

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar

MTA SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT
Biofizikai Intézet

**Az áramlás hatása agyi endotélsejtek szerkezetére és működésére:
vizsgálatok egy új dinamikus, integrált modellen**

Petneházi András
molekuláris bionika BSc IV. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Deli Mária
tudományos tanácsadó

Dr. Dér András
tudományos tanácsadó
MTA SZBK Biofizikai Intézet

Belső konzulens:

Dr. Rákhely Gábor
tanszékvezető egyetemi docens
SZTE TTIK
Biotechnológiai Tanszék

XXXII. Biológia OTDK

TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ

A mikrofluidikai megoldásokon alapuló eszközök használata az elmúlt tíz évben terjedt el szélesebb körben a biológiai kutatásokban. Ezek a miniaturizált biochipek az *in vivo* struktúrák jobb reprodukálásával hatékony és összetett vizsgálatokat tesznek lehetővé. A biológiai barrierék, köztük a vér-agy gát tanulmányozása különösen fontos élettani és gyógyszerészeti kutatásokban, például a neurodegeneratív betegségek ellen kifejlesztett gyógyszerjelöltek tesztelésében. Az agyi endotélsejtek gátfunkciójának egyik szabályzója a sejtek lumenális oldalára ható, véráramból eredő folyadék-nyírófeszültség. Ennek modellezésére számos sejtenyésztésben használt integrált mikrofluidikai eszköz létezik, azonban közülük egy sem egyesíti a rendszer monitorozásához szükséges összes paramétert. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk az agyi endotélsejtek áramlás hatására bekövetkező morfológiai és funkcionális változásait az általunk létrehozott sejtenyésztéses modellezésre alkalmas mikroelektronikai biochipen. A chipen statikus és dinamikus (keringetés) körülmények között kapott eredményeket a Biológiai Barrierék kutatócsoport által régóta használt tenyésztőbetétten nyert adatokkal hasonlítottuk össze.

Kísérleteinket az új integrált, PDMS alapú biochipen végeztük, amely lehetővé tette a sejtek naponta, valós időben történő megfigyelését. A tenyészetek jellemzéséhez fáziskontraszt mikroszkópos képeket készítettünk. A barrier szorosságának meghatározásához elektromos ellenállást mértünk az endotél egysejtrétegeken keresztül, illetve a tenyésztési idő végén meghatároztuk jelzőmolekulák átjutását. A sejtközzötti kapcsolatok kialakulását a β -katenin kapcsolófehérje immunfestésével követtük. Az áramlás modellezéséhez szükséges tápfolyadék-keringetést perisztaltikus pumpával értük el. A sejtenyésztéshez humán agyi endotél sejt vonalat (hCMEC/D3) használtunk.

Statikus körülmények között a biochipen és a tenyésztőbetétten az agyi endotélsejteket 5 napig, a legmagasabb transzendoteliális rezisztencia eléréséig tenyésztettük. A chipen a tápfolyadék áramoltatását a 3. nap után kezdtük el és 2 napig állandó szinten tartottuk. Az áramoltatás megkezdése utáni naptól a endotélsejtek az áramlás irányának megfelelő, megnyúlt morfológiát vettek fel. A dinamikus biochipen a barrier tulajdonságok javultak, ugyan a kis molekulású marker átjutása és a rezisztencia nem változott, azonban a közepes és nagy molekulájú jelzőanyagra az endotélsejtréteg permeabilitása szignifikánsan csökkent a statikus modellekhez képest.

Összefoglalva, az általunk kifejlesztett biochipet sikeresen alkalmaztuk sejtenyésztésre és a vér-agy gát statikus és dinamikus modelljeinek összehasonlítására. Terveink között szerepel a chipen a vér-agy gát primer sejt ko-kultúra modelljének tesztelése és azon az áramlás hatásának vizsgálata.

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezető	4
1.1. A vér-agy gát és az agyi endotélsejtek	4
1.2. A vér-agy gát sejttes modellezése	7
1.2.1. A hCMEC/D3 agyi kapilláris endotél sejt vonal	8
1.3. Nyírófeszültség hatása endotélsejtekre	8
1.4. Mikrofluidikai <i>in vitro</i> vér-agy gát vizsgálati módszerek	10
1.5. Célkitűzések	11
2. Anyagok és módszerek	12
2.1. Vegyszerek	12
2.2. A biochip felépítése	12
2.3. Transwell sejttenyésztő betét használata	13
2.4. hCMEC/D3 sejttenyésztet	13
2.5. Transzendoteliális elektromos ellenállás mérése	14
2.6. Permeabilitás-vizsgálat	15
2.7. Immunhisztokémia	16
2.8. Statisztikai kiértékelés	16
3. Eredmények	17
3.1. Áramlás létrehozása a mikroelektronikai biochipen	17
3.2. Áramlás hatása a sejtek növekedésére: fáziskontraszt mikroszkópia	17
3.3. Áramlás hatása agyi endotélsejtek gátfunkciójára: TEER mérés	18
3.4. Áramlás hatása agyi endotélsejtek gátfunkciójára: permeabilitás mérés	19
3.5. Áramlás hatása agyi endotélsejtek gátfunkciójára: immunhisztokémia	20
4. Megbeszélés	21
4.1. Vér-agy gát modellezés mikrofluidikai chippekkel	21
4.2. Áramlás hatása agyi endotélsejtek morfológiájára	22
4.3. Áramlás hatása agyi endotélsejtek gátfunkciójára	22
5. Összefoglalás	23
6. Irodalomjegyzék	24
7. Köszönetnyilvánítás	27
8. Tételes szakmai hozzájárulás	28

Rövidítések

BSA – borjú szérum albumin

$[C]_A$ – abluminális koncentráció

$[C]_L$ – luminális koncentráció

Da – dalton

EBA – Evans-kék albumin komplex

FITC-dextrán – fluoreszcein-izotiocianáttal jelölt dextrán

M – molekulatömeg

mM – millimólos

μ M – mikromólos

PBS – foszfátpuffer

PECAM-1 – vérlemezke endotélsejt adhézios molekula

PDMS – dimetil-polisziloxán

TEER – transzendoteliális elektromos ellenállás

TJ – tight junction, szoros sejtközütti kapcsolat

V_A – abluminális térfogat

V_L – luminális térfogat

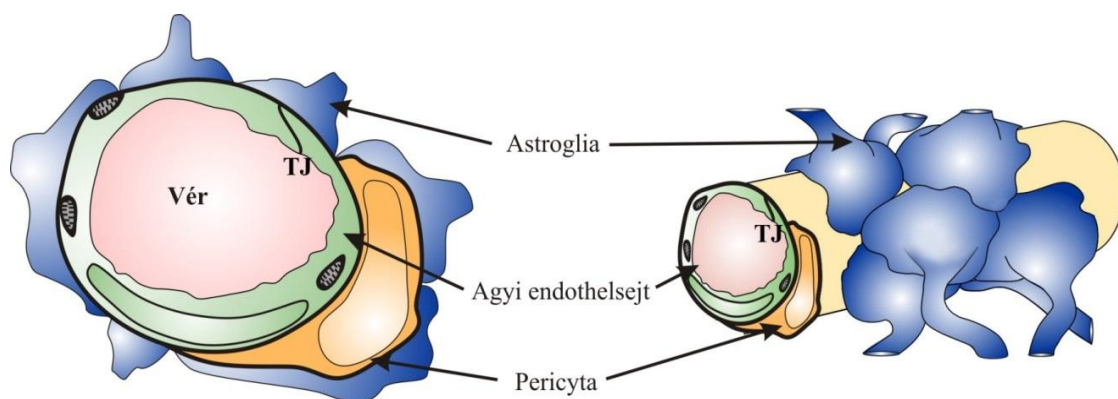
ZO – zonula occludens fehérje

1. Bevezető

A biológiai barrierék, mint a vér-agy gát, a bélhám vagy a légzőhám sejttenyészetes modelljei fontosak az ezeken a gátakon lezajló transzportfolyamatok, gyógyszerbejuttatás és betegségek vizsgálatában (Deli és mtsai., 2005). Az 1980-as évektől az ilyen gátrendszerek tesztelésére műanyag sejttenyésztő betéteket használtak. Az utóbbi évtizedben az erre a célra létrehozott eszközök nagy fejlődésen mentek keresztül: mikrofluidikán alapuló, több különböző vizsgálati lehetőséget is biztosító lab-on-a-chip modellek jelentek meg (Sackmann és mtsai., 2014). Az egyre olcsóbb, átlátszó, mikroszkopizálható, biokompatibilis műanyagoknak köszönhetően változatos csatornák készíthetők bármilyen kívánt mérettartományban. Egy jó lab-on-a-chip eszköz többfunkciós, egyszerű használni és költséghatékony. Ezek az eszközök lehetővé teszik a véráramot imitáló folyadékáramlás létrehozását, ellentétben az eddigi használt statikus *in vitro* modellekkel. Az *in vivo* mikrokeringés morfológiai és fiziológiai sajátosságainak megközelítése valósulhat meg, mivel a dinamikus rendszerben a tápfolyadék keringetése az endotélsejtek gátfunkciójának kialakításában fontos szerepet játszik.

