

Gerics Balázs
2000

Tézisek

a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karának Anatómiai és Szövetani Tanszékén készült **doktori (Ph.D.) értekezéshez**, amelynek címe:

Az asztrociták sejtvezájának dinamikája és a gonadális szteroidok hatása

A központi idegrendszer sejtjes elemei, az idegsejtek, vagy neuronok, és a gliasejtek, vagy neuroglia egymással szoros kölcsönhatásban működnek. Jelen munkánkban a neuroglia egyik jellegzetes sejt típusának, az asztrocitának funkció-függő változásait vizsgáltuk. Érdeklődésünket ezen sejtek sejtvezája (cytoskeleton) keltette fel, amely elsősorban intermedier filamentumokból áll és amelynek az asztrociták strukturális stabilitásának megtartásában döntő szerepe van.

A cytoplasma fonalas elemeit már a XIX. században leírták. Az intracytoplasmátikus fonalas anyag szerepéről megfogalmazott első hipotézisek az izomszövet tanulmányozásán alapultak, hiszen az izomsejtekről már korán kiderült, hogy nagy mennyiségben tartalmaznak filamentumokat. Érthető módon ezen rostokat a motilitással hozták összefüggésbe. Elektronmikroszkópos vizsgálatok tanúsága szerint ezen anyag többféle intracytoplasmátikus rostok és csövek összessége, amelyek nem ágazódnak el és a cytoplasmában gyakran feltűnően rendezett, szabályos elrendezést mutatnak. Ez különösen markánsan jelentkezik az idegsejtek nyúlványaiban (axonokban és dendritekben), ahol a cytoplasma alkotóelemei csaknem a nyúlvány teljes hosszán végigfutó párhuzamos sávokba rendeződnek.

Az **idegsejtben (neuronban)** fellelhető cytoskeletális rostok sokasága miatt bevezették a neurofilamentum kifejezést, hogy megkülönböztessék ezeket a más sejtekben található hasonló elemektől, a microfilamentumoktól. A neurofilamentumok kialakításában az azonos fehérjecsaldhoz tartozó három fő fehérje („protein-triplet”) vesz részt, amelyek molekulásúlya 70, 130-150, ill. 200 kDa. A neurofilamentumok pontos szerepe még nem tisztázott, de leginkább passzív struktúráknak tekinthetjük őket, amelyek az axont stabilizálják és meghatározzák keresztmetszetét.

A **gliasejtek** csoportjai nagyban különböznek cytoskeletális elemeik jellege és mennyisége tekintetében. A klasszikus elképzelések szerint közös tulajdonságuk, hogy sejtvázuk inkább stabilizáló, semmint funkcionális jellegű. Az idegsejtektől eltérően azonban gliasejtek az érett idegrendszerben is képesek alak- és helyzetváltoztatásra, zsugorodásra ill. megnagyobbodásra stb., így várható, hogy a gliális sejtvázzal gyors adaptációs készséggel bír. Az idegsejtekkel összehasonlítva valóban helytálló ez a feltételezés. Míg a neuron sejtvázzát dinamikusabb (mikrotubulusok) és statikusabb (neurofilamentum) frakcióra bonthatjuk, a gliasejt cytoskeletális elemeinek összessége kifejezett reakcióképességgel rendelkezik, ami a szerkezeti és funkcionális változások követését teszi lehetővé. Az egyik gliasejt-típusban, az oligodendrocytában szinte kizárólag microtubulusok alkotják a sejtvázzát; a sejtmag körüli régióban találunk néhány rostot. Ezzel szemben az asztrociták nemcsak a perinukleárisan, szabálytalanul elhelyezkedő microfilamentumokkal, hanem a sejtmag közelében és a nyúlványokban egyaránt fellelhető, jellegzetes intermedier-filamentum-rendszerrel bírnak. Az asztrociták által szintetizált egyik fő strukturális fehérje a **savanyú gliális rostos fehérje (GFAP – glial fibrillary acidic protein)**.

