

Szegedi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Multidiszciplináris Doktori Iskola

# **Csiplaboratóriumi eszköz biológiai gátak modellezésére**

**PhD dolgozat**

**Kincses András**

Témavezető:

Prof. Dr. Dér András, tudományos tanácsadó

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet  
Biomolekulári elektronika kutatócsoport



Szeged

2021

## Közlemények listája

### 1. A PhD dolgozat alapját képező közlemények listája

- I. Walter FR, Valkai S., **Kincses A**, Petneházi A, Czeller T, Veszelka S, Ormos P, Deli MA, Dér A. A versatile lab-on-a-chip tool for modeling biological barriers. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016;222:1209-1219. IF: 5,401
- II. **Kincses A**, Santa-Maria AR, Walter FR, Dér L, Horányi N, Lipka DV, Valkai S, Deli MA, Dér A. A chip device to determine surface charge properties of confluent cell monolayers by measuring streaming potential. *Lab. Chip*. 2020;20(20):3792-3805. IF: 6,774

A PhD tézishez közvetlenül kapcsolódó publikációk összesített impakt faktora: 12,175

### 2. A PhD dolgozathoz közvetlenül nem kapcsolódó közlemények listája

- I. **Kincses A**, Toth-Boconadi R, Dér A. 2D measurement of ion currents associated to the signal transduction of the phototactic alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Photochem Photobiol B* 2012;114:147-52. IF: 3,110
- II. Sántha P, Veszelka S, Hoyk Z, Mészáros M, Walter FR, Tóth AE, Kiss L, **Kincses A**, Oláh Z, Seprényi G, Rákhely G, Dér A, Pákáski M, Kálmán J, Kittel Á, Deli MA. Restraint Stress-Induced Morphological Changes at the Blood-Brain Barrier in Adult Rats. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2016; 8(88). IF: 5,076
- III. Lázár V, Martins A, Spohn R, Daruka L, Grézal G, Fekete G, Számel M, Jangir PK, Kintses B, Csörgő B, Nyerges Á, Györkei Á, **Kincses A**, Dér A, Walter FR, Deli MA, Urbán E, Hegedűs Z, Olajos G, Méhi O, Bálint B, Nagy I, Martinek TA, Papp B, Pál C. Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides. *Nat Microbiol*. 2018;3(6):718-731. IF=14,633
- IV. Hoyk Z, Tóth ME, Lénárt N, Nagy D, Dukay B, Csefóvá A, Zvara Á, Seprényi G, **Kincses A**, Walter FR, Veszelka S, Víg J, Barabási B, Harazin A, Kittel Á, Puskás LG, Penke B, Víg L, Deli MA, Sántha M. Cerebrovascular Pathology in Hypertriglyceridemic APOB-100 Transgenic Mice. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:380. IF=3,9

- V. Harazin A, Bocsik A, Barna L, **Kincses A**, Váradi J, Fenyvesi F, Tubak V, Deli MA, Vecsernyés M. Protection of cultured brain endothelial cells from cytokine-induced damage by  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone. *PeerJ*. 2018;15;6:e4774. IF=2,353
- VI. Santa-Maria AR, Walter FR, Valkai S, Brás AR, Mészáros M, **Kincses A**, Klepe A, Gaspar D, Castanho MARB, Zimányi L, Dér A, Deli MA. Lidocaine turns the surface charge of biological membranes more positive and changes the permeability of blood-brain barrier culture models. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2019;1861(9):1579-1591. IF=3,411
- VII. Barna L, Walter FR, Harazin A, Bocsik A, **Kincses A**, Tubak V, Jósavay K, Zvara Á, Campos-Bedolla P, Deli MA. Simvastatin, edaravone and dexamethasone protect against kainate-induced brain endothelial cell damage. *Fluids Barriers CNS*. 2020;17(1):5. IF=4,47
- VIII. Taneva SG, Krumova S, Bogár F, **Kincses A**, Stoichev S, Todinova S, Danailova A, Horváth J, Násztor Z, Kelemen L, Dér A. Insights into graphene oxide interaction with human serum albumin in isolated state and in blood plasma. *Int J Biol Macromol*. 2021;175:19-29. IF=5,162
- IX. Santa-Maria AR, Walter FR, Figueiredo R, **Kincses A**, Vigh JP, Heymans M, Culot M, Winter P, Gosselet F, Dér A, Deli MA. Flow induces barrier and glycocalyx-related genes and negative surface charge in a lab-on-a-chip human blood-brain barrier model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2021;271678X21992638. IF=5,681
- X. Dukay B, Walter FR, Vigh JP, Barabási B, Hajdu P, Balassa T, Migh E, **Kincses A**, Hoyk Z, Szögi T, Borbély E, Csoboz B, Horváth P, Fülöp L, Penke B, Vigh L, Deli MA, Sántha M, Tóth ME. Neuroinflammatory processes are augmented in mice overexpressing human heat-shock protein B1 following ethanol-induced brain injury. *J Neuroinflammation*. 2021 Jan 10;18(1):22. IF=5,793

