A kemotaxis mérése egysejtűekben és magasabb rendű szervezetekben

- Módszertani útmutató -



A kemotaxis mérése egysejtűekben és magasabb rendű szervezetekben

- Módszertani útmutató -

Írta: Kőhidai László

Szakmailag ellenőrizte:

Csaba György Láng Orsolya





Semmelweis Egyetem • Budapest, 2012 © Kőhidai László, 2012 Kézirat lezárva: 2012. május 20.

ISBN 978-963-9129-85-6

SEMMELWEIS EGYETEM



A kiadásért felel a: Semmelweis Egyetem Felelős szerkesztő: Kőhidai László Műszaki szerkesztő: Kőhidai László Terjedelem: 212 oldal

TARTALOMJEGYZÉK

ELŐSZÓ4
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS5
I. BEVEZETÉS
II. DEFINÍCIÓK, ALAPFOGALMAK10
1. A sejtmozgás fő típusai10
2. Citoszkeleton112.1 Prokarióták sejtváza122.2 Mikrotubulusok122.3 Mikrofilamentumok132.4 Intermedier filamentumok14
3. A sejtmembrán vázrendszere16
 4. A sejtmozgás alapjelenségei
 5. Receptorok, ligandok, szignalizációs rendszerek
 6. Kemotaktikus ligandok és receptoraik
III. A SEJTEK KEMOTAKTIKUS AKTIVITÁSÁNAK MÉRÉSE
1. Az ideális kemotaxis assay44
 Kemotaxis vizsgálatok kivitelezésének alapvető megfontolásai

2.2 Tápoldatok összetétele, pufferek	
2.3 Nyersanyagok és filterek	53
2.4 Referencia mérések	57
2.5 Sejtszám meghatározások	67
2.6 Az egyes technikák komparabilitása	71
3. Egyseitűek kemotaxisának mérése	
3.1 A "legősibb", filter-papíros eljárás	73
3.2 A három-furatú lemez és a T-maze assav	74
3.3 Opaleszcencia mérésén alapuló eljárás	77
3.4 Kapilláris-assay	
4. Magasabb rendűekből származó seitek migrációjának mérése	
4.1 Motilitás vizsgálata tenvésztőedényben	
4.2 Üveg, illetve teflongyűrűs eljárás	
4.3 Üveggátas eljárás	
4.4 Filteren keresztüli migráció	
4.5 Kollagén– és fibrin–géles eljárás	
4.6 Agar-lemezes assay-család	
4.7 Matrigel technika	117
4.8 Video-analízis	
4.9 Orientációs assay	
4.10 Alakváltoztatás assay	
4.11 Lab-on-chip technikák és a kemotaxis mérése	
4.12 Egyéb technikák	147
5. Módszertani kitekintés	
5.1 Fluorescence ratio imaging (FRI)	
5.2 Fluorescence resonance energy-transfer (FRET)	
5.3 Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)	
5.4 Fotoaktiváció	
5.5 Chromophore assisted laser inactivation (CALI)	
5.6 Traction-force microscopy	
5.7 Ribonuclease protection assay – RPA	
IV. ÖSSZEGZÉS	168
V. FÜGGELÉK	173
1 A kísérlettervezés szempontjai	

2 Technikák röviden	
3 Tanácsok, fogások	
4 Hasznos adatok	
VI. FORRÁSOK	



Előszó

A kemotaxis az egészséges és beteg szervezet egyik legalapvetőbb sejtélettani reakciója, tanulmányozása a XXI. század kutatója számára s elkerülhetetlen.

Sejtbiológusok, immunológusok, a molekuláris biológiával és genetikával foglalkozó kutatók nagy száma vizsgálja a prokarióták és eukarióták, sok tekintetben még ma is meglepetésekkel kecsegtető migrációs jelenségeit. Tudjuk, hogy vizsgálataink csupán akkor lehetnek a szó tudományos értelmében is eredményesnek mondhatók, ha az alkalmazott módszerek jól megválasztottak, a vizsgált modell és jelenség szempontjából egyaránt megfelelőek. A jelen munka célja éppen ezért a kemotaxis, illetve egyéb migrációs jelenségek elemzésére rendelkezésre álló technikák sokaságában való eligazodás megkönnyítése volt, ezt célozzák a rövid elméleti áttekintő részben és a kemotaxis vizsgálatok elméleti megfontolásairól írottak éppúgy, mint a módszertani kitekintés, illetve a *Függelék* aprólékosabb technikai leírásai. A szerző reméli, hogy e munkával nem csupán a már kemotaxis vizsgálatok iránt elkötelezett kutatóknak sikerül segíteni egyes problémák megoldásában, de több, eddig a kemotaxissal nem foglalkozó kutató is kedvet kap ennek az érdekes kutatási területnek a művelésére.

A szerző

Köszönetnyilvánítás

E helyen szeretnék hálás köszönetet mondani Dr. Csaba György egyetemi tanárnak a könyv írása és a kézirat áttekintése során nyújtott szakmai segítségéért és értékes tanácsaiért, valamint Dr. Láng Orsolya egyetemi adjunktusnak a szöveg értő szakmai gondozásáért.

A munkában szereplő egyes ábrák és fényképek átengedéséért hálával tartozunk az alábbi szerzőknek, kiadóknak és laboratóriumoknak: Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR , – *J of Cell Science* Wilkinson PC, Lackie JM. – *Exp Cell Res* Wilkinson PC. *J Immunol Methods* Haston WS, Wilkinson PC. *Methods Enzymol.* Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ, Mitchison TJ. *BMC Biotechnology* Folch Laboratory, University. of Washington, USA Michael W. Davidson and The Florida State University Research Foundation. NeuroProbe, Gaithersburg, USA ibidi GmbH, München, Németország Cellomics Inc, Berkshire, UK

Pierce, Rockford, USA

I. Bevezetés

A kemotaxis kutatásának kezdetei a XIX. század végére tehetők. Magát a jelenséget a XVIII. század elején, már a fénymikroszkóp egyik kidolgozója a németalföldi Leeuwenhoek is észlelte, azonban tudományos igényű leírását Engelmann (1881) és Pfeffer (1884) adták baktériumokban [1, 2], majd Jennings (1906) csillós eukariótákban [3, 4]. Mecsnyikov orosz tudós a fehérvérsejtek vizsgálata során szintén tudományos alapossággal vizsgálta a jelenséget (1908), mint az általa szintén elemzett fagocitózis egyik előkészítő lépését [5].

Ezt követően, a folyamat biológiai és klinikai fontosságának mind több elemét ismerték fel, és az 1920–1930-as évek a kemotaxis kutatások első virágkorát jelentették. A mind a mai napig alkalmazott alapvető definíciók jó részének megfogalmazása és számos biológiai és klinikai modell behatóbb vizsgálata is ekkorra tehető. A kísérletek elvégzése szempontjából alapvető felismerések leírását követően kiemelkedőnek mondható Harris munkássága az 1950-es években. A kemotaxis szempontjából modell-sejtnek tekinthető objektumok (pl. neutrofil granulocita, monocita) jellemzése mellett a kemotaxis vizsgálatok minőségi kontrollja terén fogalmazott meg alapvető elveket [6, 7].

A modern sejtbiológia és a biokémia eszköztárának kibővülése az 1960– 1970-es évek táján ezen a területen is áttörést eredményezett. Ez nem csupán abban jelentett újat, hogy a kemotaxis effektor mechanizmusainak (pl. sejtváz működése) molekuláris alapjait lehetett már magas szinten elemezni, de az egyes migráció típusok szabályozásának szignalizációját is sikerült

egyre nagyobb részletességgel leírni. Ezek között is kiemelkedőnek tekinthetjük a bakteriális kemotaxis szignalizációs folyamatainak Adler által az 1970-es években leírt folyamatát, melyben a receptor-ligand kapcsolódásától egészen az effektor mechanizmusig lépésről-lépésre sikerült feltárni a prokarióta kemotaxis intracelluláris szignalizációs folyamatait [8].

A korszerű proteinkémia gyors fejlődése e téren is éreztette hatását, lehetővé téve a kemotaktikusan aktív ligandok mind jobb jellemzését és azok hatásának molekulaszerkezettől függő elemzését egyaránt.

Fenti periódus végétől szinte folyamatosnak tekinthető a kemotaxis, mint érzékeny sejtfiziológiai válaszreakció mérésének alkalmazása a sejtbiológiai vizsgálatok során. Népszerűségét tovább fokozta, hogy a molekuláris genetikai vizsgálatok egyre bővülő eszköztárának segítségével sikerült rávilágítani a szignalizáció gén szinten megőrzött, általános mechanizmusaira (ld. az egyes bakteriális Che-proteinek filogenetikailag megőrzött volta) és egyes a kemotaxis kiváltásában fontos receptor-családok jelentőségére egészséges és kórós állapotokban (ld. CC és CXC receptorok kórtani szerepe). E vizsgálatok eredményeként az addig már számos esetben leírt és kemotaktikus potenciállal rendelkező citokin molekulák egy csoportját "kemokin" néven különítették el, majd ezek receptorainak szisztematikus vizsgálata és osztályokba sorolása követett, s ez a munka mind a mai napig változatlan aktivitással folyik.



1.1 ábra A kemotaxis-kutatás történetének fontos szakaszai és kiemelkedő személyiségei

A fentiekben említett rövid történeti áttekintés is sejteti, hogy a kemotaxis esetében egy olyan biológiai és klinika szempontból egyaránt fontos jelenségről van szó melynek általános érvényét, annak a megtermékenyítésben vagy tápanyag molekulák megközelítésében, illetve a gyulladásban vagy a tumorok áttétképzésben betöltött szerepével csupán jelezni lehet.

Az említett kemotaktikus aktivitások és számos más kemotaxishoz kötött válasz tanulmányozásában – mint a kísérletes tudományágak mindegyikében – nagy, sokszor az elemzők által nem is kellően értékelt szerep jut az alkal– mazott technikának, amellyel az egyes reakciók mérhetővé tehetők. A kísér– letes úton nyert eredmények értelmezése, pedig sok esetben függ attól, hogy a modell-sejtnek megfelelő technikát alkalmazza-e a kutató, illetve ismeri-e az alkalmazott módszer határait. A kemotaxis kutatása már történeti okokból is számos technika kidolgozására adott lehetőséget, s mind a mai napig évente több új módszer bevezetéséről számol be a szakirodalom. Ugyan a műszaki fejlődésnek köszönhetően mind újabb és jobbnak ítélt módszerekkel találkozunk, itt sem lehetünk mindig biztosak abban, hogy a legújabb, "legdrágább" módszer feltétlenül a legalkalmasabb is a feltett kérdés megválaszolására.

Alábbi munkánkban arra vállalkozunk, hogy áttekintést adjunk a kemotaxis kutatások e speciális szeletéről – a kemotaxis mérésére alkalmazott módszerek széles skálájának bemutatásával. Célunk, hogy a kemotaxis fogalomkörébe tartozó kérdések rövid áttekintése után a módszerek áttekintésekor a legalapvetőbb technikai paraméterek megemlítése mellett a módszerek alkalmazásának határait is jelezzük. A munka végén pedig a mindennapi laboratóriumi gyakorlat során összegyűjtött tapasztalatok gyűjteményével igyekszünk hozzájárulni ahhoz, hogy az olvasó ne csupán irodalmi ismereteit bővíthesse a kemotaxis mérése terén, de annak gyakorlati kivitelezésében is sikeresen működhessen.

II. Definíciók, alapfogalmak

Az alábbi alapfogalmak ismerete elengedhetetlenül szükséges a kemotaxis és kísérő jelenségeinek vizsgálata során, valamint az alkalmazott modellsejtek válaszreakcióinak értékelésekor.

1. A sejtmozgás fő típusai

1.1 Migráció

A specifikus szignál érzékelésére képes sejt elmozdulása. A fogalom általános érvényű, nem ad információt arról, hogy a sejtmozgás mennyiben függ a kiváltó molekula koncentrációjától és arra sem utal, hogy a mozgásra jellemző minőségi, illetve mennyiségi jegyek változtak-e, s ha igen, hogyan.

1.2 Kemokinezis

Az önálló mozgásra képes sejteknek a környezetükben feloldott anyagok hatására történő elmozdulása. Iránya nem függ a mozgást kiváltó kémia anyag koncentráció-gradiensétől, nem-vektoriális, hanem random mozgáselemek sorozata.

1.3 Kemotaxis

Az önálló mozgásra képes sejt mozgásának megváltozását itt is a környezetben oldott molekulák váltják ki, azonban itt a mozgás minőségi és menynyiségi paramétereinek alakulását a kiváltó anyag koncentrációjának változása (gradiens) befolyásolja. Ennek megfelelően beszélünk pozitív kemotaxisról, mely rendszerint a növekvő gradiens irányába történő elmozdulás, míg ennek negatív formája a koncentráció gradiens csökkenése irányába történik. A pozitív kemotaxist kiváltó anyagokat kemoattraktánsoknak, míg a negatív választ kiváltókat kemorepellens anyagoknak nevezzük.

1.4 Nekrotaxis

A kemotaxis egyik speciális formája, melyben az elpusztult sejtekből kiszabaduló, biológiailag aktív anyagok hatnak attraktáns, vagy repellens módon a környező sejtekre.

1.5 Haptotaxis

A klasszikus kemotaxistól eltérő mozgás, melyet a szervezet egyes szöveti tereiben található felszínekhez asszociálódott molekulák gradiense vált ki. Ebben az esetben tehát – a kemotaxistól eltérően – a mozgást kiváltó ligand nem a folyadéktérben alakít ki gradienst, hanem egy felülethez kötötten, és az időben lényegesen állandóbb. A jelenség felismerése új távlatokat nyitott a kemotaxis kutatás terén, mivel a kemotaxis szempontjából indifferens szöveti terek sejtjeiről sikerült bebizonyítani, hogy azok is képesek koncentráció-gradiens által irányított elmozdulásra.

2. Citoszkeleton

A sejtvázat három fő szerkezeti elem alkotja: a mikrotubulusok, a mikrofilamentumok és az intermedier filamentumok. Ezek ugyan különálló rendszereket alkotnak, azonban komplex hálózatkénti működtetésük elengedhetetlen a sejt mozgásjelenségei során. Az egyes komponensek között

kapcsolat megteremtését egy negyedik szerkezeti elem, a motorproteinek teszik lehetővé.

2.1 Prokarióták sejtváza

A modern sejtbiológia, illetve a mikrobiológia alapos kutatásai és több új technika bevezetésének köszönhetően csupán néhány évvel ezelőttre tehető annak a fordulópontnak az ideje, amikor sikerült prokarióta sejtek esetében is kimutatni az eukarióta sejtek vázának két jól ismert és nagy mennyiségben megtalálható elemét, illetve azok rokon molekuláit. Először 1991-ben a baktériumok sejtosztódásánál kialakuló gyűrű alakú képletből sikerült izolálni az FtsZ névre keresztelt homológot, mely magas fokú szerkezeti homológiát mutat a tubulinnal [9]. Ezt követte a MreB leírása, mely szerkezetét tekintve közeli homológja a G aktinnak, s polimerizálódó képessége folytán az eukariótákban fellelhető formához hasonló szerepet tud betölteni. [10].

2.2 Mikrotubulusok

E csőszerű képződmények, α - és β -tubulinokból álló heterodimerek összekapcsolódásával jönnek létre. Ezek először protofilamentumokat alkotnak, majd 13 protofilamentum létrehozza a pozitív és negatív véggel rendelkező mikrotubulusokat. A mikrotubulusok felépítése során megfigyelhető polimerizáció, illetve depolimerizáció következtében pozitív és negatív pólust különböztetünk meg. A felépülés kezdete a tubulin fehérje-család egy harmadik tagjának, a γ -tubulinnak a jelenlétéhez kötött, mely az ú.n. nukleációs helyeken teszi lehetővé a további α - és β -tubulinok kötődését. Maga a polimerizáció GTP energiáját igényli, mely a dimer bekötődését követően GDP-re hidrolizál. A mikrotubulusokhoz kapcsolódó fehérjéket (MAP-ok) két nagy csoportba sorolhatjuk: (i) a polimerizációt és depolimerizációt szabályozó proteinek (tau, MAP2), és (ii) az ú.n. mikrotubulus motorfehérjék (kinezin, dinein). Utóbbi fehérjék segítik a mikrotubulusok egymáson történő elmozdulását, valamint különböző molekulákat, vezikulumokat képesek megkötni és szállítani.

2.3 Mikrofilamentumok

A mikrofilamentumokat két F (fibrilláris) aktin hélixszerű összetekeredése hozza létre. Az F aktin G (globuláris) aktin monomerekből épül fel. A mikrofilamentumok a mikrotubulusokhoz hasonlóan szintén rendelkeznek pozitív és negatív véggel, mely jelzi felépülésük dinamizmusát: a pozitív vég itt is a felépülő molekula része, míg a negatív pólus a leváló G aktin molekulákkal megrövidülő véget jelenti. A mikrofilamentumokhoz kapcsolódó fehérjék egy része magát a fent leírt folyamatot szabályozza. Ilyen, pl. a polimerizáció- depolarizációt szabályozó profilin, mely a timozin és a membrán foszfolipidjeinek segítségével vesz részt e folyamat katalizálásában. A filamentumok szerveződésében szerepet játszó fehérjék (pl. alfa-aktinin, fimbrin, spektrin, gelzolin), a mikrofilamentumokból álló kötegek kialakításában illetve polaritásuk meghatározásában vesznek részt. Ezen kívül e fehérjék szabályozzák a membránhoz való kapcsolódását és a hosszirányú növekedését citoszkeletális is elemnek. А miozin-család e а mikrofilamentumokhoz kapcsolódó motor fehérjék nagy csoportja (aktinmotorok). Ezek egysejtűektől az emberi sejtekig fellelhetők, azonban mind alosztályaik eltérő tulajdonságai, mind a sejtmozgásban betöltött szerepük jelentősen eltérő lehet a filogenezis egyes fokait reprezentáló sejtek esetében (ld. miozin I és II intracelluláris eloszlása).

A fentiekben vázolt szerkezeti elemek teszik lehetővé, hogy az aktin filamentumok kétdimenziós kötegekbe, vagy háromdimenziós hálózatokba rendeződjenek a sejtmembrán alatt, s így meghatározó szerepük lehessen a sejt alakjának, a membrán stabilitásának létrehozásában, osztódó sejtekben pedig a citoplazma kettéosztódásában.

A környezeti hatásokra a sejt mind az alakját, mind az extracelluláris mátrix molekulákhoz való kapcsolódását megváltoztatja. E változások során a sejtváz elemeinek átrendeződése következik be, melyben az aktin-váz átalakulása igen fontos. Az egyik legszembetűnőbb változás, mely egysejtűekben éppúgy felfedezhető, mint emberi fehérvérsejtek, vagy keratinociták esetében az amőboid mozgás, illetve annak alapvető mozgató eleme az állábak kialakítása. A sejtek membrán alatti, ú.n. kortikális aktin váza meghatározó szerepet tölt be az eltérő morfológiájú állábak (ld. lobopódium, filopódium, lamellopódium, retikulopódium stb.) kialakításában.

2.4 Intermedier filamentumok

Az előző két pontban ismertetett sejtalkotók (mikrotubulusok és mikrofilamentumok) mechanikai adottságai jelentősen eltérnek. Plaszticitásuk és nyújtási szilárdságuk terén éppen ellentétes jellemzőik miatt, ha csupán e két elem adná a sejt vázát annak külső és belső hatásokra való dinamikus válaszkészsége jelentős mértékben korlátozott lenne, hiszen míg a mikrotubuláris rendszer kis erőbehatást tud csak elviselni, nagy alakváltozás mellett, addig a mikrofilamentumok sokkal erősebbek, ám az alakváltozás tekintetében rigidebbnek bizonyulnak. A két elem felhasználásával megoldhatatlannak tűnő ellentétet hidalja át az intermedier filamentumok rendszere. (Nevüket nem erről a funkcióról, hanem méretük köztes voltáról kapták)

Az intermedier filamentumok a sejtben jól kiterjedt hálózatot alkotnak, gyakran a sejtmag körül, ahonnan a sejt perifériája felé terjedve a plazmamembránnal létesítenek kapcsolatot, sokszor éppen a sejtkapcsoló struktúrák területén. Ezek a sejtváz kevésbé dinamikus elemei, elsősorban a sejt alakjának stabilizálásában játszanak szerepet. Az aktin filamentumokhoz és a mikrotubulusokhoz hasonlóan, az intermedier filamentumok is protein monomerekből épülnek fel, ezek azonban nem globuláris fehérjék, hanem hosszú fibrózus molekulák, amelyek három jól elkülönülő doménnel rendelkeznek. Egy N-terminális feji, egy C-terminális farki résszel, és a kettő között elhelyezkedő "rúdszerű" doménnel, amely α -helikális szerkezetű és hét aminosav motívum tandem ismétlődéséből áll. Négy, glikozilált monomer összeépüléséből jön létre a protofilamentum, melyből végül nyolc darab öszszekapcsolódása alakítja ki az intermedier filamentumot. Egyes típusaik számos keresztkötés létesítésére képesek, míg más típusokon alig találunk ilyen szerkezeti elemeket jelezve ezek eltérő intracelluláris funkcióit. A sejtben önálló hálózatokat alkotnak, melyet az is hangsúlyoz, hogy sem eltérő intermedier filametumokkal, sem más, sejtvázat alkotó fehérjével nem kapcsolódnak. Egy másik fontos eltérés az intermedier filamentumok és a másik két sejtvázalkotó között, hogy az intermedier filamentumok monomerjei sejt, illetve szövetspecifikusak pl. hámsejtekben citokeratin, kötőszöveti sejtekben vimentin, izomszöveti sejtekben dezmin az intermedier filamentumot alkotó legfontosabb fehérje. Lényeges különbség még, hogy sem a monomereknek, sem az összeépülő nagyobb egységeknek nincs az eddigiekben tárgyaltakhoz hasonló polaritásuk, felépülésük dinamizmusa is nagyban eltér azokétól.

3. A sejtmembrán vázrendszere

A sejtmozgások szempontjából igen fontos a sejtmembrán kapcsolódása a citoszkeletonhoz, illetve a sejt-sejt és sejt-mátrix kapcsolatok. A kapcsolat a résztvevő molekulákat tekintve lehet homofil, heterofil, illetve kapcsolódhatnak egy harmadik, extracelluláris mátrix elem közbeiktatásával is. E váz kialakításában fontos szerep jut azoknak a fehérjéknek, amelyek a membrán alatti váz kihorgonyzásában vesznek részt.

Ilyen membránproteinek például az *integrinek*. Ezek a fehérjék α és β alegységből állnak. Az α alegység extracelluláris térbe nyúló részén kálcium, illetve magnézium-kötő helyek találhatók. Számos integrin a kemotaxisban is fontos szerepet játszik. Ezek a sejt szabad extracelluláris felszínén fibronektinek, laminin vagy kollagén kötődését teszik lehetővé, mely kötések kialakításában a peptidek RGD vagy RGDS szekvenciái lényegesek. Az intracelluláris térben az integrineket egy több fehérjéből álló kapcsoló komplex (talin, vinculin, tensin, alfa aktinin) horgonyozza ki az aktin hálózathoz.

A *cadherinek* családjának a sejtek közötti kapcsolatok kialakításában fontos szerep jut. Egymással kapcsolódva alkotják a sejt-sejt közötti dezmoszómális kapcsolatokat, míg intracellulárisan ezek is egy több fehérjéből (ld. plaktoglobinok, dezmoplakinok) álló kapcsoló elem, a plakk segítségével kapcsolódnak az aktin hálózathoz.

A *szelektinek* az extracellulárisan elhelyezkedő szénhidrátláncok specifikus felismerésére és kötésére képesek. Három fő, eltérő szövetspecifitást mutató típusuk (E-, L-és P-szelektin) mindegyike meghatározó szerepet játszik a kemotaktikus folyamatokban.

Az *immunglobulin szupercsalád* egyes, a felszíni membrán extracelluláris felszínén megjelenő tagjait is a sejtmembrán kapcsoló struktúráiként tartják számon. Szintén fontos jellemzőjük a szövetspecifitás, és az, hogy a fejlődés más-más szakaszaiban expresszálódnak. Egyaránt részt vesznek az MHC I és MHC II β2-mikroglobulin, a CD8 és egyes citokin receptorok felépítésében. (A fenti felsorolásban csupán a leggyakrabban előforduló kapcsoló molekulákra utaltunk, azonban számos egyéb integráns membránfehérjét ismerünk, mely kihorgonyzási pontként szolgál a membrán citoszkeleton számára.)

Α sejtmembrán extracelluláris felszínén elhelyezkedő molekulák extracelluláris, ú.n. mátrix partner molekulái közül már említettünk néhányat. A dimer glikoprotein fibronektinek mellett, fontos szerep jut a glukózaminoglikánoknak (GAG) pl. heparán-szulfát, keratin-szulfát, kondroitin-szulfát, egyes "core proteinek". E molekulák sok esetben a sejt szignalizációs rendszerének részei, mivel koreceptorokként működhetnek. Ezen túl, különösen a sejtek auto- és parakrin szabályozási folyamataiban képesek a szecernált szignál molekulák aktivitásának módosítására, e molekulák immobilizálására is. Fentiek révén jelentős szerep jut e molekuláknak a sejtmozgás kivitelezése mellett, egyes szabályozási folyamatokban is.

4. A sejtmozgás alapjelenségei

Az alábbiakban a sejtmozgás három fő megnyilvánulási formájának a prokarióta csillós mozgásnak és az eukarióta sejtekre jellemző amőboid és a csillós-ostoros mozgásnak legfontosabb ismérveit gyűjtöttük össze – a teljesség igénye nélkül. Habár jelen keretek között a téma nagysága meghaladja az egyes mozgásformák részletes elemzését, nem is beszélve az egyéb, főleg alacsonyabb filogenetikai szinteken jelentkező formák (pl. ciklózis, sejtizommal történő mozgás) tárgyalásáról fontosnak érezzük e kérdések fölvázolásával jelezni a későbbiekben tárgyalásra kerülő egyes vizsgálati formák elméleti, sejtbiológiai hátterét.

4.1 A prokarióták mozgása

Már az élőlények e csoportjában elmondható, hogy – az eukarióta sejtekhez hasonlóan – korántsem minden sejttípus képes helyváltoztató mozgás végzésére. A sejteknek csupán az a csoportja képes erre, melyek a sejt méretét is sokszor meghaladó hosszúságú, egy (monotrich) vagy több flagellummal rendelkeznek, melyek több flagellum esetén a sejt egyik pólusán (ld. lopotrich) vagy a sejt egész felszínét beborítva (ld. peritrich) helyezkednek el. A bakteriális flagellumot 30–60 kD–os flagellin fehérje molekulák építik fel, melyek C– és N–terminális végei nagy konzerváltságot mutatnak, míg a mo– lekulák belső szerkezetében variabilitás figyelhető meg. A flagellinek polime– rizációja révén kialakuló pentahelikális szerkezet képezi a flagellum kb. 20 nm átmérőjű üreges falát. A falgellum sejtmembrán közeli része a flagellin polimerizációjának kezdőpontját adó ú.n. "hook" azaz horog–régió, mely

mechanikai szempontból is eltérő, erősebb komponens, a forgó mozgást végző képlet bázisát adja. A flagellum mozgását generáló és irányító képlet a sejtmembránt átérő bazális test, mely csupán nevében egyezik az eukarióta csilló/ostor esetében leírt komponenssel (4.1 ábra).



4.1 ábra Baktérium flagellumának bazális testének szerkezete és az azt felépítő főbb flagelláris proteinek.

Amint az ábra is mutatja a több rétegben számos fehérjéből felépülő képlet a bakteriális sejtmembrán/sejtfal egyes rétegeivel alakít ki kapcsolatot. Annak megfelelően, hogy Gram negatív vagy Gram pozitív sejtről van szó 4 (L, P, M, S) vagy csak 2 (M, S) gyűrűk alkotják. Magát a flagellum közvetlen mozgató apparátusának külső álló tagját az ú.n. statort az ábrán szürke színnel jelzett és 11 körkörösen elhelyezkedő, egységenként 2 MotA és 4 MotB fehérje komplexéből felépülő Ε gyűrű adja. gyűrű MotB tagjainak protonálható/deprotonálható helyei a MotA fehérjékkel együtt a gyűrű 9, protonok áteresztésére képes, transzmembrán szegmensét alkotják. A forgó mozgásra képes ú.n. rotort az ábrán narancsszínnel jelölt C gyűrű MS gyűrűvel alkotott egysége képezi. A flagellum tényleges mozgásának irányát a stator és rotor között áthaladó, a sejten belüli szignalizációs folyamatok (ld. alább) eredményeként kialakuló H+ (egyes esetekben Na+) áramlás iránya szabja meg. A protonok sejtbe történő bevándorlása a flagellum óramutató járásával ellentétes irányú (CCW=counter clockwise) forgását eredményezi, mely a sejtek egyenes irányú mozgását okozza. Az ezzel ellentétes, tehát az óramutató járásával megegyező irányú mozgás (CW=clockwise) a sejtek mozgásállapotában orientálódási ciklusként is értékelt bukdácsoló (ú.n. tumbling) mozgását eredményezi. Ugyan a rotor forgásának frekvenciája igen magas értéket is elérhet (6000–17000 rom), azonban ennek csak töredéke adódik át ténylegesen a flagellumra, annak forgási frekvenciája 200–1000 rpm. Maga a flagellumok által biztosított mozgás sebességének (kb. 50µm/mp) hatékonysága azonban a testmérethez viszonyított arányokat is véve meghökkentő.

	Sebesség (km/ó)	Sebesség (testhossz/mp)
Gepárd	111	25
Ember	37.5	5.4
Baktérium	0.00015	10

4.1 táblázat Baktérium úszási sebességének összehasonlítása

4.2 Az eukarióta sejtek mozgása

4.2.1 Amőboid mozgás

Az amőboid mozgást végző sejtek citoplazmájára jellemző annak rétegezettsége. Ennek fontos része a már előzőekben is említett külső ú.n. ektoplazma,

melyben aktin molekulák hálózata található. Az ez alatti tér az ú.n. endoplazma, melynek külső határoló felületén fibrilláris molekulák jelennek meg. A sejtekben a megfelelő stimulus hatására e két réteg határfelületén lévő molekulák között alakul ki kapcsolat, a globuláris és fibrilláris fehérjék, kálcium jelenlétében és ATP szolgáltatta energia révén elcsúsznak egymáson (ld. "sliding" jelensége). Fenti folyamatnak köszönhető, hogy az újonnan kialakuló álláb belsejébe újabb és újabb endoplazma tömegek kerülnek elősegítve az álláb tömegének növekedését, és a polarizált citoplazma szerkezetképzésével a sejtek migrációja megindul az adott irányba. Természetesen a fenti "szökőkút mechanizmus"-nak is nevezett folyamat csak egy komponense egy jóval összetettebb lépéssornak, hiszen az amőboid mozgás kialakulása szilárd felszínhez kötött, így a membrán és e felszín közötti kapcsolatok kialakulása is fontos szereppel bír. A sejt szilárd aljzathoz rögzülése adhéziós plakkok segítségével történik, melyekben integrinek és az azokhoz kapcsolódó intracelluláris stressz filamentumok játszanak döntő szerepet. Mint azt a 4.2 ábra is szemlélteti e plakkok kialakulásában, illetve azok endoplazmához való rögzülésében számos molekula vesz részt. Az integrinek membránban való eloszlásának befolyásolásával és az aktin hálózat polimerizációjának polarizálásával szignalizációs kaszkádok sora teszi szabályozhatóvá a folyamatot.



4.2 ábra: Adhéziós plakkok molekuláris összetétele, kialakulásuk dinamizmusa [11]. Az ábra jól mutatja, hogy a fokális ahhéziós plakk kialakulása során a membrán integrinek és a sejt mikrofilamentáris szerkezete közötti kapcsolat megteremtésében számos molekula vesz részt (pl. talin, vinculin), míg más molekulák egy szignalizációs kört kialakítva segítik elő az aktin–aktin közötti kapcsolatok kialakulását (ld. FAK–GIT–PAK útvonal), illetve a mikrotubuláris rendszer épülését (ld. APC és dynimin szerepe).

A membrán alakváltozásait kialakító belső erők közvetítésében nagy szerep jut a membránközeli térben kialakuló speciális aktin formációknak. Ezekben az ú.n. actin related protein-ek (Arp2/3) segítségével, egymással kb. 70 fokot bezáró aktin szálak rendszere jön létre, mely képes a membrán belső felszínéhez kapcsolódó fehérjékkel (ld. filamin, profilin, miozin) időleges öszszeköttetést teremteni. E kapcsolatok révén ezek a polimerizálódó aktin "villák" mérhető erőt fejtenek ki a membránra, elősegítve annak formálódását az álláb képződése során (4.3 ábra).



4.3 ábra: Aktin polimerizációja és annak molekuláris szintű szabályozása [11].

4.2.2 Csillós- ostoros mozgás

Morfológiai szempontból e két sejtfüggelék közötti, szemmel látható különbség, hogy míg a csillók viszonylag rövid citoplazma nyúlványok és sűrűn borítják a sejteket (pl. egy Tetrahymena testét kb. 600 csilló fedi), addig az ostorok hosszabb képletek és számuk is jelentősen kevesebb. Mozgási módjuk szintén eltérő, a haránt és hosszanti sorokba rendezett csillók a tér egy síkjában előre-hátrairányuló periodikus csapási hullámokkal mozognak. Ennek összerendezettségét mutatja, hogy a hosszanti sorokban az azonos helyeken elhelyezkedő csillók a csapási hullám azonos fázisában vannak, melyet az e képletek alapjánál elhelyezkedő *bazális testek* között kialakuló kapcsolatok tesznek lehetővé. Ostorok esetében, a lényegesen hosszabb képlet mozgástípusa eltérő, propeller-szerű, körkörös mozgást figyelhetünk meg. (Egyes kutatók szerint a két sejtfüggelék mozgásának eltérése éppen azok hosszában keresendő, az ostor hosszúságából adódhat ugyanis, hogy annak membránhoz közeli része passzívan vesz csak részt a mozgásban.

A két sejtfüggelék belső szerkezete nagyfokú hasonlóságot mutat (4.3 ábra). Plazmamembrán veszi körül az axonémát, amelyet képlettel kifejezve, 9x2+2 mikrotubulus alkot. A két centrális mikrotubulust egy fehérje réteg borítja, ezt veszi körül kilenc pár perifériásan elhelyezkedő mikrotubulus. A széli párok egyik tagja az A mikrotubulus teljes, mivel 13 protofilamentumból áll, a mikrotubulus azonban nem teljes, mert csak 10-11 másik a B protofilamentumból áll. Az A-ról a szomszédos mikrotubulus pár B tagja felé proteinek, dinein karok, nyúlnak. A középső és a szélső motor mikrotubulusokat az A-ból eredő küllők, a szomszédos párok A és B tagját pedig a nexin nevű fehérje kapcsolja össze. A csillók és ostorok alatt található a fent már említett bazális test, amelyet szintén mikrotubulusok (9x3 db), építenek fel. A csillók és az ostorok mikrotubulusainak negatív vége a bazális test felé, pozitív vége pedig a csilló disztális vége, tehát az azt borító plazmamembrán felé néz. A bazális test a tubulin alegységek polimerizációját irányítja és ezzel egyik szabályozója a mikrotubulusok hosszirányú növekedésének, illetve regenerációjának is. A mozgás molekuláris mechanizmusának lényege, hogy egy adott mikrotubulus pár A mikrotubulusán lévő motorprotein, a dinein-karok segítségével a szomszédos mikrotubulus pár B mikrotubulusán mint egy sínen lépeget, végső soron elcsúszik annak pozitív vége irányába. A küllők és a nexin azonban összekapcsolja a perifériás mikrotubulus párokat a centrális mikrotubulus párral és egymással, ezért az

elcsúszás helyett inkább elhajlás következik be. Hasonlóan szinte az összes mozgáshoz, a csilló és ostor működése is kalcium ionok jelenlétét feltételezi, míg a szükséges energiát az ATP hidrolízise szolgáltatja.