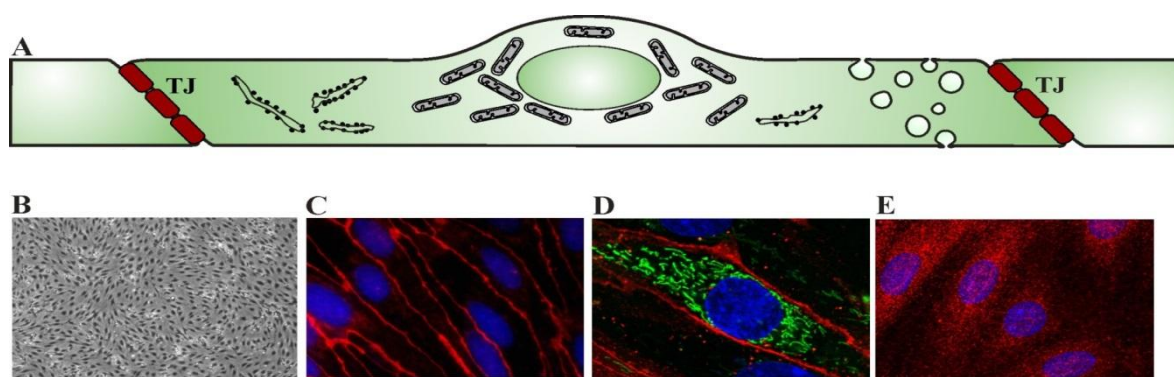
1.1 A vér-agy gát és az agyi endotélsejtek

Az élet elengedhetetlen feltétele az állandó belső homeosztázis fenntartása. Az idegrendszer számára alapvető ez az állandóság, megfelelő működéséhez az agyi intersticiális folyadékokban megtalálható ionok és tápanyagok közel állandó szintje szükséges, mivel a hormonok, aminosavak gyakran ingerületátvivőkként viselkednek, az ionok koncentrációja pedig befolyásolja az idegsejtek ingerküszöbét (Byrne és mtsai., 2004). Az agyi homeosztázis fenntartásában kulcsfontosságú a vér-agy gát szerepe (Goldstein és Betz, 1986) (1. ábra). A vér-agy gát dinamikus határfelületet képez, amely elválasztja az idegrendszert a szisztémás vérkeringéstől (Deli és Kálmán, 2008). További feladata az agy káros anyagoktól való védelme. Az agyi endotélsejtek vér-agy gát működésének kialakulását, a neurovaszkuláris egység sejtjei közötti kommunikáció segíti elő és tartja fent. A neurovaszkuláris egység tagjai az agyi endotélsejteken kívül a periciták, a glia és idegsejtek (Abbott és mtsai., 2006).



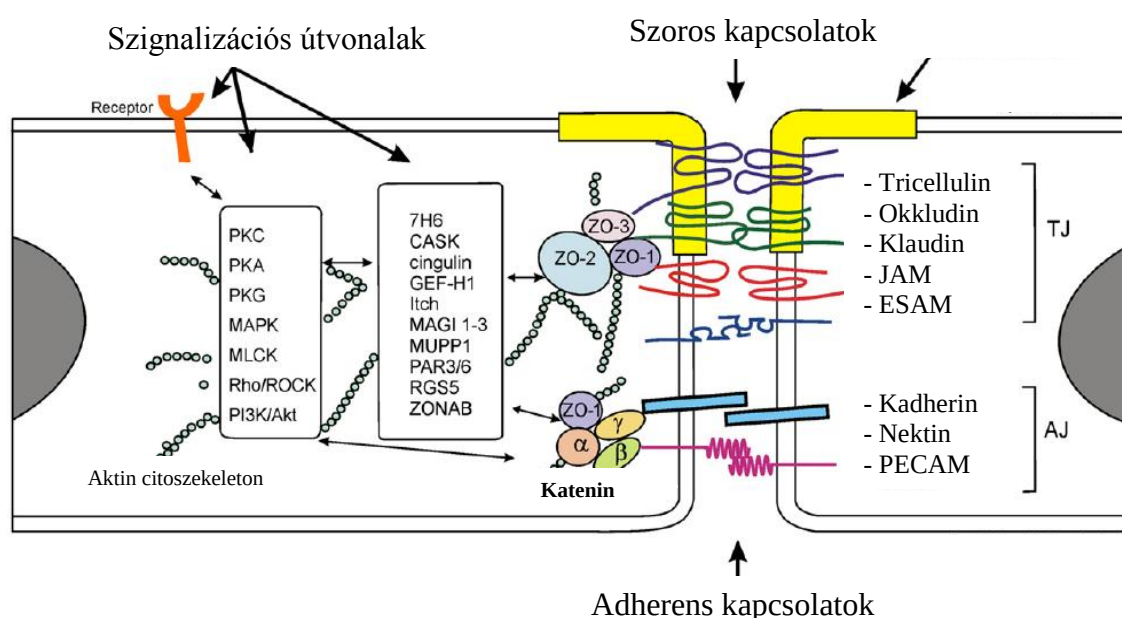
1. ábra. A vér-agy gát szerkezetének sematikus rajza. (Deli, 2010)

Az endotélium a vérerek belső felszínét alkotó egysejtréteg. Az endotélsejtek az érrendszer alap építőkövei, egészen az aortától a legkisebb kapillárisokig. A test legtöbb hajszálerének falát alkotó endotélsejtek lazán kapcsolódnak egymáshoz, a vér és az intersticiális tér közötti anyagtranszport ezért könnyen megvalósulhat. Az agyi mikróerek azonban különleges felépítésűek, a szervezet többi ereitől eltérően az agyban folytonos, hézagmentes funkcionális egységet alkotnak (2. ábra). Ez az agyi endotélsejtek speciális szerkezetének köszönhető. Mikroszkóppal vizsgálva az agyi endotélsejteken megfigyelhető a lapos sejttest, a perifériás endotéliumhoz képest az alacsonyabb számú transzportvezikula és magasabb számú mitokondrium (Deli, 2011).



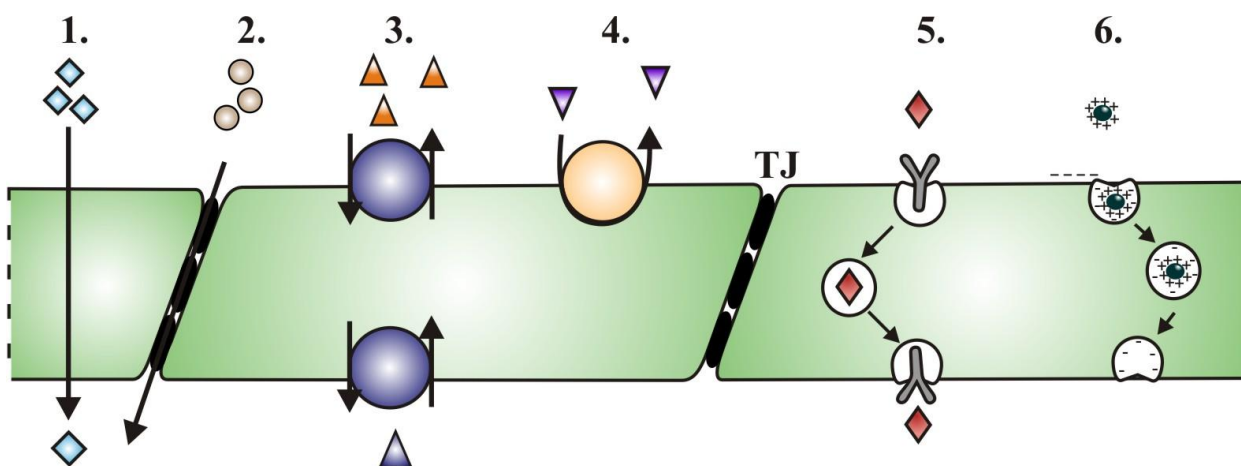
2. ábra. (A) Agyi endotélsejtek sematikus rajza. TJ: szoros kapcsolatok, középen: sejtmag, körülötte: mitokondriumok, endoplazmatikus retikulum, kaveolák. Agyi endotélsejtek jellemzése: (B) sejtenyészet fáziskontraszt mikroszkópiás képe; (C) β-katenin kapcsolófehérje immunhisztokémia. piros: β-katenin; (D) zöld: mitokondrium Mitotracker jelölése, piros: sejtmembrán Cellmask jelölés;; (E) piros: glükóz transzporter-1 immunhisztokémia; (C-E): kék: sejtmag.

A mechanikai gát kialakításában legfontosabbak a sejtközi szoros kapcsolatok. Az ezeket kialakító integráns membránfehérjék közé tartoznak a szoros kapcsolatok (TJ) fehérjéi, mint az okkludin, klaudin és az adherens junkciók fehérjéi, mint például a kadherine. Ezeket a sejtvázhoz linker vagy adaptor proteinek, mint a β -katenin vagy a *zonula occludens* (ZO) fehérjék kapcsolják (3. ábra, Deli, 2008). Az agyi endotélsejtek TJ komplexei olyan szorosak, hogy még a kis átmérőjű ionok, a víz, vagy kisméretű hidrofíl molekulák számára sem nyitott a paracelluláris transzportút. Ezt az agyi mikroereken *in vivo* mért igen magas, mintegy 2000 Ω transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER) is tükrözi (Joó, 1996).



3. ábra. A sejtközi kapcsolatok felépítése endotélsejtekben (Deli, 2008 alapján). TJ: szoros kapcsolat; AJ: adherens kapcsolat; sárga: TJ-hez asszociált membrántutaj.

Az agyi endotélsejtek szerkezeti felépítéséhez további speciális funkciók társulnak (Abbott és mtsai., 2006). A sejtek luminális (vér felőli) és abluminális (agy felőli) oldalán eltérő az ioncsatornák, transzporterek és receptorok kifejeződése, ezt nevezzük polaritásnak, amit szintén a sejtek közötti kapcsolatok hoznak létre (4. ábra). Az anyagszállítás különböző módon zajlik az endotélsejtretegeken keresztül. Az idegrendszer sejtjeinek működéséhez szükséges tápanyagok (glükóz, aminosavak, nyomelemek, lipidek, vitaminok, stb.) átjuttatását speciális kétirányú szállító fehérjék, transzportrendszerek végzik.



