

XXXII. OTDK Biológia Szekció

**Reaktív mikrogliózis immunhisztokémiai vizsgálata egér
III. és XII. agyidegének magjában**



Készítette: Barabási Beáta
Biológus szak, BSc III. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem
MTA SZBK Biofizikai Intézet

Témavezető: Dr. Hoyk Zsófia

Konzulens: Dr. Kis Zsolt

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
1.1 Neuron – mikroglia kölcsönhatás.....	3
1.2 Az ösztrogén szerepe az idegsejtek védelmében.....	4
1.3 A P2X7 receptor.....	6
2. CÉLKITŰZÉSEK	7
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	7
3.1. Kísérleti állatok	7
3.2. Műteti eljárások.....	7
3.2.1. Ovariektómia	7
3.2.2. E nukleáció	8
3.2.3. Nervus hypoglossus átvágás.....	8
3.3. Ösztrogén kezelés.....	8
3.4. Immunhisztokémia	8
3.4.1. Perfúzió	8
3.4.2. Metszés.....	9
3.4.3. Immunhisztokémiai jelölések.....	9
3.4.3.1. CD11b+ER β , illetve P2X7 receptor + NeuN fluoreszcens kettős immunjelölése.....	9
3.4.3.2. P2X7 egyszeres jelölés ABC módszerrel	10
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	11
4.1. A P2X7 receptor immunhisztokémiai lokalizálása	11
4.2. Az ER β immunhisztokémiai lokalizálása	20
5. ÖSSZEFOGLALÁS	25
IRODALOMJEGYZÉK.....	27
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	31

1. BEVEZETÉS

Franz Nissl és Santiago Ramón y Cajal kísérletei óta széles körben alkalmazzák az axotómiás modelleket a neurodegenerációs ill. regenerációs folyamatok tanulmányozására. Az ideg átvágását követően a sérült neuronokban az állat korától és a sérülés helyétől függően lassú degeneratív folyamatok indukálódnak, melyek az idegsejtek bizonyos százalékában a sejtek pusztulásához vezetnek, más sejtek viszont regenerálódnak (Koliatsos és Price, 1996). A neuronok túlélése, ill. pusztulása nem sejt autonóm folyamat, hanem a neuronok és a velük kommunikáló mikro- és asztroglia sejtek, sőt, a periféráról bevándorló immunsejtek együttes hatásának az eredménye (Clement és mtsai 2003, Kawamura és mtsai 2012, Raivich és mtsai 1998). A mikroglia-neuron kölcsönhatást számos tényező, többek között a neuroprotektív tulajdonsággal is rendelkező női nemi hormon, az ösztrogén is befolyásolja (Garcia-Segura és mtsai 2001, Crain és Watters, 2010). Munkám során a perifériás axotómiát követő mikroglia reakciót és neuronális változásokat, valamint ezek ösztrogénnel való kapcsolatát tanulmányoztuk egy purin receptor, a P2X7, és a β ösztrogén receptor (ER β) expresszió szempontjából a *nucleus oculomotorius* és a *nucleus hypoglossus* területén. A modellválasztást az indokolja, hogy a két mozgató agyideg magban eltérő az axotómiát követő reakció: a *nucleus oculomotorius* motoneuronjai sérülésre ellenállóak, míg a *nucleus hypoglossus* idegsejtei érzékenyen reagálnak az őket ért károsodásra (Obál és mtsai 2006, Kawamura és mtsai 2012).

1.1. Neuron – mikroglia kölcsönhatás

A mikroglia a gliasejtek különleges csoportját képezik, mivel a központi idegrendszer rezidens makrofágjainak tekinthetők. Azonban a mikroglia nem csak immunfunkciói vannak, hiszen a mikroglia sejtek és az idegsejtek dinamikusan kommunikálnak egymással, ami elengedhetetlen a központi idegrendszer fejlődésében és fenntartásában (Kettenmann és mtsai, 2011). Ez a kommunikáció kétoldalú: i) a neuronok képesek szabályozni a mikroglia állapotát és aktivitását, például fraktalkin, CD200, klasszikus neurotranszmitterek, komplement és purinerg szignalizáción át; ii) a mikroglia képes befolyásolni a neuronok elektrofiziológiai aktivitását, közvetlen fizikai kapcsolatban állhat szinapszissal és egyéb neuronális elemekkel, valamint pl. a DAP12 szignalizáción keresztül részt vehet a szinaptikus plaszticitásban. (Eyo és Wu, 2013).

A mikroglia fiziológiai körülmények között „nyugalmi” állapotban vannak, vékony nyúlványaikkal folyamatosan pásztáznak, tapogatnak, fizikai kapcsolatba lépnek az idegsejtekkel, és ha a fiziológiástól eltérő folyamatot érzékelnek, stimulálódnak. A mikroglia aktivációt több tényező váltja ki, pl. az idegsejtek elektromos aktivitásának megváltozása és/vagy sok ATP megjelenése az extracelluláris térben, amit a mikroglia sejtek purinerg receptoraikon (pl. P2X7) keresztül kötnek meg. Mikroglia stimulációkor egyrészt a sejtek morfológiájában, másrészt sejtfelszíni markereik expressziójában változások következnek be. A mikroglia sejtek osztódnak, nyúlványaik megvastagodnak, majd visszahúzódnak és amöboid formát vesznek fel. Fagocitotikus aktivitásuk fokozódik és számos citokint termelnek. A fagoszómákat tartalmazó előregedett mikroglia nagy része apoptózis során elpusztul, kisebb részük visszaalakul. A megmaradt mikroglia „remodelling” mikroglia lesznek, amik részt vesznek a szinaptikus kapcsolatok újraformálásában, és nyugalmi mikroglivá alakulnak vissza. A morfológiai átalakulásokat biokémiai változások kísérik, melyek többek között érintik bizonyos sejtfelszíni markerek fokozódását pl. CD11b, MHC II (Ladeby és mtsai 2005).