4.4 ábra: Csilló/ostor szerkezete [12].

5. Receptorok, ligandok, szignalizációs rendszerek

5.1 A kemotaxis szignál transzdukciója prokariótákban

Prokarióta sejtek kemotaxisának intracelluláris szignalizációja, mint azt a Bevezetés fejezetben már említettük, Adler pionír munkásságának köszönhetően mind a mai napig talán az egyetlen olyan szignalizációs folyamatnak tekinthető, melyben a ligandum/receptor interakciójától az effektor mechanizmusok beindításáig a teljes biokémiai folyamatsor ismert. Ennek a folyamatnak az áttekintő képét láthatjuk az 5.1 ábrán.



5.1 ábra Bakteriális kemotaxis intracelluláris szignalizációjának áttekintő vázlata.

A bakteriális kemotaxis szignalizációjánál fontos annak az eukariótáktól eltérő alapvető eltérés megértése, mely szerint a baktérium sejt folyamatos mozgást végez. Ezt a sejt kis mérete és a detektálható koncentráció különbségek közötti eltéréssel magyarázzák, Eszerint a sejt folyamatos mozgása során, mintegy letapogatja környezetének kémiai összetételét és egy primitív, molekuláris szintű memóriának megfelelő folyamatsor (ld. adaptáció) segítségével orientálódik a kedvező és kedvezőtlen környezeti tényezők között. A folyamat tehát a sejtek kemotaxis receptorához kötődő ligand nélkül is folyik. Ezt az teszi lehetővé, hogy a sejtben két egymástól független receptorhoz kötött mechanizmus is működik: i) az egyiket a receptor intracelluláris szignáltovábbító doménje generálja – ez ligandum kötése nélkül is aktív; ii) míg a másikat a receptor metil-csoportokat kötő fehérjéinek (methyl accepting chemotaxis protein=MCP) működése jellemzi – ez ligandum bekötődését követően aktiválódik. Mindkét folyamatsor ú.n. kemotaxis proteinek (Che~) interakciójának eredményeként valósul meg.

A *ligandum nélkül* működő lépéssor első történése a CheA foszforilációja, mely során más kemotaxis proteinek (CheW, CheV) jelenléte is nélkülözhetetlen. A foszforilált CheA ezt követően a rendszer effektor molekuláját, a CheY-t foszforilálja, melynek hatására az a fentiekben már ismertetett bazális test intracelluláris részével kölcsönhatásba lép és indukálni tudja a protonáramlás CW rotációt eredményező formáját – a sejt rövid időre bukdácsoló, tumbling mozgásformát vesz fel. A folyamat során a CheB-nek nevezett metilészteráz alacsony szinten tartja az MCP-k metiláltsági fokát.

A *ligandum bekötődéséhez* kapcsolódó reakciósor alapvető lépése több kemotaktikusan ható ligandum (pl. cukrok, dipeptidek) esetében már a sejt-

membrán és a sejtfal által közbezárt periplazmatikus térben, a receptoroktól relatíve távol lezajlik, ugyanis e ligandumok itt szállítómolekulákhoz kötődnek. A folyamat második lépésében e szállító molekulákkal alkotott komplexek – más esetekben (pl. aminosavak, ionok) pedig maguk a ligandumok –, kapcsolódnak a molekulatípusokra specifikus receptorokhoz (pl. T_{ap}, T_{sr}), melyek a sejt membránjában helyezkednek el. A kötődés következtében a sztereokonfigurációjának átalakulása, illetve MCP-k receptor az expresszálódása figyelhető meg, melyet metil-csoportok kötése követ - ezt a CheR-nek nevezett metiltranszferáz enzim katalizálja. (Az e tekintetben modellnek számító Asp receptora esetében a receptor dimerizációja következtében 8 ilyen metilációs hellyel számolhatunk receptoronként.) Fenti változások eredményeként a CheA molekulák aktivitása (foszforilált molekulák száma) csökken a sejtben. Ennek eredménye, hogy a folyamat terminációját bazális test szinten végző CheZ hatásos mértékben tudja defoszforilálni CheY-t, miközben maga foszforilálódik. A folyamat eredménye a flagellum CCW irányú rotációja és a sejt egyenes irányú úszása.

Meg kell említenünk, hogy a fenti mechanizmusok sebessége igen gyors, kb. 200 ms alatt a receptortól a flagellumig lefutó pályát ír le. Repellens és attraktáns anyagok esetében flagellum ellentétes mozgásállapotát eredményezi, de ezek az állapotok folyamatos ú.n. adaptációs folyamatok (ld. CheR, CheB hatásait) közbeiktatásával alternálva ismétlik egymást.

5.2 A kemotaxis szignál transzdukciója eukariótákban

A komplex kemotaktikus válasz kialakulásához elengedhetetlen a sejtek szignalizációs rendszerének adekvát működése. A szabályozó molekulák, a ligandok kémiai szerkezetüket tekintve igen eltérőek lehetnek. Vannak köztük fehérjék, peptidek, aminosavak, szteroidok, retinoidok, zsírsav származékok, sőt gázok is, mint a CO vagy NO. Ezek eljutnak a célsejtekhez, amelyeknek a legtöbb esetben a ligandot megkötő, specifikus fehérjéje, azaz receptora van. A kettő kapcsolódása után a receptor aktiválódik, ami különböző lépéseken keresztül kiváltja a sejt reakcióját.

A hidrofób molekulák, mint pl. a szteroidok, a retinoidok, képesek átdiffundálni a plazmamembránon, így e ligandok citoszol receptorral rendelkeznek. Ezeknek a receptoroknak hasonló a felépítésük. Inaktív állapotban a receptor C terminális részéhez egy gátló fehérjekomplex csatlakozik. Amikor a ligand is bekötődik szintén a receptor C terminális végéhez, a gátló komplex leválik, a receptor konformációjának megváltozásával szabaddá válik a középső, DNS kötő, ú.n. Zn-ujjas régió. Ezután a ligand-receptor komplex bejut a sejtmagba és ott azokhoz a specifikus DNS területekhez kötődik, amelyek a ligand által regulált gének közelében vannak. A receptor N terminális végén található, transzkripciót serkentő régió közreműködése révén megtörténik ezeknek a géneknek az átírása. Meg kell jegyeznünk, hogy az elmúlt évtized kutatásai ezen a téren sok újat hoztak. Így bizonyítást nyert, hogy az e csoportba tartozó szteroidok esetében nem csupán citoszolban elhelyezkedő receptorokkal és ennek folytán elhúzódó hatásokkal számolhatunk, de ezek a ligandok is képesek egyes membrán receptorok indukciójára. Éppen kemotaxis vizs-

gálatokkal sikerült kimutatni e receptorok rapid indukálhatóságát és a sejtek ligand-függő kemotaktikus válaszreakcióit eukarióta csillós modellen.

A hidrofil molekulák receptora a plazmamembránban található. Ez a receptor egy jelátalakító kaszkád első tagja, amely a ligand által képviselt külső jelet sejten belüli jellé alakítja, ami azután kiváltja a sejt működésének megváltozását. A külső jelnek belsővé alakítása a jelátvitel vagy szignál transzdukció. A membránreceptoroknak három fő fajtájuk ismert: i) az ioncsatornához aszszociáltak, ii) a G- fehérjéhez kötöttek és iii) az enzimekhez kapcsoltak.

A kemotaxis szempontjából a G-fehérjékhez kapcsolt receptorok a legfontosabbak, ezért ezekkel részletesen foglalkozunk.

Eltérő, specifikus részük természetesen az extracelluláris, ligandkötő régió, míg a plazmamembránt hétszer átérő, és a citoplazmába nyúló részük nagy homológiát mutat. Ez utóbbi intracelluláris felszínéhez kötődnek a trimer Gfehérjék, melyek α , β és γ alegységből épülnek fel. Az G-fehérje α alegysége GTP kötésével válik aktívvá, ennek GDP-vé hidrolizálása inaktiválja a komplexet. A ligandnak a receptorhoz történő kapcsolódása aktiválja a G-fehérjét, amely ezután olyan folyamatokat indít be, amelyek megnövelik, más esetben csökkentik néhány, másodlagos hírvivő szerepet betöltő, kis molekulasúlyú vegyület mennyiségét a sejtben. Ilyen anyagok lehetnek például a cAMP vagy a kálcium ion. A stimuláló és a gátló hatású G-fehérjék α alegységükben különböznek. A másodlagos hírvivők egyik fő támadáspontját a különböző protein kinázok jelentik, melyek enzimeket, enzimrendszereket foszforilálnak és ezáltal indukálják azokat. A G-proteinek aktivációja egyéb mechanizmusokat is beindíthat, például a foszfolipáz C aktiválása útján hatással van a membránhoz leválására. átalakulására, kötött lipidek ami során inozitol

foszfolipidek (PIP,IP3), valamint diacil-glicerin (DAG) keletkezik. Az inozitol triszfoszfát (IP3) mint másodlagos hírvivő molekula az intracelluláris kalciumszint emelkedését idézi elő, s ez újabb enzimeket kapcsol be a folyamatba. A DAG a protein kináz C-t aktiválja, s ezzel sok fehérje lépcsőzetes foszforizációját idézi elő. A DAG lebontásának egyik terméke az arachidonsav, mely a prosztaglandin-szintézis egyik előanyaga. Ez szintén egy új utat teremt a sejten belüli változások létrehozásában, s a kemotaxis egyik lehetséges induktorának, a leukotrién 4B-nek kialakulásában is szerepet játszik.

A fent vázolt szignalizációs folyamatok jellemző tulajdonsága a jelamplifikáció, mely viszonylag kevés ligand bekötődése esetén is biztosítja a hatásos celluláris válaszreakció kialakulását. E szerint egyetlen ligand bekötődése például sok G-fehérjét aktivál. Minden egyes G-protein több adenilcikláz működését serkenti, aminek hatására több cAMP keletkezik. Sok protein kináz aktiválódik, amelyek ezután sok célfehérjét aktiválnak. Ezek működése következtében nagyon sok olyan molekula keletkezik, amely a sejt válaszát biztosítja. Az alábbiakban egy professzionális kemoattraktáns ligand, az fMLF intracelluláris szignalizációjának példáján kívánjuk bemutatni azt az összetett folyamatot, melynek hatására a ligandum bekötődését követően a sejtek migrációja megvalósul (5.2 ábra). Jól látható, hogy a folyamat, melynek kialakulására már membrán szinten is hatással van a receptor glikoziláltságának jellege, a membrán alatti térben számos, egymással öszszeköttetésben álló folyamat eredőjeként értelmezhető. Ebben nagy szerep jut az e folyamatban kulcs enzimként ható foszfatidilinozitol 3-kináznak (PI3K) és a foszfolipáz C β -nak (PLC β), valamint azoknak a korábban már em-
lített lipid mediátoroknak, melyek monomer G fehérjéken keresztül hozzájárulnak a sejtek adhéziójához és a sejtváz egyes elemeire hatva azok kontrakcióját és polimerizációját indukálva segítik elő a sejt migrációját. Kiemelendőnek érezzük e direkt hatások mellett annak megemlítését, hogy fenti mechanizmusok gén-szinten megnyilvánuló hatásai szintén hozzájárulnak a migráció rövid- és hosszabb távú szabályozási folyamataihoz, mely a fentiekben már említett amplifikáció speciális megjelenési formájának tekinthető.



5.2 ábra Membrán-receptorokon keresztül történő szignalizáció – amplifikáció jelensége

6. Kemotaktikus ligandok és receptoraik

A kemotaxis kiváltására számos molekula, illetve molekula-család tagjai is képesek. Ezek közül egyesek biológiai vagy klinikai jelentőségüket kifejezetten kemoattraktáns (vagy repellens) voltuknak köszönhetik, míg mások esetében ez a hatás ugyan kimutatható, de nem tartozik a molekulák elsődleges biológiai tulajdonságai közé. Mint az a 6.1 táblázatból is jól látható az ú.n. professzionális kemoattraktáns molekulák mellett igen széles azoknak a molekula-csoportoknak a száma, melyek esetében joggal számolhatunk kemotaktikus hatásokkal, s ezek nem ritkán eddig nehezen megmagyarázható jelenségek értelmezéséhez is hozzájárulnak.

Professzionális kemoattraktánsok	Elsődlegesen nem kemotaktikus aktivitású molekulák
N-formil peptidek	aminosavak
kemokinek	oligopeptidek
arachidonsav termékek	polipeptid hormo- nok
komplement aktivációs út termékei	szteroidok
feromonok	illó olajok
	szintetikus ható-
	anvagok

6.1 táblázat Egyes kemoattraktáns hatású anyag-csoportok és a kiváltott biológiai reakció jelentősége az adott csoportban.

A kemotaktikus aktivitás mérésének szempontjából három ligand-csoportot, a formil peptideket, a kemokineket és a komplement család két tagját ragadjuk ki, mivel ezek a leggyakrabban alkalmazott molekulák a későbbiekben részletezendő referencia mérések során is. (Jó tudnunk azonban, hogy választásunk önkényes, a vizsgált anyag, illetve sejt karaktere fogja mindig meghatározni a belső kontrollként használt anyagok körét.)

6.1 Formil peptidek

Ebbe a csoportba a peptidek egy speciális köre tartozik, melyek N-terminális kezdő aminosava az a formilált metionin, ami a bakteriális peptid szintézis kezdő aminosavaként, mintegy jelzőtábla utal a peptidek bakteriális eredetére is. A leggyakrabban di-, tri- és tetrapeptidekből álló család egyes tagjainak szintézisét és szisztematikus leírását, kemotaktikus karakterük fő jegyeinek ismertetésével egyetemben Schowell, Schiffmann és Freer végezték el az 1970-es és 80-as évek során. Eredményeik világosan mutatták, hogy egy a molekulaszerkezet kis változásait nagy érzékenységgel követő rendszert fedeztek fel, melyben a formil-Met-Leu Phe (fMLF, régebbi jelölése fMLP) bizonyult a legaktívabb molekulának, s ez a hatásbeli eltérés nem csak a kemotaxis indukcióban, de egyes enzimek (pl. lizozim és β -glukuronidáz) szekréciójában is megnyilvánult. A tapasztalt sejtélettani hatások jó korrelációt mutattak a bakteriális eredetű peptidek neutrofil granulocitákon és monocitákon korábban már tapasztalt hatásaival, s elősegítették a gyulladás molekuláris mechanizmusáról kialakuló kép úi vetületeinek (ld. molekuláris kemoattraktáns trigger mechanizmusok) megértését.

A formil csoportot tartalmazó ligandok értékelése mind a mai napig tart, újabb és újabb karakterisztikus vonásaik (pl. oldószer számára hozzáférhető felszín – SEA jelentősége) leírásával gazdagodik a róluk kialakult kép.

A ligand receptorának (FPR) vagy homológjának (FPR1) jelenléte mintegy alapfeltétele a kiváltott hatás specifitásának. Újabb vizsgálatok kimutatták,

hogy a receptor család több tagból áll (FPR-26, FPR-98 és FPR-G6), melyek közül az FRP-26 bizonyul konstitucionálisan a legaktívabbnak. A receptor a klasszikus "szerpentin" család tagja, szignalizációja a receptorhoz kötött trimer G fehérjék segítségével valósul meg. A receptor nem konzervált, extracelluláris régióiban elhelyezkedő egyes aminosavakról (Arg84, Lys85, Arg205 és Asp284), valamit a konzerváltan elhelyezkedő Arg163-ról is tudjuk, hogy meghatározói a ligand kötődésének. Figyelembe kell azonban vennünk a receptor N-terminális, extracelluláris felszínen található részének glikoziláltságát is, melyek intakt volta szintén alapvetően meghatározza a receptor-ligand kapcsolat kialakulását, speciális gátlószerekkel (pl. lektinek) a receptor működése és így a kemotaxis is jól gátolható.

6.2 Kemokinek

A citokinek egyik új családja, amely abban különbözik az eddig megismert, klasszikus kemotaktikus faktoroktól, hogy hatásukat parakrin módon egyegy jól körülírt fehérvérsejt szubpopulációra fejtik ki. A molekulák nagy része jellemzően négy ciszteint tartalmaz, melyek intramolekuláris diszulfid hidakat alkotva stabilizálják a leírt szerkezetet (6.1 ábra), s jelenlétük felelős a molekulára jellemző hatás kialakításáért.



6.1 ábra A kemokinek általános szerkezete

A csoportosítás alapjául szolgál az N-terminális végen található két cisztein (6.2 ábra), melyek között a kemokinek egyik csoportjában egy beékelődő aminosav foglal helyet (CXC vagy alfa kemokinek), míg a másik nagy csoportban a ciszteinek közvetlenül egymás mellett helyezkednek el (CC vagy béta kemokinek).



6.2 ábra Kemokinek osztályozásának molekulaszerkezeti alapja

Az előzőeken túl még két kisebb csoportot is megkülönböztetünk: az egyikük az ún. C kemokinek, amelyek esetében csupán egy terminális cisztein található, a másik kisebb csoportba pedig a CX₃C kemokinek tartoznak, amelyek egy membránkihorgonyzó résszel is rendelkeznek és így nem csak szolúbilisén, hanem membránhoz kötött formában is kifejtik hatásukat. A kemokinek termelése a szervezet számos sejtjében folyik. Az immunrendszerhez tartozó sejtek szinte mindegyike képes kemokineket termelni, de például a májsejteknek, simaizomsejteknek és a fibroblasztoknak is megvan ez a képessége. Sőt már az egysejtűek, pl. Tetrahymena is termel kemokineket, és a környezetükben lévő kemokinek képesek migrációjuk indukálására.

A kemokinek hatásaikat specifikus kemokin receptorokon (6.3 ábra) fejtik ki, melyeknek közös jellemzője a membránt hétszer átérő domén-szerkezet. A ligand kötéséért a receptor N-terminális részét tartják felelősnek. A ligand receptor kapcsolat létrejöttével itt is beindul a szignál transzdukció folyamata, melynek végén a sejt citoszkeletális elemeinek aktinjai polimerizálódnak.



6.3 ábra A kemokin receptorok általános szerkezeti vázlata. Az ábrán jelzett és erősen konzervált 'DRY' motívumnak a molekula C terminálisa mellett szerepe van a Gproteinre történő szignál átadásban, a receptor membrán síkjában kialakított sajátos térszerkezete következtében. Ez előfeltétele a sejt elmozdulásának, és olyan más, a mozgás kivitelezésében fontos folyamatok is aktiválódnak, mint például a sejtadhézió és a citoszkeletális elemek átrendeződése, mely a folyamatos sejtmozgás alapfeltételét jelenti. A kemokinek kiemelt funkcióját bizonyították már például a gyulladás folyamán létrejövő leukocita szaporulatban, valamint azok aktivációjában is, de elősegítik a fagocitózis és a szuperoxid gyökök képződését is. Az angiogenezis folyamatában az endotélsejtekre hatva szintén szabályozzák azok migrációját.

6.3 Komplement rendszer egyes tagjai

Több mint 35 szolúbilis és sejtfelszínhez kötött fehérjéből felépülő lépéssorával a komplement rendszer az immunrendszer biokémiai kaszkádjainak sorában talán az egyik legösszetettebb s több úton is aktiválódó folyamatsor megtestesítője. Mint a szervezet veleszületett immunitását adó rendszer tagja aktiválódását követően éppúgy szerepe van az opszonizáció folyamatában, mint a kemotaxis kiváltásában vagy a sejtmembrán integritását megbontó citolízisben.

A szakirodalom által részletesen tárgyalt aktiválódási útvonalak – klasszikus, alternatív és lektin-függő – részletes elemzése nem lehet e fejezet tárgya. Itt csupán arra szorítkozhatunk, hogy az egyes folyamatok lépéssorát áttekint– sük, jelezve a kialakuló kemoattraktáns termékeket.



© GNU Federal Public License

6.4 Komplement aktiválódás klasszikus útvonalának kezdeti (a piros számok az egymást követő lépések sorrendjére utalnak, míg a pirossal kiemelt termékek kemoattraktáns hatásúak.)

A klasszikus útvonal (6.4 és 6.5) az antigén-antitest összekapcsolódását (1) követően a tíz alegységből álló C1 (6C1q+2C1r+2C1s) beépülésével folytatódik (2). E komponensek szerin proteáz tartalmú tagjai (C1r és C1s) bontó hatást fejtenek ki a C4 és a C2 komponensekre (3 és 5), kialakítva ezekkel egy a membránhoz a C4b bomlásterméken keresztül kötődő (4) és fokozatosan hosszabbodó komplex kezdeti tagjait. Az ebben a lépésben kialakuló C4a tekinthető a rendszer első kemotaktikus hatású termékének. A komplex növekedési fázisának egyes lépései során először a C2a kötődik, majd e komplex konvertáló hatására (6) a C3 két terméke közül a C3b is beépül a komplexbe (6.1 és 6.2), míg a C3a a folyamat egyik legjelentősebb kemoattraktáns molekulájaként képes hatni. Az így kialakuló, membránhoz kötött C4bC2aC3b komplex az, amely egy további komponens a C5 felbomlását katalizálva (7) kialakítja a további, a membránt károsító folyamatok szempontjából igen jelentős C5b alegységet, valamint a komplementek között kemotaktikus hatásairól leginkább ismert C5a-t.

A sejtmembránt károsító ú.n. "membrane attack complex" (MAC) kialakulása szempontjából a C5b szerepe meghatározó. E komponenshez kapcsolódnak egymást követő lépésekben a C6 (8), majd a C7 (9) alegységek, s az így kialakuló C5bC6C7 komplex a C8-cal történő kapcsolódása után (10) épül a sejtfelszíni membránjának foszfolipid kettősrétegébe. Ezt követi a folyamat utolsó lépésenkét a C9 polimer kapcsolódása a komplexhez (11), mely a membránt átérő csatorna falaként a sejt integritásának megbontását eredményezi lehetővé téve akár a sejtbe irányuló anyagbeáramlást, akár az intracelluláris komponensek (ionok, aminosavak stb.) kiáramlását (12).



6.5 ábra Komplement aktiválódás klasszikus útvonalának befejező lépései (a piros számok az egymást követő lépések sorrendjére utalnak, míg a pirossal kiemelt termékek kemoattraktáns hatásúak.)

Fenti lépéssor kezdeti lépéseiben különbözik az alternatív aktiválódási útnak nevezett folyamat (6.6 ábra), melynek kiinduló pontját a patogén mikroorganizmus felszínéhez kötődő C3 jelenti. Ennek B faktorral történő kapcsolódása a következő lépés (1), melyet a kötött B faktor D faktor által katalizált bontása követ. A fenti reakció eredményeként B-ből felszabaduló Ba és C3-Bb termékek (2) közül utóbbi C3 hidrolíziséhez (3), a C3a kemotaktikus ligandum felszabadulásához, illetve a kialakuló C3b membránhoz való kötődéséhez vezet. Ezt követően a kötött C3b a B faktor bomlása révén felszabaduló Bb alegység, valamint properdin (P) kötése révén (4) és egy újabb C3b bekapcsolódásával alakít ki komplexet a sejtmembrán felszínén (5). E C3b-Bb-P-C3b komplex az előfeltétele a klasszikus út esetében már ismertetett C5 aktivációs lépésének (6), mely szinttől már a lépéssor a fentiekben ismertetett úton halad a MAC kialakulásáig.



[©] GNU Federal Public License

6.6 ábra A komplementrendszer alternatív aktiválódási útvonala. (a piros számok az egymást követő lépések sorrendjére utalnak, míg a pirossal kiemelt termékek kemoattraktáns hatásúak)

A fenti két aktiválódási útvonalhoz adódik a harmadik ú.n. mannózkötő lektin-függő vonal, melynek kezdeti lépését egy a C1q-hoz hasonló, 2-6 feji részből álló komponens indukálja azáltal, hogy a patogén mikroorganizmusok felszínén megfelelő elrendeződésben megtalálható mannóz vagy fukóz molekulákhoz kapcsolódik. Ezzel szerin proteázok aktiválódása révén a klasszikus útnál már megismert elemek (C4a, C4b, C2a, C2b) kialakulása révén alakul ki a C3-konvertáz (C4bC2a komplex), melyet követően a fentiekben leírt útvonalon halad az aktiválódás folyamata egészen a membrán perforálásáig.

Mint a fentiekből is látható volt a különböző komplement aktiválódási útvonalak során három termék C3a, C4a és a C5a is jelentős kemoattraktáns hatással bír. Hatásaik olyan kifejezettek, hogy számos kísérleti rendszer referencia vizsgálatainál e peptidek – különösen a 74 aminosavból álló C5a és annak des-Arg-C5a változata –, hatását mérik.

A kemotaktikus hatások kiváltásában a sejtek felszínén expresszálódó C3a és C5a receptorok jelentősek, utóbbiak számos sejten (endotél, epitél, makrofág, neutrofil granulocita és limfocita) kimutatható, azonban profeszszionális kemoattraktánsként leginkább a neutrofileken és makrofágokon hat.

III. A sejtek kemotaktikus aktivitásának mérése

A sejtek kemotaktikus aktivitásának mérésére, mint azt már említettük, számos eljárást írtak le a szakirodalomban. Ezek sok esetben azért különböznek, mivel a vizsgálni kívánt modell-sejt eltérő, hiszen más kemotaxis assayt kell alkalmaznunk egy baktérium, egy csillós egysejtű, egy fehérvérsejt vagy egy tumorsejt migrációjának mérésekor. A gyakorlatban alkalmazott eljárások egy része a sejtek populációinak mozgását értékelő eljárás, míg más technikák már individuálisan egy-egy sejt elmozdulását képesek követni, értékelni. Eltéréseket találunk az egyes módszerek tekintetében akkor is, ha a vizsgált sejtek követésekor a migráció térbeli elmozdulását hasonlítjuk össze az egyes assay-k során: számos a síkban történő mozgást értékelő ú.n. 2D technika (pl. agar alatti migráció) mellett egyre több a sejtek térben történő elmozdulását, invázióját is követni képes ú.n. 3D módszer (pl. Matrigel technika). A felhasznált eljárások sokszínűségét indokolja az is, hogy a technika fejlődésével egyre újabb módszerek váltak/válnak ismertté lehetőséget adva ezzel még pontosabb és érzékenyebb különbségtételre az egyes válaszreakciók között. Végül nem szabad arról sem megfeledkeznünk, hogy különböző mozgás-elemek, mozgási típusok elkülönítése esetén is más-más eljárás bizonyul a legmegfelelőbbnek. Csillós és amőboid mozgást végző sejtek migrációjának éppúgy eltérő a kiértékelése, mint az aerob és anaerob sejteké nem is beszélve arról, hogy más módszer alkalmas kemokinezis és más kemotaxis mérésére, megint mást kell alkalmaznunk, ha pl. haptotaxis szeretnénk mérni.

Mint az a fentiekből is látható a vizsgálati módok tárgyalását számos, szinte egyenértékű szempont-rendszer szerint végezhetjük. Az alábbiakban az általános kérdéseket tárgyaló részt követően az eukarióta sejtek mozgásának elemzésekor a leggyakrabban alkalmazott módszereket egyrészt azok modell-sejt specifitása (ld. egysejtűek, magasabb rendű sejtek) tárgyaljuk, másrészt kísérletet teszünk arra, hogy a legkevesebb technikai felkészültséget kívánó eljárásoktól az eszköz és anyagigényesebb eljárásokig haladva áttekintsük a kemotaxis/motilitás vizsgálatok széles spektrumát. Célunk, hogy ne csupán egy-egy technika rövid bemutatását adjuk, de egyben kísérletet tegyünk arra is, hogy a módszerek előnyeire, vagy hátrányos tulajdonságaira is rámutassunk.

1. Az ideális kemotaxis assay

Az első leukocita kemotaxis mérés leírását Leber 1888-ban közölte és azóta számos a sejtmigráció, illetve a kemotaxis vizsgálatára alkalmas assay-t írtak le a szakirodalomban. Ezeket a próbákat két nagy csoportra lehet osztani: (i) egy sejt mozgását, viselkedését tanulmányozó vizsgálatok és (ii) azok amelyek egy egész sejtpopulációt képesek jellemezni ebből a szempontból.



1.1 .ábra: A görbe tetején elhelyezkedő módszerekkel kevés információ nyerhető arról, hogy valójában milyen mozgás történik (kemotaxis, kemokinezis), viszont könnyen, gyorsan elvégezhetők, nagyszámú mintát lehet vizsgálni egyszerre [13].

Az 1950-es évek elején Harris már az ideális kemotaxis assay kritériumait is megfogalmazta, amelyet azután 1988-ban Bignold az alábbiak szerint foglalt össze:

- Ki kell küszöbölni a sejtek passzív mozgatását, így minden változást a sejt elhelyezkedésében a sejt aktív mozgása hozza létre.
- Egy vízoldékony anyag hatásának vizsgálatakor annak megfelelő mennyiségben kell jelen lennie a kísérleti kamrában.
- Kontrollálni kell a mozgást kiváltó kemotaktikus faktor koncentráció gradiensét annak kiindulási pontja és a sejtek közötti térben, a kialakuló zavaró áramlásokat eliminálása végett.
- Biztosítani kell, hogy a vizsgált sejtek a vélt kemotaktikus faktor felé és attól ellentétes irányban is elmozdulhassanak.
- A próbának el kell tudni különíteni a kemotaxist és a random sejtmozgást. Ennek a kritériumnak a legtöbb ma is használt assay nem tesz eleget, de ennek kiküszöbölésére használhatunk megfelelő kontroll csoportokat.

 Az alkalmazott módszer el kell, hogy kerülje a mintavételezés hibáit is. Csupán ezáltal biztosítható mind a megbízható koncentrációgradiens, illetve a kellő sejtszám elérése.

2. Kemotaxis vizsgálatok kivitelezésének alapvető megfontolásai

Mint minden kísérletes munka esetében, a kemotaxis vizsgálatok végzésekor is van néhány olyan, a gyakorlati kivitelezés szempontjából alapvető tényező melynek átgondolása az elvégzett kísérletek értékét, saját magunk, illetve mások általi felhasználhatóságát jelentősen befolyásolja. A kísérletek és mérések minőségbiztosítási kereteit megadó olyan alapvető kérdések tartoznak ebbe a témakörbe, melyek tisztázása mind a kvalitatív, mind a kvantitatív mérések esetében, a kemotaxis vizsgálatok során is elengedhetetlenek.

A tárgyalt kérdés összetettségét bevezetőként talán jól összegzi az az ábra, mely a kemotaxis vizsgálatok során is gyakran alkalmazott sejttenyészetekben mutatja a sejtek és környezetük között kialakuló hatások sokféleségét. Az ábrán csupán a legfontosabb olyan faktorokra történik utalás, melyek nem kellően megválasztott rendszerek esetében csak nehezen meghatározhatók vagy eleve definiálhatatlanok és ezáltal igen megnehezítik az objektív vizsgálattervezés és kivitelezés folyamatát (2.1 ábra).



2.1 ábra Sejttenyészetek komponenseinek endogén, nehezen definiálható faktorai.

2.1 Sejtek

A kemotaktikus aktivitás mérése esetén igen széles azoknak a modellsejteknek a sora, melyek a szakirodalom tanúsága szerint sikeresen alkalmazhatók egy-egy vizsgálatban.

lde tartoznak az egysejtű tenyészetek, melyek között éppúgy megtalálhatók a ma már a mérések etalonjaként említett prokarióta *E. coli* vagy *B. substilis* tenyészetek, mint az eukarióta protozoonok közül egyes amőbák (ld. *Dictyostelium discoideum*) vagy csillós egysejtűek (ld. *Tetrahymena pyriformis*). Magasabb rendű modell-sejtek esetében fontos megkülönböztetnünk a laboratóriumi körülmények között fenntartott sejttenyészetek, valamint a tumoros sejtvonalak eltérő morfológiát és migrációs kinetikát mutató sejtjeit. Az emberből vagy kísérleti állatból frissen izolált sejtek közül a leggyakrabban a perifériás vérből Ficoll, illetve Percoll gradiensen történő izolálás útján nyert neturofil granulocita, monocita és T limfocita (ritkábban bazofil és eozinofil granulocita) elemek kerülnek felhasználásra.

Sejt típus	Sejtvonal	Eredet
Neutrofil granulocita	HL-60	Humán
		Promyeloblast>PMN
		(ATCC CCL-240)
Eozinofil	YY-1	
Bazofil/Hízósejt	HMC-1	Humán
		(J.H. Butterfield, Mayo Clinic,
		Rochester, MN, USA)
Monocita	THP-1	Humán
		(ATCC TIB-202)
T limfocita	Jurkat	Humán
		(ATCC TIB-152)
Fibroblaszt	MRC5	Humán
		(ATCC CCL-171)

2.1 táblázat Példák a kemotaxis vizsgálatok során alkalmazott magasabb rendű szervezetekből származó sejtvonalakra

Már itt fontos megjegyeznünk, hogy a kemotaxis vizsgálatok során alapvető fontosságú az egyes sejtek számára a vizsgálat egész időtartama alatt biztosítani a fiziológiásnak megfelelő vagy azt a lehető legjobban megközelítő környezeti feltételeket, mely a tápoldat összetételét, ozmotikus koncentrációjáért felelős összetevők gondos megválasztását, valamint egyéb kémiai és fizikai paraméterek biztosítását jelenti (ld. pH, egyes különleges ionok, hőmérséklet, CO₂ telítettség stb.)

2.2 Tápoldatok összetétele, pufferek

Számos egyéb sejtfiziológiai paraméter meghatározásához hasonlóan a sejtek kemotaktikus aktivitásának mérésekor is alapvető jelentőségű a vizsgált sejtek számára fiziológiás környezet biztosítása. Ez nem csupán az alkalmazott oldatok ozmotikus koncentrációját, pH-ját vagy a megfelelő hőmérséklet biztosítását jelenti, ennél lényegesen több szempontot kell figyelembe vennünk ahhoz, hogy a környezet sejtek és a mérések számára is elfogadható fizikokémiai paramétereit biztosítsuk.

2.2.1. A tápoldat

Talán a kérdés leggyakrabban tárgyalt eleme maga tápoldat/táptalaj kérdése. Logikusnak tűnik, hogy akkor tudjuk a kísérleteket a sejtek számára optimális környezetet modellezve véghez vinni, ha a sejtek a számukra megfelelő tápoldatban - ezáltal az oldat által biztosított kémiai környezetben - vannak. Problémák azonban már egysejtű prokarióta és eukarióta tenyészetek esetében is felvetődnek, hiszen a kellő sejtszám elérése végett esetleg több napig is tenyészetekben növekvő kultúrákban, a sejt típustól függő mértékben ugyan, de gyakran számottevő mennyiségben is kimutathatók a sejtek által termelt, biológiailag aktív molekulák. Már az egysejtű Tetrahymena tenyészetek esetében is kimutatott számos, egyébként magasabb rendű szervezetekre jellemző anyag jelenléte (ld. 2.2 táblázat), s ezek termelése. E molekulák jelenlétükkel komolyan zavarhatják a kemotaxis assay-k kivitelezését és sokszor gondot okoznak a validálás, a megfelelő kontrollok beállítása során. Sajnos a fenti nehézséget csak részben oldhatjuk meg azzal, hogy a kísérletek előtt a sejteket friss táptalajra helyezzük. Bár kétségtelen, hogy ez a leggyakrabban alkalmazott technika, azonban szem előtt kell tartanunk a friss táptalaj több esetben leírt, sejtfiziológiai szempontból "sokkoló" hatását, (proliferáció és fagocitózis indukció stb.), mely a kemotaktikus válaszkészség alakulása szempontjából sem mellékes. Megfelelő, identikus kontrollok beállítása mellett azonban jól kiértékelhető rendszerek állíthatók be, a fenti szempontok figyelembevételével. Ilyen kontroll lehet a kondicionált médium

is, mely a vizsgálni kívánt tenyészetek felülúszójából nyerhető és tartalmazza mindazokat a sejtek által a környezetbe bocsátott auto- és parakrin anyagokat, melyeket a mosások következtében eltávolítunk. Ezeknek az anyagoknak, mintegy "belső kontrollként" való alkalmazása, sokat segíthet annak tisztázásában, hogy milyen szerepe is van a definiálatlan endogén anyagok jelenlétének a kemotaxis modulálásában.