4. ábra. Transzportutak a vér-agy gáton keresztül: 1. szabad diffúzió a lipid membránon át (zsírolédékony vegyületek); 2. sejtek közötti, azaz paracelluláris transzport (vízoldékony molekulák); 3. kétirányú szállító fehérjék (tápanyagok: glukóz, aminosavak, tejsav, nyomelemek); 4. efflux transzporterek (xenobiotikumok, gyógyszerek); 5. receptor-mediálta transzcitózis (peptidek, fehérjék, pl. inzulin, transferrin); 6. nem-specifikus transzcitózis (szérumfehérjék: albumin) (Deli, 2010).

A kisméretű ($M < 400$ Da) zsírolédékony molekulák lipid-mediált szabad diffúzióval könnyen bejutnak az agyba (Deli, 2011). Ilyenek például az élvezeti szerek, mint a koffein, a nikotin vagy a heroin. A vér-agy gát rendelkezik számos aktív efflux transzportra képes szállítófehérjével is. Ezek a pumpák ATP felhasználásával akadályozzák meg az idegrendszer számára káros anyagok bejutását a véráramból, illetve pumpálnak ki endogén metabolitokat az agyból. Ebbe a csoportba az ABC transzporter család tagjai tartoznak, mint a P-glikoprotein vagy a multidrog rezisztencia asszociált proteinek amelyek az idegrendszer védelme mellett sajnos megnehezítik gyógyszerek bejutását az agyba (4. ábra) (Deli, 2011).

1.2. A vér-agy gát sejtjes modellezése

Joó Ferenc munkatársaival 1973-ban közölt egy eljárást patkány agyi mikroerek izolálására (Joó és Karnushina, 1973). Ezt a Szegeden létrehozott módszert tekintjük az első *in vitro* vér-agy gát modellnek. Vér-agy gát kutatásokhoz ember, marha, egér, sertés és patkány primer tenyészeteket egyaránt használnak. Gyógyászati kutatásokhoz a humán primer sejtenyészetek lennének a legalkalmasabbak, de etikai és módszertani okok miatt az alkalmazásuk nem elterjedt. Mivel a primer sejtenyészet készítése drága, hosszadalmas, munka és erőforrás igényes feladat, ezért számos immortalizált sejtvonalat hoztak létre virális vektorok segítségével (Veszélka és mtsai., 2011).

1.2.1 A hCMEC/D3 agyi kapilláris endotél sejtvonala

Az agyi endotél sejtvonalaikat széleskörűen alkalmazzák transzportkísérletekre, valamint immunsejtek és patogének átjutásának vizsgálatára (Veszélka és mtsai., 2011). Monokultúrában ezek a sejtvonalaik, például a b.End3 egér, az RBE4 és GP8 patkány agyi endotél sejtvonalaik alacsony TEER és magas permeabilitási értékeket mutatnak (Deli és mtsai., 2005; Veszélka és mtsai., 2011). Az első stabil és részletesen jellemzett humán agyi endotél sejtvonala a hCMEC/D3 (Weksler és mtsai., 2005). A sejtvonala létrehozásakor a fő szempont a humán agyi endotélsejtek *in vivo* fenotípusának lehető legnagyobb mértékű megtartása volt amellet, hogy a sejtek használata kísérletekre egyszerű legyen. A D3 sejtvonala előállításához egy epilepsziás beteg temporális lebenyéből műtét során eltávolított szövetdarabból nyerték a humán agyi endotélsejteket. A sejtek immortalizálását a hTERT és SV40 large T antigének primer agyi endotélsejtekbe történő szekvenciális lentivirális transzdukciójával valósították meg. A későbbi D3 sejtvonala a több száz lehetséges vonala közül választották ki a sejtek morfológiája, növekedési képességük és a normál endotél fenotípusra jellemző markerek stabil jelenléte, mint a von Willebrand faktor, PECAM-1, β -katenin és ZO-1 alapján.

A D3 sejtek rendelkeznek számos, az agyi mikroereken megtalálható receptorról, TJ fehérjével és efflux pumpával más, a neurovaszkuláris egység sejtjeivel való együtt tenyésztés nélkül is. A D3 sejtekben a ZO-1 és β -katenin expresszió és immunhisztokémiai jelölődés egységes, azonban a kladin-5 és az okkludin kifejeződése alacsonyabb szintű. Ez okozhatja az alacsonyabb, a monokultúrára jellemző $40 \Omega\text{cm}^2$ TEER értékeket. A D3 megfelelő modell számos anyag transzportjának tesztelésére, kivéve a kisméretű hidrófil molekulákat (Weksler és mtsai., 2005, 2013).

1.3. Nyírófeszültség hatása endotélsejtekre

Az *in vitro* vér-agy gát modellekben a folyadékáramlásból eredő nyírófeszültség sokszor elhanyagolt paraméter (de Boer és mtsai., 1999). A kiterjedt kapillárisrendszer nagy összkeresztmetszete ($4500\text{-}6000 \text{ cm}^2$) miatt a véráramlás a kontinuitás elvnek megfelelően a hajszálerekben nagyon lelassul, sokan ezért gondolhatják, hogy a folyadék-nyírófeszültség értéke alacsony és ezért elhanyagolható. Azonban az érrendszer esetén számításba kell vegyük az erek hosszanti, csőszerű geometriáját. Így a nyírófeszültség számolására használt képlet

szerint a nyíróerő ugyan egyenesen arányos az átáramló folyadékmennyiséggel, de fordítottan a kapilláris belső sugarának harmadik hatványával (1. egyenlet; Redmond és mtsai., 1995):

$$\tau = \frac{4\mu Q}{\pi r^3}$$

1. egyenlet. τ : nyírófeszültség ($\text{Pa} = 10 \text{ dyn cm}^{-2}$), μ : viszkozitás ($\text{Pa}\cdot\text{s}$), Q : az áramló folyadék mennyisége ($\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$), r : a belső sugár (m)

A képlet a kapillárisok idealizált modelljét használja, ugyanis a vér nem-newtoni jellege és az érfalak rugalmas tulajdonsága miatt a vaszkuláris fizikai jelenségek pontos leírása bonyolult. A véráramból adódó folyadék-nyírófeszültségnek döntő hatása van az erek egészséges morfogenezisére, a vérnyomásra és olyan patológiás elváltozásokra is, mint például az érlemezésedés (Hahn és Schwartz, 2009).

A nyírófeszültség több szignalizációs eseményt is aktiválhat endotélsejtekben, többek között befolyásolja a szoros kapcsolatok kialakításában résztvevő fehérjék expresszióját, a metabolizmust, élettartamot, transzport- és enzimfehérjék szintjét (Colazzo, 2014), ezért az agyi endotélsejtek differenciálódásában és a vér-agy gát jó barriertulajdonságának kialakításában is fontos paraméter (Siddhant és mtsai., 2007; Cucullo és mtsai., 2011).

Az endotélsejtek folyadéknírási hatására az áramlás irányának megfelelő ellipszis alakú formát vesznek fel. A megnyúlás mértéke és az irányítottság szöge, valamint a nírás nagysága erősen összefügg (Malek és Izumo, 1996). Agyi endotélsejteken is kimutatták, hogy az aktin citoszkeleton és maguk a sejtek is a folyadékáramlás irányába orientálódnak (Colgan és mtsai., 2007). Ugyanebben a munkában leírták, hogy a folyadékáramlás fokozza agyi endotélsejtekben az okkludin és ZO-1 fehérjék expresszióját és membrán lokalizációját, és ezzel párhuzamosan csökkenti a sejtréteg permeabilitását. A nyírófeszültség indukálhatja vagy elnyomhatja agyi endotélsejtek génjeinek kifejeződését, így befolyásolja többek között a kapcsolófehérjék, a transzporterek és enzimek jelenlétét (Cucullo és mtsai., 2011).

A közelmúltban aorta endotélsejteken azonosítottak egy mechanoszenzoros fehérjekomplexet, amelyet VE-cadherin, PECAM-1, VEGFR2 és vimentin alkot, és amely a nyírófeszültség sejtes hatását mediálja (Conway és mtsai., 2013).

1.4. Mikrofluidikai *in vitro* vér-agy gát vizsgálati módszerek

A vér-agy gát sejttenyészetes modelljeit széleskörűen használják a gyógyszerbejuttatás, anyagtranszport és patológias folyamatok vizsgálatában és tesztelésében (Deli és mtsai., 2005). A vér-agy gát statikus modelljeit az 1980-as évektől használják. A kereskedelmi forgalomban kapható, porózus filter alapú sejttenyésztő membránok a legelterjedtebbek a permeabilitási kísérleteknél (Deli és mtsai., 2005). Kevesebb, mint tíz éve új rendszerek fejlesztése kezdődött meg, amelyek a mikroerek alakjára jobban hasonlító hosszanti sejttenyésztő csatornákat használnak és véráramszerű folyadékáramlást alkalmaznak az *in vivo* körülmények pontosabb lemásolására (Cucullo és mtsai., 2008). A tápfolyadék áramoltatását lehetővé tevő modelleket nevezzük dinamikus modelleknek. A dinamikus rendszerben a statikushoz hasonlóan a sejttenyészetek barrierfunkcióját több módon is jellemezhetjük. Kézenfekvő a sejtréteg morfológiájának mikroszkópos megfigyelése. A jó barrierfunkció érdekében az egysejtrétegnek teljesen összefüggőnek kell lennie. A barrier jellemzésére a sejtréteg permeabilitását mérjük különböző méretű jelzőmolekulákra, míg a sejtek közötti kapcsolatok szorosságát a sejtréteg elektromos ellenállása adja meg (Deli és mtsai., 2005).

Számos mikrofluidikai modellt fejlesztettek ki a közelmúltban a vér-agy gát kísérletes modellezésére (1. táblázat). Ezek a modellek szinte kivétel nélkül legalább két kompartmenttel rendelkeznek, a kompartmenteket pedig porózus membrán választja el egymástól, amelyen endotélsejtrétegek növeszthetők.

