopez AB, Wang C, Mishra R, Zhou L, Yaman I, Snider MD, Hatzoglou M (2003) Transcriptional control of the arginine/lysine transporter, cat-1, by physiological stress. *J Biol Chem.* 278: 50000-9.
- Kakuda DK, MacLeod CL (1994) Na(+)-independent transport (uniport) of amino acids and glucose in mammalian cells. *J Exp Biol.* 196: 93-108.
- Kittel A, Walter FR, Veszelka S, Otrókoci L, Hegyi P, Takács T, Rakonczay Z, Deli MA (2013) Blood-brain barrier changes in pancreatitis: an electron microscopic study. *Kézirat összeállítás alatt.*
- Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L (2003) Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 83: 183-252.
- Mizunuma T, Kawamura S, Kishino Y (1984) Effects of injecting excess arginine on rat pancreas. *J Nutr.* 114: 467-71.
- Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, Tanaka K, Niwa M (2009) A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int.* 54: 253-63.
- Nevalainen TJ, Seppä A (1975) Acute pancreatitis caused by closed duodenal loop in the rat. *Scand J Gastroenterol.* 10: 521-7.
- Ohkubo T, Shiojiri T, Matsunaga T (2004) Severe diffuse white matter lesions in patient with pancreatic encephalopathy. *J Neurol.* 251: 476-8.
- Perrière N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, Couvreur P, Schermann JM, Temsamani J, Couraud PO, Deli MA, Roux F (2005) Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier specific properties. *J. Neurochem.* 93: 279-89.
- Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Dósa S, Iványi B, Jármai K, Biczó G, Hracskó Z, Varga IS, Karg E, Kaszaki J, Varró A, Lonovics J, Boros I, Gukovsky I, Gukovskaya AS, Pandol SJ, Takács T (2008) A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by L-ornithine in rats. *Crit Care Med.* 36: 2117-27.
- Rothermich NO, Von Haam E (1941) Pancreatic encephalopathy. *J Clin Endocrinol.* 1: 873-81.

- Sah RP, Garg P, Saluja AK (2012) Pathogenic mechanisms of acute pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol.* 28: 507-15.
- Tontsch U, Bauer H-C (1989) Isolation, Characterization, and Long-Term Cultivation of Porcine and Murine Cerebral Capillary Endothelial Cells. *Microvasc Res.* 37: 148-61.
- Ueda S, Nishio K, Minamino N, Kubo A, Akai Y, Kangawa K, Matsuo H, Fujimura Y, Yoshioka A, Masui K, Doi N, Murao Y, Miyamoto S (1999) Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 160: 132-6.
- Veszeka S, Pásztoi M, Farkas AE, Krizbai I, Dung NTK, Niwa, M, Ábrahám CS, Deli MA. (2007) Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. *Neurochem. Int.* 50: 219-228.
- Weksler BB, 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 (2005) Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* 19: 1872-4.
- Whitcomb DC (2006) Clinical practise. Acute pancreatitis. *N Engl J Med.* 354: 2142-50.
- Zhang XP, Tian H (2007) Pathogenesis of pancreatic encephalopathy in severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 6: 134-40.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálásan köszönöm

Dr. Deli Máriának, az MTA-SZBK, Biofizikai Intézet, Neurobiológiai Csoport tudományos főmunkatársának, témavezetőmnek, hogy lehetővé tette a munkacsoportban végzett kísérleteimet, hasznos tanácsaival támogatott és ösztönzött;

Dr. Tubak Vilmosnak, az MTA-SZBK, Biokémiai Intézet kutatóorvosának, témavezetőmnek, hogy lehetővé tette kísérleteim elvégzését, szakmai támogatását és bátorítását;

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

Dr. Veszélka Szilviának, az MTA-SZBK, Biofizikai Intézet, Neurobiológiai Csoport tudományos munkatársának kísérleteimhez nyújtott támogatását;

Dr. Rakonczay Zoltánnak, az SZTE-ÁOK, I. sz. Belgyógyászati Klinika tudományos főmunkatársának kísérleteimhez nyújtott segítségét és hasznos tanácsait;

Dr. Kittel Ágnesnek, az MTA-KOKI tudományos főmunkatársának az elkészített elektronmikroszkópos felvételeket;

Dr. Tóth Andrásnak, az MTA-SZBK, Biofizikai Intézet, Energiaátalakító Redoxenzimek Laboratórium tudományos munkatársának TaqMan array kísérletekben nyújtott hathatós segítségét;

Tóth Andreának és Walter Fruzsínának, az MTA SZBK Biofizikai Intézet Neurobiológiai Csoport munkatársainak kísérleteim végzéséhez és dolgozatom megírásához nyújtott segítségeit, tanácsait;

Váczai Balázsnak, munkatársamnak kísérleteim során adott hasznos tanácsait.

NYILATKOZAT

Alulírott, **Harazin András biológus MSc** szakos hallgató, kijelentem, hogy a Tudományos Diákköri Konferenciára készített dolgozatomhoz az *in vivo* permeabilitási kísérletek Rakonczay Zoltán és munkatársainak munkája, az elektronmikroszkópos felvételeket pedig Kittel Ágnes készítette. Az *in vitro* háromsejtes modellen végzett toxicitási és permeabilitási vizsgálatokat Veszélka Szilvia és Walter Fruzsina végezte. A TaqMan array vizsgálatok Tóth András és munkatársai segítségével valósítottuk meg. A dolgozatban szereplő kísérletek közül az RNS izolálást és a real-time PCR vizsgálatokat saját magam végeztem. Továbbá segédkeztem az *in vitro* kísérletek összeállításához szükséges primer sejtizolálásban, agyi mikroér-izolálásban, a háromsejtes modellen végzett toxicitási és permeabilitási vizsgálatokban, ill. a TaqMan array kísérletekben, és az RNS izoláláshoz szükséges szövetminták műtéti eltávolításában.

A dolgozat készítésekor csak a hivatkozott szakirodalmi forrásokat használtam fel.

Szeged, 2012. november 5.

Harazin András