

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Általános Orvostudományi Kar - Természettudományi és Informatikai Kar

Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszék

PROLIFERÁCIÓS INDEX MEGHATÁROZÁSA PATKÁNYOKBÓL
SZÁRMAZTATOTT TISZTA MIKROGLIA TENYÉSZETEKBEN

Dulka Karolina

PhD hallgató

Témavezető: Dr. Gulya Károly

Tanszékvezető egyetemi tanár

2015

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	3
2. Tartalmi összefoglaló	4
3. Irodalmi áttekintés.....	5
3.1. Mikroglia sejtek	5
3.2. A Ki-67 fehérje, mint proliferációs marker	9
4. Célkitűzés.....	10
5. Anyagok és módszerek.....	11
5.1. Anyagok.....	11
5.2. Tiszta mikroglia kultúra készítése	11
5.3. A tenyészetek kezelése	12
5.4. Viabilitási (életképességi) teszt	13
5.5. Ki-67 és Iba1 fluoreszcens immuncitokémia.....	14
6. Eredmények.....	15
6.1. Proliferációs index meghatározása	15
6.2. Sejt túlélés analízis.....	18
7. Összegzés	19
Irodalomjegyzék	21

1. Rövidítések jegyzéke

BSA	borjúsavó szérum albumin
CD	“cluster of differentiation”
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle-féle médium
FBS	fötális borjúsavó
GM-CSF	granulocita/monocita-kolóniastimuláló faktor
Iba1	ionizált kalcium adaptor fehérje
IL	interleukin
LPS	lipopoliszacharid
M-CSF	monocita-kolóniastimuláló faktor
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
mtsai	munkatársai
NGS	normál kecske szérum
PAMP	patogén asszociált molekuláris mintázat
PBS	sótartalmú foszfát puffer
PI	proliferációs index
PRR	mintázat felismerő receptor
PVP	Polivinil-pirrolidin
VEGF	vaszkuláris endotheliális növekedési faktor
TLR-4	Toll-szerű receptor-4
TFP	trifluoperazin

2. Tartalmi összefoglaló

A mikroglia sejtek a központi idegrendszerben előforduló speciális makrofág sejtek, amelyek az agyban a helyi immunfelügyeletet látják el. A központi idegrendszer bármilyen típusú sérülése következtében a mikroglia aktiválódik és osztódni kezdenek. A mikroglia sejtek fontos tulajdonsága a proliferációs aktivitás, amelynek számszerű meghatározására a Ki-67 immunhisztokémiai reakció alkalmazható (Ki-67 proliferációs index). A sejtmagban előforduló Ki-67 fehérje a nyugalmi fázis kivételével a sejtciklus valamennyi fázisában kifejeződik, ami alkalmassá teszi az osztódó sejtek immunhisztokémiai detektálására.

A munkám során 18 napos patkányembriók agykérgéből készített tiszta mikroglia tenyészeteket különböző gyógyszerszármazékokkal (calmidazolium chloride, trifluoperazine, rosuvastatin és aspirin) kezeltem, majd a sejtek életképességét tripánkékes festéssel, a proliferációs indexet pedig fluoreszcens immuncitokémia segítségével határoztam meg. A proliferációs indexet úgy definiáltam, hogy megállapítottam, hány sejt volt Ki-67-pozitív mikroglia az 1,000 mikroglia sejtből.

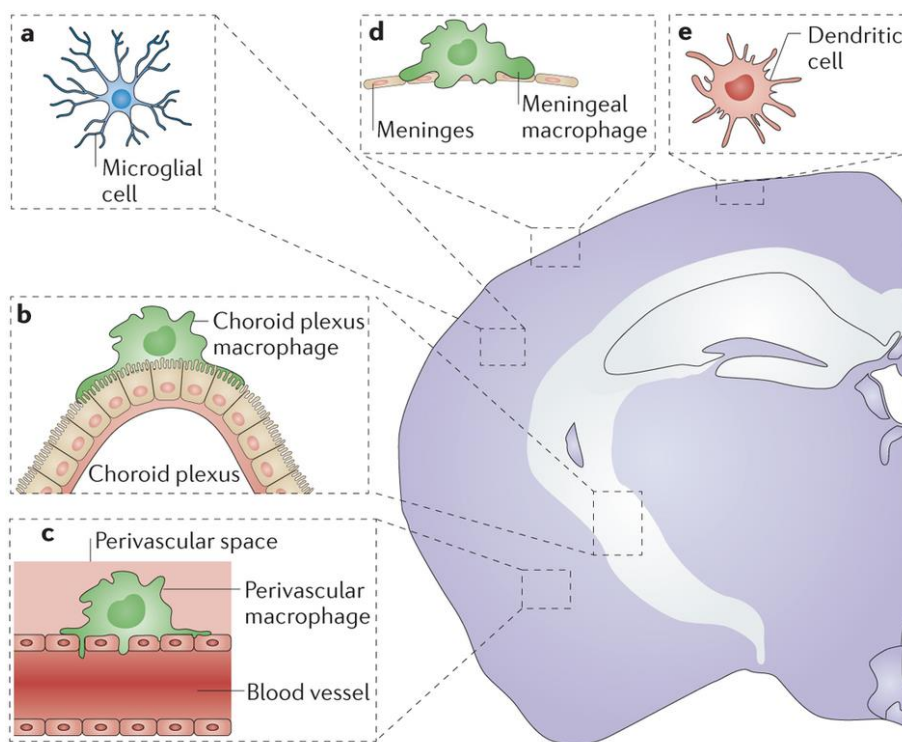
Eredményeim szerint az aspirin növeli a mikroglia sejtek proliferációs indexét, míg a rosuvastatin és a trifluoperazine csökkenti azt. Mindezek mellett tripánkékes jelöléssel bebizonyítottam, hogy a trifluoperazine csökkenti a sejtek életképességét is.