1. táblázat. A vér-agy gát kutatásra alkalmas, agyi endotél sejtvonalak felhasználásával készült mikrofluidikai modellek a szakirodalomban.

Mikroszkópia	Áramlás	Permeabilitás	TEER	Humán sejt	Hivatkozás
–	✓	✓	✓	✓	Cucullo és mtsai., 2008
✓	✓	–	✓	✓	Prabhakarbandian, 2013
✓	✓	✓	–	–	Griep és mtsai., 2013
✓	–	✓	–	–	Achyuta és mtsai., 2013
✓	✓	✓	✓	–	Booth és mtsai., 2014
✓	✓	✓	✓	✓	MTA SZBK

Az első dinamikus vér-agy gát modellt Janigro és mtsai. hozták létre, akik később D3 agyi endotélsejteket is tenyésztettek a porózus membránból készített csövek belső üregében (DIV-BBB modell; Cucullo, 2008, 2013). Ennek a modellnek a hátránya, hogy a sejtek letapadása és növekedése mikroszkóppal nem követhető, valamint a kapillárisok esetleges eltömődése megváltoztathatja az ellenállás és permeabilitási értékeket.

Griep és munkatársai (2012) szintén D3 agyi endotélsejteket használtak, azonban dinamikus modelljükön permeabilitási vizsgálat nem volt megvalósítható. Prabhakarandian és mtsai. (2012) patkány agyi endotél sejtvonalat és áramoltatást használtak modelljükben, de nem mértek ellenállást a barrier integritásának követésére. Az Achyuta és mtsai. által leírt PDMS alapú biochip rendszerben nem volt sem áramlás, sem ellenállás mérés. A legkomplexebb rendszert Booth és mtsai. (2014) fejlesztették ki, azonban nem humán agyi endotélsejteket használtak a munkájukban.

1.5. Célkitűzések

Ugyan több mikrofluidikai vér-agy gát modellt írtak le az elmúlt hét évben, azonban egyik modell sem teljesíti a kísérleteinkhez szükséges legfontosabb jellemzőket és paramétereket (1. táblázat). Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk humán agyi endotélsejtek áramlás hatására bekövetkező morfológiai és funkcionális változásait az MTA SZBK Biológiai barrierek és a Biomolekuláris Elektronika kutatócsoportok együttműködésével korábban létrehozott integrált mikroelektronikai chipen.

Munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. A munkacsoportjaink által kifejlesztett mikrofluidikai lab-on-a-chip eszköz alkalmas-e humán agyi endotélsejtek tenyésztésére és vizsgálatára?
2. A statikus körülményekhez képest milyen morfológiai változások figyelhetők meg a sejtrétegen folyadékáramlást alkalmazva?
3. Milyen hatása van az áramlásnak az agyi endotél egysejtréteg ellenállására?
4. A folyadékáramlás befolyásolja-e az egysejtréteg permeabilitását kis- és nagymolekulájú fluoreszcens jelzőanyagokra?
5. Hogyan változik a sejtközi kapcsolatok immunfestése áramlás hatására?

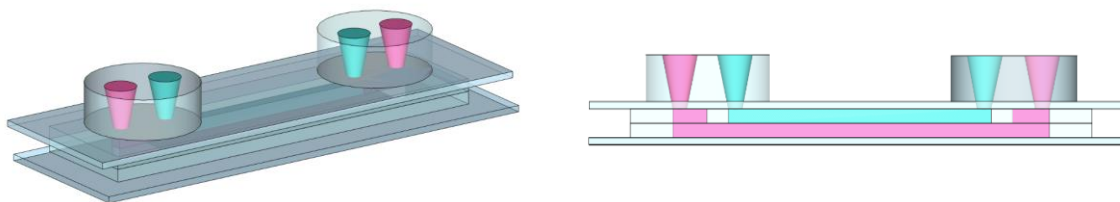
2. Anyagok és módszerek

2.1. Vegyszerek

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

2.2. A biochip felépítése

Vizsgálatainkhoz a kutatócsoportok által korábban kifejlesztett mikrofluidikai eszközt használtuk (5. ábra). Az eszközt öt különálló réteg összeragasztásával alakítottuk ki. Az öt réteget az alsó és felső üveg tárgylemezek, köztük alsó és felső dimetil-polisziloxán (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning GmbH, Németország) csatornák valamint a csatornák közötti porózus membrán (poliészter, pórusméret: $0.45\ \mu\text{m}$, pórusűrűség: $2 \times 10^6/\text{cm}^2$, vastagság: $23\ \mu\text{m}$; It4ip, Belgium) alkotják. A csatornák dimenziói: $2 \times 2 \times 35\ \text{mm}/40\ \text{mm}$. Rezervoárként 250 μl -es műanyag PCR csövek szolgáltak, a rezervoár tartók PDMS-ből készültek (5. ábra). Használat előtt az eszközt 70 %-os etanollal 1 órán keresztül sterilizáltuk, az etanol eltávolításának érdekében steril vízzel tízszer átmostuk. A sterilizálás előtt és után a biochipet plazmatisztítóban (Harrick Plasma Inc., USA) 15 percig kezeltük, amely hozzájárul a steril körülmények megtartásához és a PDMS hidrofilitásának megőrzéséhez.



5. ábra. A vér-agy gát modellezéshez használt mikrofluidikai eszköz perspektivikus és hosszsz metszeti ábrája. Világoskék: felső, luminális folyadék kompartment; rózsaszín: alsó, abluminális folyadék kompartment.

A TEER mérést lehetővé tevő egy-egy pár arany elektródát az üveg fedőlemezek felületére vákuumporlasztással (K975X Turbo Evaporator, Quorum Technologies, Egyesült Királyság) vittük fel. Az arany elektródákhoz epoxy ragasztóval vezető rézkábeleket erősítettünk, hogy a chipet össze lehessen kapcsolni az ellenállásmérő műszerrel. A

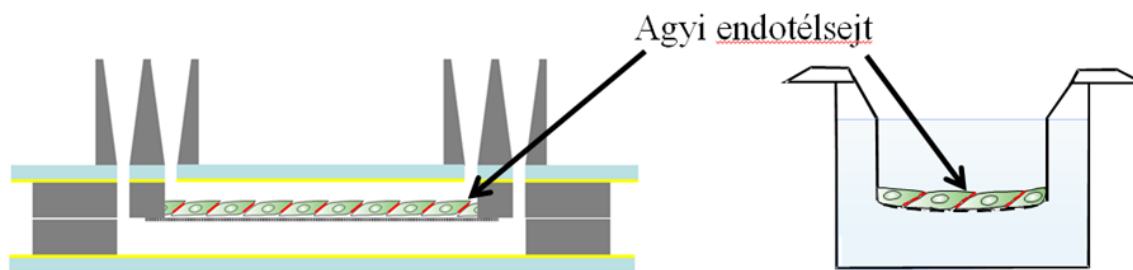
tápfolyadék áramoltatásához a chip felső csatornájának be- és kimenetére kapcsoltuk a perisztaltikus pumpát.

2.3. Transwell sejtenyésztő betét használata

A biochipen kapott kísérleti eredményeket statikus, tenyésztőlemezbe helyezhető sejtenyésztő betéteken (Corning Costar, USA, Transwell 12-well formátum, polietilén tereftalát, pórusméret: $0,4\ \mu\text{m}$, pórusűrűség: $4 \times 10^6/\text{cm}^2$, vastagság: $12\ \mu\text{m}$) mért adatokkal hasonlítottuk össze (6. ábra).

2.4. hCMEC/D3 sejtenyésztés

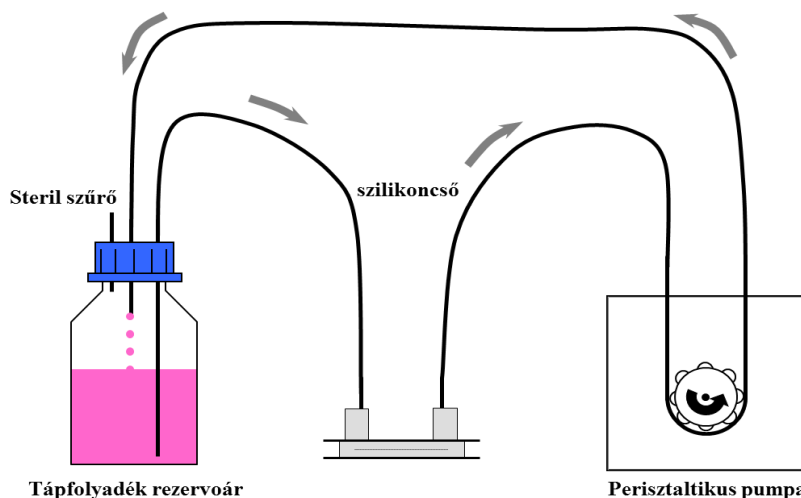
A biochipen és a sejtenyésztő betéteken végzett kísérleteinket a vér-agy gát egyszerűsített modellezéséhez használt hCMEC/D3 humán agyi endotél sejtvonalon végeztük maximum a 35. passzási számig (Weksler és mtsai., 2005). A sejteket kísérlet előtt 4-5 napig patkány-farok kollagénnel bevont Petri csészében CO_2 inkubátorban tartottuk. A tenyésztéshez használt tápfolyadék a következő összetevőkből állt: MCDB131 endotél bazális médium (Pan Biotech, Németország), 0,1 % gentamicin, penicillin-sztreptomycin (Roche, Magyarország), 5 % borjú szérum, $1,4\ \mu\text{M}$ hidrokortizon, 1 % lipid koncentrátum (Life Technologies, USA), 1 ng/ml fibroblaszt növekedési faktor, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aszkorbinsav, 1 % inzulin-transzferrin-szelenit médium kiegészítő, 0,1 % heparin és 10 mM Hepes. A kísérletekhez a biochipre 7×10^4 sejt/ cm^2 , a sejtenyésztő betétekre pedig 5×10^4 sejt/ cm^2 sűrűséggel szélesztettük a sejteket (6. ábra).