PhD tézishez közvetlenül nem kapcsolódó publikációk összesített impakt faktora: 53,589

Összes impakt faktor: 65,764

## Bevezetés

A homeosztázis fenntartásában és a gyógyszerbejutás és felszívódás folyamataiban rendkívül fontos szerepet játszanak az epitél és endotél sejtekből felépülő biológiai gátak. Élettani funkciójuk, transzportfolyamataik megértéséhez, illetve gyógyszerhatások és betegségek vizsgálatában a sejtenyészetes modellek kiemelkedően fontosak. Az epitél és endotél rétegek szoros kapcsolatát *in vivo* a sejtek közötti speciális kapcsolófehérjék biztosítják. Egy ilyen szorosan záródó sejtréteg jellemzői a magas elektromos ellenállás és az alacsony passzív permeabilitás. Ezek a fizikai és fizikai-kémiai paraméterek pontos jellemzést adnak a biológiai gát integritásáról és funkciójáról. A sejtek közötti kapcsolat szorosságát az ionok sejtrétegen keresztüli átjárhatóságával jellemezhetjük, az ezt leíró mennyiség a transz-  
endoteliális/epiteliális elektromos ellenállás (TEER). A passzív permeabilitás kis méretű lipidoldékony vagy vízoldékony, elektromosan semleges vagy töltéssel rendelkező molekulák sejteken keresztüli, illetve sejtek közötti átjutását jellemzi. A sejtfelszín erősen negatív töltése, amely a sejtfelszíni lipidösszetételből és a glikokalix proteoglikán összetevőiből adódik fontos tényezője a gátfunkciónak. Azonban a biológiai gátak fizikai tulajdonságai közül ez a legkevésbé vizsgált terület.

Az elmúlt 10 évben a biológiai gátak modellezésére a statikus tenyésztőbetétek mellett megjelentek a dinamikus csiplaboratóriumi (lab-on-a-chip, LOC) eszközök is. A sejtek közötti kölcsönhatások, molekuláris útvonalak, betegségek és gyógyszerhatások vizsgálatára fejlesztett LOC eszközök modern mérnöki tervezés eredményei. Segítségükkel lehetőségünk nyílik a folyadékáramlás hatásainak vizsgálatára az előbb említett élettani folyamatok tanulmányozására. A LOC eszközök jelentősége abban rejlik, hogy pontosan beállítható környezetet biztosítanak a sejtek szaporodásához,

növekedéséhez, és segítségével a gátfunkció kialakulása és változásai jól nyomon követhetőek.

A statikus tenyésztőbetétben nevelt, szorosan záródó, egysejtréteget alkotó epitél és endotél sejt kultúrák széles körben elterjedt tüdő-, bél- és vér-agy gát *in vitro* modellek. A biológiai barrierék modellezésére használt biochipek az elmúlt tizenöt évben robbanásszerű fejlődésen mentek keresztül. Nagy előnyük, hogy a felépítésük és a mérési lehetőségek az adott vizsgálathoz igazíthatók. Célunk volt egy sokoldalúan felhasználható eszköz fejlesztése, ami különböző biológiai gátak modellezésére és így különböző célú felhasználásra alkalmas. Emellett alkalmas a fontos fizikai paraméterek, úgymint TEER és permeabilitás nyomon követésére.