***Kulcsszavak:* mikroglia, Ki-67 fehérje, proliferációs index, sejt életképesség**

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Mikroglia sejtek

A központi idegrendszerben nagy számban előforduló idegsejtek mellett egyéb sejtípusok is megtalálhatók, többek között a nem egységes neuroglia populáció sejtjei. A mikroglia sejt a teljes glia populáció 10-20%-át alkotja. Eredetét tekintve eltér azoktól, mert míg az idegsejtek és a többi gliális sejtípus az ektodermából származnak, a mikroglia mezodermális eredetű. A mikroglia a csontvelői „*haematopoetikus*” pluripotens őssejtből származtatható, ami interleukin-1 és interleukin-6 hatására először a myeloid sejtek előalakjává fejlődik, majd monocita-kolónistimuláló faktor serkentésével promonocitává, később monocitává alakul. A monociták agyszövetben lokalizált formái a mikroglia sejtek, amelyek az agyban a helyi immunfelügyeletért felelősek. Az agyszövetben létrejött bármilyen típusú sérülés következtében erős fagocitáló képességüknek köszönhetően eltávolítják a károsult idegsejteket, sejtmaradványokat, illetve a központi idegrendszerbe kerülő kórokozókat. A mezodermális eredetet több kísérlettel is bizonyították, amelyekben többek között igazolták, hogy a mikroglia sejtek makrofág-specifikus sejtfelszíni antigéneket expresszálnak, amelyek egyben alkalmasak a mikroglia kimutatására is. A homeosztatisz körülmények között agyterületenként változó mennyiségben, de nagyon egyenletesen eloszló mikroglia sejtek mellett az agyban számos más myeloid eredetű sejtpopuláció is megtalálható. Ebbe a heterogén csoportba sorolhatók többek között a perivaszkuláris sejtek, az agyhártya makrofágok és a plexus choroideus makrofágjai. Annak ellenére, hogy ezen sejtek mindegyike hasonló myeloid- és makrofág-specifikus markereket expresszál, illetve hasonló funkcióval bírnak, ontogenezisüket tekintve eltérőek. A mikroglia sejtek a primitív haematopoézis során jönnek létre, és már a korai embrionális korban bevándorolnak az agyi parenchimába, ellentétben a központi idegrendszer többi makrofágjával, amelyek a végleges haematopoézis során később alakulnak ki és jutnak be a központi idegrendszer határterületeire (Prinz és Priller, 2014). Ma általánosan elfogadott, hogy a mikroglia a mononukleáris makrofág rendszerből származnak és onnan nyerhetnek szükség esetén utánpótlást.



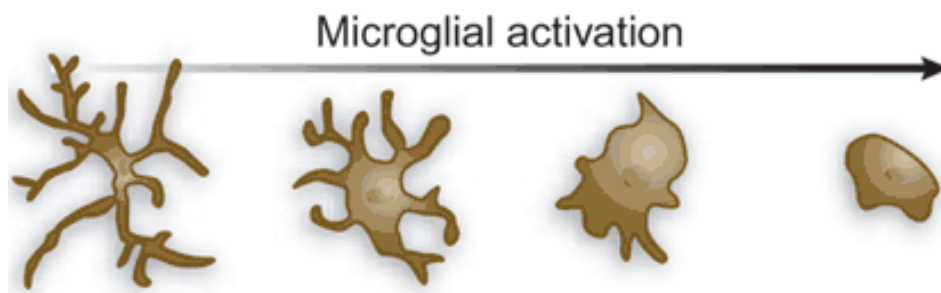
Nature Reviews | Neuroscience

Az agyban megtalálható myeloid eredetű sejtpopuláció. A szürke- és fehérállományon belül diffúzan előforduló mikrogliaik hosszú nyúlványaikkal a mikrokörnyezetük állandó monitorozását végzik (a). A többi myeloid eredetű sejt az agyszövet külső határain fordul elő, így a choroid plexus területén (b), az erek mentén (c), valamint az agyhártyáknál (d). Az agy határvonalai mentén előforduló makrofágok mellett kis számban dendritikus sejtek is megtalálhatóak.

<http://www.nature.com/nrn/journal/v15/n5/full/nrn3722.html>

A homeosztatisz körülmények közt normális működésű agyban a mikroglia sejtek inaktívak. Ezekre az úgynevezett nyugalmi állapotú, rezidens mikrogliaakra jellemző, hogy egészséges agyban is nagyon dinamikusak. Kis sejttesttel és fő, illetve mellékágakra tagolódo hosszú elágazó nyúlványokkal rendelkeznek. Sejtfelszíni nyúlványaikkal a környező szövetet sűrűn behálózzák, miközben a közvetlen környezetüket folyamatosan monitorozzák. A nyúlványos, nyugvó fenotípust a mikroglia megfelelő receptorain át részben neuronális szignálok (pl. CX3C-chemokin ligand 1, CD47, CD200) tartják fent (Saijo és Glass, 2011). Az agyat ért sérülés következtében a mikrogliaik aktiválódnak, miközben morfológiai és funkcionális változásokon mennek keresztül. Több tényezőt azonosítottak, amelyek befolyásolják a mikrogliaik aktivációját. Ezek közé sorolható a mikrobiális szignálok, a sejttörmelék jelenléte, az interferon-gamma (IF γ), IL-3, valamint a

neurodegeneráció során megjelenő α -szinuklein, β -amiloid és neuromelanin. A neurotranszmitterek - elsősorban az acetilkolin és a purinok - szintén szerepet játszhatnak a mikroglia aktiválásában. Szövetkárosodáskor a sérült sejtek ATP-t ürítenek, ezért az ATP-nek is szerepe lehet a mikroglia aktivációjában. Az aktiválódás folyamán a sejtek nyúlványaikat fokozatosan visszahúzzák, ezért a sejt megduzzad és lekerekedik. A sejtek másodlagos, vastagabb sejtfelszíni módosulásokat, pszeudopódiumokat hoznak létre, amelyekkel a sérülés helyére vándorolnak. A károsodás területén a mikroglia sejtek proliferálódnak. Az aktivált, amöboid alakot felvett sejtek membránja bekebelezésre alkalmas filopódiumokat, lamellipódiumokat képez. A bekebelezés után a mikroglia visszatérnek a nyugalmi állapotba, de egy újabb idegszöveti sérülés vagy kórokozó hatására ismét aktiválódnak (Floden és Combs, 2007). Azonban nagymértékű károsodás folyamán a fagocita tevékenységet követően a sejtek citoplazmája sejtörmelékekkel, fagocitált szemcsékkel telítődik. Ezeket a maradványokat a sejt már nem tudja lebontani, és így előregedett, granuláris mikroglia lesznek belőlük, amelyek már nem képesek visszatérni a rezidens állapotba (gitter sejt).



A mikroglia sejt aktivációja során morfológiai változáson megy keresztül. Az első, részletes leírást a mikroglia sejtekről ezüstkarbonátos vizsgálatai alapján Del Rio Hortega adta 1919-

ben. Már ő is megfigyelte, hogy a sejtek morfológiai diverzitással rendelkeznek.

Aktiválódásuk során hosszú, vékony nyúlványaikat visszahúzzák, a sejtek egyre inkább lekerekednek, miközben membránjuk állabakat, sejtfelszíni módosulásokat hoz létre.