Az aktivált mikroglia hatása kétirányú lehet, ezért a makrofág polarizáció mintájára a reaktív mikroglia között is elkülöníthető klasszikus (M1) és alternatív (M2) polaritású sejt. Az M1 mikroglia létfontosságúak a mikroorganizmusok elleni védekezésben és a neurodegenerációs folyamatokat mozdítják elő. Az M2 mikroglia szerepet játszik a szöveti megújulásban, gyógyulásban, támogatják a mielin törmelékek fagocitózist, ami fontos a remielinizációban. A reaktív mikroglia során az M1 és M2 aktivált mikroglia sejtek aránya változhat (Goldman és Prinz, 2013, Hu és mtsai, 2012).

Sérüléskor nem csak a mikrogliaiban következnek be génexpressziós változások, hanem a neuronokban is, pl. *nucleus hypoglossusban* a NeuN (Obál és mtsai 2006) és CGRP (Mader és mtsai, 2004), a *bulbus olfactoriusban* a tirozin-hidroxiláz (Baker és mtsai, 1983) expressziója csökken, az agykéregben az ösztrogén α receptoré fokozódik, míg az ösztrogén β receptoré csökken (Dubal és mtsai, 1999).

1.2. Az ösztrogén szerepe az idegsejtek védelmében

Az ösztrogén egy szteroid hormon, amely a felnőtt szervezetben, a petefészekben és a méhlepényben termelődik. A legfontosabb női nemi hormon, klasszikus szerepe a másodlagos női nemi jellegek kialakítása és a menstruációs ciklus szabályozása. Három fő fajtája: az ösztroon, az 17 β -ösztradiol és az ösztriol.

Az ösztrogének nem csak a másodlagos női nemi jellegek kialakításában vesznek részt, hanem számos más folyamatban is, például a csöves csontok érésében és növekedésében, a cukor anyagcserében, a szív- és érrendszer, sőt, az idegrendszer működésében. Az ösztrogénhiány emiatt összefügghet a csontritkulás, II. típusú cukorbetegség, szív működési zavarok és több neurológiai és mentális betegség kialakulásával is a menopauzát követően (Nelson és mtsai 2013, Murphy 2011, Garcia-Segura 2008, Garcia-Segura és mtsai, 2001).

Neurobiológiai szempontból lényeges, hogy az ösztrogének nem csak a szaporodásban részt vevő szervekben termelődnek, hanem az idegrendszer sejtjei is képesek ösztrogéneket szintetizálni. Így az idegrendszerre gyakorolt ösztrogén hatás nőstényekben egyrészt a keringő vérből származó ösztrogénekből (neuroaktív ösztrogén), másrészt az idegrendszerben termelődő ösztrogénekből (neuroszteroid típusú ösztrogén) adódik (Garcia-Segura és Melcangi, 2006). Felnőtt hímekben a neuroszteroid ösztrogén hatással kell számolni.

Az ösztrogének, csak úgy mint, az összes szteroid hormon, képesek átjutni a sejtek határolóhártyáin. Hatásukat a hormon érzékelésére képes jelfogó molekulákhoz, vagyis receptorokhoz való kötődés révén fejtik ki. Az ösztrogén receptorok két fő típusa a ligand aktivált transzkripciós faktorként is működő ER α és ER β . Az ösztrogénnek az idegrendszerben sokrétű védő, azaz neuroprotektív hatását írták le a szakirodalomban. Az ösztrogén védelmet biztosít az idegsejteknek traumás agyi sérülés, gerincvelői sérülés, ischaemiás sérülés, valamint neurodegeneratív betegségek során. (Sribnick és mtsai, 2003, Nilsen és Brinton, 2004, Soustiel és mtsai, 2005, Gerstner és mtsai, 2009). Továbbá erős antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatása is ismert. Csökkenti a gyulladáscsökkentő citokinek (interleukin-1, interleukin-6, TNF α) (Gatson és mtsai, 2009) termelését. Meg tudja akadályozni az intracelluláris szabad Ca²⁺ növekedését és az apoptózist (Sur és mtsai 2003, Sribnick és mtsai 2004), fokozza a sejtek túlélését segítő gének expresszióját (Das és mtsai 2011). Befolyásolja bizonyos neurotranszmitterek, pl. dopamin, szerotonin (Izumo és mtsai, 2012), acetilkolin (Miller és mtsai, 1999) szintjét. Az ösztrogén receptorok nem csak közvetlenül befolyásolhatják egyes gének transzkripcióját, hanem nem genomikus hatásuk is jelentős: kapcsolatba léphetnek egyéb transzkripciós faktorokkal (AP-1, NF- κ B), valamint különböző kinázokon (pl. MAPK) keresztül a másodlagos hírvivő rendszerek működését is megváltoztathatják (Azcoitia és mtsai, 2002). A számos gén között, melyek transzkripcióját az ösztrogén befolyásolja, megtalálhatók makrofágokra és mikroglia sejtekre specifikus gének is (pl. Cd11b, Iba-1). Figyelmet érdemel, hogy a neuroprotektív folyamatokat előmozdító M2 polaritású mikroglia jellemező Mrc1 gén expresszióját az ösztrogén mindkét receptorán keresztül fokozza (Sárvári és mtsai 2014).