Autokrin vagy parakrin szignálmolekula csoport	Példa	Ref.
Biogén amin	szerotonin	14
Peptid hormon	inzulin	15, 16
-	endothelin–1	17
	kalcitonin	18
	relaxin	19
	szomatosztatin	20
	ACTH, béta-endorfin	21
Citokin	IL-6	22
Lektin	beta-D glukóz	23,
	Laktóz-specifikus	24
Egyéb	melatonin	25

2.2 táblázat Magasabb rendű szervezetekre jellemző szignálmolekulák termelődése az egysejtű csillós Tetrahymena pyriformis GL-ben

2.2.2. Pufferek

Sok olyan eset van, amikor táptalajok még friss formában sem alkalmazhatók, komponenseik a vizsgált anyagokkal csapadékot alkotnak lehetetlenné téve pl. filteren vagy agaróz gélen keresztül történő sejtvándorlást, nem is beszélve a kiértékelés nehézségeiről. Ilyen esetekben a vizsgált sejtek és anyagok számára egyaránt optimális pufferek alkalmazása ajánlott. Ilyen puffer lehet az egyébként is gyakran használt foszfát puffer (PBS) különböző változatai vagy az egysejtűeknél alkalmazott ú.n. minimál médiumok (pl. a csupán egy- és kétértékű kationokból álló Losina-Losinsky médium). Már ezeknek az oldatoknak az esetében is jelentősen limitált a felhasználhatóság, hiszen a sejtek számára szükséges pH és egyéb ion-koncentráció mellett esetükben nem biztosított a főleg hosszabb inkubációs időt igénylő vizsgálatok során elengedhetetlen energiaforrás, pl. glukóz jelenléte. Utóbbi igényt elégítik ki azok az oldatok, melyek puffer és glukóz megfelelő keverékéből állnak.

2.2.3. Médiumok és kiegészítők

Leukociták esetében szintén találunk példákat igen egyszerű pufferek (ld. PBS) alkalmazására, azonban leggyakrabban a több aminosav keverékéből, vitaminokból és glukózból összeállított RPMI-1640 médiumot használják. Ez sem tekinthető azonban teljesen ideálisnak, mint azt Frow és mtsai THP-1 sejteken MCP-1 kemokinnel végzett vizsgálataikban kimutatták az RPMI-ben található glutaminsav és aszparaginsav összetevők jelentős mértékben gátolják a sejtek kemotaktikus válaszát, míg egyéb komponensek (prolin, triptofán, illetve vitaminok) ilyen szempontból nem tekinthetők károsnak. A szakirodalom szerint lényegesen kevesebb a migrációt negatívan befolyásoló tényezővel kell számolnunk Geys puffer, illetve ennek 1 mg/ml BSA-val kiegészített változata esetében. Végezetül e tekintetben fontos és a kemotaxis assay-k kimenetelét gyakran lényegesen befolyásoló tényező az RPMI esetében annak FCS-sel (fetal calf serum), illetve FBS-sel (fetal bovine serum) történő kiegészítése a leukociták migrációs képességeinek fokozása céljából. E komponensek koncentrációjának emelése eltérő hatású lehet, már 0.5% is kimutathatóan javítja a sejtek migrációját. Szintén Frow és mtsai mutatták ki azonban, hogy az FCS koncentrációjának emelése csak kb. 10%-ig tekinthető

a migráció szempontjából is pozitív hatásúnak, e felett már nem tapasztalható lényeges javulás. Az FCS fenti kedvező hatásai mellett meg kell említeni saját tapasztalatunkat is: különböző FCS-ek használatakor, vélhetően azok nem kellően definiált és standardizált kémiai összetételéből adódóan jelentősen eltérő kemotaktikus aktivitások mérhetők ugyanazon modellsejtek és kemoattraktáns ligandok esetében (2.2 ábra). Mint az ábráról is látható, az egyes FCS kivonatok között nem csupán a kemotaxis indukciójának mértékében található szignifikáns különbség, de egyes kivonatok (ld. "EU") negatív hatást is gyakorolhatnak a sejtek kemotaxisára. A probléma megfelelő kontroll beállításával ugyan minimalizálható, de az FCS és hasonló kiegészítők esetében kérdéses, hogy a kemotaktikus aktivitás amplitudójának értékelésekor mi is tekinthető a sejtek saját kemotaktikus aktivitásának és mi a kiegészítők jelenlétéből adódó műtermék.



2.2 ábra THP-1 monociták kemotaktikus aktivitásának mérése RPMI-1640 és 10% eltérő FCS kiegészítők jelenlétében – Neuro Probe kamra (Kőhidai, L., Láng, O. – nem publikált adatok)

Fenti megfontolások ellenére a kísérletek jelentős számában nem tekinthetünk el a tápoldat kiegészítőinek használatától. Azonban ismerve azok jelentős eltéréseit igen fontosnak látszik már a kísérletek és tematikailag összefüggő kísérlet-csoportok tervezésekor gondolni, pl. az FCS források homogenitásának biztosítására is.

2.3 Nyersanyagok és filterek

A kemotaxist és egyéb sejtmigrációt vizsgáló módszerek esetében, mint azt a módszerek részletezésénél is látni fogjuk nagy szerepe van az alkalmazott anyagok megválasztásának és előkészítésének. Így igen fontos, hogy az egyes oldatok frissen készüljenek, vagy amennyiben elkerülhetetlen az esetleg több napja előkészített anyagok felhasználása, azokat a bakteriális felülfertőződés esélyének minimalizálására hűtve tároljuk.

Előre elkészített assay-k, pl. agaróz-lemezek esetében szintén fontos mind a készítés, mind a tárolás alatt a csíramentes környezetre való törekedés, különösen azért mivel e lemezek kifejezetten jó táptalajként szolgálhatnak egyes baktérium törzseknek, s azok szinte láthatatlanul meghamisíthatják eredményeinket.

Műanyag eszközök esetében (ld. mikrotitrációs lemezek) fontos tudnunk az alkalmazott műanyag sajátosságait, kémiai jellemzőit, melyek polaritási viszonyaik révén a kamrákban kialakuló mikrokörnyezet polaritását is befolyásolhatják s evvel a sejtek migrációjára is hatással lehetnek. Tudnunk kell továbbá, hogy a kemotaxis vizsgálatok között is találunk egyértelműen "üvegbarát" technikákat (pl. Matrigel vagy C5a assay) melyeknél a műanyag eszközök alkalmazása eleve kudarcra ítéli a kísérletezőket.

Azoknál a módszereknél, melyek filtereket alkalmaznak, fontos gyakorlati szempont a filter kémiai összetételének ismerete. A gyakran használt filterek egy része igen vékony (6–10 μm) *polikarbonát* (PC) alapú lemez, ezek magukban vagy pedig a felszín nedvesedését elősegítő polivinil–pirrolidinnel (PVP) fedve kerülnek forgalomba. A filter felszínének PVP-vel való kezelésére azonban egyes sejtek eltérően reagálnak, monociták esetében több irodalom a PC membránok PVP-vel fedett változatát javasolja, de neutrofil granulocitáknál a PVP-mentes formát. Az egyes sejtek ú.n. mikrokamrás assay-je esetén legoptimálisabbnak talált jellemzőket PC filterekre a 2.3 táb-lázat foglalja össze.

Sejttípus	Ajánlott denzitás [sejt/ml]	Pórus átmérő [μm]	Legrövidebb hatásos inkubáci– ós idő [min]
Neutrofil gr.c.	106	3-5	45-50
Eozinofil gr.c.	106	3-5	60
Bazofil gr.c.	2x106	5	60
Monocita	2x10 ⁶	5-8	120
Limfocita	107	5	240

2.3 táblázat Egyes fehérvérsejt típusok kemotaxis mérésének jellemző paraméterei, PC-filterekre, mikrokemotaxis assay technika alkalmazásával.

Más esetekben *nitrocellulóz* filtereket alkalmaznak. Ezek a lényegesen vastagabb (100–150 μm) és fibrózus szerkezetű lemezek a sejtes fázisok elválasztására kevésbé alkalmasak, inkább a migráló sejtek előrehaladásának mértékét lehet a szövettani technikáknak (beágyazás, metszés) jól ellenálló anyagokban kiértékelni. A filterek esetében fontos a pórusátmérő jó megválasztása. A leggyakrabban forgalmazott lemezeken 3, 5, 8, 10, 12 és 14 μmes átlagos pórusátmérőkkel számolhatunk. Nem csupán az a fontos, hogy mely vizsgálandó sejt esetében melyik pórusátmérőjű filter alkalmas arra, hogy a sejt aktív mozgással jusson át azon, de annak ismerete is elengedhetetlen, mennyi a pórusok adott felületegységre számított denzitása a használt filterek esetében, hiszen valójában a sejtek számára átjárható összfelület az egyik fő meghatározója az inkubációs idő helyes beállításának (2.4 táblázat).

Pórusátmérő	Pórusok száma/mm²	Pórus összfelszín
[µm]		[teljes felszín %]
2	2x104	6.2
3	2x104	14.1
5	4x10 ³	7.8
8	103	5.0
10	103	7.8
12	103	11.3
14	4x10 ³	7.7

2.4 táblázat Polikarbonát filterek (NeuroProbe) pórus-adatai.

Mint a táblázatból is látható lényeges eltérések vannak az egyes filtereknél a sejtek számára átjárható felszínek tekintetében. Fontos, hogy az egyes anyagok és sejtek vonatkozásában végzendő összehasonlító vizsgálatokat a fenti adatok birtokában tervezzük, illetve értékeljük.



© Kohidai, L. 2006.

2.3 ábra Polikarbonát filter pórusainak eloszlása és az átvándorló sejtek viszonya a filterhez.

A fiziológiás állapot minél jobb megközelítése érdekében ma már számos filtert alkalmazó assay nem elégszik meg csupán a filter vagy annak felület– aktív molekulákkal fedett változatainak használatával. Extracelluláris matrix elemeket (pl. kollagén, elasztin, gelatin, fibronektin) és számos, a sejtek ki– tapadásában bizonyítottan szerepet játszó kisebb–nagyobb peptidet (pl. RGD, VGVAPG, kollagén) is felhasználnak a filterek fedésére. Egyes esetek– ben ezek mint gyárilag felvitt rétegek jelennek meg (pl. polimerizált kollagén – QCM™ Collagen Invasion Assay –Chemicon), azonban viszonylag egyszerű a filterek laboratóriumban történő fedése is, utóbbi lehetőséget nyújt a vizsgált sejt számára specifikus fedések, illetve arányok kialakítására.

A fenti optimalizálás további lépésének tekinthetjük az egyes ú.n. feeder rétegek felvitelét is a filterekre, melyek közül a leggyakrabban az endotél sejteket alkalmazzák. Kétségtelen, hogy mind az egyes peptidekkel, mind a sejtekkel történő fedés további lépésekkel hosszabbítja és technikailag is meg-

nehezítheti az egyes assay-k kivitelezését, azonban e nehézségek vállalása sok esetben a kemotaktikus válaszkészség lényegesen objektívabb megítélését teszi lehetővé.

2.4 Referencia mérések

A kemotaxis mérések során, különösen korábban nem vizsgált anyagok elemzésekor fontos, hogy a vizsgált sejtek válaszkészségének mértékét viszonyítani tudjuk már korábban jellemzett és az adott sejttípus szempontjából elfogadható referencia anyagok beállításával. Bár minden a kemotaxis mérésével rutin szinten foglalkozó laboratórium rendelkezik saját belső kontrollokkal, fontosnak érezzük annak áttekintését, melyek azok a leggyakrabban alkalmazott anyagok, amelyek hatását a vizsgálati rendszerek validálásakor vagy egy-egy újonnan értékelt molekulacsoport esetében feltétlenül ajánlott kiértékelni.

2.4.1 Kemoattraktánsok

Kétségtelen, hogy a kemotaxis vizsgálatok esetében a kemoattraktáns és a kemorepellens anyagok egyaránt fontos szerepet játszanak, mégis gyakorlati munka során a kemoattraktánsok hatásait lényegesen gyakrabban értékeljük. Az alábbi táblázat csupán néhány kiemelést tartalmaz a fő kemoattraktáns csoportok legjelentősebb tagjainak kiemelésével, illetve azok célsejtjeinek és az alkalmazott optimális kemoattraktáns koncentrációk feltüntetésével (2.5 táblázat)

Típus	Ligand	Receptor	Célsejt	Hatásos konc. [M]	Ref.
Formil peptid	fMLF	fMLF-rec.	Monocita Neutrofil gr.c. T-limfocita	10-9-10-7	26
Komplement	C5a	C5a-rec	Neutrofil gr.c.	10-11-10-9	27
Citokinek	TNF-α	TNF-αR	Monocita Neutrofil gr.c.	1–100 U (≈10 ⁻ 8–10 ⁻ ¹⁰ M)	28
CC kemokin	RANTES	CCR1;5 CCR1;3;5 CCR1 CCR1;3 CCR3	Monocita Limfocita NK-limfocita Bazofil gr.c. Eozinofil gr.c.	10-9-10-8	29 30
	MCP-1	CCR2 CCR2	Monocita T-limfocita	10-9	31
CXC kemokin	IL-8	CXCR1 CXCR2	Neutrofil gr.c.	10-11-10-8	32 33
Leukotriének	LTB4	B-LT1	Neutrofil gr.c. Eozinofil gr.c.	10-9-10-6	34 35,36

2.5 táblázat Kísérletekben gyakran referenciaként ajánlott kemoattraktáns anyagok és jellemző tulajdonságaik. (A különböző sejtek a ligandok koncentráció optimumát tekintve jelentősen eltérhetnek, a fenti táblázat csupán a leggyakrabban vizsgált sejteket és az azokban hatásos koncentrációkat tünteti fel.)

2.4.2 Gátlószerek alkalmazása

A kemoattraktáns molekulák aktivitásának mérése mellett a referencia mérésekhez tartozik a folyamatok specifikus aktiválhatósága, illetve gátolhatósága is. Mivel a szakirodalomban e tekintetben lényegesen gyakrabban alkalmazzák a gátlószerekkel történő minőségi kontrollt, az alábbiakban e vizsgálatokra térünk ki röviden.

A sejtbiológia egyéb területeihez hasonlóan a migráció vizsgálata során is számos olyan gátlószer kerül felhasználásra, melyek a kemotaxis-receptorok szignalizációjának gátlása és az így elmaradó kemotaktikus válasz révén jelzik az adott receptor vagy szignalizációs út érintettségét a vizsgált ligand esetében.

Kemotaxis receptorok esetében mód van azok specifikus gátlására monoklonális antitestek (pl. kemokin receptorok) vagy a receptor esszenciális, nem peptid összetevőjéhez kötődő egyéb anyagok (pl. szénhidrát komponensek esetében lektinek) általi gátlásra. A kemotaktikus ligandok hatásának specifitása is jól vizsgálható ezen az úton, szinte minden nagyobb kemotaktikus ligand csoport esetében ismertek a receptorhoz *kompetitív antagonistaként* kötődni képes formák (pl. formil peptidek BOC derivátumai). A kemotaktikus szignalizáció során a receptor-ligand kölcsönhatást követő intracelluláris folyamatsor egyes lépéseit is gyakran egy-egy gátlószerrel vizsgálják, így a trimer *G-protein érintettségét* a folyamatban pertusszisz toxinnal történő gátlásával, a kemotaxis szempontjából központi szerepet betöltő *fosztatidilinozitol 3-kináz* (PI3K) szerepét pedig leggyakrabban az enzim ATP-kötő régiójához kapcsolódó wortmannin- vagy LY294002-gátlással mutathatjuk ki.

A fenti módszerek alkalmazását követően a gátlószerek hatása két fő módon vagy azok kombinálódásával érvényesülhet: (i) a válaszadó sejtek száma csökken, illetve (ii) az optimális koncentráció egy magasabb tartományba tolódik el.

Egy-egy gátlószerről azonban csak abban az esetben jelenthetjük ki, hogy a migrációra fiziológiás körülmények között fejt ki specifikus hatást amennyiben

- mind a kemoattraktáns anyag, mind a gátlószer vizsgálata több koncentráción is megtörténik;
- a gátlószer potenciális agonista hatását is tekintetbe vesszük;
- a sejtek életképességét a gátlószerrel történő kezelést követően is ellenőrizzük;
- a sejtek morfológiai eltéréseit is elemezzük a kezeléseket követően.

Frow és mtsai. szerint csupán a fenti szempontok mindegyikének kielégítő teljesülése után fogadható el egy a migrációt gátló anyag a folyamat specifikus gátlószereként.

2.4.3 Idő- és koncentrációfüggés meghatározása

Egy-egy új, szakirodalom által még nem jellemzett anyag kemotaktikus aktivitásának vizsgálata során rendszeresen felmerülő probléma az idő- és koncentrációfüggések mérése, pontosabban az, hogy a számba jövő inkubációs idők és vizsgálandó koncentrációk igen nagyszámú előkísérletet követelhetnek. Ezek száma csak részben csökkenthető, a vizsgált liganddal rokon molekulák szakirodalomból ismert hatásoptimuma ugyan irányadó lehet a hatásos koncentráció megválasztásánál, azonban a szakirodalom több olyan példával is szolgál, mely a kemotaktikus szignalizáció nagy érzékenységére utal. Ezekben az esetekben ligandok minimális szerkezeti különbségei ellenére a koncentrációoptimum jelentős eltérései, sőt maga a kemoattraktáns jelleg kemorepellensbe fordulása is megfigyelhetők (pl. formil peptidek összetétele, SXWS ligandok amidáltsága).

2.4.3.1 Időfüggés

E vizsgálatokról általánosságban elmondható, hogy azok mérésére, az alkalmazott kemotaxis assay sajátosságait figyelembe véve, a kb. 10–15 perc és 3-4 óra közötti periódus a legérzékenyebb. Azokban a rendszerekben, melyekben a sejtek pozitív válasza irreverzibilis (pl. filterekkel elválasztott kamrák) a felvett sejtszám/idő összefüggések telítési-görbéhez hasonló lefutásúak, míg reverzibilis rendszerek esetében (pl. csillósok kapilláris assaykben) telítési értékhez közelítő oszcilláló görbét mutatnak, mely kialakulásáért feltételezhető, hogy többek között a sejtek motilitást befolyásoló autokrin- és parakrin aktivitása is felelős. Mint azt a 2.4 ábra is mutatja az időfüggés szempontjából a viszonylag rövid inkubációs idők a kis sejtszám miatt kedvezőtlenek, az exponenciális középső szakasz esetében a mintavételek igen pontos időzítése és párhuzamos kísérletek esetén azok pontos betartása lényeges. Azonban e szakaszok megbízhatósága is csak fenntartással fogadható el reverzibilis rendszerekben az oszcilláció gyakran kiszámíthatatlan volta miatt. Mintavételek szempontjából ideálisnak az exponenciális szakasz és a harmadik, "telítési" szakasz határa tekinthető, mivel itt már jelentős a nyerhető sejtek száma (attraktáns/repellens hatások jól differenciálhatók), valamint a reverzibilis rendszerek oszcillációja is kisimul. Hangsúlyoznunk kell, hogy a fenti megfontolások általánosságban érvénye-

61

sek, számos olyan sejt van mely esetében sokkal rövidebb, vagy hosszabb

inkubációs időket alkalmazva kaphatunk csak megbízhatóan értékelhető eredményt.



2.4 ábra Kemotaxis sejtszám/idő-függése közötti eltérés irreverzibilis és reverzibilis rendszerekben történő regisztrálás esetében.

2.4.3.2 Koncentráció-függés

A *koncentráció-függés* vizsgálata, illetve annak értelmezése az időfüggéstől eltérő. Már maga a kérdés tárgyalása is két szempontból lehetséges: értékelhetjük a kiváltható kemotaktikus válaszokat (i) az *alkalmazott koncentrációkra* adott válaszok függvényében és (ii) a *kialakuló koncentráció gradiens* szempontjából is.

(i) Az első kérdés vizsgálata tűnik könnyebbnek, hiszen ebben az esetben a vizsgált anyag alkalmazott koncentrációjának, illetve több általunk kijelölt koncentrációnak a hatását elemezhetjük és így kapunk információt arról, hogy a kiváltó anyag a vizsgált modell-sejten mely koncentráció(k)ban tekinthető attraktánsnak, illetve repellensnek. E vizsgálatok során az alkalmazott koncentrációk szintén a körülöttük kialakuló gradiens hatására fogják ugyan a sejtek mozgását indukálni, de a kiértékeléskor egy-egy általunk hitelesített koncentrációnak megfelelő közegben összegyűlt sejtek számát határozzuk meg, s így kielégítő biztonsággal csak az adott koncentráció(k)ról nyilatkozhatunk azok attraktáns vagy repellens jellegét tekintve. Koncentráció tartományokat felölelő mérések esetén ugyan jellegzetes harang-görbe írja le a sejtek kemotaktikus aktivitásának ligand koncentrációjától való függését (2.5 ábra), de a kapott görbét mindig a mérés lépésszámától függően tekinthetjük a valós értéket jól vagy rosszul közelítőnek.



2.5 Kemotaxis koncentráció-függése egy szolúbilis citokin-receptor szekvencia (SEWS) két eltérő formája esetében Tetrahymena modellen – kapilláris kemotaxis assay [37].

A harang-görbe alakjának értelmezésekor a migráció beindításáért felelős kemotaxis-receptorok és ligandjaik számbeli arányát kell figyelembe vennünk. Alacsony koncentrációk esetében a rendelkezésre álló ligandok száma kevés ahhoz, hogy a sejtmembránban elhelyezkedő receptorok indukciója révén jelentős sejtválaszt indíthassanak be, míg magas koncentrációk esetében a sejtek receptorainak teljes felszínen történő telítettsége akadályozza a sejtek kemotaxishoz elengedhetetlen polarizált indukcióját. Optimális válasz a harang alakú görbe csúcsához tartozó koncentrációkon figyelhető meg, melyek elegendő ligandot biztosítanak a sejtek gradiens irányú, polarizált elmozdulásához, de ezek koncentrációja a teljes telítettség eléréséhez nem elegendő. A koncentráció-függés magyarázata vélhetően a fentivel együtt ható több más komponens eredőjeként fogható fel. A receptor internalizáció dinamikája, citoszkeleton komponenseinek érzékenysége, adhéziós folyamatok hatásai mind fontos tényezők, s nem hagyható figyelmen kívül a kemotaktikus válasz szempontjából optimális inkubációs idő alkalmazása sem.

Ebben a kérdésben hangsúlyozottan fontos a vizsgált koncentrációtartomány helyes megválasztása. Mint a 2.6 ábra is mutatja egyes ligandok esetében (pl. egy polilizin származék fMLF-nal képzett konjugátuma) a konvencionálisan alkalmazott koncentrációkon a mérések eredménye ugyan mutat hatást, de az nem jelentős, és csak lényegesen alacsonyabb koncentrációk esetében regisztrálható a klasszikus harang-görbe.



2.6 ábra Polilizin–fMLF–nal képzett konjugátumának kemotaktikus hatása Tetrahymena sejteken, kapilláris kemotaxis assay–vel mérve. A szürke zóna mutatja a konvencionálisan mért koncentráció tartományt, míg a sárga terület az ennél lé– nyegesen alacsonyabb koncentrációkat, melyeken a specifikus hatása kimutatható volt [38].

(ii) A fentiektől eltérő probléma a koncentráció gradiens meghatározása, illetve annak a mozgás kiváltásában betöltött szerepének közvetlen elemzése. Itt a vizsgált anyagok diffúziós koefficiense és az általa meghatározott és matematikai függvények által jól jellemezhető karakterisztikák mellett maga a vizsgálati rendszer (ld. agar, filter, folyadékfilm) jellege is befolyásolja, mint azt [39] a kérdést igen alaposan tanulmányozó munkájában leírta. A kérdés iránt érdeklődőknek a fent említett és a jelen fejezet tartalmi kereteit is meghaladó munkát ajánljuk tanulmányozásra. Itt összefoglalásként annyit emelhetünk ki, hogy peptid természetű attraktánsoknál (diffúziós koefficiens: 10⁻⁶-10⁻⁵ cm²/sec), jelentős eltérés figyelhető meg a gradiens kialakulása, illetve annak időbeni alakulása szempontjából az egyes rendszerekben. Mivel a gradiens kialakulását és stabilitását jelentősen befolyásolja a sejtes és attraktánst tartalmazó terek geometriai viszonya, a kamrák mélysége (vertikális rendszerek), a kamrák közötti összekötő folyadékhíd vagy agarréteg hossza (horizontális rendszerek), a gradiens más-más görbével jellemezhető. Ennek megfelelően, megbízható gradiens kb. 1.5-4.5 óráig biztosítható a leggyakrabban alkalmazott rendszerekben.

2.4.3.3 A kétcsúcsú görbék magyarázata.

Egyes esetekben a fenti harang-görbe helyett a koncentráció-függés vizsgálatakor két- vagy több-csúcsú görbéket kapunk. E furcsa megjelenésre több magyarázat is olvasható a szakirodalomban. (i) Egyes esetekben bizonyított, hogy a vizsgált modell-sejt több, a ligand kötésére képes receptorpopulációval is rendelkezik, melyek más-más ligand koncentráción indukálhatók maximális effektivitással. (ii) Más esetekben a jelenség magyarázatát az intracelluláris szignalizáció (pl. Ca²⁺ szignál) eltérő pontokon és más dinamikával kifejtett eredményeként értékelik; (iii) míg egyes kórképekben (pl. refrakter periodontitis – neutrofil granulociták) kifejezetten bizonyos intracelluláris szignalizációs mechanizmusok kóros eredőjeként magyarázzák (iv) Fentieken kívül még felmerül az egyes sejtek vizsgált a ielenséget. ligandok által indukálható auto- vagy parakrin aktivitásának hatása is, mely a sejtek kemotaktikus válaszkészségét fokozva hozzájárulhat egy egyébként hatástalan koncentráción is jelentős kemotaktikus reakciók kialakulásához. Természetesen fenti megfontolásoknál a receptorok tekintetében homogén sejtpopulációkkal kell számolnunk. (v) Éppen ezért tovább nehezítheti a jelenség értelmezését ha az egyes esetekben eltérő szub-populációk jelenléte feltételezhető, melyek maguk egy-egy csúcs megjelenését indokolhatják.

2.5 Sejtszám meghatározások

A különböző migrációt mérő eljárások kiértékelő lépése és annak objektivitása, valamint azok kvantitatív jellegének biztosítása mindig nagy kihívást jelentett az e vizsgálatokat végzők szakemberek számára.

2.5.1 Hagyományos eljárások

Míg a különböző egyszerű kemotaxis assay-k és az egyedi Boyden kamrás rendszerek (ld. alább) esetében még viszonylag egyszerű volt a pozitív választ adó sejtek számának fénymikroszkópos úton történő meghatározása, sőt egyes esetekben a szabad szemmel történő értékelés sem volt kizárható, a multiwell rendszerekben egyre nehezebbé vált a sejtek számolása. A kutatók több módszert is kidolgoztak e célra. Ezek egy része csupán in vivo alkalmazható, de számos olyan is használatban van, mely már a migrált sejtek fixálása után, tehát a sejtszám bizonyosan nem változó keretei között értékel.

2.5.2 In vivo technikák

2.5.2.1 Fluoreszcens jelzés

Az egyszerű festések mellett igen nagy előszeretettel alkalmazott technika a sejtek *fluoreszcens festékkel* történő jelzése. Ilyen, a sejtek viabilitását minimálisan befolyásoló fluoreszcens festék pl. a Calcein-AM és a BCECF-AM is. Fentiek mellett, természetesen hozzáférhetők gyárilag fluoreszcensen fedett filterekkel ellátott assay-k is (pl. Calcein-AM – *Cell Invasion Assay Kit* – Calbiochem), illetve egyéb kitek, melyek a sejtek fluoreszcens jelzése révén
teszik mérhetővé a migráló sejtek számát (pl. petiddel targetált fluoreszcens odot nanokristály Qtracker[™] Kit – *Quantum Dot Corporation*). Ebben az esetben a kemotaktikusan pozitív választ adó sejtek számának meghatározására áramlási citometria vagy egyéb a fluoreszcens jel érzékelésére képes technika (pl. fluoreszcens lemez leolvasó) alkalmas. (A fent említett jelzéseket, pl. Calcein–AM, különösen a sejtek jelzettségének időben viszonylag gyorsan csökkenő volta miatt nem csupán az assay–t megelőzően alkalmaz– zák, de már a pozitív választ adó sejtek jelzése is történhet a fluoreszcens festékkel.)

2.5.2.2 Izotóp technika

A fluoreszcens jelzés mellett, bár lényegesen ritkábban, de a sejtek (pl. baktériumok) *izotóppal* történő jelzése is használatos. E célra leggyakrabban az alábbi jelzett anyagokat, illetve izotópokat alkalmazták: ³H, ¹⁴C-glukóz, ⁵¹Cr, ¹⁸F-fluorobenzoát, ⁶⁷Ga-citrát, ³²P-diizipropilfluorofoszfát, ^{99m}Tc, ¹¹¹In-8hidroxikinolin.

2.5.2.3 Sejt-anyagcsere aktivitás mérése

Szintén még élő állapotban biztosít sejtszám meghatározást a sejtek *mitokondriális dehidrogenáz* aktivitását egy tetrazólium só (sárga→lila kristály) kialakulása révén kimutató MTT assay, illetve a *sejtek redukáló környezete* következtében színreakciót adó (indigókék→rózsaszín) Alamar blue festés. Fenti technikák alkalmazásakor fontos szempont a mérések során a sejtek viabilitásának értékelése, melyre a tripánkék festékkel történő kizárás még ma is az egyik leggyorsabb megbízható módszer. A sejt-anyagcsere ak-

tivitás különböző paramétereit mérő festések (MTT, Alamar blue stb.) elvégzésekor igen lényeges figyelnünk arra, hogy maga a vizsgálni kívánt kemoattraktáns anyag nincs-e hatással a festék által detektált termék kialakulásának anyagcsereútjára, meghamisítva ezáltal a kapott eredményeket.

2.5.2.4 Mozgásállapot vizsgálata

Az in vivo technikák egy külön fejezetét jelentik azok a vizsgálatok, melyek a sejtek kemotaktikus elmozdulását, mozgásállapotuk (úszási jellemzőik) megváltozását a video technika és a számítógépes kiértékelés összekapcsolásával valósítják meg. Ezekről a technikákról itt csak annyit jegyzünk meg, hogy a mindenkori felhasználás korlátait figyelembe véve (pl. modell-sejt migrációs sebessége) szinte felsorolhatatlan az alkalmazott módszerek száma. Minden laboratórium az igényei (pl. mozgás sebesség, mintázat stb. mérése) és a leginkább felhasználóbarát (ld. kezelhetőség, illeszthetőség a regisztrációs rendszerekhez és nem utolsó sorban beszerzési árak tekintetében) változatot használja. Van mégis néhány általánosan elterjedt forma, melyek sokoldalú felhasználhatóságuk révén viszonylag tág teret adnak a felhasználói oldalnak. Ezek közé tartozik az NIH-ben kifejlesztett *Image J* program és annak továbbfejlesztett változatai. A 2.7 ábra egy evvel a programmal történt kiértékelés eredményét mutatja.



2.7 ábra Tetrahymena sejtek mozgásának vizsgálata. Az Image J program segítségével mind manuális üzemmódban, mind a program "betanítását" követően jól elkülöníthetők a sejtek mozgásállapotát jellemző fázisok (ld. run, turn →, rest ➤) [40].

E kérdéskör fejlődésének további részleteiről a 4.8 Lab-on-chip technikák fejezetben is szólunk.

2.5.3 Fixált minták kiértékelése

A sejtszám fixálást követő meghatározására széles körben elfogadott a metanolos kezelést követően kb. 1–2 perces kezelés után már mérhető *Diff-Quick* festés, melyet különösen kevert sejtpopulációk esetében célszerű alkalmazni, mivel segítségével az egyes citoplazmatikus granulumok eltérő festődése alapján jól elkülöníthetők az egyes sejttípusok.

Már komolyabb felszereltséget igénylő eljárás az áramlási citometria (FACS) felhasználása a sejtszám meghatározásra. Ebben az esetben gyakori ismert számú referencia partikulum (pl. 10.000 15μm Dynosphere/minta) bemérését követően meghatározni az adott térfogatú mintában található sejtek és partikulumok számát. Ezek arányából és a tesztpartikulum koncentrációjából már könnyen megállapítható a minta adott térfogatra számítható sejtszám

ld.: *(#sejtszám/#partikulumszám) x bemért partikulumok száma*.

További lehetőséget jelentenek azok a technikák, melyek a pozitív választ adó sejtek lízisét követően, rendszerint a sejtek DNS tartalmát véve alapul határozzák meg a sejtszámot (pl. CyQuant GR – Chemicon QCM[™] – Millipore). Az utóbbi eljárások esetében a feltárt sejtes minták komplex elemzésére is mód nyílik, pl. integrinek vagy a kemotaxisért felelős recepto– rok kimutatása is lehetséges ugyanazon mintából.

Az amőboid mozgást végző sejtek mozgásának irányát megszabó állábak izolálására kidolgozott eljárás, illetve ezen izolátumok összetételének molekuláris biológiai analízise e téren is felhasználható, bár adatai inkább a folyamatok molekuláris hátterének jobb megértését segítik elő (ld. később). Fentiek mellett, a filterek esetében már említett in situ kiértékelés, a sejtek filterekben történő fixálása, beágyazása, metszése és festése a kiértékelés további útjait jelentik.

2.6 Az egyes technikák komparabilitása

Mint azt a következő fejezetben felsorolt technikák jelezni fogják ugyanazon modell-sejt kemotaktikus aktivitását számos módon és biológiai szempontból is több megközelítésből határozhatjuk meg. Ugyan természetesnek tekinthető, hogy akkor tekinthetjük a kapott adatokat elfogadhatónak, referencia rendszereink akkor adnak zöld utat a további vizsgálatok elvégzéséhez,

ha a különböző módszerekkel történő mérések hasonló eredményeket adnak.

Eredményeink kiértékelése és különböző módszerekkel kapott adataink öszszehasonlítása során azonban soha nem felejthetjük el, hogy a vizsgált anyagok döntő többsége nem csupán kemotaktikus hatású, hanem a sejtek számos más sejtélettani funkcióját szintén pozitív vagy negatív értelemben – és sokszor a kemotaktikus potenciálhoz viszonyítva léptékekkel nagyobb mértékben – befolyásolhatja.

Fenti hatások közül a kemotaxis szempontjából kiemelkedő jelentőségű a sejtek 2.2.1 pont alatt már említett azon képessége, hogy auto- és parakrin hatású és a kemotaxist is befolyásolni tudó anyagokat termelnek, sőt az, hogy e szintetikus aktivitást az általunk vizsgált anyag még indukálhatja is. Ebből a szempontból példaértékűek azok az összehasonlító adatok, melyeket IL-1β-vel történt előkezelések után közöltek microchamber és agaróz assay technikák összehasonlításával. Az eredmények egyértelműen jelezték, hogy az IL-1ß mind a CXC IL-8, mind a CC MCP-1 kemokinek termelődését képes indukálni a fibroblasztokban. Az izolált két kemokin kemoattraktáns hatása monociták esetében az alkalmazott indukáló IL-1ß koncentrációjával, mind a két említett kemotaxis assay esetében jó egyezést mutat. A módszerek közötti lineáris összefüggés azonban granulociták esetében már nem volt megfigyelhető, mely eltérés további utalás arra, hogy vizsgálatainkban csak kellő tisztaságú, jól definiált, immunológiai módszerekkel karakterizált anyagok, illetve sejtpopulációk felhasználásával érhetünk el megbízható eredményeket.