(http://www.nature.com/neuro/journal/v9/n12/fig_tab/nn1206-1463_F1.html)

A mikroglia sejtek legfontosabb funkciója a sejtörmelékek, maradványok bekebelezése és eltávolítása. Az amöboid mikroglia fagocitáló tevékenysége fontos az idegrendszer fejlődése folyamán, mivel segítik a neuronhálózatok reorganizációját, a számon felüli szinapszisok eltávolítását és a fejlődés során feleslegessé vált gliasejtek és apoptotizáló idegsejtek eliminálását. A mononukleáris fagocita rendszer tagjaiként MHC I, II (fő hisztokompatibilitási komplex) expresszálása által központi szerepet töltenek be az

immunológiai felderítésben, antigén prezentációban és a patogének elleni immunválaszban. A mikroglia sejtek mintázatfelismerő receptorokat (PRR) expresszálnak, amelyek a baktériumokra és vírusokra jellemző patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP) ismerik fel. A PRR-ek közül a Toll-szerű receptorok (TLR) tagjai is megtalálhatók a mikroglia felszínén. Ennek köszönhetően a Gram-negatív baktériumok sejtalkomponense, az LPS (lipopoliszacharid) a TLR4 receptoron keresztül aktiválhatja a sejteket. A PRR-mediált szignalizáció különböző anyagok szintéziséhez vezet, amelyek a gyulladásos válasz elindításában és szabályozásában kulcsfontosságú citokinek, interleukinek és szolubilis faktorok lehetnek (IL-1,-6,-10, tumor nekrozis faktor, valamint a transzformációs növekedési faktor) (Kazuyuki és Shinichi, 1993). Ma is erősen vitatott, hogy a mikroglia neuroprotektív vagy inkább a neurotoxikus befolyása erősebb a központi idegrendszerben. Ez a vita azon alapul, hogy a mikroglia sejtek számos jótékony hatásukon kívül bizonyos feltételek mellett citotoxikus termékeket is szekretálnak, mint amilyenek a tumor nekrozis faktor, a nitrogén-monoxid vagy a szuperoxid. A neurotoxikus anyagok túlzott termelése révén a homeosztázis felborulhat, és a mikroglia a szervezet ellen fordulhat. Ez figyelhető meg különböző neurodegenerációs megbetegedésekben is, például az Alzheimer-kórban vagy a Parkinson kórban (Husztai és Kálmán, 2008; Imai és Kohsaka, 2002).

A mikroglia sejtek bármilyen típusú idegrendszeri károsodás hatására aktiválódnak, miközben több tulajdonságuk megváltozik, így a proliferációs képességük is. A kóros neurodegeneráció során olyan szignálmolekulák szabadulnak fel, amelyek kiválthatják a mikroglia sejtek osztódását. Ezeknek a szignálmolekuláknak köszönhetően a mikroglia felszaporodik az idegszöveti károsodás helyén. A szignálmolekulák közül nagy jelentőséggel bír a makrofág kolóniastimuláló faktor (CSF1), amely a sejtek proliferációját a CSF1 receptoron (CSF1R) keresztül segíti elő. A CSF1 upregulációja az Alzheimer-kórban is megfigyelhető. A CSF1R-on keresztül a mikroglia proliferációját váltja ki egy nemrégiben felfedezett citokin, az IL43 is. Kísérletek bizonyítják, hogy a CSF1R gátlásával a mikroglia osztódása is gátlódik, amelynek eredményeként a neuronok károsodása és ezáltal a betegség progressziója is csökken (Gómez-Nicola és mtsai, 2013). Az agyban ischemia, sérülés, illetve rosszindulatú glióma esetén vaszkuláris endothelialis növekedési faktor (VEGF), szignálmolekula expresszálódik. A VEGF családba számos mitogén tartozik, amelyek a VEGF-receptoron keresztül szintén a mikroglia proliferációját szabályozhatják (Forstreuter és mtsai, 2002). Mindezek mellett a mikroglia sejtek proliferációját stimulálják még a központi idegrendszer különböző típusú

károsodásai alkalmával expresszáldó pro-inflamatorikus citokinek is, mint amilyen a TNF- α és IL-1 β . Tehát a mikroglia proliferáció szabályozásában több molekula is lényeges lehet. Fontos a folyamat minél részletesebb megismerése ahhoz, hogy az agy immunfelügyeletét szabályozzuk, mivel ezek a sejtek a központi idegrendszer károsodásainak végkimenetelében kulcsfontosságúak. Sok esetben lényeges lehet annak felismerése, hogy a mikroglia sejtek milyen számban kapcsolódnak be a sejtciklusba. Erre több módszer is ismert, többek között a sejtciklus bizonyos fázisaiban megjelenő fehérjék (pl. Ki67) immuncitokémiai kimutatása.

3.2. A Ki-67 fehérje, mint proliferációs marker

A Ki-67 fehérje a sejtmagban előforduló fehérje, amely minden proliferáló sejtben (egészséges és tumor sejtekben egyaránt) jelen van. A sejtciklus részletes elemzése során kiderült, hogy a Ki-67 fehérje a sejtciklus valamennyi fázisában kifejeződik (G1, S, G2 valamint a mitózis során) de hiányzik a nyugvó sejtekben (G0). Magfehérje révén a Ki-67 fehérje a G1, S és G2 fázisokban a nukleoplazmában az M fázisban pedig a kondenzált kromatidákhoz asszociáltan figyelhető meg. A Ki-67 fehérjét akkor fedezték fel, amikor a humán Hodgkin-lymphomában szenvedő betegek specifikus antigénjeihez monoklonális antitestet akartak termeltetni. A fehérje a nevét a városról kapta ahonnan „származik” (Kiel); míg a szám az eredeti klónt takarja a 96 lyukú lemeztől. A Ki-67 fehérje reakciót mutat a monoklonális Ki-67 klónból származó antitesttel. A fehérje cDNS szekvenciájának meghatározása 1993-ban Schlüter és mtsai által valósult meg. A fehérje 2 izoformáját írták le, amelyek egy génről átíródó mRNS alternatív spliceingja során jönnek létre. Mindkét izoformára jellemző, hogy a központi régiójában 16 ismétlődő 366 bázispárnyi (Ki-67 repeat) szakaszt tartalmaz. A Ki-67 fehérje szekvenciája egyedülálló, más fehérjékhez való hasonlóságot nem találtak. A protein sejtmagba történő bejutását a szekvenciájában lévő 10 darab lehetséges nukleáris lokalizációs szignál valamelyike segítheti elő. A fehérje pontos funkciója illetve szerepe a sejtciklus szabályozásában nem teljesen tisztázott, de a szekvencia lehetséges kinázfunkcióra utal. A fehérjére az erős pozitív töltés is jellemző, ezért nagy valószínűséggel könnyen kötődik a DNS-hez, valamint fogékony lehet proteázokra. Annak ellenére, hogy nem ismert a Ki-67 fehérje konkrét funkciója, kétségtelen, hogy a kifejeződése és a sejtek proliferációja szorosan kapcsolt folyamat, ebből adódik, hogy a fehérje jelentős proliferációs markernek minősül. A Ki-67 fehérje minden osztódó sejt magjában jelen van, ezért a Ki-67 antitestet már évtizedek óta