Az irodalmi adatok szerint az ösztrogén mikrogliaára kifejtett hatása túlnyomó részben az ER α -on keresztül nyilvánul meg, de vannak olyan eredmények is, melyek arra utalnak, hogy az ER β is expresszálódik mikrogliaában. Az ER β jelenlétét mikroglia tenyészetben egyértelműen kimutatták, azonban szövettani metszeten eddig csak patológiás körülmények között írták le, egészséges mikrogliaában nem (Wu és mtsai, 2013).

1.3. A P2X7 receptor

A P2X7 receptor a purinerg receptorok családjába tartozó ionotrop ATP receptor, mely 3-6 alegységből tevődik össze. Az alegységek két transzmembrán doménből állnak, az őket összekötő extracelluláris hurkon található az ATP kötő hely. A P2X7 receptor aktiválódáskor nem szelektív kation csatornaként működik. 100 μ M – 10 mM ATP hatására aktiválódik. ATP ilyen nagy koncentrációban extracellulárisan csak valamilyen sérülés esetén fordul elő. Sokáig kötve ATP-t a nem szelektív kation csatornán keresztül Ca²⁺ áramlik be a sejtbe és apoptotikus útvonalak lépnek működésbe. Ez minden olyan sejt pusztulásához vezet, melyen a P2X7 receptor tartósan aktivált állapotban van (Matute és mtsai, 2007, Diaz-Hernandez és mtsai, 2009, Kim és mtsai, 2011, Harada és mtsai, 2011, Arbeola és mtsai, 2012). A P2X7 receptort mikrogliaán mutatták ki először (Ferrari és mtsai, 1996), majd asztrogliaán is (Ballerini és mtsai, 1996), később pedig bizonyították, hogy idegsejt is termeli (Brandle és mtsai, 1998). A XII. agyideg magban a preszinaptikus terminálon detektálták, ahol fiziológias körülmények között a serkentő neurotranszmitter felszabadulás elősegítésében játszott szerepét írták le (Deuchars és mtsai, 2001). A P2X7 receptor működésével glutamát és ATP felszabadulás is összefügg. További lényeges szerepe az aktivált mikroglia osztódásának, valamint a mikroglialis IL-1 β éréseinek és felszabadulásának előmozdítása (Duan és Neary, 2006, Domercq és mtsai, 2013). Részt vesz továbbá olyan transzkripciós faktorok (NF-KB, NFAT) aktiválásában, melyek számos gyulladást elősegítő fehérjét kódoló gént hoznak működésbe (Crain és Watters, 2010). A receptor elsősorban a neurodegenerációs folyamatokban betöltött szerepe miatt került az utóbbi időben az érdeklődés előterébe, ugyanis expressziója fokozott különböző neurodegenerációs betegségekben pl. ALS, Alzheimer-kór (Crain és Watters, 2010) és a P2X7 receptor működését specifikus antagonistákkal gátolva csökkenthető a neuronok pusztulása (Yiangou és mtsai, 2006).

2. CÉLKITŰZÉSEK

A sérülésre ellenálló motoneuronokat tartalmazó III., és a sérülésre jelentős sejtpusztulással reagáló XII. agyideg magjában lejátszódó neuronális és mikroglia változások immunhisztokémiai vizsgálata a perifériás axotómiát követő első négy napban a következő két szempontból:

1. P2X7 receptor expressziójának immunhisztokémiai vizsgálata axotómia és 17β -ösztradiol kezelés függvényében.
2. Az ER β immunhisztokémiai lokalizálása, különös tekintettel az esetleges mikrogliaiban történő expresszióra.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

Az állatok, amelyekkel dolgoztunk, 2 hónapos nőstény egerek, a Balb/C törzsből. Tartásuk a következőképpen zajlott: 12 óra fény és 12 óra sötét váltotta egymást, ételt és vizet mindig kaptak, amennyire szükségük volt. Három nagyobb kísérleti csoportba osztottuk az állatokat:

- a) kontroll, azaz ovariectomizált, álműtött
- b) ovariectomizált és axotomizált
- c) ovariectomizált, axotomizált és ösztrogénnel kezelt egerek.

A perifériás axotómiát az egerek egy részénél a jobb szem enukleációjával, másik részükénél a *n. hypoglossus* átvágásával valósítottuk meg. Műtét után egy és négy napos túlélési időt követően végeztük el a perfúziót. Valamennyi kísérleti csoportban öt állatot vizsgáltunk.

3.2. Műtéti eljárások

3.2.1. Ovariectómia

Az állatokat intraperitonealisan (i.p.) adott 2%-os tribromoetanol (Aldrich) segítségével (25 mg /100 g testsúly) altattuk el. Alapos megfigyelés után, mikor az állat mély altatásban volt, a hátán gerincvonalban leborotváltuk a szőrt, majd kb. 2 cm-es metszést ejtettünk a gerinc vonalában figyelve a hárttyák átvágására is, hogy széthúzhassuk a bőrt. Az állat oldalra fektetése után picit bemetszést ejtettünk a hasfalra, a rózsaszínes petefészket megkerestük, majd eltávolítottuk, végül összevarrtuk a vágást. Ezt mindkét oldalon elvégeztük, majd az állat hátát 2-4 öltéssel összevarrtuk, és felébredésig az egereket infralámpa alá helyeztük. Az ovariectómia elvégzése után egy hónapig hagytuk regenerálódni állatainkat, mialatt az ösztrogén hormon kiürült a szervezetükből.