6. ábra. Agyi endotélsejtrétegek elhelyezkedése a mikrofluidikai chipen és a sejtenyésztő betéten.

Mindkét rendszerben a membránok felszínét patkányfarok kollagénnel vontuk be. A sejtek növekedését 5 napig követtük, minden nap fáziskontraszt mikroszkópos képet készítettünk (Nikon TE 2000, Nikon, Japán). Statikus körülmények között a chipen és a

tenyésztőbetétén az agyi endotélsejteket 5 napig, a legmagasabb transzendoteliális rezisztencia eléréséig tenyésztettük.



7. ábra. Áramoltatás módjának szemléltetése a biochipen perisztaltikus pumpa segítségével.

A dinamikus chip modellen a tápfolyadék áramoltatását a 3. nap után kezdtük el és 2 napig állandó szinten tartottuk (7. ábra). Minden kísérletben a sejtek tápfolyadékát az 1. tenyésztési napot követően 10 mM lítium kloriddal egészítettük ki, ezzel is elősegítve a jobb barrier tulajdonságok kialakulását (Weksler és mtsai., 2013).

2.5. Transzendoteliális elektromos ellenállás mérése

Az endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok határozzák meg a sejtek polaritását és szabályozzák a paracelluláris transzportúton való anyagátjutást. Az *in vitro* mért TEER (Ωcm^2) a sejtközi kapcsolatok ionokkal szembeni átteresztőképességét adja meg. A mérést EVOM2 rezisztenciamérővel (World Precision Instruments Inc., USA) végeztük. Ehhez a mérőberendezéshez csatlakoztattuk a biochip elektródáit, valamint a tenyésztő betétek esetén a gyári STX-2 pálca alakú elektródákat. Amennyiben a sejtek konfluens egysejtréteget alkotnak és a sejtközi kapcsolatok kellőképpen zárnak, akkor a két kompartment közötti elektromos ellenállás megnő. A TEER mérés nem invazív, az alacsony frekvenciájú váltóárammal történő mérés nem károsítja a sejtréteget, ezért a mérés többször vagy akár folyamatosan is végezhető. A kapott TEER értékeket átlagoltuk majd levontuk belőle a sejtek nélküli chipen ill. tenyésztő betéten mért háttér értékek átlagát. Kísérleteink során a TEER mérést minden nap elvégeztük.

2.6. Permeabilitás-vizsgálat

Az agyi endotélsejtrétegek permeabilitását három, *in vivo* igen alacsony permeabilitási értékkel rendelkező jelzőanyaggal vizsgáltuk: nátrium fluoreszceinnel (M: 376 Da), fluoreszcein izotiocianáttal jelölt dextránnal (FITC-dextrán; M: 4,4 kDa) és albuminhoz kötött Evans kék festék (M: 67 kDa) (Veszélka és mtsai., 2013). A permeabilitási kísérlethez a biochip felső kompartmentjében lévő médiumot lecseréltük 250 µl Ringer-Hepes oldatra, amely a jelzőanyagokat az alábbi koncentrációkban tartalmazta: 170 µg/ml Evans kék 1 mg/ml borjú szérum albuminhoz (BSA) kötve (EBA), vagy 10 µg/ml fluoreszcein, vagy 100 µg/ml FITC-dextrán. Az abluminális kompartmentbe 500 µl Ringer-Hepes oldatot tettünk. A mérés 20., 40. és 60. percében az alsó csatorna puffer oldatát új, tiszta 500 µl oldatra cseréltük, az átjutott jelzőanyagot tartalmazó összegyűjtött puffert a méréshez 96 lyukú lemezbe mértük (100 µl/well). A sejtenyészítő betétek esetén ugyanezt a kísérleti elrendezést használtuk azzal a különbséggel, hogy a betéteket 12-lyukú tenyésztőlemezbe helyeztük, a felső kompartment 500 µl, az alsó kompartment: 1500 µl térfogatú volt. A betéteket a mérés 20., 40. és 60. percében áthelyeztük a lemez következő Ringer-Hepes tartalmazó lyukába. A biochipet és a lemezeket a mérés alatt 37 °C-on CO₂ inkubátorban, síkrázó készüléken tartottuk (100 fordulat/perc, OS10 orbital shaker, BioSan, Lettország), hogy biztosítsuk az oldatok folyamatos, nagyon enyhe mozgását, ami a permeabilitás-méréshez szükséges. Az alsó csatornából és a tenyésztőedény lyukaiban maradt oldatokból határoztuk meg a jelzőanyagok koncentrációját. A fluoreszcein és a FITC-dextrán emisszióját 485 nm-en történt gerjesztés után 520 nm-en, az EBA emisszióját 584 nm-en történő gerjesztés után 680 nm-en határoztuk meg többlyukú lemez leolvasóval (Fluostar Optima, BMG Labtechnologies). Az egyes anyagok sejtrétegen való átjutását permeabilitási együtthatóval jellemezhetjük (P_{app} , látszólagos permeabilitási koefficiens), amit Fick törvénye alapján a vese clearance analógiájára határozunk meg (2. egyenlet, Hellinger és mtsai., 2012).

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

2. egyenlet. Az endotélsejtrétegen keresztüli transzport jellemzésére alkalmazott permeabilitási koefficiens értékek számolásához használt matematikai képlet. $[C]_A$, jelzőanyag abluminális koncentrációja; V_A , abluminális térfogat; A , a permeabilis membrán felszíne; $[C]_L$, jelzőanyag luminális koncentrációja.

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

2.7. Immunhisztokémia

A permeabilitás vizsgálat után az agyi endotélsejtrétegeken immunhisztokémiai festést végeztünk a β -katenin kapcsolófehérjére, ami az adherens sejtkapcsoló struktúrák citoplazmás linkere. A sejtréteget háromszor mostuk Ringer-Hepes pufferrel, hogy eltávolítsuk a maradék jelzőanyagot. Ezután a sejteket szobahőmérsékleten fixáltuk 10 percig metanol és aceton 1:1 arányú elegyével. A sejteket háromszor mostuk foszfátpuffer (PBS) oldattal, majd a nem specifikus kötőhelyeket 3%-os BSA-PBS oldattal 30 percig szobahőmérsékleten blokkoltuk. Ezután a nyúlban termelt anti- β -katenin elsődleges antitesttel egy éjszakán át 4°C -on, míg a Cy3-kapcsolt anti-nyúl másodlagos antitesttel és a Hoechst 33342 magfestéssel 1 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az elsődleges antitestet a blokkolóban, míg a másodlagos antitestet PBS-ben hígítottuk. A két antitesttel való kezelés között a sejteket többször mostuk PBS-sel. Az utolsó lépés után a mintákat lefedtük (Fluoromount, Southern Biotech, USA) és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Nikon, Japán és Leica, Németország).

2.8. Statisztikai kiértékelés

Minden adatot átlag $\pm$ S.D. értéként adtuk meg. A különböző adatsorokon kétutas variancia analízist követően Bonferroni-tesztet végeztünk Graphpad Prism 5.0 program (GraphPad Software Inc., USA) segítségével. A $p < 0.05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A párhuzamos minták száma 3-6 volt kísérletenként.

3. Eredmények

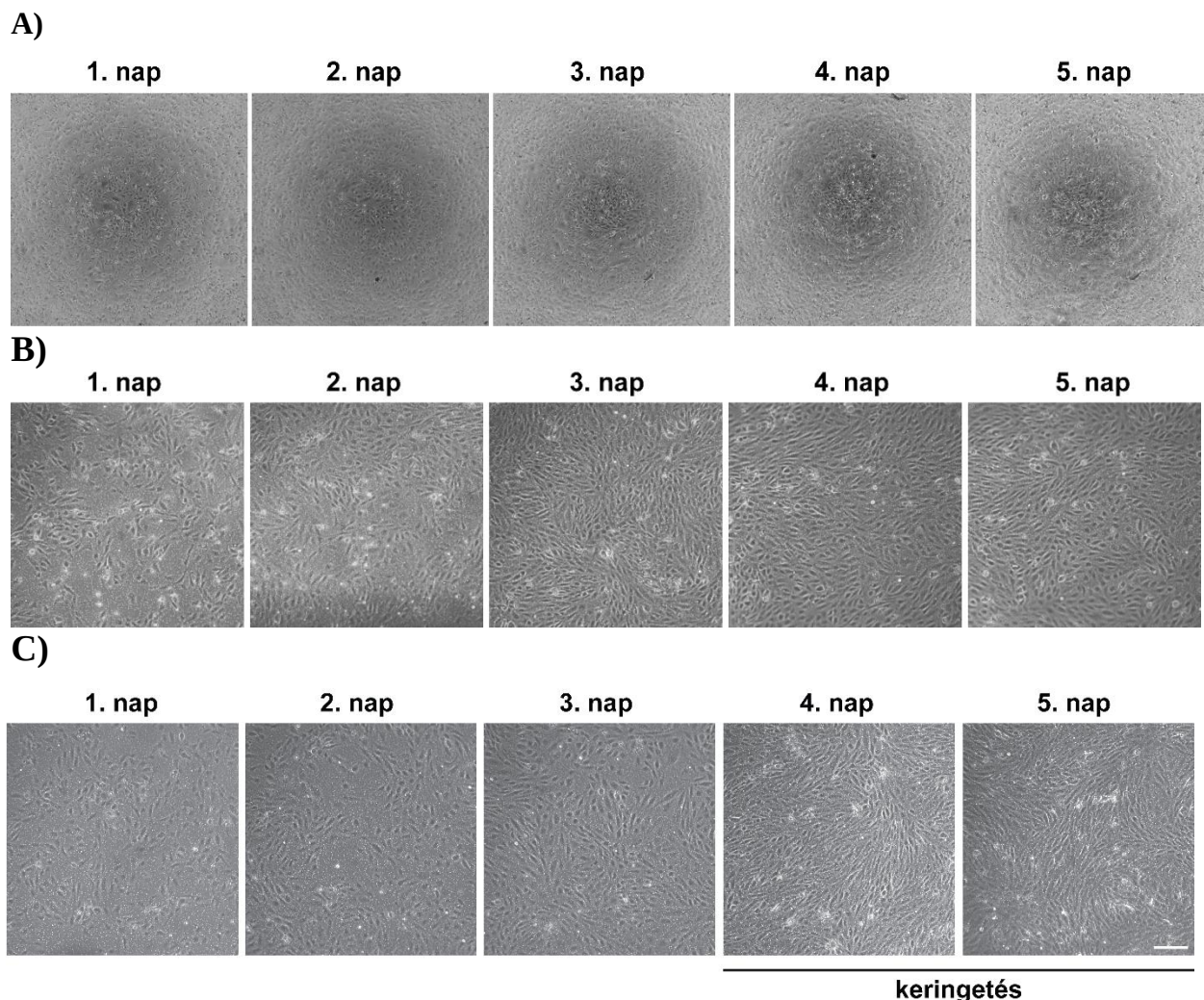
Kísérleteink során a D3 humán agyi endotél sejtvonal növekedését és barrier tulajdonságait jellemeztük a mikrofluidikai biochip modellen statikus és dinamikus körülmények között, valamint eredményeinket összehasonlítottuk Transwell sejttenyésztő betéteken kapott mérésekkel.