használják a proliferáló sejtek arányának meghatározására. Mint ideális proliferációs marker jelen van az osztódó sejt sejtciklusának minden aktív fázisában. A sejteknek pozitív jelet kell adniuk, nemcsak a tényleges mitózis alatt, de már akkor is, ha eldöntötték, hogy osztódni fognak. Irodalmi adatokból ismert, hogy a sejtek Ki-67 pozitívak maradnak, akkor is ha a DNS szintézisük hidroxiauereával gátlódik, vagy ha nocodazol kezelés során a mitózisuk is gátlódik. Az osztódó sejtek nem gátolják a Ki-67 fehérje expresszióját csak azért, mert gátolt a sejtosztódás. Azok a sejtek, amelyek továbbra is folytatják a Ki-67 fehérje expresszióját nagy valószínűséggel osztódni fognak a gátlás aluli felszabadulást követően (Scholzen és Gerdes, 2000). A fehérje felfedezése után gyorsan elterjedt a Ki-67 proliferációs index használata a tudományban és a diagnosztikában egyaránt, ami az osztódó sejtek kimutatására szolgáló módszer. A Ki-67 fehérjét - mint proliferációs markert - évek óta használják a tumor vizsgálatok hisztopatológiájában is. Szakirodalmi adatok szerint a tumorok esetében a magas Ki-67 proliferációs index rosszabb prognózisra utal a betegség kimenetelének és áttétképződés sebességének tekintetében.

A proliferációs index meghatározása viszonylag szubjektív módszernek minősül, mivel egyes vizsgálatok során csak megbecsülik a pozitív sejtek %-os arányát, míg mások precízebb számolási technikát alkalmaznak. A Ki-67 fehérje a sejtciklus folyamán különböző mértékben fejeződik ki, ami befolyásolja az immunhisztokémiai reakciók intenzitását és ez növeli az értékelés szubjektivitását. A fehérje expressziója a G1 fázisban kezdődik, a mitózis alatt éri el a maximumát, ezt követően a szintje minimumra esik és a G0 fázisban már nem mutatható ki. A Ki-67 proliferációs index 1000 sejt leszámolásával a pozitív sejtmagok százalékos arányából adódik, függetlenül a festés intenzitásától. Minden pozitív sejtet megszámlálnak.

4. Célkitűzés

Munkánk során célul tűztük ki, hogy a 18 napos patkány embriók agykérgéből előállított tiszta mikroglia tenyészetekben megvizsgáljuk négy vegyület illetve gyógyszer(származék) hatását a sejtek osztódóképességére és túlélőképességére.

A tiszta mikroglia sejtenyészeteket calmidazolium kloriddal, trifluoperazinnal (TFP), rosuvastatinnal és aszpirinnal kezeltük, majd Ki-67-fluoreszcens immuncitokémiát alkalmazva proliferációs vizsgálatokat, illetve tripánkék festést követően sejttúlélés analízist végeztünk.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Anyagok

Alexa-konjugált anti-nyúl és anti-egér IgG: (Invitrogen, Eugene, OR, USA)

BSA: borjúsavó albumin (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Calmidazolium klorid: (Sigma, St. Louis, MO, USA)

desztillált víz

DMEM: Dulbecco által módosított Eagle-féle médium (GIBCO, Scotland, UK)

FBS: főtális borjúsavó (GIBCO, Scotland, UK)

0,9% fiziológias sóoldat

formaldehid: (Molar Chemicals, Budapest, Magyaro.)

Hoechst 33258 festék (Biszbenzimid H 33258): (Sigma, St. Louis, MO, USA)

lipopoliszacharid (LPS): (Sigma, St. Louis, MO, USA)

nyúl anti Iba1 mononukleáris antitest: (Wako, Osaka, Japan)

NGS: normál kecske szérum (Sigma, St. Louis, MO, USA)

PBS: sótartalmú foszfát puffer

Polivinil-pirrolidin (PVP): (Sigma, St. Louis, MO, USA)

2,5% tripszin (GIBCO, Scotland, UK)

Triton X-100

Trifluoperazin (TFP): (Sigma, St. Louis, MO, USA)

0,4% tripánkék: (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Vecta-Shield (Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA)

5.2. Tiszta mikroglia kultúra készítése

A 18 napos patkányembriók agyparenchimájából steril körülmények között szövetdarabot veszünk ki, amelyet 9 ml DMEM-et tartalmazó Petri-csészébe helyezünk. Ehhez 1 ml 2,5% tripszint adunk a sejtkapcsoló fehérjék és extracelluláris mátrix komponensek emésztése céljából, majd tíz percre inkubátorba helyezzük (37 °C, 5% CO₂). Ezt követően a mintát centrifugacsőbe pipetázzuk és centrifugáljuk (1000 g, 10 perc, 21 °C). A felülúszó leöntése után a csapadékhoz 10 ml DMEM/10% FBS oldatot adunk és a

sejteket Pasteur pipettával fel-le pipetázzuk, majd újra lecentrifugáljuk (1000 g, 10 perc, 21 °C). A felülúszót leöntjük és a kitapadt sejtekhez 5 ml DMEM/10% FBS oldatot mérünk. Mechanikai disszociáció során ismét fel-le pipetázzuk a sejteket, majd tripánkékes festéssel sejtszámolást végzünk. Poli-L-lizinezett tenyésztő flaskákba 12 millió sejtet tartalmazó minta mennyiséget csepögtetünk majd 10 ml DMEM/10% FBS oldattal kiegészítjük. A tenyésztés (37 °C, 5% CO₂) másnapján tápfolyadék-cserét végzünk. Az így létrehozott tenyészetek kevert tenyészetek, mivel az agyszövetet alkotó valamennyi sejttípus megtalálható bennük.

Munkánk során azonban tiszta mikroglia tenyészeteket szerettünk volna vizsgálni, ezért hét nap tenyésztés után a tenyésztő flaskákat 20 percig 37 °C-on rázatjuk (100 rpm-en). A rázatás során a letapadt sejtek közül a mikroglia tapadnak leggyengébben az aljzathoz, ezért könnyedén felválnak, ennek köszönhetően a felülúszóval összegyűjthetők. Ezt a felülúszót steril centrifugacsőbe mérjük és centrifugáljuk (3000 g, 10 perc, 25 °C). A centrifugálás után a felülúszót leöntjük és a cső falához kitapadt sejtekhez 2 ml DMEM/10% FBS oldatot mérünk. Pasteur-pipettával történő fel-le pipetázással a sejteket szuszpendáljuk. Tripánkékes festést követően Bürker-kamrával sejtszámlálást végzünk. A csak mikroglia sejteket tartalmazó mintánkat poli-L-lizines fedőlemezeket tartalmazó Petri-csészékbe, illetve fedőlemez nélküli poli-lizinezett Petri-csészékbe csepegtetjük úgy, hogy a fedőlemezekre 200 ezer sejt, a fedőlemez nélküli Petri-csészékbe pedig 400 ezer sejt kerüljön. A sejtekhez 2 ml DMEM/10% FBS-t mérünk és inkubátorba tenyésztjük (37 °C, 5% CO₂).