3.2.2. E nukleáció

Mindegyik állatnál a jobb szemet távolítottuk el. Az eljárás az altatással kezdődött, szintén i.p. adott 2%-os tribromoetanollal. Miután megállapítottuk, hogy biztosan alszik az állat és nem érez semmit, enyhén oldalra fordítva az egeret, a jobb szemgolyót csipesszel enyhén kiemeltük és átvágtuk valamennyi külső szemmozgató izmot és a látóideget, majd eltávolítottuk a szemgolyót. Tamponáltunk, majd egy öltéssel összevarrtuk a sebet. Infrolámpa alá helyezve hagytuk pihenni és ébredeni az állatokat. Az álműtött állatokat elaltattuk, de az enukleációt nem végeztük el.

3.2.3. Nervus hypoglossus átvágás

A műtéti sorozat utolsó lépése volt a *n. hypoglossus* átvágása, amit mindig baloldalon végeztünk el. Az altatás ebben az esetben is 2%-os tribromoetanollal (i.p.) történt. Miután megbizonyosodtunk az állat mély alvásáról, kirögzítettük egy deszkára. A nyakon leborotváltuk a szőrt, hogy hozzáférhessünk a bőrhöz, ahol kisebb vágást ejtettünk, a légcső mellett a fül magasságában. A továbbiakban operáló mikroszkóp alatt folytattuk a műtétet. Megkerestük az izmok és az ín alatt a nyelvmozgató ideget, az elágazódás alatt eltávolítottuk egy kb. 1 mm-es darabját, majd egy-két öltéssel összevarrtuk seb nyílását. Infrolámpa alatt pihentek és ébredtek az állatok.

Az álműtött állatok nyakát mély altatásban bemetszettük, de a XII. agyideget nem vágtuk át.

3.3. Ösztrogénkezelés

Minden axotomizált csoportban az egerek egyik fele a műtét után egy órával ösztrogén injekciót (25µg/ 100g testsúly 17β-ösztadiol (Sigma) 20% 2β-hidroxi ciklodextrinben (Merck), i.p.) kapott, az állatok másik felének csak az oldószert injektáltuk.

3.4. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémia az immunbiológiai módszerek családjába tartozik. Az eljárás célja, hogy specifikusan kimutathatóvá és vizsgálhatóvá tegyen bizonyos fehérje, lipid vagy szénhidrát molekulát szöveteken vagy sejteken belül. Az eljárás alkalmazása előtt a szövetet vagy sejteket, megfelelő rögzítőszer segítségével fixálni kell.

3.4.1. Perfúzió

Az egereket ismét 2%-os tribromoetanollal altattuk el, a hasüregbe injektálva. Fatáblára kirögzítettük az állatokat, felnyitottuk a mellkast, a bordákat és a rekeszizmot átvágva eljutottunk a szívhez. Szabaddá tettük a hozzáférést a még dobogó szívhez, és peánnal

megfogva a gerinc vonalába állítottuk, egyenesen, majd a csücskétől picit jobbra szúrtuk be a kanült szintén gerincvonalban egyenesen tartva. Az aortába kellett érkeznie a kanülnek, hogy át tudjuk mosni az ereket. Ollóval vágást ejtettünk a jobb pitvaron, majd mosó pufferrel (fiziológiás sóoldat 0,01M-os foszfát pufferben, pH 7,4) teljesen kimostuk az érrendszerből és a szívből a vért. A máj fehéredéséből nagyon jól lehetett követni a művelet sikerességét. Végül a fixáló oldatot (frissen elkészített 3%-os paraformaldehid, 0,1M-os foszfát pufferben, pH 7,4) folytattuk a szíven keresztül az erekbe, míg az állat megmerevedett. Ezt követően levágtuk a fejet, és óvatos mozdulatokkal lebontottuk az agyról a koponyacsontokat, az agyat kivettük a koponyából és 4 °C-on tartott fixáló oldatba helyeztük. Négy óra elteltével az agyat 30 %-os cukoroldatba raktuk át krioprotekció céljából, és a szövet telítődéséig 4 °C-on ebben tároltuk.

3.4.2. Metszés

Miután elvégeztük a preparálási folyamatot, az így kapott fixált agyakat fagyasztó mikrotómmal metsztük. Az agyon bemetszéssel megjelöltük a műtött oldalt, majd 30 µm vastag sorozatmetszeteket készítettünk a III. és a XII. agyideg mag teljes hosszában. A metszés során végig fénymikroszkóp segítségével követtük, pontosan hol kezdődik és hol ér véget a mag.