3.1. Áramlás létrehozása a mikroelektronikai biochipen

Az új mikrofluidikai integrált biochipen sikeresen tenyésztettük a D3 agyi endotél sejtvonalat (8. ábra). A patkányfarok kollagénnel bevont membrán felszínén a chipben az alacsony fokozatú, 0.1 dyn nyírófeszültségnek megfelelő áramoltatás hatására a sejtréteg továbbra is konfluens maradt és használhatónak bizonyult a kísérleteink elvégzésére. A tápfolyadékot a perisztaltikus pumpa segítségével átszívtuk a rendszeren, ahogy ez a 7. ábrán látható.

3.2. Áramlás hatása a sejtek növekedésére: fáziskontraszt mikroszkópia

A humán agyi endotél sejtvonal növekedését, az egysejtréteg kialakítására való képességét és a sejtek morfológiáját fáziskontraszt mikroszkópiával követtük 5 napon keresztül (8. ábra), amíg tenyészetek el nem érték a kísérlet során a legmagasabb TEER értéket (9. ábra). A biochip esetén a sejtek már 3 órával a szélesztés után letapadtak, de a második napig nem alkotnak konfluens tenyészetet. A D3 sejtek növekedése egyenletes, a harmadik napra kialakul az agyi mikroér endotélsejtekre jellemző örvényszerű sejtminiatúra. Ez a statikus modell esetén stabilizálódik és egy szinten marad, míg a dinamikus modell esetében a sejtek a folyásiránynak megfelelően orientálódnak, és a korábban is megfigyelt örvényszerű miniatúra kihangsúlyozódik (8. ábra). Fontos megjegyezni, hogy az új eszközben is kialakul a konfluens endotél egysejtréteg és a keringetésre is stabil marad. Ennek az eredménynek az elérése fontos mérföldkő volt a vér-agy gát modell kifejlesztésében. A sejttenyésztő betét esetén a letapadó sejtek szinte azonnal folytonos réteget képeznek, de a szorosabb gát kialakulásához 5 napra van szükség (8.A. ábra). Ebben a rendszerben folyadékáramlást (dinamikus modell) nem lehetséges létrehozni, így a sejtek alakja és orientációja nem változik, de az egysejtréteg végig megmarad. Optikai szempontból a mikrofluidikai modell sokkal jobb mikroszkópos képek készítését teszi lehetővé a sejtekről.

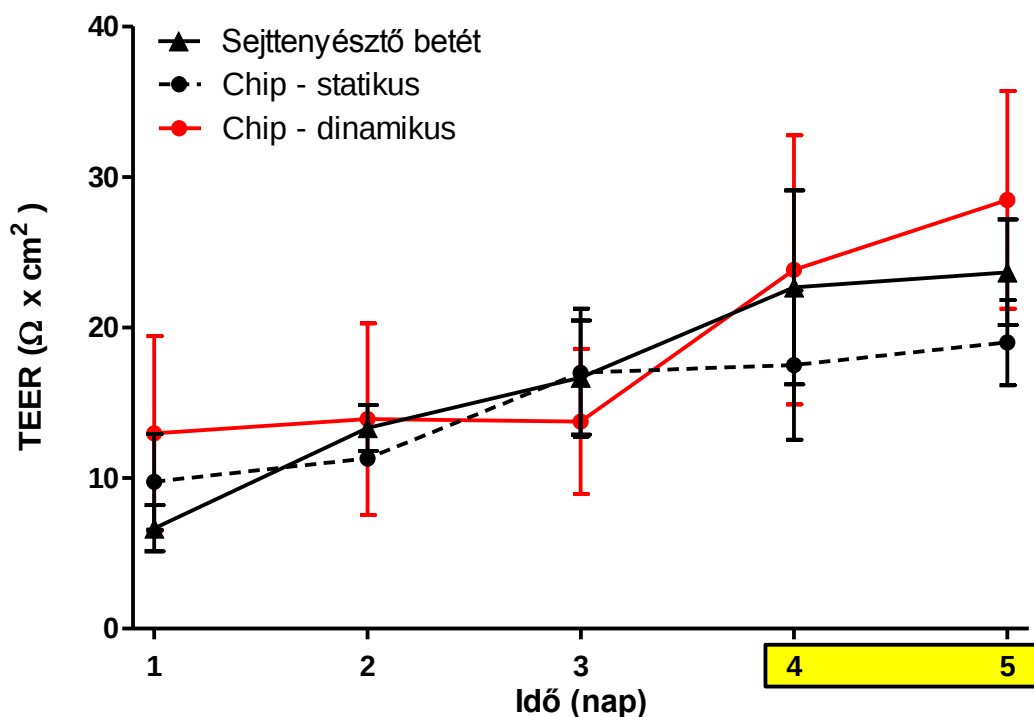


8. ábra. D3 humán agyi endotél sejtvonal növekedésének követése fáziskontraszt mikroszkópiával. A) sejttenyésztő betét, B) statikus biochip modell, C) dinamikus biochip modell. A dinamikus modellben a tenyésztés 4. és 5. napján tápfolyadék keringetést alkalmaztunk.

3.3. Áramlás hatása agyi endotélsejtek gátfunkciójára: TEER mérés

A humán agyi endotélsejtek közötti kapcsolatok erősségét a sejtréteg ionárammal szemben mutatott ellenállásának mérésével követtük minden tenyésztési napon (9. ábra). A mért TEER értékekből a sejttenyésztő médiummal feltöltött, de sejtet nem tartalmazó chipen mért ellenállás értékeket levontuk, amely átlagosan $40 \Omega\text{cm}^2$ volt. Ugyanez a háttér rezisztencia érték sejttenyésztő betéteken $70 \Omega\text{cm}^2$. A sejtek szélesztését követő első tenyésztési napon mindhárom rendszer esetén $10 \Omega\text{cm}^2$ körüli ellenállást mértünk. A legmagasabb ellenállásértéket a dinamikus modell esetén értük el, az 5. napon $38 \Omega\text{cm}^2$ -t,

ehhez képest a sejtenyésző betéten nevelt D3 sejteknél maximum $24 \Omega\text{cm}^2$ -t, az áramoltatás nélküli chip esetén maximum $19 \Omega\text{cm}^2$ ellenállás értékeket kaptunk.



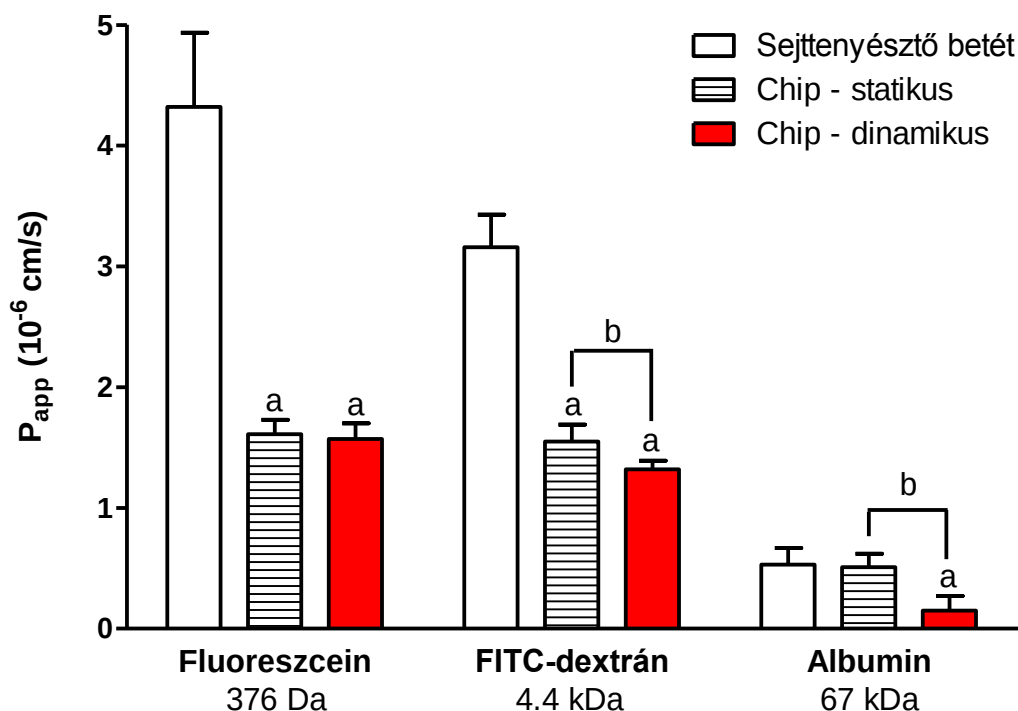
9. ábra. D3 humán agyi endotél egysejtrétegek transzendoteliális elektromos ellenállásának (TEER) követése 5 tenyésztési napon keresztül három modellen. Sárga téglalap: a tenyésztés 4. és 5. napján keringetést alkalmaztunk. $n=3$.