3. Egysejtűek kemotaxisának mérése

Ezeknek a próbáknak a kivitelezése általában egyszerű. A vizsgálandó sejtek tenyésztése és vizsgálatra való előkészítésük viszonylag kevés munkát igénylő feladat. A módszerek maguk is egyszerűek, inkubációs idejük is rövidebb, mint a magasabb rendűek sejtjeinél alkalmazott próbák esetében. Lényeges különbség, hogy mivel ezeknek a sejteknek a kemotaxisához nem mindig kell a kitapadásukkal számolni (ld. csillósok) a vizsgálatok is gyakran "egy-fázisú", gyors tesztek.

3.1 A "legősibb", filter-papíros eljárás

Egy filter-papír, mint hordozó fázis közepére egy csepp attraktáns anyagot tartalmazó oldatot cseppentünk. Ezt a filter-papírt (más esetekben agaróz gél darabkát) egy tárgylemez közepére helyezzük és a vizsgálni kívánt sejteknek megfelelő puffert (kb. 50 µl) cseppentünk a hordozóra. A sejteket a 3.1 ábrán látható módon egyenletesen visszük fel a mintára, vagy a lefedett filter-papír széléhez cseppentjük. A sejtek felvitele után fedőlemezzel lefedjük a mintát. A papír/gél környezetében az anyagnak csökkenő gradiense alakul ki, a sejtek az optimális koncentrációt reprezentáló gyűrűben helyezkednek el, viszonylag könnyen kiértékelhető.

A módszer előnye a gyors elkészíthetősége, míg hátránya, hogy igen nehéz jól összehasonlítható, megbízható párhuzamos mintákat készíteni.



3.1 ábra: A filter-papíros eljárás sematikus képe. A sejtek a tárgylemez közepén elhelyezett, filterbe vagy agarba juttatott vizsgálati anyag diffúziója következtében az optimális koncentráció zónájának megfelelő körben helyezkednek el. Az inkubáció után mikroszkópos kiértékelés történik.

Gyakorlati útmutató 1	Filterpapír-teszt (2D)
Célsejt	prokarióta, eukarióta 104–106 sejt/ml
Anyagigény	a vizsgálni kívánt anyaggal steril körülmények között elő-
	kezelt filterpapír vagy agaróz gél
Egyéb eszköz	előzetesen 70% ethanolban megtisztított tárgylemezek és
	fedőlemezek
Kiértékelés / Speciális eszköz	fénymikroszkóp
Kivitelezéséhez szükséges idő	kb. 2 óra (előkészülettel)
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvalitatív
Fő előnye/hátránya	gyors, tájékoztató jellegű mérés
Egyéb	-

3.2 A három-furatú lemez és a T-maze assay

A címben szereplő két eljárás egymás igen közeli rokonának tekinthető, azzal a különbséggel, hogy míg a három-furatú lemezes eljárás esetében mind a sejtek, mind a vizsgálandó anyagok részéről igen kis térfogatok is elegendőek, a T maze-nek nevezett eljárás esetleg több mililiter mintát is igényel. Mindkét eljárás esetében a sejtek szabadon érintkeznek a vizsgálandó, illetve a kontroll anyaggal. A három-furatú lemez egyes lyukainak betöltésénél először a sejtmentes oldatokkal töltjük fel a két széli furatot, majd a középső furatba cseppentett sejtes frakció óvatos és egyenletes felvitelével biztosítjuk a kapcsolat kialakulását az egyes komponensek között. A rendelkezésre álló viszonylag rövid inkubációs időt követően – három-furatú lemez esetében ez maximum 2 perc –, az assay kiértékelése is egyszerű, mikroszkópban gyorsan leolvasható a sejtek pozitív vagy negatív válasza az adott anyagra (3.2 ábra)



3.2. ábra A három-furatú lemez felépítése és a minták felvitele, illetve a kiértékelés menete.

A "T maze" (maze = *ang.* labirintus) egy T alakú üvegcső (3.3 ábra), melynek függőleges szárába a sejteket tartalmazó oldatot, a másik két, vízszintes szárába a két különböző vizsgálandó anyagot lehet elhelyezni. A három csatorna találkozásánál egy csiszolt csap található, ennek elforgatásával indíthatjuk el, illetve fejezhetjük be a kísérletet. A kísérlet során tehát a vizsgálandó sejtek a vízszintes két szár közötti térbe kerülnek és szabadon választhatnak az elmozdulás irányát illetően. Evvel az assay-vel nem csupán kontroll anyaghoz viszonyított preferenciát lehet mérni, de két eltérő hatású anyag szelekciós potenciálja is meghatározható. A sejteket a kísérlet után különböző módszerekkel lehet megszámolni.

A T-maze egyik előnye, hogy lehetőséget ad a sejtek szelekciójára, míg hátrányát jelentik a kísérlet indításakor, illetve befejezésekor alig elkerülhető turbulenciák, melyek a középen elhelyezkedő csap elforgatásakor jönnek létre.



Gyakorlati útmutató 2	T-maze assay (3D)
Célsejt	prokarióta és eukarióta csillós/ostoros protozoon
	10 ⁵ –10 ⁶ sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek
Egyéb eszköz	előzetesen tisztított és autoklávozott T-maze, gumidugó
	vagy parafilm
Kiértékelés / Speciális eszköz	fénymikroszkóp, Bürker-kamra (Fuchs-Rosenthal v. Neu-
	bauer kamra), illetve elektronikus számláló
Kivitelezéséhez szükséges idő	sejt–típustól függően 5–30 min.
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvalitatív > kvantitatív
Fő előnye/hátránya	sejtek ligand-függő szelekciója
Egyéb	különös óvatossággal kell eljárni a csap elforgatásánál,
	illetve a csap kenéséhez alkalmazott anyag megválasztása-
	kor
Ref.	41

3.3 Opaleszcencia mérésén alapuló eljárás

Ennél a technikánál a vizsgálandó anyag hígításaiból készített oldatot helyezzük fotométer küvettába. Ennek megmérjük az optikai denzitását, majd ezután az oldat tetejére rétegezzük a sejteket tartalmazó oldatot. Az inkubációs idő alatt a sejtek az attraktáns anyag hatására bevándorolnak az eredetileg sejtmentes oldatba (3.4 ábra), melynek így megváltozik az optikai denzitása. A mérések összehasonlításából kapott hányados (I/I₀) értéke arányos a pozitív kemotaxist mutató sejtek számával.



3.4 ábra Az optikai denzitás változásán alapuló assay sematikus képe. A sejtek a nyílnak megfelelő irányba vándorolnak.

A módszer előnye, hogy optimális számú sejt vizsgálatát teszi lehetővé és viszonylag egyszerűen összeállítható és egyben kvantitatív adatokat is szolgáltató technika. Hátránya azonban, hogy az aerob/anaerob viszonyok változása miatt az egyes sejttípusok elmozdulását nem csupán a sejtek attraktáns iránti vonzódása, hanem azok aerob/anaerob környezetet preferáló tulajdonsága is befolyásolhatja.

Gyakorlati útmutató 3	Opaleszcencia mérése (3D)
Célsejt	prokarióta, eukarióta 10 ⁵ –10 ⁶ sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek
Egyéb eszköz	laboratóriumi fotométer előzetesen megtisztított küvettája
Speciális eszköz igény	spektrofotométer (hosszabb vizsgálatoknál kontrollált bel-
	ső hőmérséklet előnyös!)
Kivitelezéséhez szükséges idő	inkubációs idő kb. 30 min
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvantitatív
Fő előnye/hátránya	anaerob/aerob sejtek eltérő válasza
Egyéb	-
Ref.	42

3.4 Kapilláris-assay

3.4.1 Egy kapillárisból álló rendszer

Az assay alapja az, hogy a vizsgálni kívánt sejteket tartalmazó oldatot egy edénybe helyezzük, majd ebbe az oldatba egy vékony kapillárist helyezünk, amelybe attraktáns anyagot szívtunk fel. Az inkubációs idő alatt a sejtek a kapilláris körül, illetve a kapillárisban halmozódnak fel.

A technika kivitelezése tekintetében vetekszik a korábban már említett filterpapíros/géldarabkás eljárásokkal. Mint a baktériumok kemotaxisának gyors vizsgálómódszere komoly népszerűségnek örvendett az 1960–1970– es évek táján, melyhez nagyban hozzájárult az, hogy a terület kimagasló mű– velője, Adler egyik cikkében [43] is egy ilyen assay-t bemutató képpel (3.5 ábra) illusztrálta a vizsgált E. coli tenyészet kemotaktikus aktivitását.



3.5 ábra E.coli sejtek kemotaxisának vizsgálata kapilláris technikával. (Adler, J. felvételének felhasználásával)

A módszer fenti és a 3.5 ábrán bemutatott szintén egyszerű elrendezésétől kissé eltérően –, olyan formáit is leírták melyben a vizsgálni kívánt anyagokat tartalmazó tér nem egy egyszerű kapilláris, hanem egy annál vastagabb alul zárt cső, mely a környező folyadéktérrel (sejtek) az alsó végen elhelyezkedő és az oldalfalat több sorban is átjárhatóvá tevő kapilláris-koszorúval érintkezik. Az egyidőben elvégezhető párhuzamos mérések számának növelését szolgálja az a további változat melyet Leick és Helle írtak le (3.6 ábra). Ebben egy plexi lemezen készített számos furat szolgál a sejteket tartalmazó oldatok befogadására (ld. külső kamra), míg egy hasonló méretű lemezben rögzített, kapillárisokkal átjárhatóvá tett falú csövek biztosítják a vizsgálandó anyagok befogadására a belső kamrákat.



3.6 .ábra Az egy kapillárisból álló assay (baloldal) és a Leick féle többcsöves eljárás (jobboldal) sematikus képe.

A módszer előnye a könnyű kezelhetőség, míg hátránya, hogy a klasszikus gumibalonos kapillárisok esetében nehéz a minta kívánt térfogatát pontosan reprodukálni a sorozatmérések esetében. További problémát jelent a plexi vagy egyéb műanyagok alkalmazása, melyek sok esetben kimutatható hatással vannak a sejtek kemotaktikus aktivitására.

Gyakorlati útmutató 4	Kapilláris assay (3D)
Célsejt	eukarióta, (prokarióta) 104–105 sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek
Egyéb eszköz	üveg, furatos gumidugó, kapilláris és gumiballon, helyben összeállítható
Kiértékelés /Speciális eszköz	fénymikroszkóp, Bürker-kamra (Fuchs-Rosenthal v. Neu-
	bauer kamra), illetve elektronikus számláló
Kivitelezéséhez szükséges idő	Inkubációs idő kb. 5–60 min
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvalitatív > kvantitatív
Fő előnye/hátránya	nehezen kalibrálható
Egyéb	-
Ref.	44

A fentiekben leírt kapilláris assay-k hátrányait igyekszik kiküszöbölni a viszonylag megbízható mintatérfogatok bemérésére képes "fecskendős" eljárás [108] (3.7 ábra).



Inkubációs idő: 15-60 min.

3.7 ábra Egyszerhasználatos eszközökből összeállítható kapilláris kemotaxis-assay elve.

A módszer kétségtelen előnye a pontosabb térfogatok bemérése mellett az egyszerhasználatos, steril eszközök használata. Hátránya azonban, hogy a sejtes minta tartójaként szolgáló pipettahegy nyilásainak zárása nehézkes, a tű és a pipettahegy egymáshoz viszonyított helyzete esetleges (ld. parafilm rögzítés).

3.4.2. Egy- és többcsatornás kapilláris assay

Az automata pipetták bevezetésével új lehetőség nyílt egyes sejttípusok kemotaktikus aktivitásának mérése terén. Mivel ezekbe a pipettákba hitelesítetten nagy pontossággal szívhatók fel a kérdéses folyadék térfogatok, magától adódott a lehetőség, hogy már egycsatornás változataikat is alkalmazzák a kemotaxis mérésére: ismert mennyiségű anyagokat (attraktáns) szívva fel a pipettahegybe csupán megfelelő rögzítésről kellett gondoskodni ahhoz, hogy ez az anyag egy külső kamrában elhelyezett sejtes mintával érintkezhessen (3.8 ábra – A). A többcsatornás mikropipetták kifejlesztése a fentiekben vázolt rendszer további javítására adott módot. A módszer előnye a pontos mintavétel mellett a párhuzamos futtatások (4–8–12) lehetősége. Utóbbi esetben a legcélszerűbb a vizsgált attraktáns anyag mikropipetta hegyeibe (belső kamra) történő felszívása után a sejteket egy 96–lyukú plate megfelelő mélyedéseibe helyezni (külső kamra), majd a pipetta hegyeit a sejtek oldatának felszínére helyezni (3.8 ábra – B). Az inkubáció elteltével mikroszkóp vagy elektronikus számláló segítségével határozható meg a mintákba került sejtek száma.



3.8 ábra Egy– és többcsatornás mikropipetta felhasználása kapilláris kemotaxis assay–ben (A és B). A folyadékfázisban (A, B), vagy agaróz lemezen (C) szélesztett sejtek az attraktáns inger (nyíl) irányába vándorolnak.

A módszer előnye, hogy a mikropipetta használata kiküszöböli az előzőekben említett technika térfogati pontatlanságát, valamint az, hogy aerob sejtek vizsgálatára is alkalmas. Hátránya, hogy elsősorban a tenyésztő oldat felső rétegében elhelyezkedő, ott aktív mozgást végző sejtek (ld. csillós/ostoros mozgás) mérésére alkalmas.

Gyakorlati útmutató 5	Mikropipetta-kapilláris assay (3D)
Célsejt	eukarióta, (prokarióta) 104–105 sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek
Egyéb eszköz	96-lyukú plate, 8-12 csatornás mikropipetta
Kiértékelés /Speciális eszköz	fénymikroszkóp, Bürker-kamra (Fuchs-Rosenthal v. Neu-
	bauer kamra), illetve elektronikus számláló
Kivitelezéséhez szükséges idő	Inkubációs idő kb. 15–30 min
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvantitatív
Fő előnye/hátránya	jól kalibrálható, aerob sejtek vizsgálatára alkalmas
Egyéb	-
Ref.	45

A módszer egy módosított formáját egy- és többcsatornás elrendezésben felhasználhatjuk azonban a felszínhez kötött, amőboid mozgás vizsgálatára is. Ekkor a pipettahegyeket a sejteket tartalmazó felszínre vagy avval igen közeli távolságban helyezzük el és az inkubációs idő lejártával a hegyek által kijelölt pontok körüli felszíneken értékeljük ki a sejtszám alakulását (3.4.2.1– C ábra).

4. Magasabb rendűekből származó sejtek migrációjának mérése

A magasabb rendűekből származó minták esetében a kemotaxis mérések kivitelezése során több nehézséggel találkozunk. Már a megfelelő sejtpopuláció preparálása is nagy körültekintést igényel, annak hatásfoka és a sejtek viabilitása sokban függ az alkalmazott technika megfelelő voltától és a kísérletet végzők gyakorlottságától is. Tenyészeti sejtek esetében a kultúrák fenntartása és azok identikus voltának folyamatos ellenőrzése is gondot okozhat. A mérések során kedvező, hogy e sejteknél már sokkal gyakoribb a szakirodalom által elfogadott, és a kemotaktikus aktivitás mérése szempontjából referenciának számító anyagok alkalmazása. Külön problémát jelenthet azonban, hogy e sejtek kemotaxisa adhéziófüggő, azonban nem minden vizsgálni kívánt sejttípus esetében indukálható a kitapadás azonos mértékben (ld. szuszpenzióban növő sejttenyészetek).

Az alábbiakban ismertetésre kerülő technikák a szakirodalomban ismertetett eljárások viszonylag széles skáláját igyekeznek felölelni. Célunk volt minden olyan eljárás megemlítése, melyek kivitelezhetőségét és esetenként a megkívánt specifitást a rendelkezésre álló irodalmi adatok dokumentálható bizonyossággal állítják.

4.1 Motilitás vizsgálata tenyésztőedényben

A magasabb rendű sejtek motilitását vizsgáló eljárások közül talán a legegyszerűbbnek azt a módszert tekinthetjük, mely minimális eszközigénye ellenére is viszonylag megbízható adatokkal szolgálhat, mind az extracelluláris

matrix elemei, mind pedig a sejtek környezetébe adott és a mozgás kemokinetikus jellegét befolyásoló anyagok hatását tekintve [46].

Az eljárás első lépéseként a vizsgálat során alkalmazott tenyésztőedény belső felszínét - a gyakorlatban használt tenyésztő felszínt - az extracelluláris matrix elemeinek keverékéből készült oldattal vagy pedig kifejezetten egy kérdéses elem oldatával fedjük (4.1.1 ábra). Ezt követően a vizsgálni kívánt, kitapadásra képes sejtek szuszpenziója kerül az edénybe. Egy rövid inkubációs periódus következik ez után, mely során az edényt rövidebb oldalfalára állítjuk és hagyjuk, hogy sejtek ide kitapadjanak. A nem kitapadt sejtek gyengéd mosással történő eltávolítását követően, a vizsgálandó anyagot tartalmazó médiumot helyezünk az edénybe, majd azt kb. 20°-os szögben alátámasztva inkubáljuk a sejtek típusától függően 1-10 napig át. Fontos figyelnünk arra, hogy a folyadékszint mindig fedje az edény kitapadt sejtekkel fedett alaplemezét. Az inkubációs idő alatt a sejtek az oldalfalról az extracelluláris matrix elemeivel fedett alaplap irányába mozdulnak el, s az elmozduló sejtek száma jó korrelációt mutat a környező közeg kémiai öszszetételének motilitást befolyásoló jellegével. A sejtek elvándorlása jól kiértékelhető a fixálásukat követően már egyszerű festések útján is, azonban ennél is jobb eredményeket kapunk a vizsgált sejtek in vivo fluoreszcens jelzését (pl. Calcein-AM technika) követő, fluoreszcens readerrel való mérések esetében.



4.1 ábra Sejtek motilitásának vizsgálata tenyésztőedény belső felszínén való migráció mérésével

4.2 Üveg, illetve teflongyűrűs eljárás

Szintén a viszonylag egyszerű eljárások közé tartozik az az eredetileg 1984– ben Pratt és mtsai által leírt ötletes módszer, mely előzetesen a vizsgálni kí– vánt ECM peptiddel bevont tényésztőedény aljára helyez teflonból vagy üvegből készült gyűrűket, s az ezek által közrezárt térbe olt kitapadásra ké– pes sejteket [47]. A technikával a sejtek motilitásbeli eltéréseit elemezhetjük a sejt/ECM kölcsönhatásaitól, illetve egyéb a tenyésztő folyadékhoz adott indukáló anyag hatásától függően. A sejtek megtapadását követően a gyűrűt eltávolítjuk, s ezzel megszüntetjük a sejtek radiális irányú mozgásának gát– lását. A kiértékelés során a tenyészetek kiterülését és migrációját értékeljük a centrumtól való távolságok mérésével vagy az ennél lényegesen szofisztikáltabb videomikroszkópos technikák valamelyikével.



4.2 ábra Sejtek motilitásának mérése teflon-gyűrűs eljárással (A) és annak módosított, olajcseppet alkalmazó formájával (B).

A fentiekben ismertetett módszer egy módosított változata az ú.n. olajcsepp eljárás (4.2.ábra B). Ekkor egy ECM peptidekkel fedett felszínen ásványi olajcsepp alá injektálunk sejteket, melyek ott kiterülnek és kitapadnak. A sejtek a felszín fedésétől függően mutatnak motilitást és fedik be az olajcsepp alatti területet, illetve migrálnak a cseppen kívüli területre [48].

4.3 Üveggátas eljárás

Az előzőekben ismertetett módszereknél nagyobb felszereltséget igénylő, de alapjaiban igen egyszerű a címben szereplő módszer, melynek alapját egy igen jól pozicionálható, a vizsgálandó anyaggal feltöltött mikrokapilláris ké– pezi [49]. A vizsgált sejtek előzetes tenyésztése fedőlemez felszínén történik. A sejtekkel borított üveglemezt Petri csésze alján rögzítjük, majd a kapilláris nyílását a fedőlemez oldalához illesztjük oly módon, hogy az a sejtes felszín alatt kb.17 μm-rel érintkezzen az üveg oldalához (4.4 ábra). A kísérlet folyamán fokozatosan emelkedő nyomást létesítünk a kapillárisban, melynek maximum értéke ne haladja meg a 25 hPa-t.



4.4 ábra Koncentráció gradiens generálása üveggátas eljárással.

A kialakuló gradiens az üvegfelszín minden irányában terjed, így az üveglap felszínén lévő sejteket is eléri, kb. 20 mp alatt kialakul és kb. 60 percig ál-

landónak mondható. Fenti módszer előnye, hogy viszonylag meredek gradiensek alakíthatók ki segítségével, míg a kapilláris sejteket hordozó felszínen való elhelyezésekor a gradiensek sokkal laposabb profilt vesznek fel. A sejtek attraktáns hatására kialakuló új elrendeződésének kiértékelésére célszerű az előre kijelölt területek lefotózása után azok morfometriai programokkal való analízisét elvégezni.

4.4 Filteren keresztüli migráció

Ezeknek a próbáknak közös tulajdonsága, hogy a sejteknek az attraktáns irányába egy filteren kell aktív mozgással áthaladni. Tehát a filter pórusának átmérője eleve kisebb kell, hogy legyen a vizsgálni kívánt sejtek jellemző méreténél, és a pórusok filtert átjáró szakaszai rendszerint nem merőlegesek a filterlemez szintjére, hanem avval szöget zárnak be, evvel is biztosítva, hogy csak az aktív amőboid mozgást végző sejtek átjutását értékeljük az assay befejeztével.

A filtereket kezdetben cellulóz-észterből készítették. Már ezek a viszonylag vastag (100–150μm) lemezek is eltérő pórusmérettel készültek biztosítva ezzel a különböző méretű sejtek differenciált vizsgálatát. A polikarbonát típusú filtereket az 1970-es években vezették be a kemotaxis vizsgálatokba. Ennek több előnyös tulajdonsága is volt a cellulóz-észter filterrel szemben. Ez a filter jelentősen vékonyabb (kb. 6–10μm), így annak mindkét oldalán nagyon rövid időn belül azonos koncentráció alakul ki. Az áthaladás a polikarbonát filteren a sejtek 2D felszínhez való adhéziós képességétől függ, szemben a cellulóz filterrel, melyben 3D mátrix szerint jutnak át a sejtek.

Újabban, a kísérletek pontossága, illetve az élettani viszonyok jobb modellezése érdekében a polikarbonát filtereket különböző anyagokkal, illetve sejtrétegekkel is bevonják. Ilyen lehet a citokinek által aktivált endotél (pl. HUVEC = human umblical vascular endothelial cells), melyet általában a különböző fehérvérsejtek és tumorsejtek vizsgálatánál használnak. Így nemcsak az adott attraktáns, vagy repellens anyag hatásai mutathatók ki, hanem az is megfigyelhető, hogyan hatnak a különböző extracelluláris mátrix elemek, citokinek, esetleges gyulladásos mediátorok, adhéziós molekulák a kemotaxisra. Egyes összetettebb technikák már a szöveti térben mérhető áramlást is modellezni képesek és így még pontosabb eredmények elérése lehetséges.

4.4.1 Kétkamrás eljárások

A sejtek filteren keresztüli gradiens irányú mozgása vizsgálható ezekkel a módszerekkel, azonban itt már az egyes kamrák elkülönítése nem csupán virtuális (ld. kapilláris módszerek), hanem azokat a filter valóban két jól elkülöníthető térrészre osztja. A leggyakrabban alkalmazott leukocita kemotaxist vizsgáló assay-k tartoznak ide. Egyaránt alkalmazzák ezeket eddig nem karakterizált sejtek és új kemotaktikus ligandok vizsgálatakor. A berendezés eredetileg csak egy filtert magába foglaló üveg vagy műanyag üvegcséből állt (ez a klasszikus Boyden kamra). Később ebből az egyszerű eszközből fejlődtek ki a sok kamrát tartalmazó rendszerek, amelyek már gyorsan, nagy sejtpopulációk vizsgálatára is képesek.

4.4.1.1 Boyden kamra

Boyden 1962-ben vezette be a használatát (4.5 ábra). Azóta sok módosított változata került forgalomba. Boyden kezdő kísérleteiben egy 150 µm vastag cellulóz-észter membránt használt 3µm-es pórus átmérővel, ez választotta el a felső és alsó kamrát. A vizsgálni kívánt anyag oldatát az alsó, a leukocitákat a felső kamrába, a membrán filter tetejére helyezte. Ezután 1-4 órán keresztül 37 °C-on inkubálta a rendszert, majd az alsó kamrában található sejteket megszámolta. Ez az eljárás képes volt a használt anyag kemotaktikus hatásának gyors meghatározására. Boyden azonban úgy tapasztalta, hogy néhány sejt akkor is átjut a filteren, ha nem használ kemotaktikusan aktív anyagot. Ezt a hibát kiküszöbölendő először egy a sejtek számára áthatolhatatlan filtert használt, amely indukáló anyag hiányában is a "lecsorgó" sejteket mintegy csapdába ejtette. Ezeket megszámolva és ennek értékét az attraktáns anyagra kapott eredményből kivonva már pontosabb eredményhez jutott. A gyakorlati felhasználás szempontjából nehézkes eljárás tökéletesítésére és a nem kívánt háttérhatásból adódó hiba csökkentésére a későbbiekben az inkubációs idő lerövidítése is jó megoldásnak bizonyult, nem is beszélve a filterbe migrált sejtek számának mikroszkópos úton történő meghatározásáról.

Bár tudnunk kell, hogy "Boyden-kamrát" igen egyszerű eszközök segítségével, házilagosan is előállíthatunk (ld. gyógyszeres fiolák műanyag zárókupakjait egymás felé fordítva is képezhetünk filterrel elválasztott kamrákat, jól reprodukálható mérések gyárilag előállított kamrákban végezhetők megnyugtató pontossággal. Ilyen gyári módosításnak köszönhető a kamra további tökéletesítése is, melynek során több változtatás is történt. Ezek közül ta-

lán a mérések megbízhatósága szempontjából legfontosabb az a kis csatorna mely a filter alsó felszínén esetlegesen felgyülemlő levegőbuborékok elvezetésére szolgál (ld. NeuroProbe által forgalmazott kamrák). Ezáltal az attraktáns közeg és a sejtes minta közötti érintkezési felszínen a számított elméleti értékek könnyen reprodukálhatókká váltak.

A Boyden kamra kedvező tulajdonságai melletti egyik nagy hátránya, hogy relatíve nagy mennyiségű kemotaktikus ligandumot, és nagyszámú sejtet kíván. (Az eredeti Boyden kamra mintegy 1.5 ml ligandumot tartalmazó oldattal és 5x10⁶ sejttel működött.) Problémát jelenthet továbbá, hogy a párhuzamos futtatások végzésére sem kifejezetten alkalmas az egyedi kamra, igen megterhelő annak szétszerelése, mosása szárítása stb. az egyes inkubációk között.



4.5 ábra A Boyden kamra leegyszerűsített vázlata.

A kamra fent jelzett hátrányait kikerülni igyekezve, Falk és munkatársai nagy szerepet játszottak a transwell és sokkamrás assay kifejlesztésében, melyek a napjainkban is használt ú.n. "multiwell" assay-k előfutárai voltak.

Gyakorlati útmutató 6	Boyden kamra (3D)
Célsejt	eukarióta (pl. neutrofil gr.c., monocita) 105 sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek, filter (∅ 3–5–8 µm)
Egyéb eszköz	-
Kiértékelés /Speciális eszköz	fénymikroszkóp, Bürker-kamra (Fuchs-Rosenthal v. Neu-
	bauer kamra), illetve elektronikus számláló; filterbe migrált

	sejtek festése/számlálása
Kivitelezéséhez szükséges idő	inkubációs idő kb. 1-4 óra (max. 24 óra)
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvantitatív
Fő előnye/hátránya	nagy anyag igény, a párhuzamos vizsgálatok sok eszközt
	igényelnek
Egyéb	-
Ref.	50

4.4.1.2 Transwell rendszerek

A Boyden kamra széles szakmai körben aratott sikerének is köszönhető volt, hogy az 1980-as években egyre jobban elterjedtek azok a kemotaxis mérésére alkalmas eljárások, melyek gyárilag előállított, steril, egyszer használatos műanyag külső kamrákból és a felhasználó által szabadon választható filterrel felszerelt belső, kosárka alakú tartályból állnak. A Boyden kamrához hasonlóan a sejtek a felső kamrába, míg a hívó jelet tartalmazó folyadék az alsó tartályba kerül (4.6 ábra). A módszer – a kamrák viszonylag nagy térfogatából adódóan –, éppúgy alkalmas a vizsgálat során termelődő és a kemotaxist feltételezetten befolyásoló anyagok izolálására, mint az alsó kamrába vándoroló sejtek szelekciójára és továbbtenyésztésére. Egymástól eltérő inkubációs idejű vizsgálatok elvégzésére szintén jól alkalmazhatók a transwell rendszerek, mivel a belső tartályok nem csak összefüggő lapokban, de sorokban és egyesével kiszerelve is beszerezhetők.

A klasszikus kemotaxis kísérletek kiértékelése ezekben a rendszerekben hasonló a fentiekben már említettekhez: az alsó kamra folyadékterének sejtszáma, valamint a filterbe migrált sejtek számának meghatározása egyaránt használatos.



© Kohidai, L. 2006.

4.6 ábra Transwell rendszer vázlatos elrendezése, valamint filterbe migrált sejtek mikroszkópos detektálása festést követően.

A módszer fentiekben felsorolt előnyei (pl. felhasználóbarát elrendezés, viszonylag nagy számú sejt szelekciója) mellett, kétségtelenül problémát jelent a külső és belső tartályban elhelyezett folyadékterek közlekedőedény-szerű kapcsolódása. Ez különösen akkor jelent gondot, ha a filtert sem peptidek, sem endotél réteg nem fedi. Ekkor ugyanis a külső és belső folyadékszintek eltérése esetén egyaránt mód van a belső tartályban elhelyezett sejtmentes állomány fokozott ütemű kijutására (a külső tér anyagainak koncentrációja hígul), illetve az attraktáns visszaáramlása révén a koncentráció gradiens sérülésére is. Ennek felismerése vezette az egyes transwell kamrákat forgalmazó cégeket arra, hogy minden egyes kamra típushoz és mérethez pontos külső- és belsőkamra térfogatokat ajánljanak, melyek betartásával a fent jel-

Gyakorlati útmutató 7	Transwell assay (3D)
Célsejt	eukarióta amőboid mozgást végző sejt
	10 ⁵ –10 ⁶ sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek
Egyéb eszköz	filterrel ellátott műanyag inzert; 6–12–24 lyukú lemez
Kiértékelés / Speciális eszköz	átvándorolt sejtek száma/filter kiértékelése
	fénymikroszkóp
Kivitelezéséhez szükséges idő	sejt-típustól függően 30 min.–3 óra
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvantitatív
Fő előnye/hátránya	könnyű kezelhetőség / folyadékszintek pontos beállítása
Egyéb	
Ref.	51

zett problémák elkerülhetők.

4.4.1.3 Sokkamrás - multiwell - assay

Az első sokkamrás rendszer 48 kamra egységből épült fel. Egy alsó és egy felső lemezből áll, amelyek a kamrákat tartalmazzák, és ezeket egy filter választja el. A napjainkban rendelkezésre álló formák már 96 vagy 384 kamrát is tartalmazhatnak (4.7 és 4.8 ábrák).



4.7 ábra A módosított Boyden kamra rajza



4.8 ábra A NeuroProbe által gyártott, módosított Boyden kamra képe. Mint azt a 4.7 ábra mutatja ebben egy 96–lyukú lemez szolgál az alsó, kemoattraktánst tartalmazó kamraként. A felső, sejtek betöltésére szánt kamrát tapadó anyaggal bevont kerettel ellátott filter választja el az alsó résztől. (http://www.neuroprobe.com/products/mbseries.html)

A sokkamrás assay-kben csökkenteni lehetett a felhasznált ligandok menynyiségét, valamint a sejtek számát is. A döntő különbséget az egykamrás Boyden kamra és a sokkamrás assay-k között a filter anyaga jelenti, mivel a sokkamrás assay-k már kizárólagosan polikarbonát filtereket használnak. Annak ellenére, hogy alkalmazásuk viszonylag könnyű, számos ellenvetés hangzik el a sokkamrás assay-k ellen is, főként akkor, ha a feladat a kemotaxis és a kemokinezis elkülönítése.

Ez utóbbi célra a checkerboard analízis elvégzése ajánlott, amely a filteren átvándorló sejtek által megtett útról készít vázlatos rajzot. A checkerboardon végzett kísérletben a kemoattraktáns anyagot a filter alatt és felett különböző koncentrációban helyezzük el, így egy jól meghatározható irányba mutató, emelkedő koncentrációgradiens alakul ki. Ennek alapján összefüggés lesz kimutatható az átvándorló sejtek és a kemoattraktáns anyag mennyisége,

illetve a koncentrációgradiens nagysága között. Ha a koncentrációgradiens meredeksége és az átvándorló sejtek száma között erős pozitív korreláció figyelhető meg, akkor a sejtek kemotaktikus válaszáról beszélhetünk (a koncentrációgradiens irányába migrálnak a sejtek). Ezzel szemben, az anyag mennyisége és az átvándorló sejtek száma között kimutatható csekély korreláció kemokinezist valószínűsít (növekszik a sejtek random elmozdulásának sebessége és ez azt eredményezi, hogy a sejtek az alsó kamrában halmozódnak fel). Bár ez az analízis egy ésszerű elméleti lehetőséget ad a kemotaxis és kemokinezis elkülönítésére, de a gyakorlatban nem használható teljesen hibamentesen, mivel az elméletben feltételezett lineáris koncentráció gradiens tökéletes formában kivitelezhetetlen. Mint azt korábban is említettük már: a gradiens mind térben, mind időben változni fog. A módszer csak akkor használható, ha képesek vagyunk a kemoattraktáns anyag koncentrációját a sejtek környezetében szigorúan kontrollálni. (Ugyanezen megfontolások alapján a sokkamrás assay-k eredményeinek pontossága sem tekinthető mindig megfelelőnek.)

Egy másik probléma, ami felmerül a filteren keresztüli migrációt vizsgáló assay-k esetében: annak hiánya, hogy az eljárás nem tud különbséget tenni a különböző sejtmozgások között. Egyes esetekben nehéz ellenőrizni, hogy az inkubációs idő alatt hány sejt halmozódik fel a koncentráció gradienstől függetlenül az alsó kamrában. A kemoattraktáns anyagok koncentrációgradiense az idő függvényében alakul ki és változik, ezért a kemoattraktáns anyagok által kiváltott különböző mozgások is ezzel együtt változnak. Például a kemokinezis a kemoattraktáns stimulus után lényegében azonnal kialakul, kemotaxis kifejlődésére várni míg а kell amíg а tényleges

koncentrációgradiens ki nem alakul. Utóbbi eltarthat néhány perctől akár órákig is. Ezért ha korai időpontban vizsgáljuk a filteren keresztül átvándorolt sejteket, akkor a sejtek kemokinezisére kifejtett hatást vizsgálhatjuk, míg egy későbbi időpontban már a kemotaxis válik meghatározóvá. Túlzottan hosszú inkubációs idő esetén már a gradiens irányú elmozdulásról sem beszélhetünk, sőt a kiegyenlített koncentrációviszonyok között ismét a vizsgált anyag kemokinetikus hatásai kerülnek előtérbe.