Bár az asztrogliasejtvázzal tanulmányozható szövettényészetben, az ilyen *in vitro* rendszerekben az idegrendszeri környezet hiányzik, amely a glia és neuron kölcsönhatásából fakadó változások vizsgálatához elengedhetetlen. Organotipikus szövet szeletek tenyésztése inkább hasonlít az *in vivo* körülményekhez, mi azonban az asztrociták sejtvázzát *in situ*, természetes környezetében kívántuk vizsgálni. Ehhez természetesen olyan modellrendszert kellett választanunk, ahol az idegrendszer komplexitása nem fedi el a változásokat és amely modellben a reaktív asztrogliát jól megfigyelhetők. Az asztrociták lényegében egyenletes elosztást mutatnak a teljes agyban. Amennyiben ez a megállapítás helytálló, úgy a GFAP-immunreaktivitás feltérképezése sem mutathatna jelentős különbséget a fehér- és szürkeállomány vonatkozásában. A teljes agyról készített koronális sorozatmetszetek GFAP-immunfestése nem támasztotta alá ezt a feltételezést (hipotézist). Számítógépes képelemzés útján nyert adatok értékelése azt mutatja, hogy a szürkeállománnyal ellentétben a **fehérállományban alig észlelhető GFAP-immunfestés**. Másrészt az egyes **szürkeállomány-régiók GFAP-immunreaktivitása nagyon eltérő**, néhány területen nem is volt kimutatható.

Ezen különbségek újból felvetették az asztrociták esetleg **eltérő elhelyezkedésének kérdését**.

Különböző agyrégiók 25000 μm^2 nagyságú területein vettük számba az asztrocitákat. A neocortexben, ahol a GFAP-immunfestődés a rétegek között extrém eltérést mutatott 1635 asztrocitát számoltunk meg. A cortex teljes vastagságát három egyforma széles sávra osztottuk, amelyeket külső, középső és belső zónának nevezünk. Agykérgi rétegeztséget figyelembe véve ezek a zónák az I.-IV. rétegnek, az V. és VI. réteg külső részének ill. a VI. réteg belső részének felelnek meg. A mért területen az asztrociták 29,38%-a volt a külső, 38,63%-a a középső és 31,81%-a a belső zónában.

Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a GFAP-immunreaktivitást határozottan ill. gyengébben felmutató szürkeállomány-régiók között **nincsen jelentős, az asztrociták számát és sűrűségét érintő eltérés**. Ugyanakkor az asztrociták az érintett terület irányába kismértékben **elmozdulnak**.

GFAP-agytérképek elsősorban **hím** patkányok agyán készültek, **nőstényeken** végzett kísérletek esetében az immunfestődés nehezen volt előre meghatározható. Néhány nőstény agy egyáltalán nem mutatott festődést, míg a velük egy időben, azonos immunszérumokkal és reagensekkel párhuzamosan inkubált hím agyakon a várt immunreakció következett be. Más nőstények agya a hímekéhez hasonló GFAP-immunreaktivitást mutatott, de a festődés összességében kevésbé volt intenzív. Különböző nőstények agyában a reakció intenzitása jelentős eltéréseket mutatott, egyesek egyáltalán nem jelölődtek, míg mások többé-kevésbé markáns immunfestődést mutattak. Több kísérletsor után úgy gondoltuk, hogy nem csupán technikai jellegű eltérésről, hanem valódi szexuális dimorfizmusról lehet szó. A GFAP-immunreaktivitás nemi különbségét leírták már, de ezek az adatok elsősorban az endokrin hypothalamusból származnak, ahol ilyen jellegű nemi különbség nem meglepő. Az „endokrin agyon” kívüli területeken a GFAP szexuális különbségét közelebbről is meg kívántunk vizsgálni.

Jelen munkában **feltett kérdések** egyik csoportja azzal foglalkozik, hogy vajon **létezik-e az „endokrin agyrégiókon” kívül is** olyan terület, ahol az asztrogliá sejtváza **nemi különbségeket** mutat és hogy a nemi hormonok szintje vajon befolyásolja-e az asztrogliá sejtvezét ill. annak GFAP-immunfestéssel követhető reakcióját?

Modellként a középagyi nucleus interpeduncularis (**IPN – interpeduncular nucleus**) választottuk. Ez a mag kiemelkedően intenzív GFAP-festődés mutat, ugyanakkor nem áll közvetlen kapcsolatban az endokrin funkciókat szabályozó agyrégiókkal.