5.3. A tenyészetek kezelése

A tiszta mikroglia kultúra tenyésztésének 4. napján a sejteket kezelésnek vetjük alá. A vizsgálatunk során rosvastatint, aszpirint, valamint két típusú kalmodulin gátlószert: calmidazolium kloridot és trifluoperazint alkalmazunk. A calmidazolium klorid és a trifluoperazin kalmodulin antagonistának számítanak, és általuk a kalmodulin hatását tudtuk vizsgálni. Mindezek mellett a tenyészeteket koleszterin-szint csökkentő rosvastatinnal, illetve fájdalom és lázcsillapító és trombólízis-képzést gátló aszpirinnel is kezeljük. Ez által betekintést nyerhetünk olyan gyógyszerek mikroglia sejtekre gyakorolt hatására, amelyeket napi szinten használnak. A kezelés során alkalmazott gyógyszer(származékok) mellett a sejtek egy-egy csoportjának aktiválásához baktériumok

sejtfalából származó LPS-t használunk. Természetesen kezeletlen (kontroll) mintákat is vizsgálunk. A kezelések időtartama egységesen 24 óra. A kontroll mintákat is beleértve összesen tízféle sejtpopulációt vizsgáltunk, az alábbi konfiguráció szerint:

1. kontroll
2. 1 μ M rosuvastatin
3. 1 mM aszpirin
4. 50 nM calmidazolium klorid
5. 10 μ M TFP
6. 20 ng/ml LPS
7. 20 ng/ml LPS+ 1 μ M rosuvastatin
8. 20 ng/ml LPS+ 1 mM aszpirin
9. 20 ng/ml LPS+ 50 nM calmidazolium klorid
10. 20 ng/ml LPS+ 10 μ M TFP

A kezelés másnapján a fedőlemezes tenyészeteket 10 percig 0,05 M PBS-ben oldott 4% formaldehiddel fixáljuk, míg a fedőlemez nélküli Petri-csészékben lévő sejteket összegyűjtjük és sejtéletképességi tesztet végezzük.

5.4. Viabilitási (életképességi) teszt

A fedőlemez nélküli kis Petri-csészék alján növesztett mikroglia sejtek az aljzatról eltávolíthatók tripszines kezeléssel és ezáltal szuszpenzióba hozhatók. A módszer során a kultúrák felülúszójához (DMEM) 2,5%-os tripszint csepegtetünk (végső koncentráció 0,25%), majd 30 percig inkubáljuk. Fél óra elteltével a tenyészetet gondosan felkeverjük, így a kémiai emésztés mellett a pipettával történő óvatos fel-le szivogatással mechanikailag is segítjük a felválás folyamatát. A felválás mértékét és sikerességét inverz fénymikroszkóppal folyamatosan ellenőrizzük. A teljes felválást követően elvégezzük a viabilitási tesztet, amelynek során a kezelések okozta változások után mérjük az élő sejtek előfordulási gyakoriságát. Az életképességi teszt alapja, hogy az elpusztult sejtek membránja károsodik és így különféle anyagok számára permeabilissé válik. Az átjárható membránnal rendelkező életképtelen sejtek színes festékekkel megfesthetők és az életképes sejtektől ezáltal megkülönböztethetővé válnak. Ezért a számolás előtt vitális festékekkel (tripánkék) kezeljük a sejteket. A mintából származó 60 μ l sejtsuszpenziót 90 μ l fiziológiás sóoldattal és 150 μ l tripánkék festékekkel mérjük össze, majd meghatározzuk a

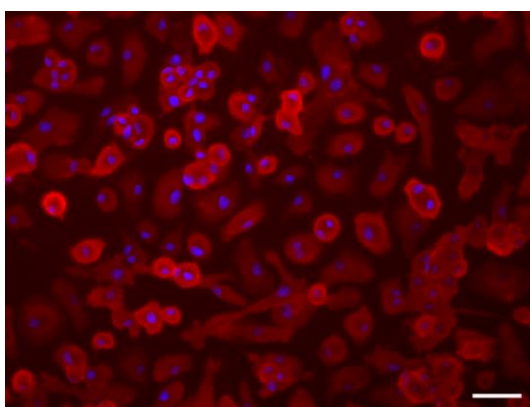
sejtszámot a Bürker kamra segédvonalai segítségével. A sejtszám meghatározása a három párhuzamos segédvonallal határolt négyzetekben történik, amelynek területe 1 mm^2 térfogata pedig $0,1 \text{ mm}^3$. A minta sejtkoncentrációja (c) az alábbi formula alapján kiszámolható $c=n \times 10^4$ (n a négyzetekben számolt átlagos sejtszám). Az így kapott sejtkoncentráció 1 ml-re vonatkozik.

5.5. Ki-67 és Iba1 fluoreszcens immuncitokémia

A fixált fedőlemezes tenyészeteken fluoreszcens immuncitokémiai vizsgálatokat végzünk. Tízennégy mintára számolva $4400 \mu\text{l}$ végtérfogatú oldatot készítünk 5% NGS, 1% BSA és 0,05 M PBS oldat összekeverésével. Az oldatból kivesszünk $2900 \mu\text{l}$ -t és $14,5 \mu\text{l}$ 10% triton X-100-at mérünk hozzá. Ebből az oldatból $90 \mu\text{l}$ -t a fedőlemezekre csepegtetünk, hogy a nonspecifikus fehérje-fehérje kölcsönhatásokat blokkoljuk. A blokkolás alatt a mintáinkat 30 percig $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáljuk. Eközben a maradék tritonos oldatból összemérjük a primer antitest hígító oldatát. A mikrogliák azonosítására nyúl-anti-Iba1 fehérjét (1/500-as hígításban), míg az osztódó sejtekek azonosítására az egér-anti-Ki-67 fehérjét (1/50-es hígításban) használjuk. A blokkolást követően a fedőlemezekre $100 \mu\text{l}$ primer antitestet tartalmazó oldatot mérünk. Ahhoz, hogy az oldatot egyenletesen oszlassuk szét a fedőlemezen, illetve, hogy a kiszáradást elkerüljük, parafilmet helyezünk a fedőlemezekre, majd $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on egy éjszakán át inkubáljuk sötétben. Másnap a lemezeket 4×10 percig 0,05 M PBS-el mossuk, majd összemérjük a fluoreszcens festéssel jelölt szekunder antitestet tartalmazó oldatot úgy, hogy a Triton X-100-at nem tartalmazó oldatban hígítjuk az Alexa konjugált anti-egér és anti-nyúl IgG antitesteket (1/1000 hígításban). $90 \mu\text{l}$ mennyiséget a fedőlemezekre csepegtetünk, parafilmmel lefedjük és szobahőmérsékleten, 3 órán át a sötétben tároljuk. A 3 óra elteltével a lemezeket 4×10 percig 0,05 M PBS-es mossuk majd magfestést végzünk. A magfestéshez 14 mintára számolva 60 mg polivinil-pirrolidin port oldunk fel 60 ml 0,05 M PBS-ben. Ebből a törzsoldatból 1,6 ml-t kivesszünk és $1 \mu\text{l}$ Hoechst 33258 (Biszbenzimid) magfestéket mérünk hozzá. Ebből az elkészített oldatból $90 \mu\text{l}$ -t a mintákra csepegtetünk és 10 percig sötétben, szobahőmérsékleten tartjuk. Utána a lemezeket 2×5 percig polivinil-pirrolidin tartalmú PBS-el, majd pedig 5 percig desztillált vízzel mossuk. A fedőlemezeket szárítjuk és Vecta-Shield-del lefedjük. A tárgylemezeket fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáljuk.