3.4.3. Immunhisztokémiai jelölések

3.4.3.1. *CD11b + ERβ, illetve P2X7 receptor + NeuN fluoreszcens kettős immunjelölése*

Jelölni kívánt metszeteink kiválasztása után 3x10 perces pufferes (0,01M PBS) mosás következett, majd 1 órán át inkubáltunk 2 %-os normál ló szérumot (NHS, Sigma), 0,3 % marha szérum albumint (BSA, Sigma) és 0,01M PBS-t tartalmazó oldattal, hogy az aspecifikus fehérje kötőhelyeket telítsük. Ezt követően a megfelelő hígítású elsődleges antitesttel inkubáltuk a metszeteket szobahőn egy éjszakán át (CD11b 1:500, AbD Serotec, és P2X7 1:500, AbD Serotec, mindkettő a blokkoló oldattal hígítva). Másnap újabb 3x10 perces pufferes mosással folytattuk, majd a primer antitesteknek megfelelő másodlagos antitesttel inkubáltuk a metszeteket. A CD11b és a P2X7 is patkányban termelt, ezért a szekunderük számárban termelt anti-patkány, mely Alexa647 fluorofórral volt kapcsolva (1:300 Alexa 647 anti-rat IgG, Jackson ImmunoResearch, a blokkoló oldattal hígítva). Ez piros színben fluoreszkál.

Két óra inkubálási idő után átmostuk a metszeteket 3x10 percre, majd elkezdtük a másik kimutatandó antigén, vagyis a CD11b-t felismerő primerrel inkubált metszeteknél az ER β receptor, illetve a P2X7-et felismerő elsődleges antitesttel reagáltatott metszeteknél a NeuN jelölését. Ezúttal egy órán át blokkoltunk 5% normál kecske szérummal (NGS, Sigma, 0,3% BSA és 0,01M PBS-ben, pH 7,4) majd a primer antitesttel (ER β 1:100, Santa Cruz Biotechnology, ill. NeuN 1:1000, Millipore, a blokkoló oldattal hígítva) következett egy éjszaka inkubálás. Harmadnap 3x10 perces mosással indítottunk, majd két óra inkubálás történt a megfelelő másodlagos antitestekkel. Az ER β antitestet nyúlban termelték, így a szekundere kecskében termelt anti-nyúl IgG, melynek fluorofórja a zöld színben fluoreszkáló DyLight488 volt. A NeuN antitestet egérben termelték, a hozzá kapcsolódni képes másodlagos antitestként kecskében termelt anti-egér IgG-t használtunk, melyhez szintén DyLight488 fluorofórt kapcsoltak (DyLight488 anti-rabbit IgG 1:100, ill. DyLight488 anti-mouse IgG 1:100, Jackson ImmunoResearch, a blokkoló oldatban hígítva). Végül 3x10 percre mostuk a metszeteket, majd öt percre kezeltük őket 300 nM DAPI (Sigma)-val 0,01M PBS-ben. A DAPI sejtmag jelölésre használatos, DNS-hez kötődő molekula, mely UV fényben gerjesztve kék színben fluoreszkál. A nem kötődött DAPI-t újabb 3x10 perces mosással távolítottuk el, majd a metszeteket felhúztuk tárgylemezre, lefedtük Confokál Matrix-szal (MicroTech Lab), és konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk őket.

3.4.3.2. P2X7 egyszeres jelölés ABC módszerrel

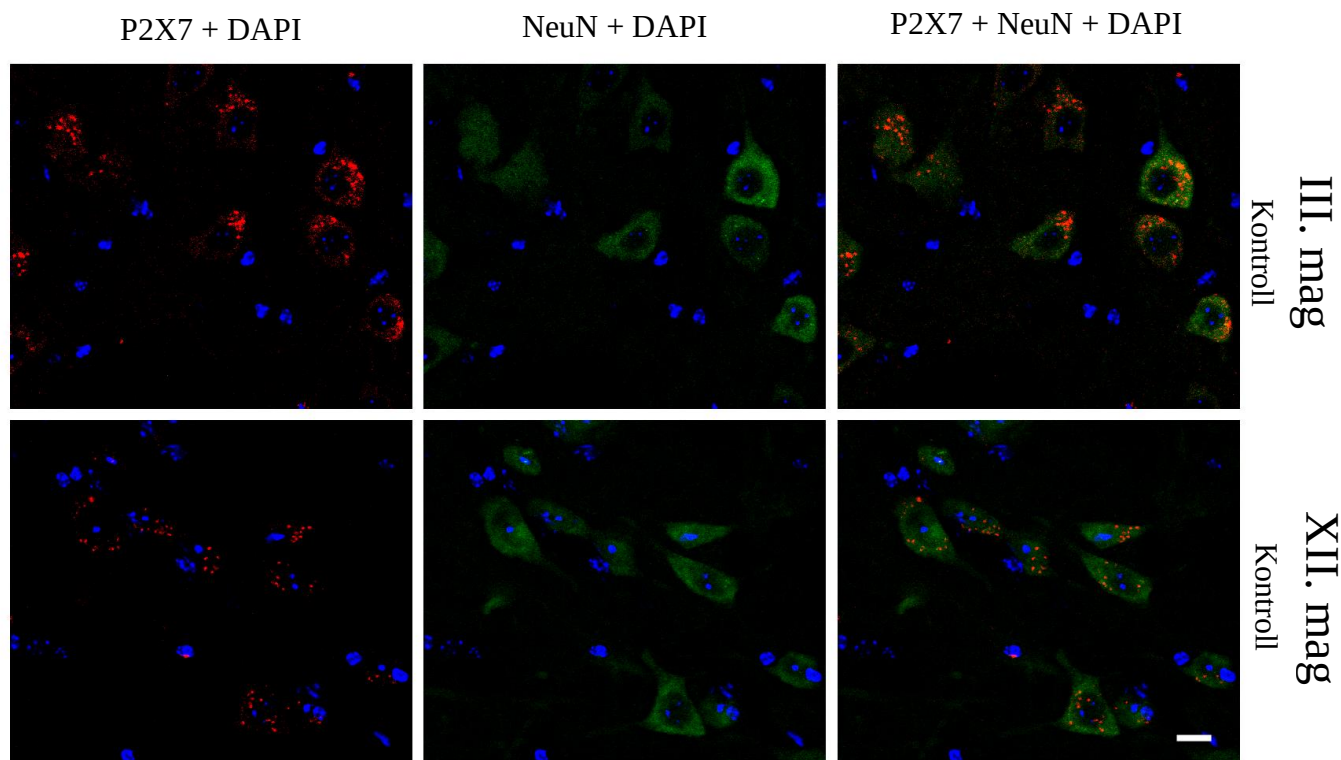
Miután kiválogattuk a metszeteinket, először 0,01M foszfát pufferrel mossuk őket 3x10 percre, majd 20%-os metanol (Molar) és 3%-os H₂O₂-t (Sigma) tartalmazó oldattal kezeltük 15 percre. Ezzel egyrészt feltártuk a szövetet, másrészt telítettük a szövetben esetleg előforduló endogén peroxidázt. Ezután 3x10 perces mosás következett 0,3% marha szérum albumint (BSA, Sigma) tartalmazó 0,01M foszfát pufferrel, így már a mosással megkezdjük az aspecifikus fehérje-fehérje kötések telítését, majd a másodlagos antitestet termelő állatnak megfelelő normál szérummal, esetünkben normál ló szérummal egy órás inkubálás alatt blokkoltuk az aspecifikus kötések (2%-os NHS, 0,3% BSA, 0,01M foszfát puffer). Ezt követően az elsődleges antitesttel, vagyis a P2X7 receptort felismerő primerrel (P2X7 1:500, AbD Serotec, a blokkoló oldatban hígítva) inkubáltunk egy éjszakán át szobahőn. A második napon 3x10 percre mostuk a metszeteket, majd újabb inkubálás következett két órán át szárazon termelt biotinált anti-patkány másodlagos antitesttel (biotinált anti-patkány IgG 1:1000, Jackson ImmunoResearch, a blokkoló oldattal hígítva). Ezt követően 3x10 percre