Nőstény patkányokban lényegesen gyengébb immunfestődés volt tapasztalható – úgy a mag központjában, mint perifériáján. Hímektől eltérően azonban a nőstények GFAP-immunreakciója igen jelentős egyedi eltéréseket mutatott, ami lehet nemi ciklusfüggő. Korábbi tapasztalatok alapján jó okunk volt feltételezni, hogy ezen természetes fluktuációk érintik az asztrociták sejtvezát. Mielőtt tehát az asztrogliareakciójában fellépő hormonfüggőséget tanulmányozhattuk volna a nőstényben természetesen fellépő, a szexuális szteroidok szint-ingadozása által előidézett sejtvezát-módosulásokat kellett leírnunk.

GFAP-antitestekkel végzett immunfestés csak kisebb, jelentéktelen változást mutatott metösztuszban ill. proösztusz kezdeti szakaszán lévő állat interpedunkuláris magjában. Minthogy ez a hypothalamusban talált eredményekkel teljesen megegyezett, a metösztuszban és proösztusz kezdeti szakaszában fellépő határozott GFAP-immunreakciót metösztusz-reakciónak neveztük. Az immunfestés alapján további különbségtétel nem lett volna megalapozott. Az előbbiekkal összevetve ösztuszban a GFAP-reakció intenzitása határozottan csökkent.

Metösztuzos állat interpedunkuláris magjában a GFAP-immunreakció egyenletes eloszlást mutat a mag teljes középponti részében. A centrális régiót egy fokozott intenzitású héj, vagy köpenyrész borítja, amiben asztrociták és az erek sorozatát övező perikapilláris asztrocitavégtalpak találhatóak. *Ösztuzos* állatból vett analóg metszeteken mind a mag centrális része, mind annak héja markánsan csökkent GFAP-szintet mutat. Megemlítendő, hogy a perikapilláris glia sejtvezáta nem követte a leírt ciklusos változást. Az egyes asztrociták szintjén megfigyelhető, hogy míg metösztuszban a GFAP-immunprecipitátum a sejtet, nyúlványait és annak elágazásait is jelöli, addig ösztuszban a festődés fragmentáltá, töredezetté vált, úgyhogy a sejtek nehezen körvonalazhatóvá váltak.

A vizsgálat előtt 4 héttel végzett *ovariectomia* jelentősen fokozta az interpedunkuláris magban észlelt GFAP-immunreakciót. Ez nem csupán a festődés intenzitására igaz, hanem az asztrocita nyúlványok is határozottabban, hosszabb szakaszon jelölődtek. A 4 hétnél hosszabb túlélési idő nem okozott további változást a GFAP-immunreaktivitás intenzitásában és kiterjedésében. A leírt változásokat számítógépes képelemzést is igazolta.

Hímekben is az *ivartalanítást* alkalmaztuk a nemi hormonok szintjének drámai megváltoztatására. Eredményeink azt mutatják, hogy kasztráció (kortól függetlenül) jelentősen csökkenti az interpedunkuláris magban fellépő GFAP-immunreakció intenzitását. A csökkenés észlelhető volt a herélést követő második héten és a 4. héten volt a legkifejezettebb. Az IPN középső és caudalis harmadából készített metszeteken a mag

centrális részében a csökkent GFAP-immunreaktivitás sejtszinten is kimutatható volt. Míg a kontroll interpedunkuláris nucleusban az asztrociták teljes egészükben jelölődtek, a herétekben a GFAP-immuncsapadék fragmentált volt: a nyúlványok csupán rövid szakaszait festette. A perikapilláris glia-borítást (az ér IPN-en belül elfoglalt helyzetétől függetlenül) nem módosította a kasztráció. A mag széli részén a laterális és dorsolaterális szubrégiók immunreaktivitását nem befolyásolta az ivartalanítás, míg a dorsomedialis subnucleus esetében mérsékelt csökkenés volt észlelhető. A herélést követő napon megkezdett *tesztoszteron-kezelés* kivédte a kasztráció okozta GFAP-immunreaktivitás csökkenését. A gonadektómiát követő 8 héten belül megkezdett tesztoszteron-adagolás még eredményes volt, míg a négy hónap után elindított helyettesítő hormonkezelés már alig volt hatásos.