6. Eredmények

Irodalmi adatok és saját vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a mikroglia sejtek azonosítására és vizsgálatára jól használható marker a kalcium-szenzor protein, az Iba1 (ionizált kalcium adaptor fehérje). Imai és mtsai (1996) írták le először ezt a mikroglia/makrofág specifikus 17-kDa nagyságú foszfoprotein, amelynek expressziója az idegsejtekben, oligodendrocitákban és asztrocitákban nem mutatható ki. A fluoreszcens immuncitokémia vizsgálataink során az Iba1 fehérjét a sejtek detektálására használtuk fel, mivel citoplazmatikus fehérje révén jól alkalmazható a mikroglia sejtek azonosítására.

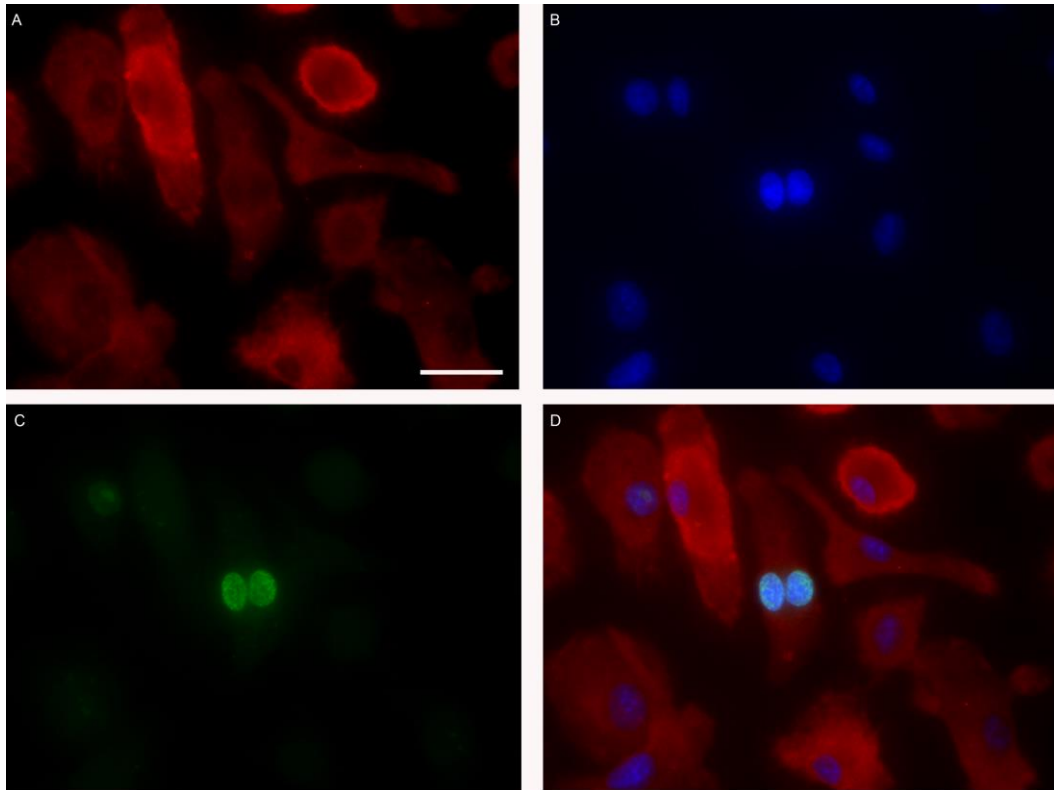


1. Tiszta mikroglia sejtenyészet. Az Iba1 kalcium-kötő foszfoprotein immunreaktivitás (piros jelzés) a sejtek minden részletét jól kirajzolja. A sejtmagok jelölése a szigorúan DNS-hez kötődő Hoechst 33258 festék segítségével történt, amelynek köszönhetően minden mikroglia sejtmag kék színben látható. A tenyészetben előforduló sejtmagok és az Iba1 pozitív sejtek mennyiségi viszonyából látszik, hogy csak mikroglia sejtet tartalmazó tiszta mikroglia tenyészetekkel dolgoztunk. (Lépték 50 μm .)

Eredményeink alapján az állapítható meg, hogy az alkalmazott kezelések közül mind a kalmodulin gátlószerek által bekövetkezett kalmodulin aktivitás csökkenés, mind a gyógyszerek (rosuvastatin és aszpirin) jelentős mértékben befolyásolták a mikroglia sejtek egyes élettani funkcióit, így a sejtek osztódását és a túlélés képességét.

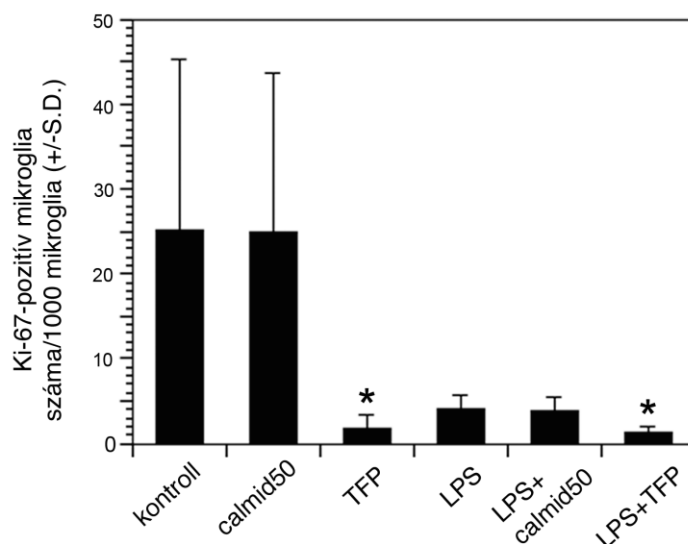
6.1. Proliferációs index meghatározása

Az osztódó sejtek jelenlétéről a Ki-67 proliferációs marker immuncitokémiai kimutatása adott felvilágosítást. Proliferációs antigén révén a mikroglia sejtek szaporodási üteméről és osztódási sajátosságairól szolgáltatott információt.