Hátránya még a rendszernek, hogy a sejtek mintegy csapdába esnek az alsó kamrában, visszafelé nem tudnak spontán áthaladni a filteren. Megfelelő előkísérletek elvégzése nélkül, rossz inkubációs időket alkalmazva, lényegében képtelenség elkülöníteni a kemotaxist a kemokinezistől. Mivel a kamrák nem egy sejtet, hanem egy egész sejtpopulációt vizsgálnak fenti probléma komplexitása további elemekkel bővül. Ez indokolja az ilyen kísérletek esetében különösen ajánlott nagyszámú vizsgálat, illetve párhuzamos csoportok elemzésének létjogosultságát.

Gyakorlati útmutató 8	Sokkamrás assay (3D)
Célsejt	eukarióta (pl. neutrofil gr.c., monocita) 105–5x106 sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek, filter (\oslash 3–5–8 μ m), 96-lyukú
	plate
Egyéb eszköz	alternatív lehetőség az áthaladó sejtek fluoreszcens jelzé-
	sét lehetővé tevő speciálisan előkezelt filter
Kiértékelés /Speciális eszköz	alsó kamra - sejtek detektálása MTT, EZ4U stb. mt-
	dehidrogenáz-assay-k, Alamar blue festés stb.;
	filter – fénymikroszkópos számlálás
	fluoreszcens jelzés esetén fluoreszcens leolvasó
Kivitelezéséhez szükséges idő	inkubációs idő kb. 1–4 óra (max. 24 óra)
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvantitatív
Fő előnye/hátránya	Számos párhuzamos minta, jó reprodukálhatóság, kis
	anyagigény
Egyéb	
Ref.	50

4.4.1.4 Chemo Tx rendszerek

Mint azt az előzőekben ismertetett assay-nél láthattunk, ugyan nagy hatékonyságú rendszert sikerült kidolgozni, de a kemotaxis kamra egyes elemeinek többszöri felhasználása miatt, komoly gondok adódhatnak bizonyos ligandok vizsgálatakor (pl. nehezen kimosható lipid-származékok). Ezt a problémát hidalja át a néhány éve kidolgozott Chemo Tx rendszer, aminél az assay elvégzéséhez felhasznált minden elem csupán egyszer kerül felhasználásra.



4.9 ábra Chemo Tx rendszer elemei és működésének vázlatos rajza. (http://www.neuroprobe.com/products/chemo_tx.html)

Mint az a 4.9 ábrán is jól látható, esetünkben a "kétkamrás" jelleg nagyon leegyszerűsödött: az alsó kamra megmaradt ugyan, de 30 és 300µl űrtartalmú lemezek között választhatunk, a sejteket eredetileg tartalmazó felső kamra a filter gyárilag felhelyezett, vízhatlan, körkörös mintázatává zsugorodik. Ezekre a gyűrűkkel határolt 8 és 25.5 mm²-es felszínekre kerül a sejtes minta egy-egy csepp formájában.

A módszer előnye egyszer használatos volta mellett abban áll, hogy az eltérő méretű alsó kamrák, illetve felső felszínek kombinációival jól alkalmazkodhatunk mind az egyedi inkubációs időkhöz, mind az esetleg csak kis menynyiségben rendelkezésre álló ligandumokhoz. További előnye a módszernek, hogy jól áttekinthető, a korábbi fejlesztésnél gondot jelentő buborékképződés könnyen elkerülhető.

Az eljárás hátránya az, hogy különösen a kis volumenek felvitelekor, a rendszer könnyen kiszárad, melyet a gyártó speciálisan az assay-hez tartozó műanyag fedővel ajánl elkerülni, bár hosszabb inkubációk esetén ennek hatása nem mindig kielégítő. További problémát jelenthet a beszerzési ár ma még viszonylag jelentős volta is.

Gyakorlati útmutató 9	Chemo Tx assay (3D)
Célsejt	eukarióta (pl. neutrofil gr.c., monocita) 105–5x106 sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek, gyűrűs filter (∅ 3–5–8 µm),
	96-lyukú plate
Egyéb eszköz	alternatív lehetőség az áthaladó sejtek fluoreszcens jelzése
	pl. Calcein-AM-mel
Kiértékelés / Speciális eszköz	alsó kamra - sejtek detektálása MTT, EZ4U stb. mt-
	dehidrogenáz-assay-k, Alamar blue festés stb.;
	filter – fénymikroszkópos számlálás
	fluoreszcens jelzés esetén fluoreszcens leolvasó
Kivitelezéséhez szükséges idő	inkubációs idő kb. 1-4 óra (max. 24 óra)
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvantitatív
Fő előnye/hátránya	számos párhuzamos minta, jó reprodukálhatóság, kis
	anyagigény
Egyéb	lehetőség van igen kis térfogatú minták vizsgálatára is
Ref.	107

4.4.2. Mikrokemotaxis assay

A módszer bevezetése óta legtöbbször hangsúlyozott előnye, hogy nagyon alacsony sejtszám mellett is használható, 10⁵ sejt/lyuk sejtszám elegendő, szemben a Boyden kamrával, ahol 4–8x10⁵ sejt/lyuk sejtszámra van szüksé– günk a megbízhatóan sikeres munkához. Az egyetlen különbség a Boyden kamra és a mikrokemotaxis próba között, hogy ez utóbbi egy plexiből ké– szült 12; 24 vagy 48 lyukú mikrokamrát használ (4.10 ábra), mely lyukainak a térfogata 25 μl. Hátránya, hogy technikailag sokkal nehezebben kivitelez– hető, mint a Boyden kamra, valamint az, hogy a kis térfogatok miatt itt is na– gyobb a kamra kiszáradásának veszélye, még nedves–kamra alkalmazása mellett is.



4.10 ábra Mikrokemotaxis kamra összeszerelt és használat előtt szétbontott állapotban. A kép jól mutatja az egyes kamrákat elválasztó filterek felhelyezésének módját. A látható kamra esetében Az alsó kamrák 25, a felső kamrák 50 μl űrtartalmúak. (<u>http://www.neuroprobe.com/products/ac48.html</u>)

Gyakorlati útmutató 10	Mikrokemotaxis assay (3D)
Célsejt	eukarióta (pl. neutrofil gr.c., monocita) 106x107sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek, filter (∅ 3–5–8 µm)
Egyéb eszköz	alternatív lehetőség az áthaladó sejtek fluoreszcens jelzé-
	sét lehetővé tevő speciálisan előkezelt filter, szilikon
	tömítőlemez
Kiértékelés /Speciális eszköz	alsó kamra és filter – a migráló sejtek festését követő

	fénymikroszkópos számlálás
	fluoreszcens jelzés esetén fluoreszcens leolvasó;
	CO2-termosztát (5% CO2)
Kivitelezéséhez szükséges idő	inkubációs idő kb. 1–4 óra (max. 24 óra)
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvantitatív
Fő előnye/hátránya	számos párhuzamos minta, jó reprodukálhatóság, kis
	anyagigény / kiszáradás veszélye
Egyéb	-
Ref.:	52

4.4.3 Transzendoteliális migráció és áramlási assay

A leukociták felhalmozódása és az érfalon való átjutása komplex, több lépésből álló (adhézió, rolling, transmigráció) és több tényezőtől függő folyamat. In vivo a kemokinek mellett számos olyan kemotaktikusan aktív ligand is megtalálható az endotél-felszín érlumen felőli oldalán, amelyek befolyásolják a leukociták viselkedését. A filteren keresztüli migrációt, valamint a különböző géleket használó assay-k eddig ezeket a környezeti hatásokat nehezen tudták modellezni, leggyakrabban figyelmen kívül hagyták e hatások legtöbbjét. Újabban már sikerült úgy módosítani egyes assay-ket, hogy azok az in vivo állapotot lényegesen jobban megközelítik és az erek falán át történő, mindkét irányú sejtvándorlás jól modellezhető ezekkel. Ilyen módosítást jelent, amikor endotél sejtek vékony rétegével vonják be a polikarbonát filterből és nitrocellulóz filterből álló rendszereket (direkt assay) vagy egy polikarbonát filter endotéllel való bevonása után, annak sejtmentes oldalára, egy újabb polikarbonát filterre az extracelluláris mátrix (ECM) egyes elemeiből készült réteget juttatnak (reverz assay) (4.11 ábra).



4.11 ábra A transzendoteliális migráció (TEM) mérésének direkt és reverz módja.

Erre a célra a legtöbbször használt sejttípusok egyike az ún. HUVEC (Human Umblical Vein Endothelial Cells). Ezek az assay-k lehetőséget adnak arra is, hogy kombinált hatásokat vizsgáljunk, így többek között mód van az adhézió, vagy az endotél által termelt kemoattraktánsok migrációra kifejtett hatását is megfigyelni, elemezni. Természetesen egy puszta endotél sejtréteg beiktatásával a használt assay-k még mindig nem megfelelően reprezentálják az in vivo körülményeket, hiszen még számos tényezőt hagynak figyelmen kívül. Ilyen a leukocita adhézióban, illetve az endotélen való áthaladásban fontos szerepet játszó és az erek falában ható erők (ld. nyíróerő) is. Napjainkban ezt a problémát is sikerül talán csökkenteni, mivel egyes technikák már képesek olyan áramlási rendszereket létrehozni, amellyel az in vivo körülmények elég jól modellezhetők.

Ezekben a "tökéletesnek" látszó rendszerekben is felmerültek azonban bizonyos problémák. Talán a legnagyobb gond, hogy egy áramló rendszerben nagyon nehéz kontrollálni a kemoattraktáns anyagok koncentrációgradiensét, és ez alatt nem csak a szolúbilis anyagokat kell értenünk, hanem az endotél sejtekhez adszorbeálódókat is. Mindezek alapján elmondható,
hogy a ma alkalmazott áramlási assay-k ugyan új utat nyitottak az in vivo állapot mind jobb megközelítése érdekében, de ma még csupán a felszínhez kötött, haptotaktikus ligandok vizsgálatában nyújthatnak megbízható segítséget.

Gyakorlati útmutató 11	Transzendoteliális migráció (3D)
Célsejt	eukarióta (pl. neutrofil gr.c., monocita) 105–106 sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek, filter (\oslash 3–5–8 μ m), valamint
	a filter bevonására alkalmas endotél sejttenyészet
Egyéb eszköz	a vizsgálatokat leggyakrabban a célra egyedileg kialakított
	kamrákban végzik, melyekben az attraktáns mint mozgó
	fázis alkalmazható
Kiértékelés /Speciális eszköz	a kitapadó és migráló sejtek számának meghatározása az
	endotéllel bevont filter festésével és mikroszkópos kiérté-
	kelésével történik;
	CO ₂ -termosztát (5% CO ₂)
Kivitelezéséhez szükséges idő	inkubációs idő kb. 1–24 óra (célsejt-függő, leggyakoribb
	3-4 óra)
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvantitatív
Fő előnye/hátránya	a fiziológiás állapotot jól modellező rendszer /
	a klasszikus kemotaxis és a haptotaktikus hatás nehezen
	elkülöníthető
Egyéb	-
	53

4.5 Kollagén- és fibrin-géles eljárás

Számos kemotaxist vizsgáló assay gyengesége, hogy nem fiziológiás felszíneken (pl. polikarbonát) történik a sejtek kemotaxisa. Ezeknek az anyagoknak a használatakor a leukociták migrációja kétdimenziós mátrixban, míg in vivo a migráció háromdimenziós mátrix-térben valósul meg. Ezért napjainkban, a természetes környezet még jobb megközelítése és modellezése érdekében kollagénből, fibrinből vagy más ECM proteint tartalmazó komponensből készítenek géleket. A kemoattraktáns anyagot a gél egyik oldalán helyezik el vagy tetszőleges koncentrációban bele is keverhetik a gélbe. Ezután nyomon követik a sejtek migrációját az attraktáns irányába. A fehérvérsejtek szinte mindegyik típusát lehet ezzel a módszerrel vizsgálni, mely a gyakorlatban ú.n. "inváziós" technikaként is ismert és gyakori modellje gyulladás, illetve tumor metasztázis vizsgálatoknak. A sejtek gélbe jutását in vivo különböző képalkotó eljárásokkal követhetjük, de fixált mintákat is elemezhetünk, ezekben vizsgálva a sejtek számát, illetve eloszlását. Mivel a gél áttetsző így a sejtek viselkedése (mozgása, sebessége, stb.) videomikroszkóppal a kísérlet folyamán végig jól nyomon követhető (4.12 ábra), az adatok számítógéppel is rögzíthetők a későbbi alaposabb elemzés érdekében.



4.12 ábra: Limfociták a kollagén géles assay-ben. A kép közepén az éles, átlós vonal a kollagén gél határát jelenti. Jól látható, ahogy néhány sejt már behatolt a gélbe [54].

Gyakorlati útmutató 12	Kollagén-gél assay (3D)
Célsejt	eukarióta (pl. neutrofil gr.c., monocita) 105–106 sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek, filter (\oslash 3–5–8 μ m), valamint
	a filter bevonására alkalmas kollagén vagy elasztin, illetve e
	molekulák fragmensei
Egyéb eszköz	a vizsgálatokat leggyakrabban a célra kialakított ú.n.
	transwell kamrákban végzik, ennek beépített filterét fedik
	az adott ECM komponensekkel
Kiértékelés /Speciális eszköz	videomikroszkóp – a kitapadó és migráló sejtek mozgásá–

	nak meghatározására;
	inverzmikroszkóp – a fixált majd megfestett migráló sejtek
	detektálására;
	CO ₂ -termosztát
Kivitelezéséhez szükséges idő	inkubációs idő kb. 1–24 óra (célsejt-függő, leggyakoribb
	3-4 óra)
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvantitatív
Fő előnye/hátránya	a fiziológiás állapotot jól modellező rendszer
Egyéb	-
Ref.	54

4.6 Agar-lemezes assay-család

Az agar-lemezes eljárások egész családját dolgozták ki a kutatók az elmúlt évtizedek során. Bár a magyar és angol szakzsargon is gyakran "agar"–t említ a technika során alkalmazott közeg megjelölésekor, az agar valójában két galaktóz alapláncú összetett szénhidrát, a savas oldalláncokat tartalmazó agaropektin és a semleges karakterű és lényegesen egyszerűbb szerkezetű agaróz keveréke. Mivel az agaróz sokkal kevésbé lép reakcióba a kísérletek során alkalmazott molekulákkal, elsősorban proteinekkel, ezt a komponenst használják a kemotaxis assay-k során készített lemezek alapanyagaként is. Különösen fontos a fenti szempont figyelembe vétele akkor, ha az agaróz gél készítésekor, annak proteinekkel való szupplementációjára is sor kerül. Utóbbi lépés célszerű, hiszen ez hozzájárul egyenletesebb gradiensek kialakulásához megelőzve az attraktáns nem specifikus szubsztrátumokhoz történő kötődését, valamint a géllemez könnyebb kezelését is elősegíti. A gyaáltalánosan elfogadott a gelatin alkalmazása. Ugyanakkor korlatban ovalbumin, BSA vagy FCS hasonló felhasználása is lehetséges, de ezek mellett csak azok rendszerben kifejtett hatásainak előzetes elemzése után döntsünk.

A fenti megfontolások alapján készített lemezek a technikák sokszor nehezen áttekinhető kínálatát eredményezték. Az assay-k kivitelezésének egyik alapvető kérdése a minta felvitel módja, melyre szintén sok eljárást dolgoztak ki. Ezek néhány, leggyakrabban alkalmazott formáját tekintjük át az alábbiakban.

4.6.1 Kapilláris-minták futtatása agaron

Ezek közül talán a legelső volt az a technika, mely kombinációját jelenti a kapillárisos assayk-nek és az agar-lemez technikának. Ebben az esetben viszonylag nagy vagy egymástól elkülönített agar-lemezeket alkalmaznak, melyekbe eltérő koncentrációban keverik a vizsgálni kívánt attraktáns anyagot. Mint azt a 4.13 ábra is mutatja a kapillárisokba felszívott sejtek megfelelő inkubációs idő elteltével az agarba vándorolnak, migrációjuk mértéke azonban attól függ, hogy mennyire attraktáns az adott anyag vizsgált koncentrációja.



4.13 ábra A különböző attraktáns koncentrációjú agar-lemezekre kapillárisok segítségével sejteket juttatunk. A sejtek az attraktáns erősségétől függően fognak vándorolni a gélben.

A módszer használatakor, látszólagos egyszerűsége ellenére, több problémával is számolnunk kell. Egyrészt, – és ez minden agar-lemezes assay-re igaz –, felvetődik annak veszélye, hogy a vizsgált attraktánst az agar olvasztási hőmérséklete már károsan befolyásolja, másrészt nem zárható ki annak veszélye sem, hogy az agar kölcsönhatásba lépve a molekulával azt semlegesítheti. Természetesen, mind a két fenti probléma kivédhető megfelelő számú, jól beállított kontrollal. Egy másik típusú gondot jelent a kiértékelés, melyre hosszú ideig csak igen szubjektív módszerek álltak rendelkezésre. Az első kvantitatív kiértékelést a nagyon pontatlan planimetriás eljárások jelentették – és sajnos sok esetben jelentik még ma is –, bár egyes szerzők már komputeres, morfometriai kiértékelési technikákat is leírtak.

Gyakorlati útmutató 13	Kapilláris-agar technika (2D)
Célsejt	prokarióta, eukarióta (pl. neutrofil gr.c., monocita) 105–106
	sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek, agar
Egyéb eszköz	kapilláris
Kiértékelés /Speciális eszköz	Planimetriás úton vagy komputeres morfometriával
	CO2-termosztát
Kivitelezéséhez szükséges idő	inkubációs idő kb. 1–4 óra
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvalitatív
Fő előnye/hátránya	gyorsan kivitelezhető / az agar és vizsgálni kívánt anyag
	interakciója nem mindig zárható ki
Egyéb	-
Ref.	

4.6.2 Több furatos agarlemezes módszerek

E klasszikus agar-lemezes assay-k esetében szilárd, sejtek számára átjárhatatlan agaróz géllel kitöltött üveg, vagy műanyag edényt használnak. A legegyszerűbb kísérleti elrendezés esetében egymástól megadott távolságra két furatot készítünk. Egyikbe a vizsgálni kívánt anyag, másikba a kísérlet során alkalmazott sejtek kerülnek (4.14 ábra). Mivel az anyag diffúzióval terjed a gélben, ez időben állandó koncentrációgradienst biztosít a kísérlet folyamán. Ez a diffúzió függ a használt anyag molekuláinak tulajdonságaitól, valamint az időtől. A sejtek a kemoattraktáns stimulusra az agaróz gélben (vagy az alatt) vándorolni kezdenek a kemoattraktáns anyag felé. A sejteket az inkubációs idő letelte után fixálni lehet, majd az agar-lemezben (vagy annak eltávolítása után) megvizsgálható a sejtek eloszlása. A bemélyedések távolsága, a sejtek száma és az idő azok a legfontosabb változók, amelyek az eredményt befolyásolják.



© Kohidai, L. 2006.

4.14 ábra Agar-lemezes assay – Az attraktáns jellegű anyag (zöld) vonzó hatása a vizsgált sejtek (narancs) vándorlására.

A legegyszerűbbnek tekinthető fenti eljárás továbbfejlesztése eredményezte a három-furatos elrendezést, illetve ezek kombinációinak kialakítását. Ezek, mint a 4.15 ábra is mutatja lehetőséget adnak párhuzamos kísérletek végzésére, illetve összehasonlító vizsgálatokra is egyazon agaróz-lemezen belül.



4.15 ábra Többfuratos agaróz lemez és a kiértékelés fő irányelvei

Ezeknél az elrendezéseknél a felhelyezett sejteknek módjuk van a kialakult koncentráció gradiensnek megfelelően az agaróz rétegben vagy az alatt migrálni. A sejttömeg elmozdulása, illetve a sejttömeg frontjának határvonala szabad szemmel vagy mikroszkóppal jól látható és a középső, sejteket tartalmazó furattól való távolságok mérésével numerikusan is jellemezhető.

Az agar-lemezes assay-k alkalmazása relatíve egyszerű, könnyen megvalósítható, nem igényel speciális berendezést, kis sejtszám, és kevés mennyiségű anyag rendelkezésre állásakor is elvégezhető. Hasonlóan a sokcsatornás rendszerekhez az eredményt csak egy bizonyos időpillanatban lehet leolvasni, a folyamat közben nem meghatározható. Hadjout és mtsai. azonban kifejlesztettek egy olyan, elektromos impedancián alapuló technológiát, mely segítségével a kísérlet egész ideje alatt nyomon követhető a sejtek mozgása.

A fent leírt módszer kissé bonyolultabb formája, amikor az agar-lemezbe egy vonal mentén három (egyenként kb. 2,5-3 mm átmérőjű) bemélyedést/furatot készítenek. A vizsgálandó sejtek a középső, míg a vizsgálandó anyag az egyik szélső bemélyedésbe kerül. A harmadik bemélyedésbe a kontroll anyagot helyezzük el.

Gyakorlati útmutató 14	Agarlemez assay (2D)
Célsejt	prokarióta, eukarióta (pl. protozoon, neutrofil gr.c.,
	monocita) 104–10 ⁵ sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek, agar
Egyéb eszköz	autoklávban sterilizált Petri-csésze
Kiértékelés /Speciális eszköz	planimetriás úton vagy komputeres morfometriával
	CO2-termosztát
Kivitelezéséhez szükséges idő	inkubációs idő kb. 1–4 óra
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvalitatív
Fő előnye/hátránya	gyorsan kivitelezhető / az agar és vizsgálni kívánt anyag
	interakciója nem mindig zárható ki; az egyes anyagok dif-
	fúziójának sebessége eltérő
Egyéb	-
Ref.	55

4.6.3 Agar-csatorna és agar-furat módszer (Double-P assay)

Ez a technika a fentiekben már ismertetett többfuratos módszerek továbbfejlesztéséből jött létre. Amint a 4.16 ábra mutatja a furatok elhelyezésével és feltöltésével ebben az esetben nem elégszünk meg, hanem azok között párhuzamosan futó csatornákat vágunk erre a célra kialakított speciális vágóeszközzel. Jelen módszerben tehát a viszonylag kemény, a sejtek számára átjárhatatlan agar, csupán alakítható környezetet jelent és nem vivő-, illetve elmozdulást lehetővé tevő anyagot. A sejtek elmozdulni a párhuzamos csatornák összekapcsolása után tudnak, amikor a kialakuló koncentrációgradienst érzékelve egészen az attraktáns anyagot tartó furatig is eljuthatnak, de ettől távolabb is akkumulálódhatnak, amennyiben az optimális koncentráció ennél alacsonyabb.

A módszer előnye, hogy lehetőséget ad számos anyag egyidejű vizsgálata révén annak tisztázására, melyiket is preferálják a sejtek. Az is mérhető e "multichannel" módszerrel, hogy több eltérő sejtpopuláció közül melyik milyen mértékben viszonyul ugyanazon migrációt kiváltó anyaghoz.

A módszer fenti előnyei mellett hátránya, hogy a fixálószer bejuttatásakor igen gondosan kell ügyelni arra, nehogy annak áramlata meghamisítsa az eredményt.



4.16 ábra Többcsatornás agar-lemezes assay. Egy Petri-csészébe kiöntött agar gélbe két vagy több lyukat vágnak. A lyukak között vágási felszíneket hoznak létre, a

sejtek gyorsabb haladása érdekében. Lehetővé teszi a sejtek különböző attraktánsok iránti érzékenységének szinkron meghatározását is.

Gyakorlati útmutató 14	Double-P assay (2D)
Célsejt	prokarióta, eukarióta protozoon 104–105 sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek, agar
Egyéb eszköz	autoklávban sterilizált Petri-csésze; vágó-sablon – több-
	csatornás mintázatok esetében
Kiértékelés /Speciális eszköz	Fénymikroszkóp, fixálást követően a célkonténerekben
	összegyűlt sejtek számlálása
	CO2-termosztát
Kivitelezéséhez szükséges idő	inkubációs idő kb. 30 min. – 2 óra
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvalitatív
Fő előnye/hátránya	gyorsan kivitelezhető, összehasonlító vizsgálatok végezhe-
	tők ugyanazon lemezen / a fixáló anyag felhelyezése kö-
	rültekintést igényel
Egyéb	-
Ref.	56

Meg kell jegyeznünk, hogy az agar-lemezes assay-k terén a kemotaxis mérésénél egyébként is megszokott sokszínűség és nagy technikai variabilitás még tovább fokozódik, vélhetően azok könnyen előállítható volta miatt.

Így különböző más assay-kkel történő kombinálására is több példát találhatunk. Ilyen a Dvorak-Stotler kamra is (4.17 ábra), mely teflon gyűrűkkel ellátott fedőlemezek között helyez el agarba vágott csatornákat, amelyeket a kamra összeállítását követően töltünk fel a vizsgálandó sejtekkel [57]. A példánkban említett kamra – több más modellhez hasonlóan –, viszonylag jó kezelhetősége és a csíramentes állapot viszonylag hosszú időn keresztüli biztosítása mellett, átfolyó rendszerek beállítását is lehetővé teszi és különböző mikroszkópos technikával (fáziskontraszt, Nomarski stb.) is jól kiértékelhető.

Sejtek agar környezetben



4.17 ábra A Dvorak–Stotler kamra felépítésének egyszerűsített modellje.

4.6.4 Agar-gátas eljárás

A gyakorlat az agar-lemezek alkalmazását éppen a fentiekben már említett problémák miatt igyekezett minimalizálni és megtartva annak gradiens kialakításban betöltött előnyös szerepét alkalmazta a sejtek számára viszonylag könnyen átjárható anyagot. Ilyen technika a 4.18 ábrán vázolt agar-gátas eljárás is, melyben egy műanyag vagy üveglemezben kialakított két, viszonylag nagy folyadéktároló egységet összekötő fal legfelső sávjának fedésére alkalmazzuk az agar-réteget. Az egyik tároló térbe sejteket, a másikba pedig a vizsgálandó anyagot helyezünk. A diffúzióval átjutó anyag hatására a sejtek az agar rétegen aktív mozgással fúrják át magukat és jutnak át az attraktánst tartalmazó térbe. Az assay kiértékelése az "agar-gát" szélességének, illetve az inkubációs idő hosszának függvényében eltérő: széles gátak esetében szerencsésebb a gátban található sejtek számát vizsgálni viszonylag rövid inkubációt követően, míg keskeny gát esetében az átjutott sejtek számának meghatározása ad jobb eredményt.



4.18 ábra Az agar gátas eljárás. Lényege, hogy egy lemezben két bemélyedést egymástól egy agarból álló gát választ el. Az egyik bemélyedésben az attraktáns oldata, a másikban a sejtek helyezkednek el. A sejtek az attraktáns hatására átvándorolnak a gáton. A kiértékelés mikroszkóppal történik.

Gyakorlati útmutató 15	Agar-gát módszer (2D)
Célsejt	eukarióta protozoon 104–105 sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek, agar
Egyéb eszköz	autoklávban sterilizált két-medencés lemez
Kiértékelés /Speciális eszköz	fénymikroszkóp, sejtszámlálás az agar-gátban vagy fixá-
	lást követően a célkonténerben
	CO ₂ -termosztát
Kivitelezéséhez szükséges idő	inkubációs idő kb. 30 min. – 2 óra
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	Kvalitatív > kvantitatív
Fő előnye/hátránya	gyorsan kivitelezhető / a fedőlemez agar-gátra helyezése-
	kor gyakori a buborékképződés
Egyéb	-
Ref.	58

4.6.5 Agar-csepp assay

Az eljárás a fentiekben leírt agar-alapú módszerek egyes tulajdonságait kombinálva alakít ki sok párhuzamos csoport vizsgálatára alkalmas technikát. Alapja az, hogy 12 vagy 24 lyukú szövettenyésztésnél használt lemezek üregeinek középső részére helyez el 1-1 csepp 0.2% agarózban elkevert sejtet, majd a csepp megszilárdulása után a környező felszíneket ECM peptidekkel, illetve BSA-val fedi (4.19 ábra) [59].



4.19 ábra Agaróz-csepp assay kivitelezésének főbb lépései.

A következő lépésben a sejtek kemotaktikus aktivitását befolyásoló anyag felvitele, illetve az avval való inkubáció következik. A kísérletet a központi csepp körüli régióba migrált sejtek fixálásával, majd festésével fejezzük be. A kiértékelés mind kvalitatív (ld. szabad szemmel történő mikroszkópos), mind kvantitatív (számítógépes analízis) eljárásokkal kivitelezhető.

A módszer kétségtelen előnye a viszonylag gyorsan preparálható, sok párhuzamos minta. Evvel szemben fel kell hívnunk a figyelmet arra, hogy a kísérletezőnek nagy körültekintéssel kell lennie az agarózba kevert sejtek viabilitását tekintve (ld. validáló kísérletek során az elpusztult sejtek számának toluidin kékkel való meghatározása), és a sejteket tartalmazó csepp műanyag felszínhez való kitapadásának ellenőrzésekor (különböző gyártók lemezeinek eltéréseit szemléltető adatokat ld. a Függelék fejezetet.)

4.7 Matrigel technika

Az agaróz alapú technikákhoz sokban hasonlít az 1980-as évek közepe táján bevezetett és többek között a *BD Biosciences* által forgalmazott anyag, mely az előző fejezetben tárgyaltnál lényegesen jobban modellezi a magasabb rendűek szöveti környezetét, s így egyes migráció vizsgálatokra is sokkal megfelelőbbnek bizonyult [60, 61, 62]. A gél alapanyaga egér Engelbreth-Holm-Swarm szarkómából izolált s extracelluláris matrix fehérjékben gazdag. A fő komponensei a laminin, IV-es típusú kollagén, entaktin, heparinszulfát és proteoglikán. Fentiek mellett több enzim (pl. kollagenáz) és más a migráció szempontjából is fontos szabályozó funkciót betöltő molekula (pl. plazminogén aktivátor), valamint számos, növekedési faktor (4.1 táblázat) található meg a keverékben a biológiai hatás elérése szempontjából számottevő koncentrációban.

Növekedési faktor	Koncentráció Matrigel-ben	Koncentráció GFR Matrigel-ben
EGF	0.5-1.3 ng/ml	< 0.5 ng/ml
bFGF	< 0.1-0.2 pg/ml	n.d.
NGF	< 0.2 ng/ml	< 0.2 ng/ml
PDGF	5-48 pg/ml	< 5 pg/ml
IGF-1	11-24 ng/ml	5 ng/ml
TGF-β	1.7-4.7 ng/ml	1.7 ng/ml
GFR – növekedési faktor szint csökkentett; n.d. – nem detektálható		

4.1 táblázat A Matrigel-ben található növekedési faktorok hozzávetőleges koncentrációja (BD Bioscience – Matrigel) A fentiekben már felsorolt extracelluláris matrix komponensek közül a laminin és a kollagén tekinthető a Matrigel domináns összetevőjének s ezek aránya a speciális célokra készített, növekedési faktorokat csak csökkentett mennyiségben tartalmazó Matrigel-ben sem változik lényegesen (4.2 táblázat).

Bazális membrán fehérje	Matrigel matrixban [%]	GFR Matrigel-ben [%]
laminin	56%	61%
kollagén IV	31%	30%
entaktin	8%	7%
GFR – növekedési faktor szint csökkentett		

4.2 táblázat Bazális membrán fehérjéinek aránya Matrigel-ben (BD Bioscience -Matrigel).

Az összetételében a bazális membránt modellező Matrigel számos kísérlet vivőközegéül szolgálhat. Membránok bevonásával ú.n. kétdimenziós rend– szerekben segíthet ahhoz, hogy a vizsgált sejtek migrációs aktivitását az in vivo környezethez közeli állapotban elemezzük. Ebben a dimenzióban alkal– mazzák endotél monolayereken az angiogenezis kezdeti fázisának tanulmá– nyozásában is, jól vizsgálhatók benne a kialakuló kapillárisok és azok háló– zatai. Nagyobb rétegvastagságokat alkalmazva már a háromdimenziós vizs– gálatok egyik leggyakrabban alkalmazott alapanyaga a Matrigel, melyben egyaránt jól vizsgálható az angiogenezis folyamata (ld. endotél migrációja, érképzés stb.), valamint tumorsejtek inváziója is. Az eddig felsorolt felhasználási lehetőségek komoly gátját jelenti, hogy a fejezet elején felsorolt összetevők mellett számos nem definiált komponens is található a Matrigel-ben. Ez a bizonytalansági tényező szab mind a mai napig határt az ezen az anyagon végezhető vizsgálatoknak több területen (pl.

gyógyszer-fejlesztés) is.

Gyakorlati útmutató 16	Matrigel technika (3D)
Célsejt	amőboid mozgást végző sejtek (endotél, fibroblaszt, neu-
	ron, tumoros sejtek)
Anyagigény	Matrigel, vizsgálandó anyag, pufferek
Egyéb eszköz	Petri-csésze
Kiértékelés / Speciális eszköz	fénymikroszkóp
Kivitelezéséhez szükséges idő	sejt-típustól függően 3–5 nap – 2 hét
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvalitatív > kvantitatív
Fő előnye/hátránya	szöveti környezetet jól modellezi
Egyéb	különös óvatossággal kell eljárni a gél készítésénél (ld. idő
	előtti polimerizáció elkerülése) és a sejtek gélbe keverése-
	kor
Ref.	62

A Matrigel technika már lehetőséget nyújt a migráló sejtek és nagyobb sejt populációk vizsgálatára kísérleti állatban is. A korábban említett technikai és elméleti limitáló tényezők (ld. a hőmérsékletre érzékeny szilárdulás, illetve a készítmény gyártásisorozat-függő, növekedési faktorbeli eltérései) ellenére, gyakran alkalmazott technika különösen az erek képződését, illetve újraképződését vizsgáló *in vivo* kísérletek során.

4.7.1 Aorta-gyűrű technika

A címben jelzett eljárás még csak átmenetet jelent az in vivo és in vitro kísérletek között [63]. Lényege az, hogy kísérleti állat nagyartériájából, legcélszerűbben az aortájából készítünk szeleteket, melyeket fiziológiás só oldatban történő mosást követően az aljukon 200 μl Matrigel-lel vagy más extracellulársi matrix komponenseket tartalmazó anyaggal bélelt, 24–48 lyukú szövettenyésztő lemezek aljára helyezzük. Ezt követően, 30 perc várakozási idő után az érdarabokat 100–100 µl Matrigel–lel fedjük. Egy ismételt 30 perces várakozás után a gélek megszilárdulásával kialakul a kívánt rendszer, melyet kb. 500 µl RPMI és 50 µl FBS hozzáadásával teszünk a sejtek növekedése szempontjából optimális összetételűvé. A kísérlet kontrolljaként FBS mentes minták beállítása is ajánlott (4.20 ábra).



4.20 ábra Aorta gyűrű technika kivitelezésének főbb lépései.

Ezt követően a tenyészetet 37 °C-on tartjuk, az RPMI tenyésztő médiumot naponta cseréljük. A kísérlet kiértékelése a 4.-6. (-14.) napon történik. Ekkor az aorta gyűrűből kivándorló endotél és egyéb sejtes elemek mennyisége, illetve az azokból kialakuló, az angiogenezis mértékére utaló tubuláris elemek számának és hosszának a meghatározása a leggyakoribb, melyre egyszerű fénymikroszkópos technikák mellett egyre gyakrabban alkalmaznak komputerasszisztált morfometriai eljárásokat.