A sejtfelszín negatív töltése fontos védelmi feladatot lát el a biológiai gátak esetében. Az erek falát alkotó endotél erős negatív töltésű sejtfelszíni glycocalyxszal rendelkezik, melynek fontos szerepe van a keringési rendszer védelmében és mikrobiális fertőzések elleni védekezésben. A felszín elektromos tulajdonságainak kvantitatív jellemzése ezért nélkülözhetetlen az élettani folyamatokban és betegségekben betöltött szerepének jobb megértéséhez. Kísérleteink során ezért további célunk volt a felszíni töltés objektív mérési módszerének kifejlesztése egysejtrétegeken.

## **Célkitűzések**

Munkám első célja egy sokoldalú LOC eszköz tervezése és építése volt, mely alkalmas lehet a gátfunkció jellemzésére szolgáló fizikai mennyiségek mérésére. Felépítésében a kereskedelmi forgalomban is kapható tenyésztőbetéteket vettük alapul: a felső és alsó csatornát egy porózus tenyésztőmembrán választja el egymástól, erre növeszthetjük a sejteket. Az eszközt úgy terveztük kialakítani, hogy lehetőség nyíljon különböző biológiai gátak mono- és ko-kultúrák tenyésztésére is. Integrált aranyelektrodákkal transzendenteliális/epiteliális elektromos ellenállás mérése valósítható meg,

illetve a felső-alsó csatornás kialakításnak köszönhetően permeabilitási tesztek is végezhetünk. A tenyésztőmembrán teljes felszíne megfigyelhető fáziskontraszt mikroszkóppal a sejtek morfológiájának és növekedésének követése végett. Immunhisztokémiai festéssel jelölhető sejtek konfokális mikroszkóppal vizsgálhatók a kivehető tenyésztőmembránon. Az eszközhöz könnyen csatlakoztathatunk csöveket és azokon keresztül pumpákat, így bizonyos biológiai folyamatokat, például a véráramlást modellezhetjük a tápfolyadék áramoltatásával.

Munkám második célja az eszköz továbbfejlesztése volt, hogy alkalmas legyen zétapotenciál mérésére egysejtrétegeken. A zétapotenciált az áramlási potenciál mérésén alapuló módszerrel határozzuk meg. Egy Ag/AgCl elektródapár, egy feszültségerősítő és egy oszcilloszkóp segítségével tervezzük fölvenni az áramlási potenciál időben nem állandó jelét. Az eredményeket COMSOL szimulációkkal és lézer-Doppler sebességmérésen (LDv) alapuló zétapotenciál-mérésekkel hasonlítjuk össze.

## **Anyagok és módszerek**

### **LOC tervezése és felépítése**

Az eszköz egy-egy felső és alsó csatornából áll, ezeket egy porózus PET membrán választja el egymástól. Az eszköz kialakítása lehetővé teszi a TEER mérését és permeabilitási tesztek elvégzését. A csatornák fröccsöntéssel készülnek, poly(dimethylsiloxane) (PDMS) felhasználásával. A csatornákat alul és felül műanyag tárgylemezek zárják le; ezek felületén található a TEER mérésre szolgáló integrált aranyelektrodák. A bevezetéseknél luer-lock csatlakozókat használunk, hogy a folyadékáramlást biztosító csöveket könnyedén csatlakoztathassuk. Szintén luer-csatlakozókba ágyazzuk be az áramlási potenciál méréséhez használt Ag/AgCl elektródákat, így szükség esetén egyszerűen rászerezhetők az eszközre.