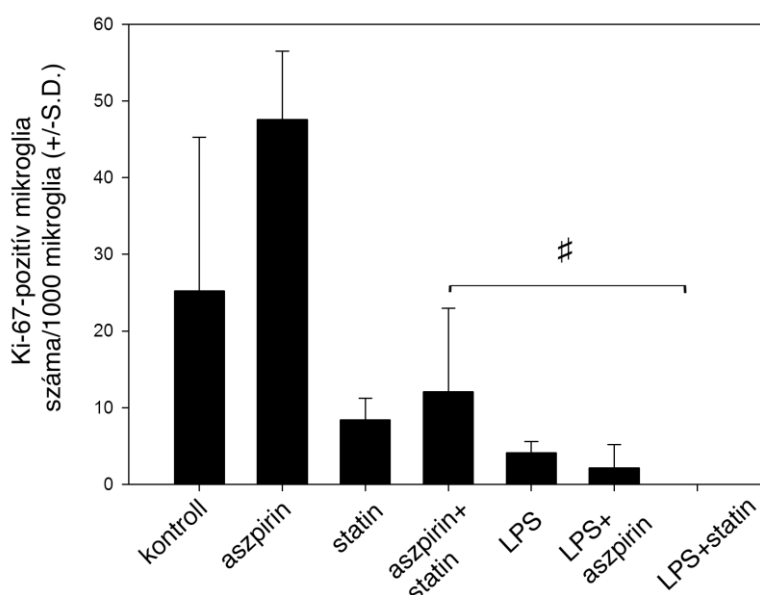


2. Iba1 és Ki-67 immunreaktivitás tiszta mikroglia sejtenyészetben. A) Az Iba1-pozitív mikroglia sejtek piros jelölésűek, B) a mikroglia sejtmagok élénk kék színben láthatóak Hoechst 33258 festéknek köszönhetően, C) az osztódó, Ki-67-pozitív sejtek sejtmagjai zöld színűek, D) színegyesített kép. (Lépték: 50 μm .)

A Ki-67 proliferációs index meghatározása folyamán 1000 sejt leszámolásakor megszámláltuk a pozitív sejtmagok százalékos arányát. Függetlenül a jel erőségétől, minden pozitív sejtet értékeltünk. A Ki-67 pozitivitási százalékok ismeretében vizsgáltuk, hogy van-e az általunk alkalmazott gyógyszer(származékok) esetén szignifikáns különbség az immuncitokémiai eredmények között. A Ki-67 pozitív mikroglia sejtek számát meghatároztuk a kezeletlen kontrollokban, az LPS-el kezelt kultúrákban, a gyógyszerrel kezeltéknél illetve az LPS és gyógyszerrel együttesen kezelt tenyészetekben. Kutatásunk során azt tapasztaltuk, hogy a kontrollhoz viszonyítva az aszpirin növelte a mikroglia sejtek proliferációs indexét, míg a rosuvastatin és a trifluoperazin nagymértékben csökkentette azt. A kalmidazolium klorid nem befolyásolta jelentősen a sejtek osztódóképességét. Eredményeink alátámasztották az irodalomból is ismert tényt, miszerint az LPS aktiválja a mikrogliaikat, de proliferációjukat erőteljesen gátolja.



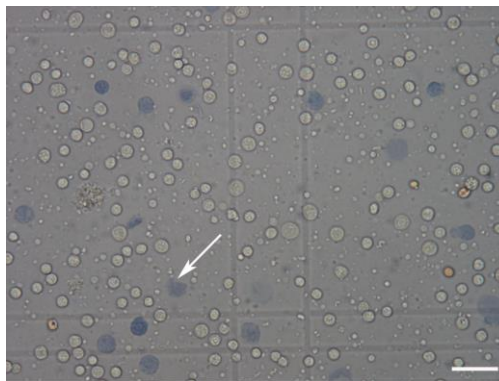
3. Kalmodulin gátlószerek hatása a mikroglia sejtek proliferációjára. A kontroll tenyészetek proliferációs index értéke 2,5%. Az LPS kezelés nagymértékben csökkentette a sejtek osztódóképességét (PI=0,41). A calmidazoliumos kezelés önmagában nem befolyásolta a sejtek proliferációját (PI=2,48), de LPS-el kombinálva jelentősen csökkentette azt (PI=0,23). A TFP önmagában és LPS-el kombinálva is erőteljesen csökkentette a proliferációs index értékét 0,17% és 0,12%-ra.



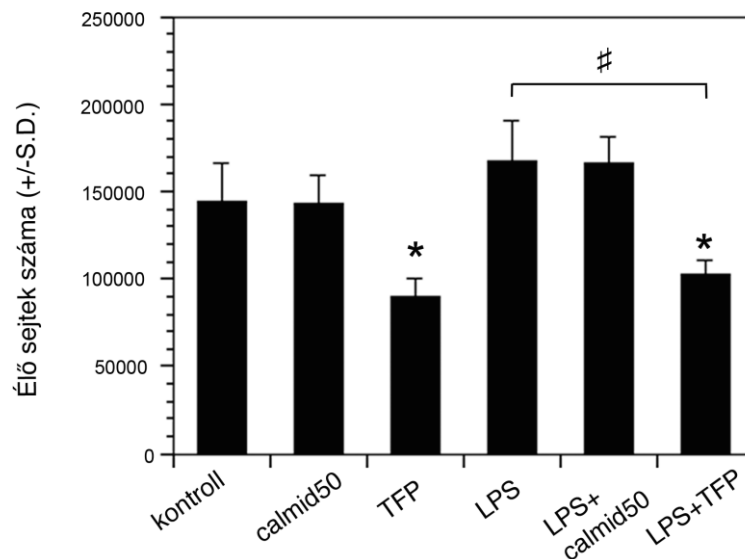
4. Az aszpirin és rosuvastatin gyógyszerek hatása a sejtosztódásra. Szembetűnő különbség figyelhető meg az aszpirin és a rosuvastatin hatása között. Az aszpirin magas proliferációs indexet (PI=4,7) kölcsönöz a sejteknek, míg a rosuvastatin befolyása alatt a sejtek osztódóképessége lecsökken és a proliferációs index értéke 0,84% lesz. A két gyógyszer együttes alkalmazása során szintén csökken a proliferáló sejtek mennyisége (PI=1,21). Az aszpirin és a rosuvastatin LPS kombinálásával hatásos proliferáció gátlás keletkezik (PI=0,21 és PI=0).

6.2. Sejt túlélés analízis

A kutatásunk során kíváncsiak voltunk arra is, hogy az általunk használt anyagok mellett, hogy befolyásolják a sejtek osztódását, hogyan hatnak a mikroglia sejtek életképességére. A sejt túlélés analízis folyamán meghatároztuk az élő sejtek %-os arányát viabilitási festékekkel (tripánkék) történt kezelés után. Az elhalt sejtek membránja átjárható volt a festék számára, ezért az analízis folyamán a sejtpusztulást tudtuk detektálni. A megfestett, elpusztult sejtektől könnyedén megkülönböztethetők voltak az élő sejtek, amelyeknek %-os mennyiségére voltunk kíváncsiak.