mostunk, majd újabb két órás inkubálást végeztünk, immáron avidin-biotin komplex-szel (ABC, Vector, A 1:250, B 1:250, a blokkoló oldattal hígítva). Tehát az antigénekhez kötődtek a primer antitestek, utóbbiakhoz a szekunder antitestek, a másodlagos antitesthez pedig biotinon keresztül az avidin. Az avidint, melynek négy biotin kötőhelye van, peroxidáz enzimmel kapcsolt biotinnal reagáltattuk, majd a kialakult ABC komplex-szel kezelve a metszeteket peroxidáz enzimet kapcsoltunk a másodlagos antitesthez. Végül 3x10 perces mosást követően kromogének (3,3 diamino-benzidin, Sigma, és NiCl_2 (Sigma) jelenlétében hozzáadtuk a rendszerhez a peroxidáz szubsztrátját, a H_2O_2 -ot. A peroxidázos reakció a kromogénekből sötét színű oldhatatlan csapadékot képez, mely láthatóvá teszi a kimutatandó antigén lokalizációját. Az előhívási reakció után újabb 3x10 perc mosást végeztünk, majd a metszeteket zselatinózott tárgylemezre húztuk fel. Egy éjszaka száradás után lefedtük őket alkoholos víztelenítés és xilolos kezelés után Entellan-nal (Merck), majd hagyományos fénymikroszkóppal elemeztük az immunjelölést.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. A P2X7 receptor immunhisztokémiai lokalizálása

Első kísérlet sorozatunkban a P2X7 receptor expresszióját vizsgáltuk meg egér III. és XII. agyideg magjában. Kiindulási hipotézisünk a P2X7 receptor sejtpusztító folyamatokban betöltött szerepe alapján az volt, hogy a két agyideg mag motoneuronjainak sérülést követő eltérő reakciója a P2X7 receptor expresszióban is megmutatkozhat. Mivel az irodalmi adatok a XII. magban elsősorban neuronális expresszióra utalnak (Deuchars és mtsai, 2001, Ireland és mtsai, 2004, Yu és mtsai, 2008), az általánosan elfogadott neuronális marker NeuN-nel történő P2X7 kolokalizációt analizáltuk P2X7 és NeuN fluoreszcens kettős immunjelölt metszeteken konfokális mikroszkóp segítségével. Kontroll állatokban a szakirodalomban publikált eredményekkel összhangban a *nucleus hypoglossus*-ban neuronális jelet detektáltunk. A P2X7 receptor *nucleus oculomotorius*-ban történő expresszióját eddig nem dokumentálták. Jelen vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy a III. agyideg magjában a XII. maghoz hasonló neuronális P2X7 expresszió mutatható ki (1. ábra).