Az elmúlt évek során e technika egy módosított változatával sikerült a jelentős (4–14 napos) vizsgálati időtartamot lecsökkenteni [64]. A módostítás 12– 14 napos csirke embriók aortaívéből készített szeleteket alkalmaz. Így a Matrigel-re helyezett mintákban már kb. 48 óra múlva érszerű struktúrák kifejlődése észlelhető. Tovább gyorsítható a technika az gyűrűk kifordításával, ekkor már kb. 24 óra múlva megjelennek az angiogenezisre utaló tubuláris elemek.

4.7.2 Matrigel-plug technika

Ezek között is talán a leggyakrabban alkalmazott az ú.n. Matrigel plug módszer (4.21 ábra), melyben a kísérleti állat bőre alá injektálunk kis mennyiségű (kb. 0.2–0.5 ml) Matrigelt, illetve abban elkevert vizsgálandó anyagot (pl. érképződést elősegítő vagy gátló gyógyszerek) [65]. Igen gyakori az angiogenezist elősegítő 0.1–1 µg/ml bFGF hozzáadása a gélhez. A kísérlet tartama kb. (5)–10–14 nap, mely végeztével a polimerizálódott géldarabkát szöveti környezetével egyetemben távolítjuk el az állat testéből. A kiértékelés eszköztára nagyon széles, a legalapvetőbb szövettani technikák felhasználá– sától a számítógépes analízisig terjed.

A vizsgálatok során jól elemzhető a Matrigel-ben bejuttatott és onnan fokozatosan felszabaduló anyagok angiogenezisre gyakorolt hatása éppúny, mint a kísérleti állatok egyéb kezeléseinek érképződést befolyásoló jellege.

121



4.21 ábra A Matrigel-plug technika főbb lépései.

4.7.3 Matrigel-kapszula technika

Szintén a Matrigel-t felhasználó módszer, amikor az előzőekben ismertetethez képest jobban körülhatárolt térben, egy szövetbarát és allergiás reakciókat ki nem váltó anyagból készült gyűrűvel határolt térben helyezik el a Matrigel-ben elkevert anyagokat [66]. A módszer leírói a gyűrű két oldalát eltérő vastagságú nylon filterrel fedik. Ez egyrészt módot ad az anyagok szabad kiáramlására a kapszulából, azonban a sejtek bevándorlását csupán a vékonyabb oldal felől teszi lehetővé (4.22 ábra).

A kapszulák behelyezésére azok fertőtlenítése után kerül sor, rendszerint a kísérleti állat testének oldalán ejtett metszést követően. A subcutan elhelyezett kapszula 5–10 napig marad a testben, majd eltávolítják. A kialakult és főleg az angiogenezisre utaló új képletek kiértékelése az előző részben leírt módszerek segítségével történik.



4.22 ábra Matrigel-kapszula szerkezete és a technika főbb lépései.

4.8 Video-analízis

Ennek a módszernek egy régebbi formája az ú.n. time-lapse cinematography, amelyet 1930-as években vezettek be. Ebben az assay-ben még csak mikroszkópon keresztül vizsgálták a sejtek mozgását, morfológiáját. Ez volt a polarizációs assay-k alapja is.

A módszer jelentőségét az adja, hogy szemben az eddig felsorolt vizsgálati eljárások döntő hányadával, melyek a kezdeti és végállapotok összehasonlítása alapján kapnak eredményt a migrációról, itt egyedi sejtek mozgására jellemző folyamatok elemezhetők lépésről–lépésre. Pontosan e fentiekben jelzett individuális analízis tette lehetővé az egyes mozgástípusok esetében azok alaposabb megismerését, és egyes mozgáselemek dominanciájának kimutatása révén a környezetben lévő attraktáns, illetve repellens anyagok jelenléte jól kiértékelhetővé vált. A kiértékelések során alkalmazott és egyre fejlettebb számítógépes eljárások esetében, a vizsgálatok egyedi jellege miatt nehéz olyan példát említeni, mely általánosan elfogadott lenne, hiszen szinte minden laboratórium a saját speciális szempontjait kielégítő programokat alkalmaz. Említésre érdemes mégis a bevezető fejezetben már említett és az NIH által kidolgozott *Image J* program, melyet a folyamatos fejlesztés és az egyes segédprogramok szinte havonta bővülő száma tesz alkalmassá arra, hogy ezen a téren kezdeti kiértékeléseiket végzők alkalmazzák. A 4.23 ábra egy kemotaxis vizsgálatára alkalmas videoberendezés általános vázlatát mutatja, feltüntetve a rendszer főbb elemeit.



© Kohidai, L. 2006.



4.9 Orientációs assay

A fent említett assay-k visszatérő problémája, hogy nem vagyunk képesek pontosan ellenőrizni a kemotaktikus ligandok eloszlását a térben. A következő két assay módot ad arra, hogy a koncentrációgradiens stabilitása a vizsgálat időtartama alatt állandó legyen.

4.9.1 Zigmond kamra

A kamrát 1977-ben írta le Sally Zigmond [67]. Alapjául az a tény szolgál, hogy a granulociták különböző kemotaktikus anyagok hatására, a migráció első lépéseként, morfológiájuk megváltoztatásával válaszolnak.

A rendszer két tárgylemezből áll, amelyek üvegből, vagy műanyagból készülnek. Az egyik lemez két bemélyedést tartalmaz és ezek egymástól egy 1mm széles gáttal vannak elválasztva (4.24 ábra). Az egyik bemélyedésbe a kontroll oldat, míg a másikba a vizsgálandó anyag oldata kerül. A leukociták a másik lemezen adhézióval tapadnak Ezt a lemezt a sejtes felszínnel lefelé fordítva helyezzük rá a vizsgálandó anyagokkal telt lemez tetejére. A két tartályt elválasztó rész magasságának pontos kialakítása révén egy vékony (kb. folyadék híd alakul két bemélyedés 20µm) ki а között. Α koncentrációgradiens ezen a hídon keresztül jön létre. Mivel ennek a hídnak a térfogata nagyon kicsi egy állandó stabil gradiens alakul ki. A sejteket fázis-kontraszt mikroszkóppal vizsgálhatjuk, vagy felvételt is készíthetünk mozgásukról. Zigmond fluoreszkáló anyag segítségével 15 percig hozzávetőlegesen lineáris gradiens emelkedést tudott kimutatni ebben a rendszerben, ami a gradiens kialakulása után kb. 90 percig állandó maradt.

125

Később az attraktáns anyag hídon át történő diffúzióját egyenlettel is leírták, a gyakorlatban azonban ez az állandó gradiens mégsem bizonyult megbízhatónak, mivel a rendszer nyitottsága, az áramlás, és a kialakuló turbulenciák annak kialakulása, illetve fennmaradása ellen hatnak.





4.24 ábra A Zigmond kamra és a feltöltést követően, a sejtek kemotaxisát mutató vázlatos kép. A koncentrációgradiens a híd és a fedőlemez közötti 20 μm–es résben alakul ki.

Gyakorlati útmutató 17	Zigmond kamra (2D)
Célsejt	prokarióta, eukarióta (neutrofil gr.c., monocita) 104–105
	sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek
Egyéb eszköz	autoklávban sterilizált Zigmond kamra, fedőlemez
Kiértékelés /Speciális eszköz	fénymikroszkóp
	CO2-termosztát
Kivitelezéséhez szükséges idő	inkubációs idő 15–30 min.
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvalitatív < kvantitatív

Fő előnye/hátránya	gyorsan kivitelezhető, állandó gradiens / -
Egyéb	-
Ref.	67

4.9.2 Dunn-kamra

A kamra kidolgozói a Zigmond kamrát vették alapul. Itt azonban már egy zárt rendszert készítettek, amely mind elméletileg, mind gyakorlatilag lehetővé teszi az állandó gradiens kialakulását. Ez a rendszer üveglemezbe ágyazottan két koncentrikus bemélyedésből áll, a kettő között pedig egy kör alakú gát helyezkedik el (4.26 ábra). A belső bemélyedésbe a kontroll oldat, a külsőbe pedig a vizsgálandó anyag oldata kerül. A leukociták itt is egy a kamrákat tartalmazó lemezre helyezett fedőlemezhez tapadnak, s migrációjuk egy zárt rendszer felszínéhez kötötten történik. A vizsgálat kezdeti szakaszában a sejtek a növekvő koncentráció gradiens irányába polarizálódnak (4.25 ábra), kellő inkubációs idő elteltével migrációjuk is megfigyelhető.



4.25 ábra Humán neutrofil granulociták attraktáns felé (jobboldal) történő polarizálódása Zigmond kamrában [68].

A sejteket itt is videomikroszkóppal tudjuk vizsgálni. A módszer kidolgozói, Zicha és Dunn a gradiens kialakulását, illetve annak fennállását is vizsgálták a rendszerben: erős összefüggést találtak az elméletileg elvárt és a gyakorlatban tapasztalt eredmények között. Állandó lineáris gradiens volt mérhető a rendszer összeállításától számított 10–30 perc múlva (a vizsgált anyag molekula nagyságától függően), s ez órákig fennállt. (Egy 10–20 kDa molekulasúlyú anyag esetében a gradiens féléletideje kb. 30 órának bizonyult, míg egy kis molekulasúlyú <2kDa anyag esetében a kb.10 órát is elérte.) [69]. Mindent egybevetve a Dunn rendszert tekinthetjük a legközelebb állónak a fejezet bevezetésében említett Harris-féle kritériumokhoz. Segítségével könnyen elkülöníthető a kemotaxis és kemokinezis is.

Hátránya azonban e módszernek is van, ugyanis nem alkalmas minden leukocita típus vizsgálatára. Ezenkívül a kiértékeléshez optimális esetben egy számítógéphez csatlakoztatott mikroszkópra is szükség van, és ez még ma sem áll minden laboratóriumban rendelkezésre.





© Kohidai, L. 2006.

4.26 ábra A Dunn kamra képe. A két cirkuláris bemélyedés közti híd és a fedőlemez közti résben jön létre a gradiens.

Gyakorlati útmutató 18	Dunn kamra (2D)
Célsejt	prokarióta, eukarióta (neutrofil gr.c., monocita) 104–105
	sejt/ml
Anyagigény	vizsgálandó anyag, pufferek,
Egyéb eszköz	autoklávban sterilizált Dunn kamra, fedőlemez
Kiértékelés /Speciális eszköz	fénymikroszkóp, videomikroszkóp, számítógépes mozgás-
	analízis;
	CO ₂ -termosztát
Kivitelezéséhez szükséges idő	inkubációs idő 30 min – 30 óra
Kvalitatív / kvalitatív jelleg	kvalitatív < kvantitatív
Fő előnye/hátránya	gyorsan kivitelezhető, 10 órán túl fennálló, állandó gradi-
	ens / –
Egyéb	-
Ref.	69

4.9.3 Sebgyógyulás (wound healing) technika

A kemotaxis vizsgálatok egy speciális ágát jelenti a sebgyógyulás számos migrációra képes szöveti elemének vizsgálatára alkalmazott módszer (4.27 ábra A része). A leggyakrabban epiteliális sejtek kemotaxisának indukciója mérhető evvel az egyszerűségében is igen jól használható eljárással, melynek alapja különböző ECM peptidekkel fedett felszínek sejtekkel történő monolayer fedése. E monolayer rétegen alakít ki a vizsgáló egy a célra kialakított eszközzel "sebzést", mely nem más, mint a sejtek egy jól elemezhető sávban történő eltávolítása a lemezről. Az ezt követő inkubációs időszak folyamán a kialakított sebzési felszínek felől megindul a sejtek lassú migrációja, míg végül bekövetkezik a sejtmentes régió befedése, tehát a mesterséges körülmények közötti sebgyógyulás. Ez folyamat több tényezőtől függ, így hatással van rá a sejtek osztódásának foka és attól függően, hogy milyen a sejtek motilitása, illetve milyen ezen alap-motilitást befolyásoló külső indukáló hatások érik a sejtet, más-más dinamikával történik meg a felszín fedése.

Mint az a 4.27 ábra B és C részén jól látható egy viszonylag egyszerű eszköz (ú.n. floating in replicator) használatával jól standardizálható a sejtes felszíneken ejtett nyílások nagysága. Így a minták jobban összehasonlíthatók, objektívebb elemzésükre is mód van. Az eredmények kiértékelésére alkalmazható technikák igen széles skálán mozognak. A sebzési felszínek közötti távolság csökkenésének egyszerű mérését a marginális sejtek immuncitokémiai detektálásával, illetve time-lapse mikroszkópia alkalmazásával kombinálva igen jó, objektív vizsgáló eljárások alakíthatók ki.

130



4.27 ábra Sebgyógyulás assay alkalmazása sejtek migrációjának vizsgálatában. A – a módszer elméleti alapja; B – egységes sebzést kialakító ú.n. floating pin replicator vázlatos rajza; C – a bemutatott eszközzel készített sebzési felszínek mikroszkópos képe [70].

4.10 Alakváltoztatás assay

Ezt az assay-t is főként fehérvérsejteknél használják. A nem mozgó fehérvérsejtek gömb alakúak, azonban ha különböző anyagok kerülnek a környezetükbe, aktiválódhatnak és alakváltozáson mennek keresztül (4.28 ábra). Ez a morfológiai változás az anyag megjelenése után pár másodperc múlva már megkezdődik és néhány perc alatt teljesen végbemegy. A sejtek jellegzetes alakot vesznek fel, frontális (feji) és elmaradó (farki) régióra különülnek el. A feji, aktinban dús régió, halad a mozgás irányába, míg a farki régió tartalmazza a sejttestet. A módszer az adhéziótól teljesen független.



4.28 ábra Attraktáns hiányában a neutrofil granulociták gömb alakúak (baloldal), míg attraktáns jelenlétében polarizálódnak (jobboldal) [71].

Lényegében e kategóriába sorolható az az eljárás is, amelyben neutrális anyaggal töltött kapillárisokat használunk fehérvérsejtek polarizálódásának vizsgálatakor. A kapillárisok szabad végéhez precíziós pumpát csatlakoztatva a vizsgálni kívánt sejtek károsodás nélkül rögzíthetők a másik véghez, majd a vizsgálni kívánt anyaggal inkubálhatók. Kemoattraktáns anyagok hatására a sejtek szabad felszínén pszeudopódiumok megjelenése, illetve azok számának szignifikáns fokozódása figyelhető meg a mikroszkópos, illetve videomikroszkópos értékelések alkalmával (4.29 ábra).



4.29 ábra Állábképződés és annak gátlása kapilláris-technika segítségével [72].

4.11 Lab-on-chip technikák és a kemotaxis mérése

A kemotaxis mérés során eddig megismert technikák között több szempontból is áttörést jelentettek az 1990-es évek vége felé egyre nagyobb számban megjelenő új, ú.n. "lab-on-chip" technikát megvalósító eljárások. Jelentőségüket növelte a jól reprodukálható és ugyanakkor nanométeres kiterjedésű kamra kivitelezését biztosító technika, a fotolitográfia, majd a "soft litográfia", illetve nagy precizitású laser sugarak alkalmazása is. E módszerek lehetővé teszik, hogy előre meghatározott, néha igen bonyolult mintázatokat vigyünk fel sík felszínekre, igen kis rétegvastagságban. A lépéssor, melynek leegyszerűsített menetét a 4.30 ábra mutatja két fő szakaszból áll: az első szakaszban a fentiekben említett mintázat felvitele történik, majd e negatív minta felszínének befedése következik gyorsan polimerizálódó és szilárduló anyaggal ("soft" litográfia esetében polidimetilsziloxán – PDMS-nal).



4.30 ábra Soft litográfia fő lépései "Lab-on-chip" eszköz készítéséhez.

4.11.1 Gradiensek kialakítása lab-on-chip kamrákban

Az új eljárások szinte végtelen teret nyitottak az addig csak képzeletben létező és sokszor technikai akadályok miatt nem vagy csak igen rossz minőségben kivitelezett kamrák és kamrasorok kifejlesztésében. Nemzetközi szinten talán a legtöbb, legszerteágazóbb és eredeti ötlettel előálló laboratórium a Folch Laboratory (USA, Univ. of Washington), jelen fejezet gerincét is e laboratórium kutatási eredményei szolgáltatták [73–76]. A fotolitográfia adta lehetőségeket felhasználva a gyakran µm-es vastagságú rétegek felvitelével olyan eltérő vastagságú sablonok előállítása vált lehetővé, melyek eltérő mintázatuk révén a kemotaxis vizsgálatok számos új változatát jelentették. Ilyen a 4.31 ábrán látható eljárás is, mely egy, az agar-lemezeknél már említett, párhuzamosan futó csatornakiképzéshez hasonló rendszert alkot, melyben egyszerre két anyag hatása elemezhető a középen felvitt sejtes minta elmozdulásának mérésével.



© Kohidai, L. 2006.

4.31 ábra Két–csatornás PDMS rendszer elkészítésének lépései és annak használata két eltérő anyag gradiensének vizsgálatakor.

Fentiek felhasználásával a kemotaxis assay-k két fontos kérdése lett lényegesen pontosabban szabályozható: (i) maguk a koncentráció gradiensek és ellenőrizhetőségük; (ii) a vizsgálatok indítása és leállítása. (Nem beszélve az egyetlen lemezen felvihető és párhuzamosan mérhető kísérletek számának növekedéséről.)

A kemotaxis mérések szempontjából nagyon fontos *koncentráció gradiensek* kialakítására igen ötletes, az oldószer és a higítandó anyag jól kiszámítható keveredését biztosító szisztémák hozhatók létre. Egy ilyen szisztémát mutat a 4.32 ábra is, melyen a festett anyagok (sárga=Y és kék=B) keveredése kö-vetkeztében kialakuló szín, illetve intenzitás változás jól mutatja a rendszer működési elvét.



4.32 ábra Az ún. kombinatorikus titrálás elvén alapuló berendezés, műanyag lemezen laser segítségével kialakított keverő, mely az egyes folyadékáramlatok többszöri forgatásával, a rendszer kidolgozói által szerpentin mixernek nevezett csatornában hozza létre a kívánt titrálási fokozatot.

A kemotaxis assay-k biztos indítását és leállítását teszik lehetővé azok az eljárások, melyek a "soft" litográfia felhasználásával és szelepek működtetése révén teremtik meg a kapcsolatot a sejteket tartalmazó minta és a kemoattraktáns betöltésére szolgáló üregrendszer között. Ebben az esetben a mikropneumatikus rendszereken keresztül működtetett szelepek nyitása esetén, jól szabályozható a gradiens kialakulásának dinamizmusa, illetve az inkubációs idő leteltével a vizsgálat nagy biztonsággal leállítható (4.33 ábra).



4.33 ábra Mikropneumatikus rendszer által működtetett szelepek felhasználása gradiens kialkítására.

A chip technológia egy további lehetősége olyan mikrométeres átmérőjű lyukak elhelyezése a PDMS lemezeken, melyek a megszokott kétkamrás, filterrel elválasztott assay-k mintájára működnek, ugyanakkor lehetővé teszik az egyes lyukak környezetébe összegyűlő sejtek, illetve az átvándorló sejtek egyedi vizsgálatát fénymikroszkóppal (4.34 ábra). E technika továbbfejlesztésével olyan rendszereket is kidolgoztak, melyekben a két kamra közötti tér töltéseloszlását változtatva lehet a gradiens kialakulását szabályozni. Ez utóbbi esetben persze már az előnyös oldal mellett, felmerül a technika gyengéje is, hiszen az ilyen módon kialakított elektromos terek a szakirodalom által már bizonyítottan képesek befolyásolni az intracelluláris aktin polimerizáció polaritását, valamint az amőboid mozgáshoz elengedhetetlen fokális kontaktusok kialakulását is.

136



4.34 ábra Kétkamrás kemotaxis assay chip-re átalakított formája.

A felszíneken elhelyezett nanolyukak segítségével, a patch-clamp technika egy chip-re átalakított formájában, a kemotaxist végző sejtek által leadott auto- és parakrin anyagok is jól vizsgálhatók. Ioncsatorna vizsgálatokkal és a migráló sejt membránjának egyéb molekuláris szintű in vivo jellemzésével egészíthetők ki az eredmények.

A mikrofluiditási és a chip technika ötvözéseként jelent meg a fentiekben már említett sebgyógyulási assay-k egy új formája is [109] (4.35 ábra). Ebben az esetben a mérőkamrán átáramló folyadékok három, elkülönült áramlási vonalban mozgó folyadékteret alkotnak. Igy a kamra kezdeti, sejtekkel történő feltöltése és konfluens sejtes rétegű fedését követően jól tervezhető, hogy melyik sávból távolítjuk el a sejteket (ld. enzimes emésztés), illetve a kamra mely részén áramoltatunk olyan folyadékot, amelynek migrációra kifejtett hatását kívánjuk tanulmányozni.



4.35 ábra Három-csatornás, mikrofluidikai mérőszeköz sejtmigráció, illetve sebgyógyulási folyamatok mérésére.

A fenti módszer jól alkalmazható nem csak sebgyógyulási assay-k esetében, hanem szabadon elmozduló (pl. baktériumok) sejtek úszási preferenciáinak megállapításakor is. Utóbbi esetben a sejtes minták a középső csatornában áramlanak a mérőkamrába, míg a két szélső csatornán refrencia és vizsgált anyag oldatai áramlanak a mintatéren át. A migrációs választ a pl. fluoreszcensen jelzett sejtes minta eltérülése adja, annak fokával becsülhető.

4.11.2 Az ibidi lemez-család

Az USA-beli *Applied Biophysics* nagy szerepet játszott az elmúlt évek során mind a viszonylag egyszerű, mind a méréstechnika szempontjából szofisztikáltabb módszerek kifejlesztésében.

Az egyszerűbb eljárások egyik képviselője az ibidi lemez-család, mely számos, a kemotaxis vizsgálatok során fontos kísérleti megközelítést alakított

138

egyszerű, a mindennapi laboratóriumi gyakorlat számára is könnyen kivitelezhető eljárássá [77].

E problémakörhöz tartozik a kemotaxis vizsgálatok szempontjából sem közömbös érfal modellezés. Ennek tárgylemezen való, átfolyó rendszerekkel történő modellezése, mind az adhézió, mind a kemotaxist vizsgáló kísérletek esetében nagy előrelépést jelentett a házilag előállított és sokszor technikai paramétereiket tekintve nehezen reprodukálható rendszerekkel szemben. Mint azt az alábbi 4.36 ábra is mutatja az ú.n. μ -Slide típusú lemezek több e célra kialakított formája is forgalomban van. A lemezek átfolyó rendszerbe csatlakoztatva jól modellezik az érpálya egyes szakaszainak eltérő tulajdonságait (ld. egy-csatornás - I, és a kapillárisok jellemző elágazódásait modellező – V lemezek). A V lemezek esetében az elágazások eltérő szöge lehető– séget ad áramlástani szempontból különböző paraméterek tanulmányozására is. A lemezfalak vékonyságának köszönhetően mikroszkóposan igen jól vizsgálható az egyes sejttípusok kitapadási kinetikája statikus és dinamikus rendszerekben (4.35 ábra B). Az egyes kamrák fizikai paramétereinek ismerete lehetőséget ad az alkalmazott médium rheológiai tulajdonságainak ismeretében további számítások elvégzésére, illetve az egyes vizsgálatok standardizálására (ld. nyíróerő számítása és annak hatásának értékelése a kitapadásra.).

139


4.36 ábra Az ibidi μ–Slide érfal modellező formái (Az ábra az ibidi GmbH, München engedélyével a cég illusztrációs anyagának felhasználásával készült)

A fenti lemez 4.37 ábrán bemutatott sokcsatornás változata lehetőséget nyújt az érfal kialakulás vizsgálatának tanulmányozására és mikroszkópos követésére éppúgy, mint koncentráció-függő folyamatok elemzésére. A párhuzamosan elhelyezett csatornákban a vizsgálatok kezdetétől, tehát a csatorna fal sejtekkel való bevonásának kezdeti lépéseitől nyomon követhető az angiogenezis folyamata és annak egyes hormonokkal vagy gyógyszerekkel való befolyásolhatósága. Amint az ábra mutatja inverz mikroszkópot használva a csatornák teljes szélessége optikailag jól kiértékelhető felszínnek fogható fel, mely a lemez alapján a falvastagság minimalizálásának köszönhető és annak, hogy a széli részeken a folyadék oldalfalhoz történő kitapadásával a zárt csatornák esetében nem kell számolnunk (4.37 ábra B).



4.37 ábra A 6 csatornás ibidi μ-Slide csatornáinak elrendezése és sejttenyészeti sejtekkel fedett és festett formája (A), valamint a kamra felépítése és a széles sávban éles optikai kép kialakulása közötti kapcsolat magyarázata (B) (Az ábra az ibidi GmbH, München engedélyével a cég illusztrációs anyagának felhasználásával készült)

Míg az előzőekben tárgyalt két lemeztípus főként az angiogenezis vizsgálatát, illetve az avval kapcsolatos adhéziós folyamatok modellezését teszi lehetővé, a közelmúltban a μ-Slide lemezcsalád kifejezetten kemotaxis mérésére kifejlesztett formája [77] is elérhetővé vált (4.38 ábra). Ez a négy furattal ellátott lemez két nagy, zárt folyadéktároló üregből és egy a sejtek rendszerbe juttatását lehetővé tevő lényegesen kisebb térfogatú részből áll. A vizsgálat első lépése a sejtek rendszerbe töltése, mely során a két nagy tároló üreg nyílásai zárva vannak, ezáltal gátolva meg a sejteket tartalmazó folyadék e terekbe történő bejutását. A sejtes minta betöltését és kitapadását követően történik a két nagy üreg kemoattraktáns, illetve kontroll folyadékkal történő feltöltése. Utóbbi folyamat során a sejtes minta tere feltöltő nyílásainak zárásával biztosítjuk az adott anyagok kellő terekbe történő áramlását. Mint azt a 4.38 ábra B része mutatja a két üreg feltöltését követően jól elkülönülő koncentráció gradiens alakul ki, és vizsgált anyagokat összekötő sejtes tér kb. 250-szer kisebb térfogata a rendszer kis tehetetlensége révén viszonylag gyors gradiens kialakulást tesz lehetővé a sejteket tartalmazó üreg két oldalán. A sejtek a korábban már említett T-maze assay-hez hasonló módon a vizsgált anyagok kémiai jellege alapján választhatnak, s migrációjuk viszonylag gyorsan elemezhetővé válik. Mivel a lemez három fentiekben leírt kamrát tartalmaz, módunk van egyetlen lemez felhasználásával egy teljes vizsgálat elvégzésére, hiszen a fentiekben leírt kemoattraktáns/referencia anyag betöltések mellett, így mód adódik további a két kontrollmérés (referencia anyag/ referencia anyag, illetve kemoattraktáns/kemoattraktáns) elvégzésére is. Így a vizsgált anyagok kemoattraktáns jellege mellett esetleges kemokinetikus jellegük is mérhetővé válik.

A fenti módszer előnye a bevezetőben említett jól reprodukálható technikai paraméterek mellett az, hogy a kialakuló lineáris koncentráció gradiensek kb. 48 óráig stabilan fennállnak a kamrán belül. Fenti paraméterek elérésével sikerült az egyik legkedvezőbb kemotaxis mérő eszközt előállítani. A módszer hátrányának fogható azonban fel zárt jellege, mely a gázcsere korlátozott lehetősége miatt behatárolja mind a vizsgálható sejtek körét, mind az inkubációs idő káros fiziológiai mellékhatások nélkül alkalmazható idejét.



4.38 ábra Az ibidi μ-Slide kemotaxis mérésére kifejlesztett változatának felépítése (A) az egyes mintatároló üregek kapcsolódása és a kialakuló gradiens (B), valamint egy feltöltött lemez képe (C). (Az ábra az ibidi GmbH, München engedélyével a cég illusztrációs anyagának felhasználásával készült)

4.11.3 ECIS (electric cell-substrate impedance sensor) technológia

Az utóbbi évtized folyamán szintén az *Applied Biophysics* támogatásával fejlesztették ki a Nobel díjas Ivar Giaever és Charles R. Keese munkája nyomán azt az elektromos ellenállás mérésén alapuló technikát, melynek segítségével már a sejtek igen kis hely, illetve helyzetváltoztatásai is regisztrálhatók [78]. A módszer alapelve az, hogy a sejteket a szövettenyésztési technikában alkalmazott tenyésztő lapokhoz hasonló műanyag edények üregeibe helyezik. Ezek alján a sejtek és a kemoattraktáns anyag elhelyezésére speciálisan kiképzett üregek találhatók, valamint a mérés céljának megfelelően megválasztható elrendezésben elhelyezett elektródok (4.39 ábra)



4.39 ábra A sejtmotilitás mérésére alkalmas ECIS technológia mérőfelszíne az egyes főbb elektród elrendezési mintázatokkal (A és B, valamint a nyolc párhuzamos mérésre alkalmas lemez, melynek alján jól látható az elektródok elrendezése (C) [79].

A vizsgálat során a felhelyezett sejtek az üregek alján kiterülnek, majd az attraktáns által kiváltott aktív mozgásuk segítségével egyre nagyobb felületen teremtenek kapcsolatot az üreg aljának közepén elhelyezett kisméretű (Ø250μm) elektród és az üreg peremén körbefutó elektród között. A vizsgálat kezdetén, kitapadó sejtek nélkül a rendszerhez kapcsolt mérőberendezéssel kb. 2000 ohm-os ellenállás mérhető, míg a sejtek, mint fizikai értelemben szigetelő komponensek kitapadását követően ez az érték jelentősen megemelkedik, elérheti a 15 000 ohm-os értéket is. Fontos megjegyeznünk, hogy a mérés során alkalmazott egyenáram feszültségét (néhány mV) és áramerősségét (1μA) a módszer kifejlesztői elhanyagolhatónak értékelik a mérések szempontjából. (Ugyanakkor emlékeztetnünk kell más szakirodalmi adatokra, melyek igen kis áramerősségek és feszültségek hatását is jelentősnek írták le különösen a fokális kontaktusok kialakulása során.) A módszer sejtek igen kis mozgásait is képes követni, illetve egyes idődiagramok összevetésével képet kaphatunk különböző anyagok kemoattraktáns hatásának eltérő voltáról, vagy egyes sejttípusok eltérő migrációs képességéről az adott rendszerben (4.40 ábra).



4.40 ábra Eltérések BCS és NRK sejtek kitapadása és motilitása között ECIS technológiával vizsgálva.

4.11.4 Fotoaktivációs microarray

A fotoaktiváció jelenségét, mely során kémiai vagy biológiai szempontból inaktív vegyületek különböző hullámhosszúságú fénysugarak hatására aktív állapotba jutnak vagy reakcióképes formáik révén folyamatsorokat indítanak be – számos technika alkalmazza az orvosbiológia területén is. Éppen ezért nem meglepő, hogy a migráló sejtek vizsgálatánál is helyet kapott ez az eljárás, bár lényegéből adódóan felhasználási területe bizonyos mértékben behatárolt mind a mai napig, hiszen segítségével sejtek migrációjának útvonalát jelölhetjük ki, mintegy "versenypályát" szabva a vizsgálatok kivitelezése során.

Az alábbiakban a Nakanishi és mtsai által kidolgozott módszert ismertetjük [80, 81], melynek első lépése üveg felszínek (pl. fedőlemezek) alkil-sziloxánnal (1-(2-nitrofenil)-etil-11-triklorozililundekanoat) való fedése (4.41 ábra). A molekulák aromás gyűrűt tartalmazó, üvegfelszíntől távoli terminális csoportja maga is gátolja a sejtek kitapadását, de e csoporthoz BSA-t kötve a sejtek kitapadásának gátlása tovább fokozható. Ezt követően a vizsgáló által megszabott vonalak vagy mintázatoknak megfelelően UV fénnyel történő besugárzás következik, melynek hatására a 2-nitrobenzil csoportok, illetve az általuk kötött BSA molekulák válnak le a felszínről és a fedő réteg besugárzott helyein hidrofil csoportokkal fedett területek maradnak. Az eljárás következő lépésében a hidrofil felszínekhez a sejtek kitapadását és migrációját elősegítő fibronektint köthetünk. A sejtek adhéziója után a fenti lépéssor (ld. BSA fedett sejtmentes terület besugárzása, fibronektin, illetve a fibronektint helyettesítő más molekula alkalmazása) megismétlésével, a sejtek migrációját, annak felszíni molekula típusától és denzitásától való függését vizsgálhatjuk.

A módszer előnye, hogy ú.n. fotomaszkok alkalmazásával viszonylag kis felszíneken számos párhuzamos kísérlet elvégzését teszi lehetővé. Ezáltal új lehetőséget ad fibroblasztok és egyéb kitapadó sejtek migrációjának vizsgá-

lata mellett a felszínen kialakított csatornákban neuronok nyúlványai növekedésének elemzésére is.



4.41 Fotoaktiváción alapuló microarray kialakítása (A) és főbb lépései (B és C)

4.12 Egyéb technikák

4.12.1 Fagokinetikus módszer

A módszer lényege, hogy – mint neve is mutatja – sikeresen kapcsolja össze a kemotaxist sejtélettani célreakciójával a fagocitózissal. A vizsgálat során először sejttenyésztéshez használt műanyag – 12 vagy 24 üregű – lemezek alját kezeljük 1%-os BSA oldattal, majd a nem kötődött BSA etanolos eltávolítását követően arany kolloid oldattal fedjük a felszíneket. Ismételt PBS-es mosások után a felszíneket ECM peptidek 1mM CaCl₂-ot tartalmazó oldatával inkubáljuk, 2-3 órán keresztül. Ezt követően kerülnek a sejtek a felszínekre. Kitapadnak, majd migrációs és fagocitotikus aktivitásuktól függő mértékben rövidebb-hosszabb jól detektálható útvonalakat járnak be (4.42 ábra) [82].



4.42 ábra Sejtmotilitás fagokinetikus eljárással történő mérésének főbb lépései

4.12.2 Gyöngyök alkalmazása

Az eddig tárgyalt technikáktól alapvetően eltér az a megoldás, melyekben a vizsgált ligandra pozitívan válaszoló sejtek egy mikrogyöngy felszínére tapadnak ki. Egyes esetekben e célra Cytodex gyöngyöket használnak, melyeket a vizsgálni kívánt ligand adott koncentrációjú oldatával kezelnek elő. Ezt követően a sejtekkel történő inkubáció során azok a számukra legkedvezőbb koncentrációt képviselő mikrogyöngy minta felszínére tapadnak ki (ld. amőboid mozgást végző sejtek) vagy annak a környezetében találhatók (ld. csillós-ostoros mozgást végző sejtek) nagy számban [83]. A módszer kiértékelése – különösen a kitapadó sejtek esetében – fluoreszcens vagy egyéb festésekkel kombinálva automatizálható, áramlási citométerben mérhető.

A módszer kétségtelen előnye a gyors kivitelezhetőség, hátránya, hogy a hatásos koncentráció csupán becsülhető. A különböző ligandok alkalmazásakor a ligand-gyöngy közötti kötés kialakulása, annak időben tartós volta, illetve a ligand gyöngyről történő diffúziójának mértéke mind egyedi paraméterek által megszabottak és igen nehezen mérhetők.

Eltérő elven nyugszik – a fagokinetikus eljárásra emlékeztető – és a *Cellomics* által kidolgozott eljárás, mely fluoreszcensen jelzett felszínű gyöngyöket alkalmaz. Ebben az esetben a vizsgált sejtek a mikrogyöngyökhöz való kitapadásuk után mozgásállapotuknak megfelelő utakat járnak be a gyöngyfelszínen, melyek jól láthatók mivel a nyomvonalakon a felszíni fluoreszcens jelzés eltűnik (4.43 ábra).



4.43 ábra Kitapadt sejtek vándorlásának útvonalai jól detektálhatók fluoreszcensen jelzett mikrogyöngyfelszíneken (© Cellomics Inc 1999–2006. – Engedélyezett felhasználás)

A sejtek festésével és számítógépes kiértékelőprogram támogatásával a felszíni fluoreszcencia csökkenése, illetve az egyes mintázatok regisztrálhatók, elemezhetők.