Hím és nőstény patkányok agyának összevetése GFAP-t érintő nemi különbséget mutatott ki az interpedunkuláris magban – egy olyan agyrégióban, amelyik nem vesz részt hormonális folyamatok szabályozásában. Hormonmegvonás hímeiben drámaian csökkentette a GFAP-immunreaktivitást, míg kasztráltaknál alkalmazott hormonpótlás enyhítette a csökkenés mértékét. Nőstényekben ciklusfüggő volt a GFAP-jelölődés, ennek intenzitása ösztruszban volt a legalacsonyabb. Mindez azt mutatja, hogy a nemi hormonok jelenléte szükséges a normál GFAP-immunreaktivitás fenntartásához. Ílymódon a gonadális szteroidok mint az asztrociták sejtvezának aktiváló tényezői szerepelnek.

Az asztrociták sejtvezának fibrilláris elemeit mint „gliális rostokat” már a XIX. században leírták. Azt is megfigyelték, hogy ezen rostok igen dinamikusan reagálnak az asztrocita bármely funkcionális változására. Tömörülnek a sejt aktivált állapotában és visszahúzódnak a nyugalmi stádiumban. Leírták, hogy **agyi sérülésekre** a lézió körüli asztrociták megnagyobbodnak és citoplazmájukban rostos anyagot halmoznak fel, hogy a keletkezett teret kitöltsék, a sérült idegsejtek helyét elfoglalják. Ezért a fokozott GFAP-immunreaktivitás kimutatása a „reaktív gliózis” kórjelzésére használható. Az agyi sérülésre adott helyi, lokális glia-válaszon túlmenően megfogalmazódott a hipotézis, amely szerint a sérült agyrégió projekciós területén is várhatóak változások. Ezen jelenség leírására a „**távoli asztrogliaválaszt**” („**RAR –remote astroglial response**”) fogalmát vezették be.

Egy kísérletsorozatban **arra kerestünk választ**, hogy a GFAP-immunhisztokémia megfelelő módszer-e az asztrociták reakciójának nyomon követésére; hogy a távoli asztrogliaválaszt szinapszisok pusztulása váltja-e ki; hogy a GFAP-immunreaktivitásban észlelhető módosulások a fehérjeszintézis változását tükrözik-e, vagy a molekula

konformációs változását jelzik; hogy a sejtvez prolifrációja, vagy hipertrófiája bír-e elsődleges jelentőséggel és hogy a gonadális szteroidok befolyásolják-e a glia-reakció mértékét?

A modellként alkalmazott **genikulo-kortikális rendszer** ideálisnak tűnt céljainkra, hiszen az projekciáló idegsejtek könnyen hozzáférhetőek kísérletes léziók ill. stimulációk számára. Az occipitális kéreg az elsődleges látómezőt és társult régióit tartalmazza. Ezen terület afferensei a hátulsó thalamusból származnak. Az elsődleges látómező III.-IV. rétegében végződő idegsejtek a corpus geniculatum laterale-ban találhatóak. Minthogy a projekció szigorúan egyoldali, a sértéssel ellentétes oldal természetes kontrollként használható. Az ebben a rendszerben esetleg fellépő GFAP-immunreaktivitás egy körülhatárolt, GFAP-negatív területen jelentkezne, tehát akkor is jól felismerhető, ha az agyi sérülés mérete a **corpus geniculatum laterale (CGL)** dorsolateralis magját meghaladja (túllépi).

A CGL sztereotaxiás roncsolásával anterograd sejtpusztulást idéztünk elő. A projekciós területek asztrocitáinak változása igazolta a korábbi megfigyeléseinket, amely szerint anterograd (Waller-típusú) degeneráció esetén fellép a távoli asztrogliaválasz. Előkísérleteink a távoli asztrogliaválaszt kísérő látványos GFAP-immunreaktivitás-növekedést mutattak ki.

Az ellenoldali, kontroll kérgi területeken GFAP-jelölt asztrocitákat csupán a cortex külső és legbelső rétegeiben találunk, a középső rétegekben nem keletkezik immuncsapadék. A sértett, műtött oldalon a cortex egy ék alakú, az elsődleges látómezőnek megfelelő területén erőteljes GFAP-jelölődés látható, tehát a középső rétegekben is kimutathatóak intenzíven immunpozitív asztrociták. Ezt a jellegzetes távoli asztrogliaválaszt képanalízissel is igazolni tudtuk, és időbeli lefutása is megfelelt a jelenség korábban leírt jellegzetességének. Ennek értelmében a GFAP-immunreaktivitás növekedésének első jeleit a léziót követő harmadik napon észleltük, a reakció a 7. és 14. nap között volt a legintenzívebb, majd fokozatosan csökkent és három hónappal a sérülés után már nem volt GFAP-reakció a kéreg III.-V. rétegében – ami a lézió előtti állapotnak felel meg. Kivétel ez alól az említett rétegek nagyobb ereinek közvetlen környezete volt, ahol az immunreakció még a sértést követő 6. hónapban is kimutatható volt.