### **Zétopotenciál-mérés: az áramlási potenciál detektálása**

Mikrofluidikai csatornákban az áramlási potenciál kialakulása jól ismert elektrokinetikai jelenség. Ha a csatorna belső falán töltések helyezkednek el, azok az oldat ellentétes töltésű ionjait a felszín közelébe vonzzák. A rögzített töltések és az oldat mozgékony töltései a Coulomb erő és a Brown mozgás egyensúlyának megfelelő elektromos kettősréteget alakítanak ki, ez az ún. Guy-Chapman réteg (GCL). Ennek eredményeként a felszínre merőleges potenciálgrádiens alakul ki, ami leárnýekolja a felszíni potenciált a GCL-en keresztül. Ha a csatornában folyadékáramlás indul meg, a mozgó folyadék a GCL ellenionjainak egy részét magával ragadja. A falnál maradó és a mozgó részt elválasztja egymástól az ún. „slipping plane”, ahol a két réteg lamináris áramlás esetén egymáshoz képest elcsúszik. A folyadékkal áramló eredő többlettöltés áramlási áramként jelenik meg, az ehhez társuló áramlási potenciált a csatorna hossz tengelye mentén elhelyezett elektródapárral mérhetjük. A Helmutz-Smoluchowski egyenlet alapján az áramlási potenciál egyensúlyi helyzetben arányos a nyíróréteg felületi potenciáljával, az ún. zéta potenciállal. Ebben a tanulmányban időben nem állandó, tranzienis áramlási potenciált mértünk nagy bementi áramlási sebesség mellett, így maximalizálva a regisztrált jel amplitúdóját. Elméleti és kísérleti úton is igazoltuk, hogy az így kapott tranzienis jel amplitúdója szintén arányos a zéta potenciállal.

### **Zétopotenciál-mérés: lézer-Doppler sebességmérés**

A lézer-Doppler sebességmérés során egy szuszpenzió töltött részecskéinek elektroforetikus mobilitását mérjük két kollimált, monokromatikus és koherens lézer sávós interferenciájával. A sávokon áthaladó részecske fényt szór egy fotodetektorra. A szórt fény intenzitásingadozásának frekvenciája arányos a beeső fény és a szórt fény közti Doppler eltolódással, ami a részecske sebességével arányos. Így a Smoluchowski egyenlet felhasználásával a  $\zeta$  zéta potenciál kiszámítható.

## **Szimulációk**

A tranzienis áramlási potenciál idő- és zéapotenciál-függését egy áramlási csatornában szimuláltuk COMSOL Multiphysics software (Comsol Inc., USA) segítségével. A szimulációkat az Electrostatics, Transport of diluted species és a Creeping flow munkacsomagok csatolt differenciálegyenleteinek megoldásával végeztük. A lamináris áramlás szimulálásához a Poisson-eloszlás közelítését, a Nernst-Planck és a Navier-Stokes egyenleteket használtuk föl. A szimuláció két lépésben zajlott: először az áramlás nélküli egyensúlyi állapot kialakulását modelleztük, ezt követte a második lépésben a lamináris áramlás szimulációja. A csatolt differenciálegyenleteket a Backward Differentiation Formula módszerrel oldottuk meg.

## **Sejttenyésztés**

Az eszköz sokoldalú felhasználását bélepitél és agyi mikroér endotél egysejtréteggel és egy hármás ko-kultúra vér-agy gát modellel teszteltük, a sejttípusnak megfelelően áramlás nélkül és folyamatos folyadékáramlással. A sejtek minden esetben egy magas páratartalmú, 37 °C hőmérsékletű, 5% CO<sub>2</sub> koncentrációjú inkubátorban növekedtek. Áramlás nélküli, statikus körülmények között teszteltük a Caco-2 bélepitél sejteket (ATCC, USA). A vér-agy gát modellezéséhez a hCMEC/D3 agyi endotél sejtvonalat és primer patkány agyi endotél sejteket használtuk primer patkány asztrogliaikkal és pericitákkal ko-kultúrában áramlás nélküli és áramlás alatti üzemmódban.