4. 12.3 Pszeudopódium izoláló eljárás

Az amőboid mozgás alapjelenségének számító pszeudopódium képzés számos vizsgálat tárgyát képezi, e képlet kialakulása, membránjának összetétele és annak dinamikus változásai esszenciális elemeit jelentik a migráció afferens és efferens elemekből felépülő lépéssorának. E képletek membránjának sajátos összetétele (ld. receptorok száma és specifitása, sejtadhéziós molekulák stb.) és a pszeudopódiumok fejlődését és mozgását meghatározó intracelluláris elemek (ld. citoszkeleton komponensei) nem csak a sejt mozgásállapotát jellemzik, de kemotaktikus válaszkészsége szempontjából is meghatározóak lehetnek. A fentiekben vázoltak fontosságát ismerték fel a 4.44 ábrán vázolt, pszeudopódium izoláló eljárás kidolgozói.



4.44 ábra Pszeudopódium izolálása.

A *Chemicon* cég által kitben is kifejlesztett eljárás első fázisában a sejtek egy kétkamrás kemotaxis assay során a vizsgálni kívánt anyaggal (pl. kemokinnel) kerülnek kapcsolatba, s a két kamrát elválasztó filter pórusain keresztül állábakat fejlesztenek. A viszonylag kis pórusátmérő megnehezíti a sejtek átvándorlását, azonban a pozitív kémiai inger hatására több pszeudopodium is kifejlődik, melyek a membrán másik oldalára is átnyúlnak anélkül, hogy maga a sejt átjutna. Ebben a fázisban az alsó felszín lízis pufferrel történő kezelése mintegy "levágja" az átnyúló citoplazma nyúlványokat. Az izolált nyúlványokat tartalmazó sejtmentes frakció további vizsgálata több, esetleg szinkron vizsgálatra is lehetőséget ad, elemezhető a membrán receptorai mellett a lipidtartalom vagy egyéb komponensek (pl. CD markerek) is.

4.12.4 Az "air pouch" modell

A kemotaxis vizsgálatok egy speciális formáját jelentik azok a kísérleti állaton – esetleg emberen – elvégezhető beavatkozások, melyek az élő szervezetben folyó kemotaktikus folyamatok talán legjobb megközelítésének tekinthetők. Az 1980-as évek elején kidolgozott technika alapja kb. 5 ml steril, pirogén mentes levegő (egyes esetekben nemesgázok) a bőr subcutan rétegébe történő befecskendezése, melynek révén ú.n. légtasak (air pouch) keletkezik (4.45 ábra) [84].



4.45 ábra Az "air pouch" technika kivitelezésének lépései

Kísérleti körülmények között rendszerint rágcsálók hátbőrén a fentiekben leírt módon kialakított gázzal telt ürege akár több napig is steril környezetnek tekinthető, alapja pedig sok tekintetben hasonlatosságot mutat a szinoviális membrán összetételével, és lehetőséget biztosít a szöveti térbe kivándorló sejtek (neutrofil granulociták, makrofágok stb.) összegyűlésére. Hosszabb megfigyelések esetén kb. 2–3 nap elteltével ismételt steril levegő befecskendezés szükséges lehet. Egyes esetekben a művi úton létrehozott hólyagszerű képletbe további anyagok is juttathatók. A módszer kidolgozói a tengeri hínár galaktopiranóz alegységekből álló poliszacharidját, az 1 ml 1%– os i-carrageenan-t alkalmaztak fiziológiás sóoldat kontrollok mellett a sejt– szám növelése céljából. Az újabb kísérletek alapján a 0.5% karboximetil– cellulóz használata célszerűbbnek látszik, segítségével lassítható a tasakba befecskendezett vízoldékony indukáló anyagok (pl. gyógyszerek, kemokinek) felszívódása és jól elemezhető a sejtes elemek migrációjának érzékenysége, illetve a kemotaxis szöveti dinamizmusa is in vivo körülmények között.

A vizsgálat kiértékelésére a néha 10–14 napot is meghaladó inkubációs időt követően kerül sor a felgyülemlett szövetközti folyadék leszívásával. Az így nyert minták kiértékelése és maga a módszer felhasználhatósága szempontjából is fontos megemlítenünk, hogy nem csupán a sejtes elemek számának, illetve összetételének meghatározása lehet a célunk, hanem egyre gyakoribb azoknak a kísérleteknek a száma, melyek a sejtmentes fázis összetételét elemzik (ld. kemokinek koncentrációja).

4.12.5 Kemotaktikusan aktív sejtpopulációk gyűjtése Sephadex gyöngyök segítségével

Már nem kifejezetten kemotaxis assay, hanem kemotaktikusan aktív sejtcsoportok gyűjtésének egy igen ötletes formája az, amikor kísérleti állatok peritoneális üregébe fiziológiás sóban vagy citrát pufferben elkevert Sephadex G-40 gyöngyöket (3-5%-os keverék, 1 ml/100g testsúly dózis) juttatunk [85]. A beadott gyöngyök lokális peritoneumra kifejtett indukáló hatásának következtében, a beadást követő 48 órán belül (egyes esetekben ismételt indukciók is szükségesek), a hasüregi folyadékból vett mintákban a sejtszám jelentős szaporulata, illetve a humorális komponensek koncentráci-

ójának gyulladásos reakciókat kísérő emelkedése is megfigyelhető (4.46 ábra).

A módszer éppúgy jól felhasználható aktivált sejtpopulációk gyűjtésére, mint egyes citokinek, kemokinek termelésének indukciójára. Alkalmazásakor problémát jelenthetnek az egyes kísérleti állatok közötti egyedi eltérések, ez mind a sejtes, mind a humorális komponensek összetételének értékelésekor fokozott körültekintést igényel.



4.46 ábra Kemotaktikusan aktív sejtcsoportok és humorális komponensek keletkezésének indukciója Sephadex gyöngyöket tartalmazó oldat intraperitoneális befecskendezése segítségével.

4.12.6 Denritikus sejtek migrációjának kimutatása FITC-festéssel.

A technika alapja a bőr hámrétegében található és a kültakaró immunvédekezésében kulcsszerepet betöltő, jelentős migrációs képességgel bíró Langerhans sejtek és dendritikus sejtek kimutatása. E célra rendszerint a kísérleti állat szőrtelenített és a stratum corneum elemeitől cellux ragasztócsíkok segítségével nagyban megfosztott has- vagy fülbőrét használjuk. A leírt módon előkezelt bőrfelületet 500 µl, 0.5% FITC-et tartalmazó aceton/oliva olaj keverékkel (v:v=4:1) ecseteljük. A szakirodalom által szintén ajánlott dibutil ftalát használatát a bőr irritáció és a dendritikus sejtek következményes érését megelőzendően egyre több felhasználó ellenzi. A festés következtében a két fent már említett sejt szelektív festődése következik be, melyek ezt követően az elvezető nyirokérrendszerbe jutnak majd a környéki nyirokcsomókból 18–48 óra elteltével készített preparátumokban jól kimutathatók (4.47 ábra) [86].



4.47 ábra A bőr dendritikus és Langerhans sejtjei migrációjának kimutatása FITCfestéssel.

A vizsgált sejtpopuláció migrációjának indukciójában fontos szerepet tölt be a sejtek felszínén megtatálható CCR7 kemokin-receptor. A szakirodalom a nyirok rendszer egyes helyein kialakuló CCL19, illetve CCL21 kemokin gradiensek és a CCR7 receptorok expresszálódását tekinti a vizsgált migráció specifitását alapvetően meghatározó szignalizációs tényezőnek. (Nem hallgatható azonban el az a feltételezés sem, mely szerint a sejtek FITC-cel történő festődése csak a bőr felszín közeli nyirokereiben történne, az oda bediffundáló FITC által.)

5. Módszertani kitekintés

Mint az eddig áttekintett módszerek sokszínűségéből is érezhető, a kemotaxis mérésére szolgáló eljárások száma mondhatni napról napra szaporodik. Meglepően új, ötletes módszerek jelennek meg a legegyszerűbb szinteken és a fejlett műszerezettséget követelő területeken egyaránt, nem is beszélve a kiértékelési lehetőségek gyarapodásáról.

Talán a fentiek is indokolják azt a szándékot, hogy bár jelen munkánk elsődleges célja magának a kemotaxisnak a mérésére alkalmas módszerek gazdag tárának áttekintése, szükségesnek érezzük – ha csak egy rövid áttekintés erejéig –, megemlíteni azokat az eljárásokat is, melyeknek fókuszában ugyan már nem kifejezetten a migráció áll, de a folyamat biológiai komplexitásából adódóan elválaszthatatlanok a kemotaxistól.

E vizsgálatok között kiemelkedő helyet foglalnak el a sejtek intracelluláris folyamatait molekuláris szinten vizsgáló eljárások, melyek közül a kemotaxis vizsgálatok esetében számos, fluoreszcens jelek detektálásán alapuló mikroszkópos technikát találunk. Alkalmasak e technikák a citoszkeleton elemei funkcionális állapotának meghatározására, a kemotaxis receptorok és

szignalizációs kaszkádok értékelésére éppúgy, mint a kemotaxist számos sejtben megelőző lépés, az adhézió egyes elemeinek vizsgálatára.

5.1 Fluorescence ratio imaging (FRI)

Ilyen szempontból kiemelkedő jelentőségű technika a **fluorescence ratio imaging (FRI),** mely fokális kontaktusok kialakulásának monitorozását teszi lehetővé az e képletek felépítésében jellemző fehérjék eltérő színű fluoreszcens festékkel való detektálása révén [87]. Jó példa e módszer alkalmazására, pl. a foszfotirozin/tensin arány meghatározása rhodamine/fluorescein jelzés, illetve azok kolokalizációjának követése útján.

5.2 Fluorescence resonance energy-transfer (FRET)

A technika sokban hozzájárult a bakteriális kemotaxis szignalizációs lánca egyes elemeinek lokalizácójához éppúgy, mint az adhézióban és az azt követő migrációban részt vevő intracelluláris proteinek interakcióinak nyomon követéséhez. A módszer két eltérő színű fluoreszcens festékkel (CFP=cyan fluorescence protein és YFP= yellow fluorescence protein) jelzett és megfelelő közelségben egymáshoz kapcsolódni tudó ligand kötésének kimutatásán alapul. Mindaddig, amíg a két komponens egymástól kellő távolságban helyezkedik el – tehát nincs kapcsolódás – csupán az ú.n. donor komponens gerjeszthető, s egy arra jellemző hullámhosszban emittál fényt. A két komponens megfelelő közelségbe kerülésével lehetővé válik azok kapcsolódása is. Ennek eredménye a technika nevében is jelzett energia transzfer, tehát a donor adott hullámhosszon történő besugárzását követően most már az ú.n.

akceptor rész fog a rá jellemző és az előzőtől eltérő hullámhosszban fényt emittálni (5.1 ábra).



5.1 ábra FRET technika molekuláris alapjai – FRET-párok interakciója

A technika segítségével a konformációbeli változások intramolekuláris szinten kb. 2–7 m–es, intermolekulárisan pedig kb. 300 nm–es érzékenységgel követhetők. Az egyes szignalizációs folyamatok elemeinek állapotváltozása, pl. bakteriális CheA és CheY proteinek kapcsolódása segítségével éppúgy kimutatható [88], mint receptor szintű változások, pl. CXCR4 receptorok dimerizációja [89].

5.3 Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

A sejtfelszíni membrán összetételének dinamikus változásai és intracelluláris molekuláris szintű változások is jól követhetők a címben jelzett technikával. Ennek alapja a sejt adott részének (pl. membrán) kezdeti fluoreszcens festékkel történő jelölése, melyre gyakran GFP-t használnak. Ezt követi egy adott mérőfelület lézersugárral történő besugárzása, mely a fluoreszcencia kioltását eredményezi. E kezdeti F0 időponttól számítva a felszín fluoreszcencia intenzitásának folyamatos mérésével és a flureszcens jel egyre növekvő értékeiből a megfigyelt területet alkotó komponensek diffúziójáról, transzportjáról, illetve egyes komponensek beépüléséről kaphatunk értékes információkat (5.2 ábra).



5.2 ábra A FRAP technika során kialakuló "kioltási" jel és az ú.n. "recovery" szakasz jellemző mérési karakterisztikája.

Jól alkalmazható a módszer az amőboid mozgás vizsgálata során az alfaaktinin beépülésének követésével a stressz-filamentumok vizsgálatára [90] éppúgy, mint arra, hogy a membrán lipid komponenseinek követése révén a fluiditási paraméterek és a migrációs képesség közötti összefüggések segítségével jellemezzük a folyamatot [91].

5.4 Fotoaktiváció

In vivo vizsgálatoknál molekuláris szintű hatások elemzésére szintén jól alkalmazható módszer. A technika lényege olyan kovalensen kötött, fotolabilis csoportok alkalmazása, melyek a vizsgálni kívánt modulátorokhoz kötődve, azok funkcióját átmenetileg gátolni képesek. A komplex UV besugárzás hatására történő felbomlása a vizsgálni kíván modulátor aktiválódását eredményezi. Egyes esetekben a technika egy scavenger molekula sejtbe juttatásával is párosul, mely a felszabaduló fotolabilis gátló csoport megkötésével biztosítja a reakció irreverzibilis voltát (5.3 ábra – A).



5.3 ábra Fotoaktiváció (A) és Chromophore–Assisted–Laser–Inactivation (B) –l mole– kuláris mechanizmusának összehasonlítása.

A vizsgálatok szempontjából elsőrendű szempont az aktiváció gyors kialakulása. Ezt részben a besugárzás intenzitásának fokozása és a besugárzási idő minimalizálása segít elő, másrészt pedig a kialakuló hatásos derivátum lehetőség szerinti kis mérete, mely a molekula gyorsabb diffúziója révén eredményez generalizált biológiai hatást. A felhasznált komplexek kialakítására számos, rendszerint a modulátor molekula sajátosságai által meghatározott kötési technika ismert. Ezek közül reaktív aminosavak vagy rövid peptidszekvenciák beépítése, valamint a fotolabilis aminosavak beépülését lehetővé tevő nonsense-kodon-szuppreszió technikák egyaránt használatosak. A gátló hatást kifejtő komponens szintén eltérő lehet (pl. karboxil sav, nitrobenzil alapú csoportok).

A módszert számos migrációt vizsgáló munka alkalmazza: kiválóan alkalmas calmodulinra és miozin L-lánc kinázra kifejtett hatások révén a lamellopódiumok kialakulásának rapid gátlására éppúgy, mint az aktivált timozin 4 G-aktinhoz való kötődésének előségítése útján az F-aktin kialakulás gátlására [92, 93].

5.5 Chromophore assisted laser inactivation (CALI)

Az előzőekben ismertetett módszerhez bizonyos tekintetben hasonló egy 1988-ban kifejlesztett technika [94]. Itt a vizsgálni kívánt intracelluláris komponensre (enzim, citoszkeletális fehérje, membrán receptor, szignál traszdukciós elem stb.) specifikus antitestet használunk. Az antitesteket különböző fotoaktivációs hatásra érzékeny festékekkel (malachitzöld, fluoreszcein, EGFP) jelöljük, majd a sejtekbe juttatjuk. Az internalizálódott antitestek besugárzása hidroxil-gyök felszabadulással jár, azonban csupán a

célmolekulákhoz kötődött, jelölt antitestek esetében, mely a módszer jó fókuszálhatóságát eredményezi. A kialakuló gyökök igen rövid élettartama $(10^{-9}-10^{-12} \text{ mp})$ következtében a sejt jól körülhatárolható terében, csak a kötött antitestek közvetlen közelében (malachitzöld – 15Å, floureszcein – 30 nm) figyelhetjük meg a célmolekulák károsodását – a teljes inaktiváció perceken belül kifejlődik, az eredeti állapot visszaállása órákig, esetleg napokig is eltarthat (5.3 ábra – B).

A módszer, mint már fentiekben is jeleztük, számos intracelluláris rendszer vizsgálatára alkalmas. CALI technikával a kinesin inaktiválása révén lehetőség van a mikrotubuláris rendszer gátlására, egy tovább fejlesztett változata a **micro-CALI** a megvilágító lézer fénnyaláb 10µm átmérőjű területre szűkíté-sével a sejt motilitásáért felelős egyes elemek gátlását teszi lehetővé [95]. A kétségtelenül nagy szelektivitás és a jó molekuláris szintű fókuszálhatóság ellenére megemlítendő, hogy egyes esetekben a CALI általi gátlás nem fejlő-dik ki. Ennek főbb, a kísérletek tervezése és kivitelezése szempontjából leg-fontosabb okai lehetnek: i) a hidroxil-gyök donor viszonylagos távolsága a célmolekula funkcionális doménjétől; ii) a domén rezisztens volta a kialakuló gátló gyökökre; iii) a vizsgálandó molekula intracelluláris koncentrációjának eredeti kalkulációt meghaladó volta.

5.6 Traction-force microscopy

Az előzőekben tárgyalt technikáktól alapjaiban térnek el a migráló sejtek és a felszín közötti kölcsönhatás kvantitatív analízisére is alkalmas eljárások. Mivel a sejtek letapadásában fontos szerepet játszó fokális kontaktusok eltérő eloszlása révén a sejt-felszín között ható nyújtó/hajlító erők megoszlása je-

lentősen eltérő lehet a sejt egyes részein (ld. frontális és elmaradó rész, illetve pszeudopódiumok és a mozgó sejt centruma), ennek mérése értékes adatokkal szolgál számos migrációt jellemző intra- és extracelluláris folyamatban.

E vizsgálatok közül a kezdeti lépést felszínek szilikon filmekkel való fedése jelentette [96]. E technikák esetében a sejt-szilikon közötti kölcsönhatás kialakulására, illetve annak mértékére a szilikon-redők kialakulásából következtetünk. Ugyan a mérhető erők nagysága már ezen az úton is meghatározható volt (10 nN - 10 μN tartományban), azonban a kialakuló ráncok geometriája igen megnehezítette a kvantitatív mérések elvégzését. Mivel a szilikon anyagának relatív keménysége csupán gyorsan mozgó sejtek (pl. keratinocita) vizsgálatát teszi lehetővé, s adhéziós fehérjékkel alkotott komplexének optikai tulajdonságai sem a legkedvezőbbek a kiértékelés szempontjából, új felületkezelő anyagok bevezetése látszott célszerűnek.

Az 1999-ben kidolgozott Traction-Force-Microscopy [97] új megvilágításba helyezte a kiértékelés menetét. A technika alapja olyan poliakrilamid tartalmú és a sejtek fiziológiás kitapadását és mozgását lehetővé tevő bevonat készítése, melybe kezdetben jelöletlen majd fluoreszcensen jelölt 0.2 mm-es latex gyöngyöket ágyaznak be, homogén eloszlásban. A sejtek felszínekre helyezését és kitapadását követően komputer-vezérelt rendszerrel letapogatják a felszíneket és tárolják a gyöngyök eloszlásának mintázatát. Ezt követi a sejtek migrációjának indukciója, melynek hatására a felszínen elmozduló sejtek erőt fejtenek ki a beágyazott gyöngyökre és azok kitapadástól és a kifejtett erő nagyságától függő elmozdulását eredményezik. A kísérlet leállítását a sejtek felszínről való enzimes emésztése jelenti, mely nincs hatással

a poliakrilamid rétegbe ágyazott gyöngyök eloszlására. Az újonnan elvégzett letapogatás adatainak a kezdeti tárolt adatokkal való összevetése alapján az elmozdulásokat kísérő nyújtóerők vektoraiból álló sejtkép rajzolható ki (5.4 ábra – A, B)



5.4 ábra Traction force microscopy – a sejt és a felszín között kialakuló kölcsönha– tások (A), azok mérhető változásainak húzóerő–térképen való ábrázolása (B) és a mikrotű technika elve (C).

Mint az az 5.4 sémás ábrán is látható a sejtek mozgásakor generálódó fő húzóerők a sejt frontális széli részein és az elmozdulás irányára merőlegesen hatnak, s ez azt is jelenti, hogy az újonnan kialakuló kis fokális adhéziók esetében regisztrálhatók a jelentősebb erők. Bár ezen a téren számos egyéb felületkezelési eljárást is ismer a szakirodalom (pl. kollagén filmek) és egyéb módszerek is használatosak a sejt és környezete közötti tapadás erőviszonyainak jellemzésére (pl. a sejtre mikropipettával gyakorolt külső erő hatásának elemzése), talán a **mikrotűk** alkalmazása jelent e témakörben még kiemelten fontos, új megközelítési módot (5.4 ábra – C) [98].

Utóbbi esetben a soft litográfia segítségével mikrotűk egyenletesen eloszló rétegével vonják be a felületet. A sejtek elmozdulásakor keletkező erők nagysága és iránya a tűk elhajlásának regisztrálásával számítható ki.

Az eddig tárgyalt módszerek mellett meg kell emlékeznünk még egy, napjainkban már a biológiai és orvosi kutatások igen jelentős részét kitevő tudományág a **molekuláris biológia és molekuláris genetika** eszköztáráról és a migráció-kutatás terén elért eredményeiről is. Tisztában vagyunk avval, hogy e terület a migráció szerkezeti elemeinek kutatása területén, szignalizációs folyamatainak feltárása és az egyes expresszálódó komponensek genetikai hátterének vizsgálatai terén egyaránt sok új, metodikai szempontból is értékelhető eredménnyel szolgált, azonban e könyvtárnyiadat áttekintésére még vázlatosan sem vállalkozhatunk.

Úgy érezzük azonban, hogy áttekintésünk hiányos maradna, ha teljesen példa és említés nélkül maradna ez a nagy és a migrációkutatás számára oly sok újat hozó terület. Ezért egyetlen példa, kemokinek és kemokin receptorok kimutatására az elmúlt évtized során kidolgozott talán legötletesebb módszer a **ribonukleáz protection assay (RAP)** bemutatásával szeretnénk utalni e

tudományterület vizsgálati módszereinek a kemotaxis kutatás terén is érezhető fejlődésére.

5.7 Ribonuclease protection assay - RPA

A címben szereplő eljárás specifikus mRNS szekvenciák detektálására és mennyiségi meghatározására is alkalmas [99]. A módszer alapja igen egyszerű, a keresett mRNS szekvencia (pl. egy kemokin receptor jellegzetes peptid szekvenciáját meghatározó bázissorrend) komplementer szekvenciáját állítjuk elő in vitro transzkripció útján. E próbák komplementer mRNS-be történő beépülésének követése miatt azok radioaktív izotóppal vagy biotinilációval való jelölése célszerű. Ezt követően a vizsgálni kívánt minta és a jelzett próba inkubációja következtében, a komplementer RNS szakaszok hibridizációja révén, kétszálú RNS szakaszok alakulnak ki, míg a többi helyén egyszálú RNS található. Az RN-ase emésztés során az utóbbi egyszálú, tehát számunkra értékes információt nem hordozó szekvenciák lebomlanak, míg a kétszálú szekvenciák tovább vizsgálhatók. A kiértékelés az RN-ase emésztett és emésztetlen minták elektroforetikus szeparálásával, majd a jelzett szekvenciák detektálása révén történik (5.5 ábra).



5.5 ábra Ribonuklease protection assay (RPA) főbb lépései (A), és e technika alkalmazása kemokinek és receptoraik kimutatására (B) (Forrás: Pierce)

A módszer előnye, hogy a cél RNS-ek számának és egyes nehezen hibridizálható pontjainak hozzáférhetősége lényegesen jobb, mint a Northern blott esetében, érzékenység terén pedig az egyébként hasonló kapacitású kvantitatív RT-PCR technikát előzi meg.

A módszeren alapuló kitek kidolgozásával először vált lehetővé kemokin családok és receptoraik párhuzamos vizsgálata biológiai mintákból, s egyben új utat nyitott olyan peptid és fehérje-családok kutatásában, melyek klinikai vagy biológiai szempontból történő szisztematikus, közös értékelése a kemotaktikus szignalizáció hálózatában résztvevő elemek komplex rendszeréről ad információt.

IV. Összegzés

A kemotaxis mérésére alkalmas eljárások elméleti hátterének és a gyakorlati kivitelezés számos lehetőségének áttekintése után, munkánk zárásaként rövid összefoglalóban, néhány táblázat segítségével szeretnénk a kísérletező számára segítséget nyújtó összegzést adni a megismert technikák legfontosabb tulajdonságairól.

Mint az alábbi 1. táblázat is mutatja a vizsgálatot végző a rendszer kialakításának reverzibilis, illetve irreverzibilis jellegétől egészen a szükséges laboratóriumi felszereltség fokáig a technikák igen széles kínálatából választhat. A kísérletező szabadsága e téren csak viszonylagos, hiszen a modell-sejt jellege (ld. a migráció sebessége), a vizsgált válaszreakció típusa (ld. kemotaxis/kemokinezis), a gradiens kialakulásának és fennmaradásának időbeli viszonyai stb., mind meghatározzák és egyben korlátozzák is a felhasználható módszerek körét. Mint látható, a táblázatban azok a főbb módszerek kaptak helyet, melyek sejt-populációk vizsgálatát teszi lehetővé, bár egyes esetekben az individuális sejtkövetés is lehetséges (pl. Zigmond kamra). Ugyanakkor, e módszerek összevetésekor, érdekes ellentmondásként állapíthatjuk meg, hogy a táblázatunkban legkevésbé kedvezőnek ítélt Boyden kamra (ld. reverzibilitás, egy sejt követése, kemotaxis és kemokinezis elkülönítése, stakoncentráció gradiens kialakulása) továbbfejlesztéséből kialakított bil multiwell rendszerek örvendenek legnagyobb népszerűségnek a mindennapi laboratóriumi gyakorlatban, s ennek oka döntően a nagyszámú párhuzamos

kísérlet elvégezhetőségében kereshető. Ugyanakkor látnunk kell azt is, hogy teljesen optimális módszer mindezidáig nem áll rendelkezésre, hiszen még a kialakuló koncentráció gradiens stabilitása szempontjából legmegfelelőbb Dunn kamra sem tekinthető minden szempontból ideális módszernek (ld. parallel kísérletek végzése).

	Filteren Kollagén Agaróz						
	Boyden keresztüli		géles géles		Transzendoteliális Zigmond Dunn		
	kamra	migráció	assay	assay	áramlási assay	kamra	kamra
Reverzibilis rendszer	_	_	+	+	+	+	+
Egy sejt követése	-	_	+	-	+	+	+
Sejtpopuláció vizsgá-							
lata	+	+	+	+	+	+	+
Kemotaxis és							
kemokinezis elkülö–							
nítése	-	-	+	-	-	+	+
Stabil							
koncentrációgradienst							
hoz létre	-	-	-	-	-	-	+
Parallel kísérleteket							
lehetővé tesz	-	+	_	+	-	-	-
Nem kell speciális							
felszerelés	+	+	+	+	_	_	-

1 táblázat Kemotaxis assay-k összehasonlító táblázata (XVIII)

Az összefoglalásban fontosnak érezzük az egyes assay típusok összevetését az általuk szolgáltatott adatok jellege szempontjából is (2. táblázat). Mint a táblázat mutatja a vizsgálatok alapkövetelményének tekinthetjük azt, hogy a vizsgált anyag indukálta sejtszám alakulásról információt kapjunk. Bizonyos módszerek csupán ezt az alapkövetelményt elégítik ki (ld. transwell, mikrogyöngy). Egyes módszerek esetében a sejtek által megtett távolságok mérése is lehetséges, s ezt 2D és 3D rendszerekben is elvégezhetjük (ld. radiális migráció vagy mozgásanalízis vizsgálata). Fenti index mellett, a módszer sajátosságaiból adódóan a felszínek sejtek általi fedettsége is mérhető (becsülhető), ez talán a leginkább kulcsfontosságú meghatározási pontja az ú.n. wound healing típusú módszereknek.

		Az assay által szolgáltatott adat					
Assay típusa	Sejtszám	Felszíni	Lineáris	Mozgási–	Folyamatos		
		fedettség	kiterjedes	pālya	megfigyelés		
Radiális migráció	+	+	+		+		
(2D vagy 3D)							
Transwell	+						
Wound-healing	+	+			+		
Kollagén invázió	+		+		+		
Mikrogyöngy	+						
Mozgásanalízis	+		+	+	+		
(2D vagy 3D)							

2. táblázat Kemotaxis assay-k által szolgáltatott információk (XIX)

A kemotaxis vizsgálatok kiértékelése napjainkban mind egysejtes, mind sejtpopulációk esetében egyre inkább a rendelkezésre álló technikai adottságoktól függ. Különösen így van ez a sejtek síkbeli (2D) és térbeli (3D) migrációját vizsgáló rendszerek összehasonlításának terén, valamint a tumorok vizsgálatában egyre nagyobb szerephez jutó, kifejezetten 3D invázió assay-k esetében. Mint azt a 3. táblázat összefoglalója is mutatja a vizuális kiértékelési mód még mind a mai napig szinte egyeduralkodónak tekinthető, bár az alkalmazott mikroszkópia típusa (fénymikroszkóp, fluoreszcens mikroszkóp, fáziskontraszt mikroszkóp) technikafüggő.

A kemotaxis vizsgálatokat most kezdők számára fontosnak tarjuk leszögezni, hogy bár a kemotaxis esetében még ma is megdöbbentően egyszerű technikákkal érhetünk el új eredményeket, a módszerek – különösen a 3D kiértékelés – már egyre nagyobb arányban támaszkodnak a komputeres kiértékelés asszisztált vagy teljesen automatizált formáira.

	Kapott ered- mény	Sejtek festése szükséges	Mikroszkópia típusa	Megfigyelés módja
	Sejtszám	+	FM, FluoM	Látóterenként
2D	Optikai denzitás	+	_	Automatikus
sejttenyészet,	Lineáris	+		Felvétel alapján
transzwell	kiterjedés		FM, FluoM	(Komputer–
				asszisztált)
	Lineáris kit. Felszín fedett– ség	_	Fáziskontraszt	Automatikus
3D	Sejtszám			Látómező/képsík
kollagén in-	(képsíkonkénti)	-	Fáziskontraszt	Komputer-
vázió				asszisztált v.
				Automatikus
2D és 3D	Individuális	+	FluoM	Komputer-
mozgási–	mozgási/úszási			asszisztált
pálya	pályák	-	Fáziskontraszt	Automatikus
				(szegment stb.)

3 táblázat Síkbeli (2D) és térbeli (3D) kemotaxis assay–k technikai feltételeinek ösz– szehasonlító táblázata (XIX)

A további, kifejezetten technikai részletek, megoldások és főbb gyakorlati szempontok tekintetében utalunk a *VI. Függelék* fejezet pontokba foglalt részeire.

V. Függelék

1 A kísérlettervezés szempontjai

 Alapvető cél, hogy a vizsgálat során alkalmazott technika, inkubációs idő stb. megfeleljen a mérni kívánt index kísérleti követelményeinek. Leggyakoribb probléma a kemotaxis mérése során az inkubációs idő rossz megválasztása, illetve annak túlzottan hosszú volta miatt a koncentráció gradiens megszűnése. Ezekben az esetekben gyakori, hogy kemotaxis helyett kemokinezist mérünk.

Megoldás: a kísérletek megkezdése előtt ajánlott a koncentráció gradiens időbeni stabilitásának ellenőrzése a vizsgálni kívánt ligand(ok) festett, fluoreszcensen jelzett formáival.

 Különösen friss táptalajban, illetve pufferben felvett sejtek esetében gyakori, hogy maga a sejteket körülvevő közeg is hatással van a sejtek motilitására (pl. kemokinezist indukál) vagy gátolja a sejtek motilitását (pl. egyes FCS-ek).

Megoldás: (i) célszerű az így felvett sejtek számára még a kísérlet megkezdése előtt adaptációs idő beiktatására, melynek hosszát a sejttípus határozza meg (ld. sejtciklus hossza, metabolikus aktivitás stb.); (ii) a nem kívánt mellékhatás esetleg kivédhető a sejttenyészetekből nyerhető ú.n. kondicionált médium segítségével, mely összetételének meghatározása, illetve annak oldószerkénti alkalmazása egyes esetekben megoldást nyújthat.

 Egyes esetekben a vizsgált sejtek autokrin vagy parakrin aktivitása révén a környező térbe kerülő biológiailag aktív molekulák, illetve fenti aktivitás indukciója jelenthet problémát. Ezek az anyagok hatással lehetnek a sejtek kemotaktikus jellegére éppúgy, mint a vizsgált ligandok aktivitására.

Megoldás: amennyiben a sejtek által termelt anyag ismert (esetleg menynyiségét is mérni tudjuk), annak a liganddal azonos térbe helyezése vagy a ligandot tartalmazó oldat megfelelő sejtszámmal történő előinkubációja segíthet a probléma megoldásában. A felvetett kérdés teljesen megnyugtató megoldása azonban nem ismert, mivel a sejtek endogén aktivitása révén termelődő anyagokról van szó.

 Problémát okozhat kétkamrás rendszerekben éppúgy, mint agar-lemezes assay-knél a vizsgálni kívánt anyag oldószerének (pl. ethanol, DMSO stb.) önmagában kifejtett kemotaktikus hatása.

Megoldás: ezekben az esetekben a vizsgált ligand nélküli, de az oldószert megfelelő hígításban tartalmazó kontrollok alkalmazásával tudunk olyan referencia adatokhoz jutni, melyekre vonatkoztathatóak lesznek a kapott adatok.

 Ritkán ugyan, de egyes esetekben felvetődhet a kétely, hogy az oldószer vagy a felhasznált vivőanyag (pl. agar-lemezes assay-k) nem lép-e reakcióba a vizsgált liganddal, megakadályozva annak hatását vagy éppen egy új, a vizsgáló számára nem ismert komponensként hatva.

Megoldás: a minta kémiai analízise, kromatográfiás elemzése nyújthat némi megnyugtatást ezen a téren, bár meg kell jegyeznünk, hogy vizes oldatokban a fenti probléma viszonylag ritkán vetődik fel.

Egyes esetekben a vizsgált anyagok a sejtek ozmotikus regulációjára (pl. vazopresszin analógok) vagy sejtciklusára (pl. timidin) kifejtett hatásuk révén jelentős méretbeli elváltozásokat okozhatnak, melynek következtében különösen filtereket alkalmazó eljárásoknál a reális érték alatti (megnövekedett méret), illetve azt jelentősen meghaladói (csökkent méret) eredményeket kaphatunk. (Más esetekben a vizsgált anyagok a sejtek egymás közötti adhéziójának fokozása révén teszik lehetetlenné a migráció vizsgálatát.)

Megoldás: a sejtméretre kifejtett hatás nem jelenti egyértelműen a mérés meghiúsulását. A sejtek mikroszkópos vizsgálata, illetve a minta FACSszal történő elemzése pontos adatokkal szolgál, milyen pórusátmérőjű filter használata mellett kaphatunk reális eredményeket.

2 Technikák röviden

• Filterek házilagos fedése:

a filter áztatása 0.5M ecetsavban – 2 min.; alapos mosás PBS-sel; 0.01% gelatin oldattal való inkubáció – 24 óra; szárítás levegőn.

• Tripán kék viabilitási teszt:

0.4% tripán kék + sejtszuszpenzió v/v = 1/1. Inkubációs idő: 5 perc. Eredmény: élő sejtek membránja nem engedi át a festéket, halott sejtek membránján a festék átjut, ezek a sejtek kékre festődnek.

• Calcein-AM jelölés:

A sejtek médiumban vagy assay pufferben történő mosását követően (denzitás $2x10^6$ sejt/ml) jelölés 1.5 μ M Calcein–AM–mel – 30 min. (37°C, 5% CO₂); sejtek mosása médiumban vagy assay pufferben. Leolvasás λ_{Exc} =485nm; λ_{Em} =520 nm.

• Agaróz gél készítése:

Feloldunk 0.25 g agarózt 12.5 ml dH2O-ban egyenletes melegítés mellett - 10-15 min., majd 56°C-os vízfürdőbe helyezzük.