Összességében azonban elmondható, hogy a három rendszeren mért rezisztencia adatok az 5 tenyésztési napon folyamatosan, közel egyenletes növekedést mutattak. Az 5. napon, a dinamikus modellen mért magasabb értékek átlaga azonban nem különbözött szignifikánsan a sejtenyésző betéteken és a statikus chip modellen mért TEER értékektől.

3.4. Áramlás hatása agyi endotélsejtek gátfunkciójára: permeabilitás mérés

A rezisztencia mérés mellett az endotélsejtrétegek gátműködését tovább vizsgáltuk az 5. tenyésztési napon három jelzőanyag permeabilitási együtthatójának meghatározásával. Az agyi endotélsejtréteg permeabilitását fluoreszcein, FITC-dextrán és EBA markerekkel teszteltük (10. ábra). A chipen statikus és dinamikus körülmények között tartott agyi endotélsejtrétegek fluoreszceinre és FITC-dextránra mért permeabilitásában kétszer kisebb értékeket kaptunk a sejtenyésző betétekéhez képest, míg a legnagyobb jelzőanyag, az albumin átjutásában nem volt különbség a statikus chipen és a sejtenyésző betéten létrehozott

sejtes modellek között. A mikrofluidikai eszközön két nap tápfolyadék-keringetés hatására a FITC-dextrán és az albumin jelzőanyagok átjutása a D3 sejtrétegen szignifikánsan csökkent, míg a fluoreszcein transzportja a statikus chip rendszerhez képest nem változott.

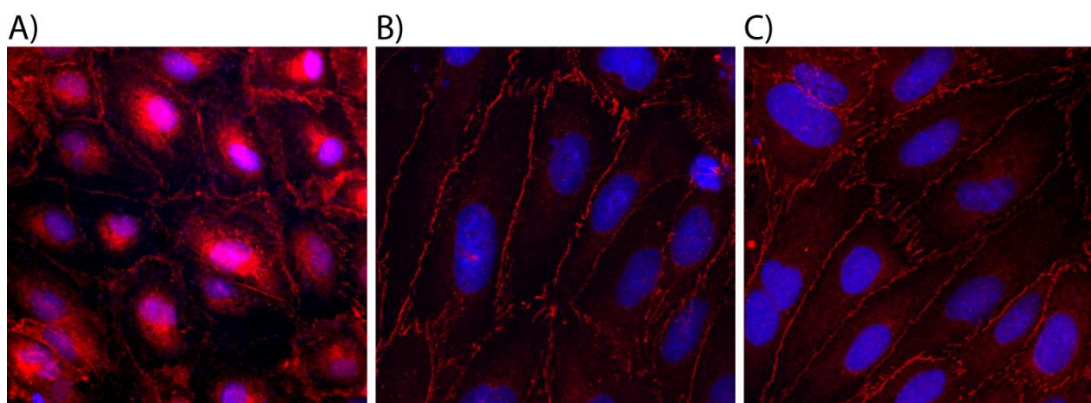


10. ábra. D3 humán agyi endotél egysejtrétegek permeabilitása fluoreszcein, FITC-dextrán és albumin jelzőanyagokra az 5. tenyésztési napon. n=3-6; a, $P < 0.05$ a sejttenyésztő betétéhez képest; b, $P < 0.05$ a statikus chip modellhez képest. Da: dalton.

3.5. Áramlás hatása agyi endotélsejtek gátfunkciójára: immunhisztokémia

A funkcionális mérések (permeabilitási és TEER adatok) mellett megvizsgáltuk, hogy milyen hatása van a statikus és dinamikus körülmények közötti tenyésztésnek a β -katenin kapcsolófehérje festődésére agyi endotélsejtekben. A kétféle chip elrendezés és a sejttenyésztő betétek esetében is az agyi endotélsejtek határán, a sejtközötti kapcsolatokra lokalizálódó egyenletes, folyamatos membránfestődést láthatunk (11. ábra). A festés is igazolja, hogy a D3 sejtrétegek konfluensek, egybefüggőek, azonban az endotélre jellemző hosszúkas, orsó alakú sejtfforma csak a chipben való tenyésztés esetén volt megfigyelhető. A mikrofluidikai eszközben dinamikus körülmények között a sejthalak még jobban elnyúlik, a sejthalak keskenyebb, hosszúkasabb. A tenyésztőbetéten a β -katenin immunfestés nem csak a sejtek

határán, hanem a citoplazmában és a mag területén is megfigyelhető volt szemben a chipben tenyésztett D3 sejtekkel.



11. ábra. D3 humán agyi endotél egysejtrétegen β -katenin immunhisztokémiai festés az 5. tenyésztési napon. A) sejttenyésztő betét, B) statikus biochip modell, C) dinamikus biochip modell. A dinamikus modellen a tenyésztés 4. és 5. napján tápfolyadék keringetést alkalmaztunk.

4. Megbeszélés

A sejtvonalak és az *in vitro* vér-agy gát modellek használata leegyszerűsíti és felgyorsítja a vér-agy gát kutatást, így például a központi idegrendszeri gyógyszerjelöltek fejlesztését (Deli, 2011). Az agyi mikroerek *in vivo* fiziológiás körülményeinek minél pontosabb közelítése egyre jobb sejttenyésztetes modelleket eredményez. Az egyik legfontosabb ilyen, a vér-agy gát szempontjából kevésbé vizsgált fiziológiás paraméter az erekben áramló vér által az érfal sejtjeire gyakorolt nyírófeszültség. Egyre több a bizonyíték, hogy a folyadékáramlás okozta nyírófeszültség hatással van a perifériás vaszkuláris endotélsejtek gátfunkciójára (Tarbell, 2010).

4.1. Vér-agy gát modellezés mikrofluidikai chipekkel

Az elmúlt években nagy hangsúly került a lab-on-a-chip eszközök és modellek létrehozására és továbbfejlesztésére, azonban az eddig leírt modellek nem rendelkeznek minden olyan fontos jellemzővel, ami a vér-agy gát modellezés szempontjából fontos (1. táblázat). Az együttműködő SZBK csoportok által korábban létrehozott mikroelektronikai chip fejlesztésekor fő szempont volt az alábbi jellemzők és funkciók integrálása: membránnal elválasztott kétcsatornás rendszer; ellenállás mérése beépített elektródokkal; a tápfolyadék

áramoltatása; anyagok permeabilitásának tesztelése; a folyamatos mikroszkópos megfigyelés lehetősége. Ezen az új mikrofluidikai eszközön sikeresen hoztunk létre humán agyi endotél egysejtrétegeket D3 sejtvonal alkalmazásával mind statikus, mind dinamikus tenyésztési körülmények között. Léteznek már olyan két kompartmentből álló modellrendszerek, amelyeken az ellenállásmérés is lehetséges, azonban ezeket a chip modelleket eddig nem alkalmazták permeabilitási vizsgálatokra, aminek fő oka a mikroméret, tehát a visszamérhető folyadékok térfogata nem elegendő kismolekulák hagyományos tömegspektrometriai analíziséhez (Avdeef és mtsai., közlés alatt). A mi vér-agy gát modellünk geometriai paraméterei miatt azonban rendelkezik a megfelelő térfogatokkal analitikai vizsgálatokhoz, így a további alkalmazása ígéretes lehet a gyógyszerkutatásban is.

4.2. Áramlás hatása agyi endotélsejtek morfológiájára

A chipen jól követhető volt a sejtek növekedése és a sejtrétegek állapota fáziskontraszt mikroszkóppal. Ezzel szemben a tenyésztőbetétén a sejtréteg nehezen látható, és az egyedi sejtek alakja nem különíthető el. Ennek több oka is lehet: (i) a chip készítéséhez használt üveg fedőlemezek optikai tulajdonságai jobbak, mint a tenyésztéshez használt műanyagoké; (ii) a tápfolyadék meniszkusza a tenyésztőbetéteknél optikai hibát eredményez. A tenyésztőbetétekkel szemben a chipen tenyésztett D3 agyi endotélsejtek jellegzetes agyi mikroér endotélsejt morfológiát mutatnak. Mivel mind a statikus, mind a dinamikus tenyésztési körülményeknél jól látható volt ez a változás, feltételezzük, hogy a keskeny és hosszú csatornarendszer kialakítása hozza létre ezt a hatást. A fáziskontraszt mikroszkópos képek és az immunhisztokémiai festés is hasonló sejtalakváltozást mutatott, a sejtek elnyúltabbá váltak, amit a tápfolyadék áramoltatás még kifejezettebbé tett. A dinamikus tenyésztési körülmények között általunk megfigyelt változások összhangban állnak vaszkuláris endotélsejteken korábban leírt morfológiai változásokkal (Malek és Izumo, 1996; Tarbell, 2010).