## **Eredmények és megbeszélés**

### **Az eszköz felépítése és működése**

Az eszköz szerkezete a tenyésztőbetétekéhez hasonló: a felső és alsó csatornát egy porózus PET tenyésztőmembrán választja el egymástól. A két párhuzamosan elhelyezkedő csatorna PDMS-ből készült. A párhuzamos elrendezés előnye, hogy a tenyésztőfelület nagy mérete (~ 1 cm<sup>2</sup>) mellett a csatornák átfedése ideális az *in vitro* permeabilitási tesztek elvégzéséhez. A



vékony, átlátszó aranyelektrodák előnye, hogy fáziskontraszt-mikroszkóppal a tenyésztőmembrán egész felülete a kísérlet teljes időtartama alatt megfigyelhető.

Az arany mellett másik lehetőségként átlátszó ITO elektrodapárok impedanciáját teszteltük. Az alacsony frekvenciatartományban (1 Hz-1 kHz) az elektrodák polarizációja miatt kialakuló elektromos kettősréteg akadályozza az ohmikus ellenállás pontos mérését, míg magas frekvenciák (>3 MHz) esetén az ionok alacsony mozgékonyága csökkenti a vezetőképességet. A köztes tartományban az ellenállás közel állandó, de az aranyelektrodák esetében egy nagyságrenddel alacsonyabb az ITO-hoz képest.

A sejteket növekedési fázisban egy programozható fecskendőpumpa segítségével automatikusan, 8 óránként etettük. Naponta mértük a TEER adatokat és ellenőriztük a sejtek növekedését fáziskontraszt-mikroszkóppal. Amikor a sejtek majdnem teljesen benőtték a tenyésztőfelszínt, perisztaltikus pumpával 24 órán keresztül folyamatosan áramoltattuk a tápfolyadékot a csatornában. Ezzel a dinamikus üzemmóddal a véráramlás nyíró hatását modelleztük.

Az áramlási potenciál meghatározásához az Ag/AgCl elektrodákat luer-lock csatlakozókba ágyasztuk, így könnyen csatlakoztathatók LOC eszköz be- és kivezetéseikhez. A mérés során az áramlást ismétlődően elindítottuk és leállítottuk, ezzel megfelelő időt biztosítottunk a sejtfelszíni ionkoncentráció kiegyenlítődéhez. Az ilyen módon mért áramlási potenciál esetén a Helmutz-Smoluchowski egyenletet nem használhatjuk, mivel az stacionárius áramlási potenciál esetén ad lineáris összefüggést a zépotenciállal. Elméleti és kísérleti módon igazoltuk az általunk mért, időben nem állandó áramlási potenciál amplitúdója és a zépotenciál közti összefüggést.

### **Az áramlási potenciál mérése**

Az áramlási potenciált a csilaboratóriumi eszközben töltéssel rendelkező tesztmembránon (Nafion) illetve egysejtrétegen mértük. A mérés időben nem állandó potenciálkülönbséget eredményezett a két elektróda között, ami az áramlás hatására, a negatívan töltött felszín közeléből elsodródó ionok miatt alakul ki. A negatív töltés a vér-agy gát sejtek esetében a lipid fejcsoportoktól és a sejt felszíni glycolyxthól származik, a Nafion tesztmembránnál pedig a szulfát csoportok felelősek érte. A töltött felszín közelében az elektromos kettősrétegnek az oldat többi részéhez képest eltérő az ionkoncentrációja. A folyadékáramlás a pozitív ellenionokat tartalmazó GCL egy részét magával sodorja a kivezetésnél elhelyezett elektróda felé. Ezzel időlegesen megemelkedik az elektróda nagyobb térfogatú térrészében a pozitív ionok koncentrációja, ami az elektromos potenciál emelkedését eredményezi a bementi oldalon elhelyezett referencia-elektrodához képest. A szimulációk és az LDV-vel végzett kontrollkísérletek bizonyították, hogy a tranzien áramlási potenciál amplitúdója arányos a membrán/egysejtréteg zétapotenciáljával.