1. ábra. P2X7 receptor (piros) és NeuN (zöld) fluoreszcens kettős immunjelölés DAPI sejtmagfestéssel (kék) kontroll nőstény egér III és XII. agyideg magjában. Lépték: 10 μ m

A XII. magban elektronmikroszkópos (Deuchars és mtsai, 2001) és elektrofiziológiai (Ireland és mtsai, 2004) vizsgálatok szerint a P2X7 receptor a serkentő preszinaptikus terminálokban lokalizálódik, és részt vesz a neurotranszmitter felszabadulásban. Saját eredményeink a III. agyideg magjában írják le a P2X7 receptornak a XII. magban tapasztaltakkal megegyező morfológiájú neuronális expresszióját. Azonban ennek pontos lokalizációja, valamint funkciója a P2X7 + NeuN fluoreszcens kettős immunhisztokémiai jelölés konfokális mikroszkópos analízisével nem állapítható meg. Annak eldöntése, hogy a *nucleus oculomotorius*-ban kimutatott P2X7 receptor a XII. maghoz hasonlóan a serkentő preszinaptikus terminálokban expresszálódik-e, elektrofiziológiai vizsgálatokkal és elektronmikroszkópos, vagy szuper rezolúciós lokalizációs mikroszkópiával lehetséges, melyek elvégzését a jövőben tervezzük.

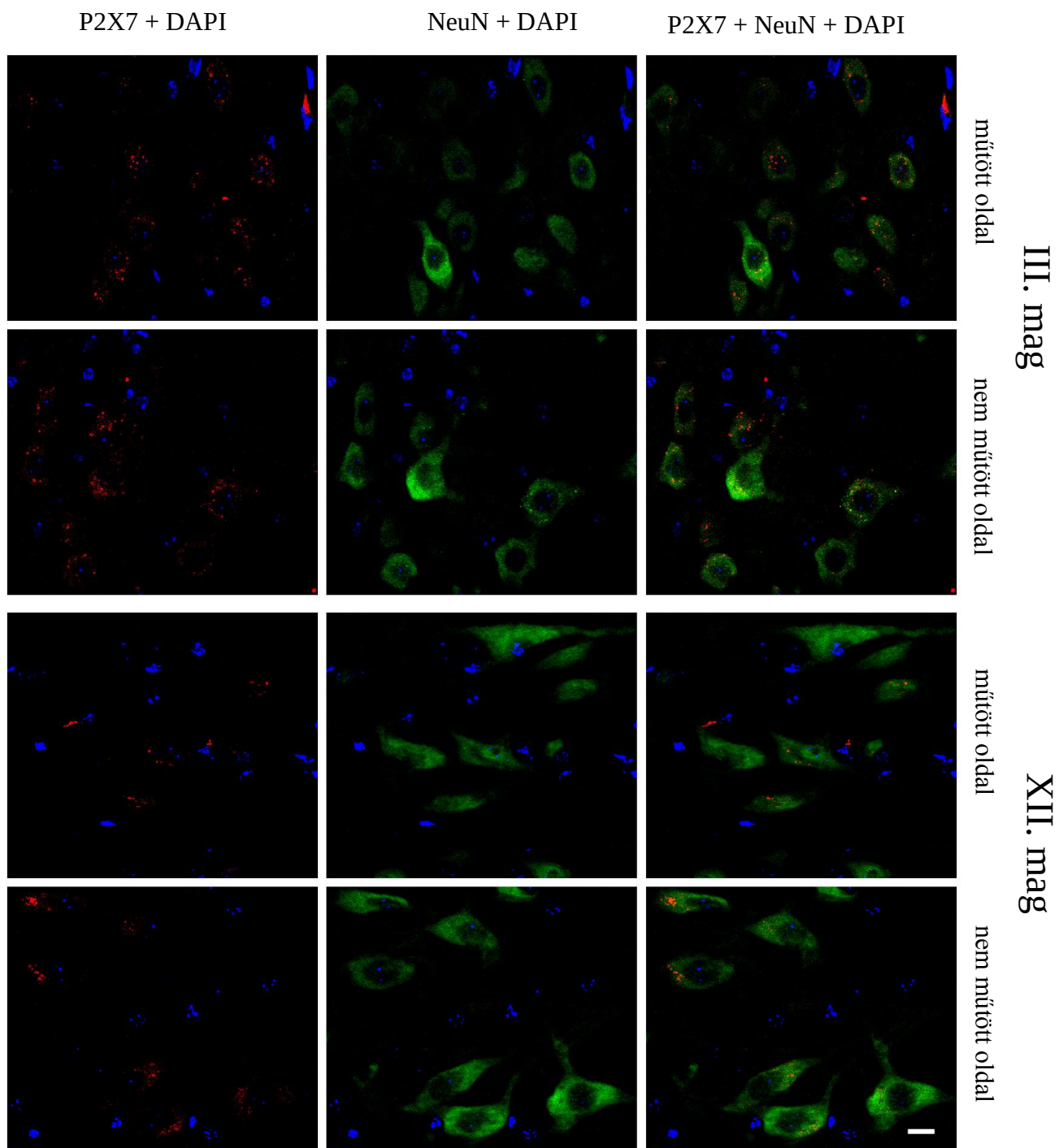
Perifériás axotómia után egy nappal a III. magban a kontrollhoz képest nem tapasztaltunk lényeges eltérést: a P2X7 immunjelölés továbbra is alapvetően idegsejteken lokalizálódott mind a műtött, mind a nem műtött oldalon. A XII. magban viszont a neuronális P2X7 expresszió mellett elvéve NeuN-nel nem kolokalizáló P2X7 immunjelölődés is megjelent az axotomizált oldalon, de lényeges eltérést nem tapasztaltunk sem a III. maghoz,

sem a kontrollhoz viszonyítva. A nem műtött oldalon szintén a kontrollhoz hasonló NeuN + P2X7 kolokalizáció volt látható (2. ábra).