4.3. Áramlás hatása agyi endotélsejtek gátfunkciójára

A rezisztencia adatok alapján mindhárom modellen a szakirodalomban leírtak megfelelő értékeket kaptunk (Weksler és mtsai., 2013), azonban nem volt különbség a tenyésztőbetétén, illetve a chipen statikus és dinamikus körülmények között tenyésztett D3 sejtrétege ellenállása között. Ennek egyik lehetséges oka, hogy a D3 sejtek nem hoznak létre

igazán szoros paracelluláris barriert más vér-agy gát modellekhez képest (Veszélka és mtsai., 2011). D3 agyi endotél sejteken mért maximális ellenállás értékek egyes dinamikus modelleken (DIV-BBB) jóval magasabbak, mint az általunk mért értékek (Cucullo és mtsai., 2013). Fontos különbségek a rendszerek között, hogy mi kereskedelmi forgalomban kapható mérőműszert használtunk, illetve kísérleteink során alacsony áramlási nyírófeszültséget alkalmaztunk, ami az eltérő eredményeket magyarázhatja. Folyamatban van egy alacsonyabb belmagasságú csatorna kifejlesztése, amivel lehetővé válik magasabb nyírófeszültség hatásának tanulmányozása is. Az új mikrofluidikai eszközön az agyi endotélsejtrétegek permeabilitása csökkent közepes és nagy molekulájú jelzőanyagra a keringetés hatására, ami a barrier szorosabbá válását jelzi. A legkisebb jelzőanyag, a fluoreszcein átjutása a rezisztencia értékekhez hasonlóan nem változott dinamikus körülmények között, ami arra utal, hogy a paracelluláris útvonalon való anyagátjutást az alacsony sebességű keringetés nem változtatja meg D3 sejteken. Az általunk D3 sejtekkel tenyésztőbetétben mért FITC-dextrán permeabilitási együttható a szakirodalomban leírt értékeknek a fele (Weksler és mtsai., 2005, 2013) ami tovább csökken a chip modell esetében, és azt jelzi, hogy a mikrofluidikai eszköz alkalmas vér-agy gát modellezésre.

5. Összefoglalás

Az SZBK-ban kifejlesztett új mikroelektronikai chipet sikeresen alkalmaztuk a vér-agy gát humán agyi endotélsejtekkel létrehozott egyszerűsített statikus és dinamikus modelljeinek összehasonlítására. Az áramoltatás hatására megváltozott az endotélsejtek morfológiája. A chipen dinamikus tenyésztési körülmények között a barrier tulajdonságok javultak a permeabilitás tekintetében a közepes és nagy molekulájú jelzőanyagokra. További terveink között szerepel a mikrofluidikai eszközön a vér-agy gát primer háromsejtes ko-kultúra modelljének összeállítása, tesztelése, és azon az áramlás hatásának vizsgálata. Az új vér-agy gát modell alkalmas lehet élettani és kórélettani változások eddiginél komplexebb vizsgálatára, valamint hatóanyagok átjutásának tesztelésére.

6. Irodalomjegyzék

- Abbott NJ, Rönnebeck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Rev. Neurosci.* 7:41-53, 2006.
- Achyuta AK, Conway AJ, Crouse RB, Bannister EC, Lee RN, Katnik CP, Behensky AA, Cuevas J, Sundaram SS. A modular approach to create a neurovascular unit-on-a-chip. *Lab Chip.* 21;13(4):542-53, 2013.
- Avdeef A, Deli MA, Neuhaus W. In vitro assays for assessing BBB permeability: artificial membrane and cell culture models. Szerk.: Di L, Kerns EH. *Blood–Brain Barrier in Drug Discovery: Optimizing Brain Exposure of CNS Drugs and Minimizing Brain Side Effects for Peripheral Drugs*, John Wiley & Sons, Inc. (nyomdában, megjelenés: 2015)
- de Boer AG, Gaillard PJ, Breimer DD. The transference of results between blood-brain barrier cell culture systems. *Eur J Pharm Sci.* 8(1):1–4, 1999.
- Booth R, Noh S, Kim H. A multiple-channel, multiple-assay platform for characterization of full-range shear stress effects on vascular endothelial cells. *Lab Chip*, 14(11):1880-90, 2014
- Byrne, J.H., Roberts J.L. *From Molecules to Networks - An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience*. Elsevier, 2004.
- Colazzo F, Alrashed F, Saratchandra P, Carubelli I, Chester AH, Yacoub MH, Taylor PM, Somers P. Shear stress and VEGF enhance endothelial differentiation of human adipose-derived stem cells. *Growth Factors.* 5:139-49, 2014.
- Colgan OC, Ferguson G, Collins NT, Murphy RP, Meade G, Cahill PA, Cummins PM. Regulation of bovine brain microvascular endothelial tight junction assembly and barrier function by laminar shear stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292(6):H3190-7, 2007.
- Conway DE, Breckenridge MT, Hinde E, Gratton E, Chen CS, Schwartz MA. Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1. *Curr Biol.* 23(11):1024-30, 2013.
- Cucullo L, Couraud PO, Weksler B, Romero IA, Hossain M, Rapp E, Janigro D. Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28(2):312-28, 2008.
- Cucullo L, Hossain M, Puvenna V, Marchi N, Janigro D. The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology. *BMC Neurosci.* 12:40, 2011.
- Cucullo L, Hossain M, Tierney W, Janigro D. A new dynamic in vitro modular capillaries-venules modular system: cerebrovascular physiology in a box. *BMC Neurosci.* 14:18, 2013.
- Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol.* 25(1):59-127, 2005.

- Deli MA, Kálmán M. Vér-agy gát: kölcsönhatás gliasejtek és az agyi endothelsejtek között. In: Glia, Huszti Zs, Kálmán M (szerkesztők), Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 345-368, 2008.
- Deli MA. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *BBA Biomembranes*, 2008.
- Deli MA. Drug Transport and the Blood-Brain Barrier. In: *Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug Candidates*, 144-165, 2011.
- Deli MA. Vér-agy gát modellek létrehozása, jellemzése és alkalmazása gyógyszer tudományi kutatásokban. MTA doktori értekezés, 148 p. 2010.
- Griep LM, Wolbers F, de Wagenaar B, ter Braak PM, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, Vermes I, van der Meer AD, van den Berg A. BBB on chip: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function. *Biomed. Microdevices*. 15(1):145-50, 2013.
- Goldstein GW, Betz AL. A vér-agy gát. *Tudomány*. 11:40-53, 1986
- Hahn, C., and Schwartz, M.A. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 53–62, 2009.
- Hellinger E, Veszelka S, Tóth AE, Walter F, Kittel A, Bakk ML, Tihanyi K, Háda V, Nakagawa S, Duy TD, Niwa M, Deli MA, Vastag M. Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 82(2):340-51, 2012.
- Joó F. Endothelial cells of the brain and other organ systems: some similarities and differences. *Prog Neurobiol.* 48: 255-273, 1996.
- Joó, F., Karnushina, I., A procedure for the isolation of capillaries from rat brain. *Cytobios* 8, 41-48, 1973.
- Koutsiaris AG, Tachmitzi SV, Batis N, Kotoula G, Karabatsas CH, Tsironi E, Chatzoulis DZ. Volume flow and wall shear stress quantification in the human conjunctival capillaries and post-capillary venules in vivo. *Biorheology*. 44(5–6):375–386, 2007.
- Malek AM, Izumo S. Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J Cell Sci.*, 109 (Pt4):713-26, 1996.
- Prabhakar Pandian B, Shen MC, Nichols JB, Mills IR, Sidoryk-Wegrzynowicz M, Aschner M, Pant K. SyM-BBB: a microfluidic Blood Brain Barrier model. *Lab Chip*. 13(6):1093-101, 1996.
- Redmond EM, Cahill PA, Sitzmann JV. Perfused transcapillary smooth muscle and endothelial cell co-culture - a novel in vitro model. *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 31(8):601–609, 1995.
- Sackmann EK, Fulton AL, Beebe DJ, The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*. 507(7491):181-9, 2014.

- Siddharthan V, Kim YV, Liu S, Kim KS. Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. *Brain Res.* 1147:39-50, 2007.
- Tarbell JM. Shear stress and the endothelial transport barrier. *Cardiovasc. Res.* 87:320–330, 2010.
- Veszelka S, Kittel Á, Deli MA. Tools for Modelling Blood-Brain Barrier Penetrability. In: *Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug Candidates*, 166-188, 2011.
- Veszelka S, Tóth AE, Walter FR, Datki Z, Mózes E, Fülöp L, Bozsó Z, Hellinger E, Vastag M, Orsolits B, Környei Z, Penke B, Deli MA. Docosahexaenoic acid reduces amyloid- β induced toxicity in cells of the neurovascular unit. *J. Alzheimers Dis.* 2013;36(3):487-501, 2013.
- Weksler B, Romero IA, Couraud PO. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS.* 10(1):16, 2013.
- 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. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* 19(13):1872-4, 2005.

7. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm

Dr. Deli Máriának, az MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Biológiai Barrierek Kutatócsoport tudományos tanácsadójának, témavezetőmnek, hogy lehetőséget adott és végig támogatott munkám során;

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

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

Dr. Ormos Pálnak, az MTA SZBK főigazgatójának és az Optikai Mikromanipuláció Kutatócsoport vezetőjének, Dr. Valkai Sándornak és Kincses Andrásnak a Biomolekuláris Elektronikai Kutatócsoport tagjainak munkám során nyújtott segítségét és tanácsait, valamint

Walter Fruzsínának, az MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Biológiai Barrierek Kutatócsoport tudományos segédmunkatársának türelmét, a kísérleteim elvégzéséhez és dolgozatom megírásához adott hasznos tanácsait és áldozatos munkáját.

8. Tételes szakmai hozzájárulás

Alulírott Petneházi András a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a

- mikrofluidikai chip készítését,
- a chipen való sejttenyésztést,
- transzendoteliális elektromos ellenállás mérését,
- permeabilitás mérését,
- és immunhisztokémiai festést,

végeztem el.

Szeged, 2014. november 13.

.....
aláírás