### **Szimulációk**

Az áramlási csatornában mért, időben nem állandó áramlási potenciál elméleti alátámasztásához a COMSOL Multiphysics szimulációs szoftvert használtuk. A folyamatot két lépésben modelleztük: első lépésben a csatornát kitöltő, nem áramló folyadékot elektromosan semlegesnek feltételeztük, és hagytuk, hogy a rendszer elérje az egyensúlyi állapotát a Poisson-Boltzmann-Nernst-Planck közelítés alapján. A második lépésben a bementi oldalra lamináris áramlást állítottunk be, a csatorna méretével arányos átlagsebességgel. A csatorna hossz tengelye mentén, a töltött felszín előtt és után elhelyezett felületeken mértük az elektromos feszültséget. A zétapotenciál és a mért szimulált jel amplitúdója közti kapcsolatot úgy határoztuk meg, hogy az előbbi két nagyságrenden belül futtattuk, és az ezekhez tartozó szimulált jelek időbeli

lefutását felvettük. A felvett jelek amplitúdója és a zétapotenciál között nagyon pontos lineáris összefüggést kaptunk.

### **Sejttenyészetek**

Háromféle sejttenyésztésen alapuló gátmodell segítségével teszteltük az LOC eszköz fő funkcióit: humán bélepitél és agyi endotél sejtvonalon illetve primer patkány agyi endotél sejtek hármaskultúra vér-agy gát modelljén. A kapott eredményeket minden esetben a hagyományosan használt tenyésztőbetéteken végzett kontroll kísérletekkel vetettük össze. Az összehasonlítást a gátfunkció fizikai tulajdonságai alapján végeztük: a TEER és különböző méretű fluoreszcens molekulák permeabilitása alapján.

A legszorosabban záró egysejtréteg a három modell közül a Caco-2 bélepitél sejtvonalnál alakult ki a LOC eszközben, magasabb TEER és alacsonyabb permeabilitási értékekkel. A sejtek alakja, az egysejtréteg ellenállása és a permeabilitási adatok jó egyezést mutattak a tenyésztőbetéteken mért értékekkel.

A hCMEC/D3 humán agyi endotél sejtvonal a vér-agy gát részletesen jellemzett, egyszerűsített *in vitro* modellje. Miután a közel teljesen konfluens egysejtréteg kialakult, elindítottuk a tápfolyadék folyamatos áramoltatását. Ezzel a véráramlás hidrodinamikai hatásait modelleztük a tenyésztőcsatornában. A kísérletek során a dinamikus mód mellett áramlásmentes kontrollt is vizsgáltunk az eszközben. A statikus modell eredményei pontos egyezést mutattak a tenyésztőbetéteken mért TEER adatokkal, míg a dinamikus modell ellenállása szignifikánsan magasabb értékeket vett fel. Nagy méretű fluoreszcens marker molekulák esetén a permeabilitás a TEER eredményekkel azonos mintázatot mutatott. A statikus esetben a permeabilitás alacsonyabb volt, mint a tenyésztőbetétek esetében. Mivel a LOC eszköz esetében nem tudtunk pontosan ugyanolyan tenyésztőmembránt használni, mint amilyen a betétekben van, nem tudtuk figyelembe venni a membrán vastagságának hatását a permeabilitásra.

Az irodalomban az első alkalommal írtuk le a vér-agy gát primer sejtekből álló, hármas ko-kultúra modelljének vizsgálatát miniaturizált áramlási rendszerben. Tenyésztőbetétben, az anatómiai elhelyezkedésnek megfelelően, gliasejtekkel és pericitákkal együtt tenyésztve az agyi endotél sejtek sokkal jobb gátfunkciókat mutattak, mint akár az endotél sejt mellett csak pericitát vagy csak gliasejtet tartalmazó ko-kultúrák. A LOC modellben a tenyésztőbetéthez hasonlóan a periciták a tenyésztő membrán alsó felén helyezkedtek el a gliasejtek pedig nincsenek közvetlen kapcsolatban az endotél sejtekkel, a csatorna aljára vannak letapadva.

A statikus és dinamikus csipben mért TEER és permeabilitási adatok nem különböznek szignifikánsan. Ezek az ellenállásértékek alacsonyabbak, mint a tenyésztőbetéteken mért adatok. A nátrium-fluoreszcein kisméretű marker passzív permeabilitása a tenyésztőbetétek esetében magasabb volt, mint a LOC eszközben statikus körülmények között. A másik két marker esetében nem volt különbség a folyamatos folyadékáramlást követően, sem a statikus és dinamikus, sem pedig a csipmodellek és a tenyésztőbetétek összevetésében. A modellünkben az alacsony nyíróerő nem emelte meg a primer endotél sejtek ellenállását.