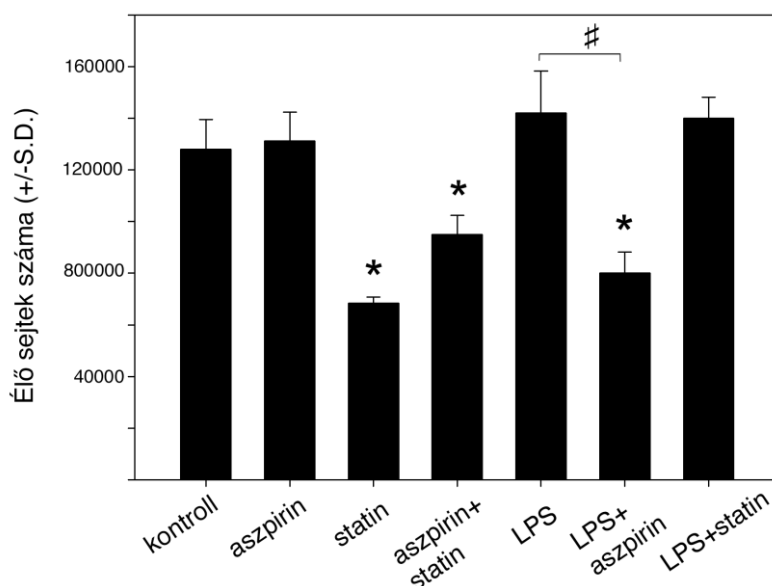


5. Reprezentatív felvétel tripánkékekkel festett sejtekről a Bürker kamrában. Az életképtelen sejtek károsodott sejtmembránján átjutott festék kékre színezi az elpusztult sejteket (nyíl), míg az élő sejtek átlátszóak.



6. Kalmodulin gátlószerek hatása a sejt-túlélésre. Azzal szemben, hogy a calmidazolim klorid önmagában sem LPS-el kombinálva nem volt hatással a sejtek életképességére, a TFP

nagymértékben befolyásolta a sejtek túlélését. A TFP önmagában és az LPS-el kombinálva is szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét (a kontroll érték 62,47 illetve 71,28%-ára).



7. Az aszpirin és a rosuvastatin hatása a sejt-túlélésre. A kontroll értékkel összehasonlítva az tapasztalható, hogy a sejtek életképességére az aszpirin nincs hatással, míg a rosuvastatin feltűnően csökkenti (a kontroll érték 53,4%-ára). A két gyógyszer együttes alkalmazásával, illetve az aszpirin kombinálása LPS-el szintűgy mérsékelték a sejtek túlélését (a kontroll érték 74,2 illetve 62,5%-ára).

A tripánkékes jelöléssel bebizonyítottuk, hogy míg a trifluoperazin és a rosuvastatin csökkenti, a calmidazolium klorid és az aszpirin önmagában nem befolyásolták a sejtek életképességét.

7. Összegzés

Munkánk összegzéseként megállapíthattuk, hogy az általunk alkalmazott módszer megfelelő volt arra, hogy tiszta mikroglia tenyészetet hozzunk létre, és ezekben a mikrogliaák osztódóképességét és túlélését tanulmányozhattuk. A kísérleteinkben felhasznált mikroglia-specifikus Iba1 fehérje alkalmas a mikrogliaák detektálására. Megállapíthattuk, hogy a Ki-67 proliferációs marker egy jól mérhető, gyors paraméter a sejtek proliferációs indexének meghatározásában, amelynek definiálásakor megszámloltuk hány sejt volt Ki-67-pozitív az 1,000 mikroglia sejtből.

Kísérleteinkben a multifunkcionális kalmodulin két gátlószerének hatását, illetve két általánosan használt gyógyszer befolyását vizsgáltuk a mikroglia sejteken. A kalmodulint célmolekulaként azért választottuk, mert különféle módon a kalmodulin a sejtosztódásban is részt vesz, ezért gátlószerei antimitotikus szerként is használhatók. A mikroglia kutatásban fontos a sejtek proliferációs folyamatainak minél jobb megismerése, hogy hatékonyabban kutatható legyen a különböző neurodegenerációs folyamatokban zajló mikroglia sokasodás kontrolálása.

Összehasonlítottuk a kalmodulin két gátlószerének hatékonyságát a proliferációra, illetve a sejtek életképességére. A kiértékelés eredményeiből a TFP bizonyult hatékonyabb antagonistának. TFP-vel történő kezelést követően szignifikáns csökkenést figyelhettünk meg a proliferáló mikroglia számában és a sejtek túlélőképességében, nagyszámú sejt el is pusztult. A calmidazolium a TFP-vel ellentétben nem öli el a sejteket, és a mikroglia proliferációjára sem hat kifejezetten. Az aszpirin és rosuvastatin ellentétes hatású, hiszen az aszpirin fokozza a proliferációt, a rosuvastatin erősen gátolja azt. A viabilitási teszt alapján láthattuk, hogy az aszpirin nincs hatással a sejtek életképességére, míg a rosuvastatin szignifikánsan csökkenti azt. További megfigyelésünk, hogy az LPS nem befolyásolta a sejtek viabilitását, de jelentősen redukálta a sejtek proliferációs képességét.

Irodalomjegyzék

- Floden A. M., Combos C. K.** (2007): Microglia repetitively isolated from in vitro mixed glial cultures retain their initial phenotyp. *J. Neurosci. Methods.*, 164 (2): 208-224.
- Forstreuter F., Lucius R., Mentlein R.** (2002): Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. *J. of Neuroimmunology*, 132 (1-2): 93-98
- Gómez-Nicola D, Fransen NL, Suzzi S, Perry VH.** (2013): Regulation of Microglial Proliferation during Chronic Neurodegeneration. *J. Neurosci.* 6;33(6):2481-93.
- Husztai Z., Kálmán M.** (2008): *Glia*, Akadémia Kiadó, Budapest
- Imai Y., Iбата I., Ito D., Oshawa K., Kohsaka S.** (1996): A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 224: 855-865.
- Imai Y., Kohsaka S.** (2002): Intracellular signaling in M-CSF induced microglia activation: Role of *Iba1*. *Glia*, 40: 164-174.
- Kazuyuki N., Shinichi K** (1993): Functional roles of microglia in the brain. *Neurosci. Res.*, 17 (3): 187-203.
- Prinz M., Priller J.** (2014): Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neurosci.* 15: 300-312.
- Saijo K., Glass C. K.** (2011): Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat. Rev. Immun.*, 11: 775-787.
- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J.** (1993): The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol.*, 123(3):513-22.
- Scholzen T., Gerdes J.** (2000): The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. of Cell. Phys.* 182: 311-322.