A GFAP-immunreakció tehát megbízhatóan jelzi a távoli asztrogliaválaszt, de csak az asztrociták sejt-testének, valamint nagyobb és közepes méretű nyúlványaiknak szintjén. A legkisebb, a szinapsziszokat övező nyúlványok térfogat-növekedéssel és glikogén-felhalmozással reagálnak a szinapszisz pusztulására. Ezen végső nyúlványok nem

tartalmaznak gliális rostokat, még távoli asztroglia-reakció esetén sem, tehát a GFAP-immunreakciót tisztán citoskeletalis jelenségnek tekinthetjük. Következésképpen a távoli asztroglia-válasz során észlelhető fokozott GFAP-immunreaktivitás a sejtvázasz hipertrófiáját tükrözi, ami a gliá-aktiválódás eredménye. A műtött oldalon határozottan megemelkedett az össz-GFAP mennyisége. Ez azt mutatja, hogy a távoli asztroglia-válasz (RAR) esetében az amúgy immunnegatív rétegek GFAP-festődésekor a fehérjeszintézis fokozódása az elsődleges az érintett területen. Levonható az a következtetés is, hogy a GFAP-immunnegatív régiókban ezen fehérje szintézise ill. össz mennyisége az immunhisztokémia érzékenységi küszöbét nem éri el.

Az **asztrocita-reakció jellegének** megítélése eltérő. Számos állítás szerint ebben a jelenségben az asztrociták proliferációja a meghatározó, míg más szerzők nem tudtak sejtszámnövekedést kimutatni. Ha a műtött oldal érintett agykérgében számoljuk meg az asztrocitákat, a három azonos szélességű sáv közül a külsőben láthatjuk az asztrociták 47,00%-át, a középsőben 32,24%-ukat, míg a legbelső rétegben a sejttestek csupán 19,70%-a található.

Ezen számokat összevetve a kontroll-oldal értékeivel (29,38%, 38,63% ill. 31,81%) megállapítható, hogy a távoli asztroglia-válasz által érintett területen a sejtszám növekedése helyett/mellett az **asztrociták átrendeződése**, a felsőbb rétegek irányába történő **elmozdulása** tapasztalható.

A gonadectomia nőstényekben megakadályozta a GFAP-immunreaktivitással kimutatható távoli asztroglia-válasz kialakulását. Hímekben a reakció kezdeti fázisát ugyan nem blokkolta a kasztráció, de az gyorsan csökkenő tendenciát mutatott. Ezáltal abban az időtartományban, amikor a gonadálisan intakt állatban a legintenzívebb a RAR-indukálta GFAP-immunreaktivitás, a herélten alig láttunk reakciót. A nem rostos citoskeletalis fehérjék (MAP2) és a riboszómához kötött fehérjék (tubulin, dystrophin) nem vesznek részt a gliális reakcióban.

A nemi hormonok megvonása gátolta a távoli asztroglia-válasz kialakulását. Ezen gátló hatás erőteljesebben érvényesült nőstényekben, mint hímekben. Az a tény, hogy a látókéreg asztrocitáinak sejtvázasz az állat hormonális állapotának függvényében másképpen reagál sérülésre, a gonadális szteroidok agyra gyakorolt hatásának az eddig gondoltnál kiterjedtebb voltát bizonyítják.

Végezetül, az agy lokális sérülésére adott, a projekciós területeket érintő távoli asztroglia-válasz (RAR) a jelenség holisztikus jellegét bizonyítja. A másodlagos

szinaptikus degeneráció közelében az asztrociták sejtváza hipertrófiát mutat. Ezen változás mértéke a nemi hormonok által befolyásolható.

Mindezek tükrében elképzelhető, hogy jelen eredményekből kiindulva az asztrociták reakciójának káros hatásai csökkenthetőek a nemi szteroidok szintjének változtatásával pl. agyi ödéma, fokális epilepszia és neurodegeneratív megbetegedések esetében.