### **A felszíni töltés módosítása és az áramlási potenciál mérése hCMEC/D3 agyi endotél sejtvonalon**

A vér agy gát esetén az agyi endotélsejtek jelentős sejtfelszíni negatív töltése alapvetően két forrásból származik: egyrészt a plazmamembrán speciális lipid összetételéből, másrészt a luminális sejtfelszínen található erősen negatívan töltött glikoprotein hálózatból, amelyet glikokalixnak nevezünk. A sejtfelszíni töltés módosítása kísérletes körülmények között ennek megfelelően két módon történhet, a glikokalix enzimatis emésztésével vagy a plazmamembránba beépülő kationos, zsírolékony molekula hozzáadásával. A kísérletek során két - klinikai szempontból fontos - töltésmódosító molekulát alkalmaztunk. A glükózidáz aktivitással rendelkező neuraminidáz

enzim lehasítja az n-acetil neuraminsav és szialsav csoportokat a glycolyxról, ezzel csökkenti a negatív töltések számát. Ezzel a sepszis során fellépő glycolyx leválást modellezhetjük. Az antiaritmiás, intravénásan adagolt kationos lidokain pedig használat során akár beépülhet az érfal endotél sejteinek plazmamembránjába is, ezáltal megváltoztatva annak töltését.

A LOC eszköz újfajta zéta-mérési funkcióját egyértelműen igazolták az eredmények: 1 U/ml 60 perces neuraminidáz kezelés hatékonyan megváltoztatta a sejtek felszíni töltését és megváltoztatta a glikokalix mintázatot. A lidokain 1000  $\mu$ M-os koncentrációban nem okozott viabilitás változást, azonban hatékonyan beépült az agyi endotélsejtek membránjába, így módosítva a zétapotenciált. Kísérleteinkkel meghatároztuk a kalibrációs faktort, amely szükséges a sejtréteg zétapotenciáljának pontos kiszámításához. Szintén megmutattuk, hogy az általunk használt áramlási potenciál mérésének technikája megfelelően érzékeny ahhoz, hogy kimutathassuk a felszíni töltés változásait, amelyek befolyásolhatják a töltéssel rendelkező molekulák és nanorészecskék átjutását a vér-agy gát modellen.

## **Következtetés**

Munkám első célja egy általános felhasználású LOC eszköz fejlesztése volt különböző típusú biológiai gátak modellezésére. Fontos szempont volt a tervezésnél, hogy a mono- illetve kettes és hármas ko-kultúrában tartott tenyészetek elektromos ellenállását és marker molekulák permeabilitását egyaránt tudjuk mérni. A csatornás kialakítás lehetőséget biztosít áramlásmentes és folyamatos folyadékáramlást igénylő gátmodellek tesztelésére egyaránt. A kísérletek során a tenyésztőmembrán teljes felületén nyomon követhettük a sejtek növekedését fáziskontraszt-mikroszkóppal. A miniatürizált eszközt sikeresen teszteltük két fajta biológiai gátmodellel,

háromféle sejt kultúra felhasználásával, köztük elsőként optimalizáltuk a vér-agy gát hármis ko-kultúra modelljét LOC eszközön.

A második célkitűzésem egy módszertani újítás beállítása és tökéletesítése volt egysejtrétegek felületi töltésének meghatározására. A LOC eszközt kiegészítettük egy Ag/AgCl elektródapárral, amelynek segítségével biológiai gátmodelleken sikerült az áramlási potenciált megmérni, az irodalomban elsőként. Agyi endotél egysejtrétegen a két „zéta”-elektróda beiktatásával, egy feszültségerősítővel és egy oszcilloszkóppal felvett tranziens jellel pontosan meghatároztuk a sejt felszíni töltés értékét.