Feloldunk 0.125 g gelatin port 12.5 ml pufferben (pl. RPMI-1640, HEPES/MEM vagy egyéb médium) és ezt is 56°C-os vízfürdőbe helyezzük. Az elkészített agaróz és gelatin oldatokat folyamatos keverés mellett ösz-szekeverjük és az így elkészített 1%-os agaróz/0.5% gelatin oldatból 6-6 ml-t pipettával Petri-csészékbe (\emptyset =6cm) mérünk.

• Leukocita izolálás:

Granulocita

Frissen vett perifériás, heparinos vér hígítása 1:2 arányban PBS-sel (pl. 10ml vér+10ml PBS).

A higított vérhez a vvt-ek szedimentációját elősegítő 10 ml hidroxietil keményítőt keverünk, majd a keveréket 30 percig 37 °C-on állni hagyjuk.

A felülúszót leemeljük és 500g-n 4 °C-on 8 percig centrifugáljuk.

A pelletet a maradék vvt lízisét előidéző 24 ml kétszeresen desztillált vízben szuszpendáljuk 30 mp-ig, majd 8ml 0.6M NaCl oldat hozzáadása után 500g-n 4 °C-on 8 percig centrifugáljuk a mintát.

A kapott pelletet 5ml, 1mg/ml HSA-val kiegészített HBSS-ben reszuszpendáljuk.
A kapott leukocita szuszpenziót 30ml Ficoll-Na-diatrizoat oldat felszínére rétegezzük, majd 400g-n 30 percig centrifugáljuk. (A centrifuga leállítá-sánál nem fékezzük a forgást!)

Arra alkalmas eszközzel leemeljük a monocitákat tartalmazó köztes réteget.

A granulocitákat tartalmazó pelletet 20ml a fentiekben alkalmazott HBSS+HSA keverékkel elkeverjük, majd 500g-n, 4 °C-on 8 percig centrifugáljuk.

A felülúszót leemeljük és a pelletet 1 ml HBSS-ben elkeverjük.

Mikroszkóposan ellenőrizzük a mintát, Tripán kék kizárási tesztet végzünk.

Monocita

A sejtek izolálása Ficoll-Hypaque gradiensen (denz.= 1.070 g/ml) majd enyhén hiperozmotikus Percoll gradiensen (denz.= 1.064 g/ml) történik. A Percoll oldat az alábbiak szerint készül: először izoozmotikus Percollt készítünk 1.5 M NaCl oldat hozzáadásával (1:9 v/v) (Pharmacia, denzitás =1.130 g/ml). Ezt követően az izozmotikus Percoll-t PBS/Citrát-tal (NaH₂PO₄ 1.49mM; Na₂HPO₄ 9.15mM; NaCl 139.97mM; C₆H₅Na₃O₇ .2H₂O 13mM; pH 7.2) keverjük (1:1 v/v)

A centrifugálás mindkét gradiensen: 400 g, 25-35°C-on, 35 min.

Mikroszkóposan ellenőrizzük a mintát, Tripán kék kizárási tesztet végzünk. A Percoll gradiens után a minták tisztasága monocitára 90%-feletti értéket mutat.

3 Tanácsok, fogások

3.1 Beszerzés

- Számos olyan alapanyag van, melyek esetében a sejtek igen érzékeny volta miatt célszerű már a kísérletek tervezésekor ugyanazon gyártótól származó, nagyobb mennyiségű alapanyagot beszerezni, azt az előírásoknak megfelelően tárolni (ld. agar, FCS stb.)
- Műanyag eszközök esetében igen lényeges ellenőrizni a felhasznált termék (plate, filter) anyagát, az esetleges bevonat képzéséhez használt nyersanyagot, pórusátmérő és denzitási adatok.

3.2 Sejtes frakciók

- Még a kísérletek megkezdése előtt fontos megbizonyosodnunk az alkalmazott módszer érzékenységéről, a minta milyen sejtszáma mellett kapható optimális eredmény. Általánosságban 10³-10⁶ sejt/ml denzitás közötti értékek preferáltak.
- A sejtes frakciók kísérlet előtti kezelése (centrifugálás, mosások) alapvetően meghatározhatja a sejtek migrációs képességét. Egyes esetekben a használt edények falának anyaga biológiailag aktív molekulák leadását indukálhatja (pl. üveg eszközök kemokinek és más citokinek leadását eredményezheti).

3.3 Kemotaxis kamrák használata

- Többször használatos kemotaxis kamrák esetében ellenőrizendő azok tisztasága, a szigetelő réteg pontos illesztése, valamint a lezárás tökéletes volta.
- A kamrák betöltésekor ügyelnünk kell a megfelelő számú minta és kontrolljaik ugyanazon kamrában történő elhelyezésére. Maga a minták elhelyezése is - bár néha hihetetlen - komolyan befolyásolhatja a kapott eredményeket. Az alábbiakban a 96 lyukú lemez néhány betöltési mintája látható:



Mint az ábrákból is látható (ld. A–B) már maga a 'vak" felhelyezésével is lényeges számú mintát nyerhetünk vagy veszíthetünk. Mivel igen gyakori a kamrák széli részének hő, fény és egyéb hatások miatti, a belsőbb terektől eltérő expozíciója, nem is beszélve a kamrák sarki részeinek megbízhatatlan voltáról, egyértelműen a 'B' variáns alkalmazását ajánljuk, és csupán nagyon indokolt esetben hagyatkozzunk az 'A' variánsra.

Azokban az esetekben, amikor az egy csoporthoz tartozó mintaszám 10 alatt is elfogadható, már felvetődik a soronkénti vagy oszloponkénti felvitel lehetősége is (C-D), azonban ezeknél a betöltéseknél is megfontolandó – a kamrán belül esetlegesen kialakuló gradiens ellenőrzése végett a kontroll anyag két ellentétes oldalon történő felvitele (D). Abban az esetben, ha két eltérő sejtpopulációt szeretnénk összehasonlítani (pl. előkezelt sejtek), szintén célszerű az ugyanazon kamrán belüli vizsgálat (E-F). Hangsúlyozzuk, hogy itt is célszerű törekedni a nagyobb mintaszám elérésére (F).

- Tartózkodjunk a filterek kézzel való érintésétől, ez meghatározatlan és a migrációt néha jelentősen befolyásoló anyagok (főleg lipidek) felvitelével járhat.
- Fontos megbizonyosodnunk arról, hogy a filterek felhelyezését követően nem maradnak-e buborékok az egyes kamrák felsőrészében, meggátolva ezzel a két kamra két folyadéktere közötti közvetlen kontaktus kialakulását.
- A felső kamra sejt-szuszpenzióval történő betöltésekor szintén figyelnünk kell, hogy a viszonylag szűk csatornában buborék ne maradjon. Ezt a problémát a minták furatfalra történő lassú fecskendezésével, valamint a kamra összeszerelése után gyengéd ütögetéssel megelőzhetjük.
- Az inkubációs idő alatt lényeges a sejtek számára optimális környezet (ld. 5% CO₂, 37 °C), valamint termosztátban való elhelyezéskor a kamra egyes pontjai egyenletes felmelegedésének biztosítása (ld. falaktól való távolság).
- Az inkubációs idő lejárta előtt kb. 15 perccel célszerű a kamra falainak enyhe ütögetésével elősegíteni a filter alsó oldalához tapadt sejtek leválását.
- A sejtek filterről való leválását tovább segíthetjük 1–2 mM EDTA/PBS alkalmazásával, melyet a kamrák felső tartályába cseppenthetünk, vagy a filterek eltávolítása előtt helyezünk a sejtmentessé tett filter felszínére.
- A kamra szétszerelésekor, illetve a filter leválasztásakor fontos, hogy a lehető legkisebb legyen az egyes alsó kamrák közötti anyagátmosódás. Ennek érdekében célszerű olyan lemezek alkalmazása, melyeknél a kamrák közötti tér üreges, meggátolva ezzel is az assay alatti, illetve azt követő mintaátmosódást.
- Fontos különbséget tennünk a magukban is nagy adhezivitást mutató sejtek és a szuszpenzióban növekvő tenyészetek között. Utóbbiak esetében célszerű a kemotaxis assay-t követően a lemezek centrifugálása (1500– 2000 rpm, 37 °C).
- A filterekben történő sejtszám meghatározást megelőzően lényeges a sejtes minta felőli oldal alapos sejtmentesítése.

- A polikarbonát filterekbe történt migráció hagyományos festéssel történő kiértékelésekor a sejteket tartalmazó lemezeket célszerű először ethanollal dehidrálni, majd xilollal kezelni. Utóbbi hatására a filterek átlátszóvá válnak, megfelelő festékkel festhetők és fénymikroszkópban kiértékelhetők.
- A filterekben történő sejtszám meghatározás esetén fontos, különösen összehasonlító vizsgálatok során azonos mikroszkóppal, azonos nagyítás mellett ugyanannyi látótér kiértékelése.
- Assay-t követően a filterek kezelésekor nem célszerű azok erős savakban történő áztatása.
- Kamrák tisztítására csak a gyártó cég által előírt anyagokat használjuk.

3.4 Agar-lemezes assay-k

- A kiöntött agar-lemezek 4°C-on, hűtőszekrényben, steril körülmények között tárolhatók (minimális hűlési idő 30 perc).
- Az előre elkészített/kiöntött agar-lemezeken az utolsó előkészítő lépést (vájatok, üregek készítése) célszerű a kísérletet közvetlenül megelőzően megtenni.
- A vájatok közötti minimális távolság 3-5 mm.
- Az inkubációs idő lejártával a kísérlet leállítására célszerű abszolút methanolt használni (3 ml-30 perc).
- A sejtek további fixálása 37%-os formaldehiddel történjen. Fenti két lépés az agaróz réteg rigiditását megnöveli és megkönnyíti annak eltávolítását a lemezről.
- A sejtek detektálására tetszés szerinti, azokat gyorsan festő eljárás megfelelő (pl. MGG).

3.5 Matrigel technika

- A Matrigel matrix idő előtti polimerizációját meggátolhatjuk a felolvadt gél jégen tartásával.
- Először egy 35 mm-es Petri-csésze alját fedjük kb. 300 μl Matrigel-lel, vigyázva a buborékmentes anyagfelvitelre.
- A polimerizáció 37°C-on 10 perc alatt következik be.
- A többször mosott sejtes mintát kb. 1.2 ml Matrigel-lel keverjük jégen.
- A sejt/gél keveréket az előkészített felszínre öntjük, a Petri-csésze folyamatos körkörös döntögetése közben.

- A sejteket tartalmazó film réteg polimerizációja 37°C-on. 15-30 perc alatt megy végbe.
- A kialakult gélt 1.5 ml tenyésztő médiummal fedjük és a sejteket 37°C-on tenyésztjük.

4 Hasznos adatok

Kemotaxis vizsgálatok modell-sejtjeinek átlagos sebessége (indukció nélkül)

Prokarióták [100]:

Pseudomonas aeruginosa	55.8 $\mu m/s$ (monotrich)
Escherichia coli	16.5 µm/s (peritrich)
Bacillus licheniformis	21.4 µm/s (peritrich)
Sarcina ureae	28.1 µm/s (peritrich)
Chromatium okenii	45.9 µm/s (lopotrich)
Thiospirillum jenense	86.5 µm/s (lopotrich)

Protozoonok [101-104]:

Csillósok	400-2000 µm/s
Ostorosok	20- 200 µm/s
Amőbák	5µm/s

Paramecium	1000 µm/s
Dictyostelium	10-12µm/min (!)
Chlamydomonas	1.6µm/s

Magasabb rendűek sejtjei [105,106]:

Neutrofil grc.	10–15 µm/min
Monocita	3−5 µm/min
Eozinofil grc.	0.75–1 µm/min
T limfocita	9–16 µm/min
Spermium (egér)	95–120 μm/s
Fibroblaszt	0.1–1.0 µm/min
Keratinocita	10 μm/min

VI. Források

A témában megjelnt összefoglaló publikációk

- I. Allavena P, Bianchi G, Sironi M, Garlanda C, Vecchi A, Mantovani A. Cytokine regulation of endothelial cells. In: Cytokine Cell Biology Ed. Balkwill F, Oxford University Press, Oxford, pp. 87-101 (2000).
- II. Van Damme J, Lenaerts J-P, Struyf S. Assays for leukocyte migration. In: Cytokine Cell Biology Ed. Balkwill F, Oxford University Press, Oxford, pp. 103–114 (2000).
- III. Wynter EA, Heyworth CM, Lord BI, Testa NG. Biological assays for haemotoetic growth factors.
 In: Cytokine Cell Biology Ed. Balkwill F., Oxford University Press, Oxford, pp. 115–135 (2000).
- IV. Haston WS, Wilkinson PC. Visual methods for measuring leukocyte locomotion. Methods in Enzymology 162, 17-38 (1988)
- V. Wilkinson PC. Micropore filter methods for leukocyte chemotaxis. Methods in Enzymology 162, 38-50 (1988)
- VI. Nelson RD, Herron MJ. Agarose method for human neutrophil chemotaxis. Methods in Enzymology 162, 50-59 (1988).
- VII. Gallin JI. Chromium-51 radioimmunoassay for chemotaxis. Methods in Enzymology 162, 59-64 (1988).
- VIII. Zigmond SH. Orientation chamber in chemotaxis. Methods in Enzymology 162, 65-72 (1988).
- IX. Ford-Hutchinson AW, Evans JF. Neutrophil aggregation and chemokinesis assays. Methods in Enzymology 162, 72-78 (1988).
- X. Daughaday CC, Bohrer AN, Spilberg I. Semiautomated measurement of neutrophil chemotaxis with an image analyzer. Methods in Enzymology 162, 79-85 (1988).
- XI. Lauffenburger DA, Tranquillo RT, Zigmond SH. Concentration gradients of chemotactic factors in chemotaxis assays. Methods in Enzymology 162, 85-101 (1988).
- XII. Boyle MDP, Lawman MJP, Gee AP, Young M. Measurement of leukocyte chemotaxis in vivo. Methods in Enzymology 162, 101–114 (1988).
- XIII. Hayashi H, Honda M, Mibu Y, Yamamoto S, Hirashima M. Natural mediators of leukocyte chemotaxis. Methods in Enzymology 162, 140-170 (1988).
- XIV. Marasco WA, Ward PA. Chemotactic factors of bacterial origin. Methods in Enzymology 162, 198–214 (1988).
- XV. Maderazo EG, Woronick CL, Ward PA. Inhibitors of chemotaxis. Methods in Enzymology 162, 223-235 (1988).
- XVI. Otterness IG, Moore PF. Carrageenan foot edema test. Methods in Enzymology 162, 320-327 (1988).
- XVII. Bailey PJ. Sponge implants as models. Methods in Enzymology 162, 327–334 (1988).
- XVIII. Frow EK, Reckless J, Grainger DJ. Tools for anti-inflammatory drug design: in vitro models of leukocyte migration. Med Res Rev. 24, 267–298 (2004).
- XIX. Decaestecker Ch, Debeir O, Van Ham Ph, Kiss R. Can anti-migratory drugs be screened invitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration. Medicinal Research Reviews 27, 149-176 (2007).
- XX. Auerbach R, Lewis R, Shinners B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: A critical

overview. Clin Chemistry 49, 32-40 (2003).

Web helyek

http://www.cellmigration.org/index.shtml

http://www.molecularstation.com/protocol-links/Immunology/chemotaxis/

http://parts.mit.edu/wiki/index.php/X-Y_chemotaxis

http://en.wikipedia.org/wiki/Chemotaxis_assay

http://www.neuroprobe.com/protocols/

http://faculty.washington.edu/afolch/FolchLabResearchProjects.htm

http://chemotaxis.usn.hu

Irodalmi hivatkozások

- 1 Engelmann TW. Bacterium photometricum. Ein. Beitrag zur vergleichenden Physiologic des Licht- und Farbensinnes. Arch Physiol. 30, 95-124. (1883).
- 2 Pfeffer W. Locomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize. Unter-. suchungen aus dem Botanischen Institut in Tiibingen 1, pp 363-482 (1884).
- 3 Jennings H S. Studies on reactions to stimuli in unicellular organisms. IV.-Laws of chemotaxis in paramecium. American J Physiol 2: 355-379 (1899).
- 4 Jennings H S. Behavior of the lower organisms. Columbia University Press, New York, (1906).
- 5 Mechnikov I. The Comparative Pathology of Inflammation (1892)
- 6 Harris H. Chemotaxis of granulocytes. J Pathology and Bacteriology, 66, 135–146 (1953)
- 7 Harris H. Chemotaxis of monocytes. Br J Exp Pathol.34: 276–279 (1953).
- 8 Adler J, Tso WW. Decision-making in bacteria: Chemotactic response of Escherichia coli to conflicting stimuli. Science 184, 1292-1294 (1974).
- 9 Bi E, Lutkenhaus J. FtsZ ring structure associated with division in Escherichia coli. Nature 354, 161-164 (1991).
- 10 van den Ent F, Amos LA, Löwe J Prokariótic origin of the actin cytoskeleton 413, 39-44 (2001).
- 11 Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR. Cell migration at a glance J Cell Sci. 118, 4917-4919 (2005).
- 12 http://micro.magnet.fsu.edu/cells/ciliaandflagella/images/ciliaandflagellafigure1.jpg
- 13 Frow EK, Reckless J, Grainger DJ. Tools for anti-inflammatory drug design: in vitro models of leukocyte migration. Med Res Rev. 24, 267–298 (2004).
- 14 Csaba G. Presence in and effects of pineal indoleamines at very low level of phylogeny. Experientia 49, 627-634 (1993).
- 15 LeRoith D, Shiloach J, Heffron R, Rubinovitz C, Tanenbaum R, Roth J. Insulin-related material in microbes: similarities and differences from mammalian insulins. Can J Biochem Cell Biol. 63, 839-49 (1985).

- 16 Csaba, G., Gaál, Annamária, Kovács, P., Simon, G. and Kőhidai, L. Prolonged elevation of insulin content in the unicellular tetrahymena after insulin treatment: induction of insulin production or storage? Cell Biochem. Function 17, 165–173 (1999).
- 17 Kőhidai, L. and Csaba, G. Effects of the mammalian vasoconstrictor peptide, endothelin-1, on Tetrahymena pyriformis GL, and the immunocytological detection of endogenous endothelin-like activity. Comp. Biochem. Physiol. 111C, 311-316 (1995).
- 18 Deftos LJ, LeRoith D, Shiloach J, Roth J. Salmon calcitonin-like immunoactivity in extracts of Tetrahymena pyriformis. Horm Metab Res. 17, 82-85 (1985).
- 19 Schwabe C, LeRoith D, Thompson RP, Shiloach J, Roth J. Relaxin extracted from pro- tozoa (Tetrahymena pyriformis). Molecular and immunologic properties. J Biol Chem. 258, 2778-2781 (1983).
- 20 Berelowitz M, LeRoith D, von Schenk H, Newgard C, Szabo M, Frohman LA, Shiloach J, Roth J. Somatostatin-like immunoactivity and biological activity is present in Tetrahymena pyriformis, a ciliated protozoan. Endocrinology. 110, 1939-1944 (1982).
- 21 Leroith D, Liotta AS, Roth J, Shiloach J, Lewis ME, Pert CB, Krieger DT. Corticotropin and beta-endorphin-like materials are native to unicellular organisms. Proc Natl Acad Sci U S A 79, 2086-2090 (1982).
- 22 Kőhidai, L, Kovács, P, Lázár-Molnár, E, Csaba, G. Presence, uptake and localization of an immunoreactively interleukin 6 (IL-6)-like molecule in Tetrahymena pyriformis. Cell Biol. Internat. 24, 749-755 (2000).
- 23 Csaba G, Kovács P. Lectins in the unicellular Tetrahymena. I. Lectin detection with FITClabeled anti-lectins. Acta Histochem. 73, 53-61 (1983).
- 24 Kovacs P, Muller WE, Csaba G. A lectin-like molecule is discharged from mucocysts of Tetrahymena pyriformis in the presence of insulin. J Eukariót Microbiol. 44, 87-91 (1997).
- 25 Kőhidai, L, Vakkuri, O, Keresztesi, M, Pállinger, É, Leppaluoto, J, Csaba, G. Melatonin in the unicellular Tetrahymena pyriformis: effects of different lighting conditions. Cell Biochem Funct. 20, 269-272 (2002).
- 26 Showell HJ, Freer RJ, Zigmond SH, Schiffmann E, Aswanikumar S, Corcoran B, Becker EL. The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils. J Exp Med. 143, 1154–1169 (1976)
- 27 Chenoweth DE, Hugli TE. Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 75, 3943-3947 (1978).
- 28 Ming WJ, Bersani L, Mantovani A. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. J Immunol. 138, 1469–1474 (1987).
- 29 Schall TJ. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. Cytokine. 3, 165–183 (1991).
- 30 Rot A, Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, Schall TJ, Dahinden CA. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. J Exp Med. 176, 1489-1495 (1992).
- 31 Leonard EJ, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Immunol. Today. 11, 97-101 (1990).
- 32 Schröder JM, Mrowietz U, Morita E, Christophers E. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. J Immunol. 139, 3474-3483 (1987).
- Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. J Clin Invest. 84, 1045-1049 (1989).
- Palmblad J, Malmsten CL, Uden AM, Radmark O, Engstedt L, Samuelsson B. Leukotriene B4 is

a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. Blood 58, 658-61 (1981).

- 35 Wardlaw AJ, Moqbel R, Cromwell O, Kay AB. Platelet-activating factor. A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. J Clin Invest. 78, 1701–1706 (1986).
- 36 McEwen BJ, Wilcock BP, Eyre P. The effect of leukotriene B4, leukotriene C4, zymosan activated serum, histamine, tabanid extract and N-formyl-methionyl-leucyl- phenylalanine on the in vitro migration of equine eosinophils. Can J Vet Res. 54, 400-404 (1990).
- 37 Kőhidai L, Bősze Sz, Soós P, Illyés E, Láng O, Mák M, Sebestyén F, Hudecz F. Chemotactic activity of oligopeptides containing EWS motif on Tetrahymena pyriformis. The effect of amidation of the C-terminal residue. Cell Biochem Funct 21, 113–120 (2003)
- 38 Kőhidai L, Török K, Láng O, Láng J, Sebestyén F, Mező G, Hudecz F. N-formil metionint tartalmazó kojugátumok kemotaktikus hatása Tetrahymena modellen. XII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, (2004).
- 39 Lauffenburger DA, Tranquillo RT, Zigmond SH. Concentration gradients of chemotactic factors in chemotaxis assays. Methods in Enzymology 162, 85-101 (1988).
- 40 Muto Y, Kőhidai L. Image analysis for recording cell locomotin. Bull. Coll. Gifu Univ 5, 87–93 (1999).
- 41 Van Houten J, Hansmal H, Kung Ch. Two quantitative assays for chemotaxis in Paramecium. J Comp Physiol. A 104, 211-223 (1975)
- 42 Koppelhus U, Hellung-Larsen P, Leick V. An improved quantitative assay for chemokinesis in Tetrahymena. Biol Bull. 187, 8-15 (1994).
- 43 Adler J. Chemoreceptors in bacteria. Science 166, 1588-1597 (1969).
- 44 Leick V, Helle J. A quantitative assay for ciliate chemotaxis. Anal Biochem. 135, 466-469, (1983).
- 45 Kőhidai L, Lemberkovits É, Csaba G. Molecule dependent chemotactic responses of Tetrahymena pyriformis elicited by volatile oils. Acta Protozool. 34, 181–185 (1995).
- 46 Lallier TE, Miner QW Jr, Sonnier J, Spencer A. A simple cell motility assay demonstrates differential motility of human periodontal ligament fibroblasts, gingival fibroblasts, and preosteoblasts. Cell Tissue Res. 328, 339-354 (2007).
- 47 Pratt BM, Harris AS, Morrow JS, Madri JA. Mechanisms of cytoskeletal regulation. Modulation of aortic endothelial cell spectrin by the extracellular matrix. Am J Pathol. 117,349-354 (1984).
- 48 Cai G, Lian J, Shapiro SS, Beacham DA. Evaluation of endothelial cell migration with a novel in vitro assay system. Methods Cell Sci, 22,,107–114 (2000).
- 49 Soon L, Mouneimne G, Segall J, Wyckoff J, Condeelis J. Description and characterization of a chamber for viewing and quantifing cancer cell chemotaxis. Cell Motil Cytoskel 62, 27–34 (2005).
- 50 Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. J Exp Med. 115, 453–66 (1962).
- 51 Repesh LA. A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion. Invasion Metastasis. 9,192-208 (1989).
- 52 Falk W, Goodwin RH, Leonard EJ. A 48 well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. J Immunol Methods, 33, 239–247 (1980).
- 53 Furie MB, Naprstek BL, Silverstein SC. Migration of neutrophils across monolayers of cultured microvascular endothelial cells. An in vitro model of leucocyte extravasation. J Cell

Sci. 88, 161–175 (1987).

- 54 Wilkinson PC, Lackie JM. The influence of contact guidance on chemotaxis of human neutrophil leukocytes. Exp Cell Res 145, 255–264 (1983)
- 55 Nelson RD, Quie PG, Simmons RL. Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. J Immunol 115, 1650-1656 (1975)
- 56 Kőhidai L. Method for determination of chemoattraction in Tetrahymena pyriformis. Curr Microbiol 30, 251-253 (1995).
- 57 Dvorak JA, Stotler WF. A controlled-environment culture system for high resolution light microscopy. Exp Cell Res. 1971;68:144-148.
- 58 Leick V, Koppelhus U, Rosenberg J. Cilia-mediated oriented chemokinesis in Tetrahymena thermophila. J Eukariót Microbiol. 41, 546-553 (1994).
- 59 Levine JA. The Development of a Smart[™] Matrix to Support Robust Fibroblast Migration. Thesis work. Biomedical Engineering, State University of New York, Stony Brook (2002).
- 60 Liotta LA, Thorgeirsson UP, Garbisa S. Role of collagenases in tumor cell invasion. Cancer Metastasis Rev. 1, 277–288 (1982). – Matrigel invasion
- 61 Furcht LT, Critical factors controlling angiogenesis: cell products, cell matrix, and growth factors. Lab Invest. 55, 505-509 (1986).
- 62 Pretlow TG, Delmoro CM, Dilley GG, Spadafora CG, Pretlow TP. Transplantation of human prostatic carcinoma into nude mice in Matrigel. Cancer Res. 51:3841-3847 (1991). Matrigel
- 63 Nicosia RF, Ottinetti A. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. Lab Invest 63,115-122 (1990).
- 64 Muthukkaruppan VR, Shinners BL, Lewis R, Park S-J, Baechler BJ, Auerbach R. The chick embryo aortic arch assay: a new, rapid, quantifiable in vitro method for testing the efficacy of angiogenic and anti-angiogenic factors in a three-dimensional, serum-free organ culture system. Proc Am Assoc Cancer Res 41, 65 (2000).
- 65 Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS, Martin GR. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. Lab Invest 67, 519–528 (1992).
- 66 Kragh M, Hjarnaa P–JV, Bramm E, Kristjansen PEG, Rygaard J, Binderup L. In vivo chamber angiogenesis assay: an optimized Matrigel plug assay for fast assessment of anti-angiogenic activity. Int. J Oncology 22, 305-311 (2003)
- 67 Zigmond SH. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. J Cell Biol. 75, 606–616 (1977).
- 68 Wilkinson PC. Assays of leukocyte locomotion and chemotaxis. J Immunol Methods 216, 139-153 (1998)
- 69 Zicha D, Dunn GA, Brown AF. A new direct-viewing chemotaxis chamber. J Cell Sci. 99, 769-775 (1991).
- 70 Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ, Mitchison TJ. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. BMC Biotechnology, 4:21 (2004).
- 71 Haston WS, Wilkinson PC. Visual methods for measuring leukocyte locomotion. Methods Enzymol. 162, 17-38 (1988)
- 72 Haribabu B, Zhelev DV, Pridgen BC, Richardson RM, Ali H, Snyderman R. Chemoattractant

receptors activate distinct pathways for chemotaxis and secretion. Role of G-protein usage. J Biol Chem. 274, 37087-37092 (1999).

- 73 Neils C M, Tyree Z, Finlayson B, Folch A. Combinatorial Mixing of Microfluidic Streams. Lab on a Chip 4, 342 (2004).
- 74 Frevert CW, Boggy G, Keenan TM, Folch A. Measurement of Cell Migration in Response to an Evolving Radial Chemokine Gradient Triggered by a Microvalve. Lab on a Chip 6, <u>849</u> (2006).
- 75 Kosar TF, Chen C, Stucky N, Folch A. Arrays of Microfluidically-Adressable Nanoholes. J Biomed Nanotechnology 1, 161 (2005).
- 76 Stucky N, Chen C, Kosar TF,Folch A. Fabrication of Microfluidically-Accessible Planar Nanoholes on Elastomeric Substrates. J Biomed Nanotechnology 1, 384 (2005).
- Zantl R, R\u00e4dler U, Horn E. Chemotaxis in µ-channels. Imaging and Microscopy 8, 30-32 (2006).
- 78 Giaever I, Keese CR. Micromotion of mammalian cells measured electrically. PNAS USA 88, 7896-900 (1991).
- 79 Hadjout N, Xinyun Y, Knecht D, Lynes M. Automated real-time meausrements of leukocyte chemotaxis. J Immunol Meth 320, 70-80 (2007).
- 80 Nakanishi J, Kikuchi Y, Takarada T, Nakayama H, Yamaguchi K, Maeda M. Photoactivation of a substrate for cell adhesion under standard fluorescence microscopes. J Am Chem Soc 126, 16314-16315 (2004).
- 81 Nakanishi J, Kikuchi Y, Takarada T, Nakayama H, Yamaguchi K, Maeda M. Spatiotemporal control of cell adhesion on a self-assembled monolayer having a photocleavable protecting group. Anal Chim Acta 578, 100-104 (2006)
- 82 Clément M, Rocher J, Loirand G, Le Pendu J. Expression of sialyl-Tn epitopes on b1 integrin alters epithelial cell phenotype, proliferation and haptotaxis. J Cell Sci, 117, 5059-5069 (2004).
- 83 Csaba G, Kovács P. Pheromone and insulin induced chemotaxis in Tetrahymena. Microbios 76, 35-39 (1993).
- 84 Edwards J, Sedgwick A, Willoughby D. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. J Pathol 134, 147–156 (1981).
- 85 Chu Y, Dietert RR. The chicken macrophage response to carbohydrate-based irritants: temporal changes in peritoneal cell populations. Dev Comp Immunol. 12, 109–119 (1988).
- 86 Bonasio R, Scimone ML, Schaerli P, Grabie N, Lichtman AH, von Andrian UH. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. Nature Immunology 7, 1092-1100 (2006).
- 87 Grinstein S, Woodside M, Waddell TK, Downey GP, Orlowski J, Pouyssegur J, Wong DC, Foskett JK. Focal localization of the NHE-1 isoform of the Na+/H+ antiport: Assessment of effects on intracellular pH. EMBO J. 2, 5209-5218 (1993).
- 88 Güvener ZT, Tifrea DF, Harwood CS. Two different Pseudomonas aeruginosa chemosensory signal transduction complexes localize to cell poles and form and remould in stationary phase. Mol Microbiol. 61, 106–118 (2006).
- 89 Wang J, He L, Combs CA, Roderiquez G, Norcross MA. Dimerization of CXCR4 in living malignant cells: control of cell migration by a synthetic peptide that reduces homologous CXCR4 interactions. Mol Cancer Ther 5, 2474–2483 (2006).
- 90 Roy P, Rajfur Z, Pomorski P, Jacobson K. 2002. Microscope-based techniques to study cell

adhesion and migration. Nat Cell Biol. 4, E91-E96.

- 91 Hulse D, Kusel JR, O'Donnell NG, Wilkinson PC Effects of anaesthetics on membrane mobility and locomotor responses of human neutrophils. FEMS Immunol Med Microbiol. 8, 241-248 (1994).
- 92 Roy P, Rajfur Z, Jones D, Marriott G, Loew L, Jacobson K. Local photorelease of caged thymosin beta4 in locomoting keratocytes causes cell turning. J Cell Biol. 153, 1035–1048 (2001).
- 93 Roy P, Rajfur Z, Pomorski P, Jacobson K. Microscope-based techniques to study cell adhesion and migration. Nat Cell Biol. 4, E91-E96 (2002).
- 94 Jay DG. Selective destruction of protein function by chromophore-assisted laser inactivation. Proc Natl Acad Sci U S A. 85, 5454-5458. (1988).
- 95 Wang FS, Wolenski JS, Cheney RE, Mooseker MS, Jay DG. 1996. Function of myosin-V in filopodial extension of neuronal growth cones. Science 273, 660-663 (1996).
- 96 Harris AK, Wild P, Stopak D. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. Science. 208, 177-179 (1980).
- 97 Dembo M, YL Wang. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. Biophys J. 76, 2307-2316 (1999).
- 98 Tan JL, Tien J, Pirone DM, Gray DS, Bhadriraju K, Chen CS. Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. Proc Natl Acad Sci USA. 100, 1484-1489 (2003).
- 29 Zinn K, DiMaio D, Maniatis T. Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human beta-interferon gene. Cell. 34, 865-879 (1983).
- 100 Vaituzis Z, Doetsch RN. Motility tracks: Technique for quantitative study of bacterial movement. Applied Microbiology 17, 584-588 (1969).
- 101 McNeill AR. The Invertebrates. London, Cambridge University Press, (1979).
- 102 Bray D. Cell Movements. New York, Garland, (1992).
- 103 Harris EH. The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. San Diego, Academic Press, (1989).
- 104 Prassler J, Murr A, Stocker S, Faix J, Murphy J, Marriott G. DdLIM is a cytoskeleton-associated protein involved in the protrusion of lamellipodia in Dictyostelium. Mol Biol Cell. 9, 545-559 (1998).
- 105 Ryschich E, Kerkadze V, Lizdenis P, Paskauskas S, Knaebel H, Gross W, Gebhard M, Büchler M, Schmidt J. Active leukocyte crawling in microvessels assessed by digital time-lapse intravital microscopy. J Surgical Research 135, 291–296 (2006).
- 106 Ulfman LH, Alblas J, van Aalst CW, Zwaginga JJ, Koenderman L. Differences in potency of CXC chemokine ligand 8-, CC chemokine ligand 11-, and C5a-induced modulation of integrin function on human eosinophils. The Journal of Immunology, 175, 6092-6099 (2005)
- 107 Frevert CW, Wong VA, Goodman RB, Goodwin R, Martin TR. Rapid fluorescence-based measurement of neutrophil migration in vitro. J Immunological Methods 213, 41-52 (1998).
- 108 Mazumder, R, Phelps, T.J., Krieg, N.R., Benoit, R.E. Determining chemotactic responses by two subsurface microaerophiles using a simplified capillary assay method. J. Microbiol. Meth. 37, 255-263 (1999).
- 109 Nie, FQ, Yamada, M, Kobayashi, J, Yamato, M, Kikuchi, A, Okano, T. On-chip cell migration assay using microfluidic channels. Biomaterials 28, 4017-4022 (2007).

Rövidítések jegyzéke

CAS, p130CAS (Crk-associated substrate) Crk, CT10 regulator of kinase; Eb1, end binding protein-1; Ena/VASP, Enabled/ Vasodilator activated phosphoprotein ERK, extracellular-regulated kinase FAK, focal adhesion kinase GIT, G protein coupled receptor interacting protein LIMK, LIM kinase mDia, mouse Diaphanous MHC, myosin heavy chain MLC, myosin light chain PAK, p21-activated kinase PDMS, poly-dimethylsiloxane PKC, protein kinase C WASP, Wiskott-Aldrich syndrome protein

WAVE/Scar, WASP-verprolin homolog/ Suppressor of cAMP receptor