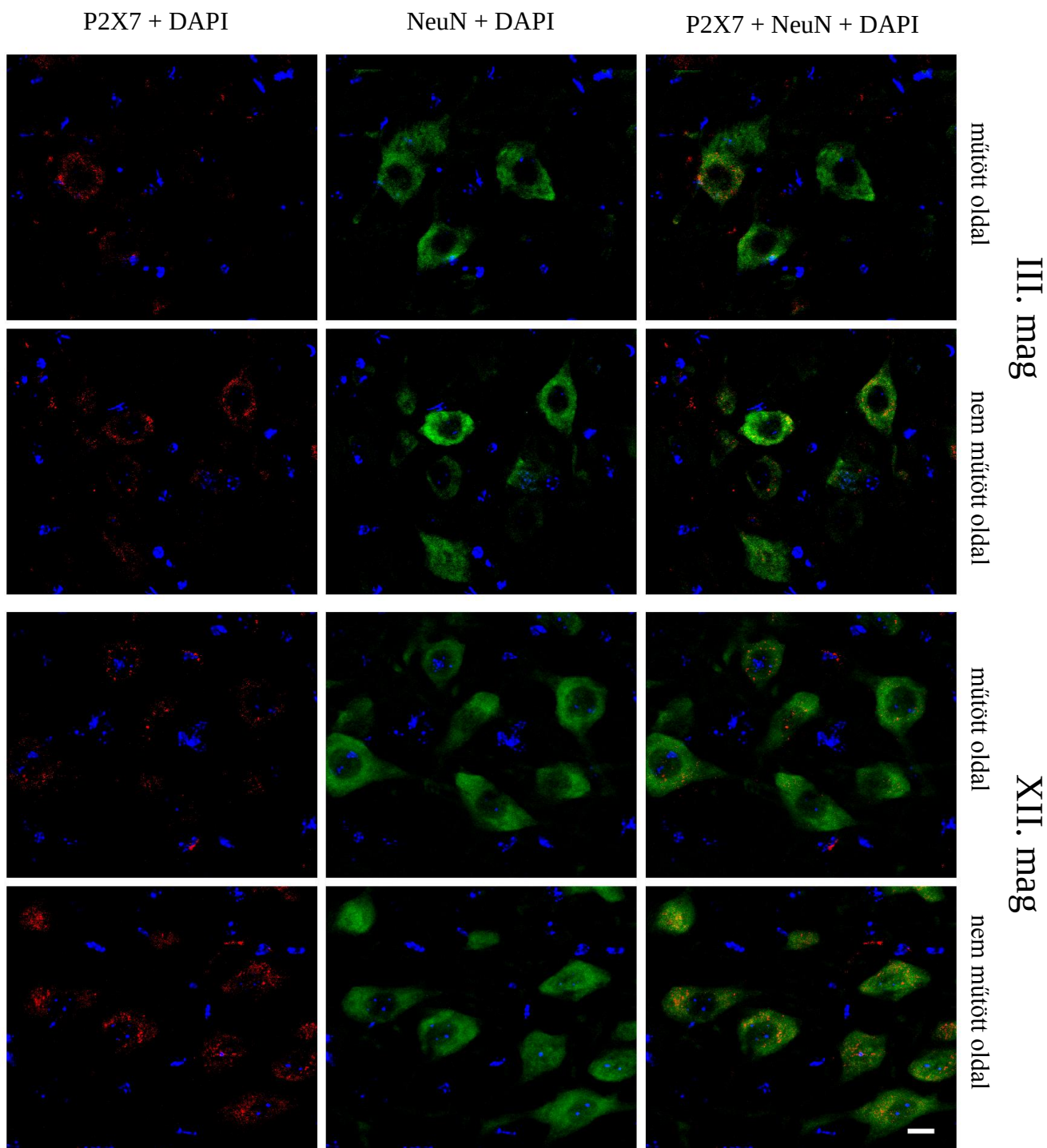
A neuronális P2X7 receptor expressziót a 17β -ösztradiol kezelés nem befolyásolta sem a III., sem a XII. magban. A XII. magban a műtött oldalon helyenként látható, NeuN-nel nem kolokalizáló P2X7 receptor immunfestődésben sem láttunk változást ösztrogén kezelést követően az axotómia után egy nappal, valamint a neuronális marker NeuN expressziójában sem volt kimutatható különbség a kontrollhoz képest egyik magban sem (3. ábra).

Perifériás axotómia után négy nappal a III. magban továbbra sem tapasztaltunk eltérést sem a P2X7 receptor, sem a NeuN expresszióban: a kontrollhoz hasonlóan döntően NeuN-nel kolokalizáló P2X7 immunfestődést detektáltunk a III. mag sérült és nem sérült oldalán egyaránt. Ezzel szemben a *nucleus hypoglossus*-ban, ahol a sérülésre érzékenyen reagálnak a motoneuronok, négy nappal perifériás axotómiát követően az axotomizált oldalt a nem sérült oldallal összehasonlítva két jelentős eltérést figyeltünk meg: egyrészt a műtött oldalon jelentősen csökkent a NeuN immunreaktivitás, másrészt az axotomizált oldalon az egy napos túlélésű állatokban kimutatotthoz képest több olyan P2X7 immunjelölődés volt látható, mely nem kolokalizált NeuN-nel (4. ábra).

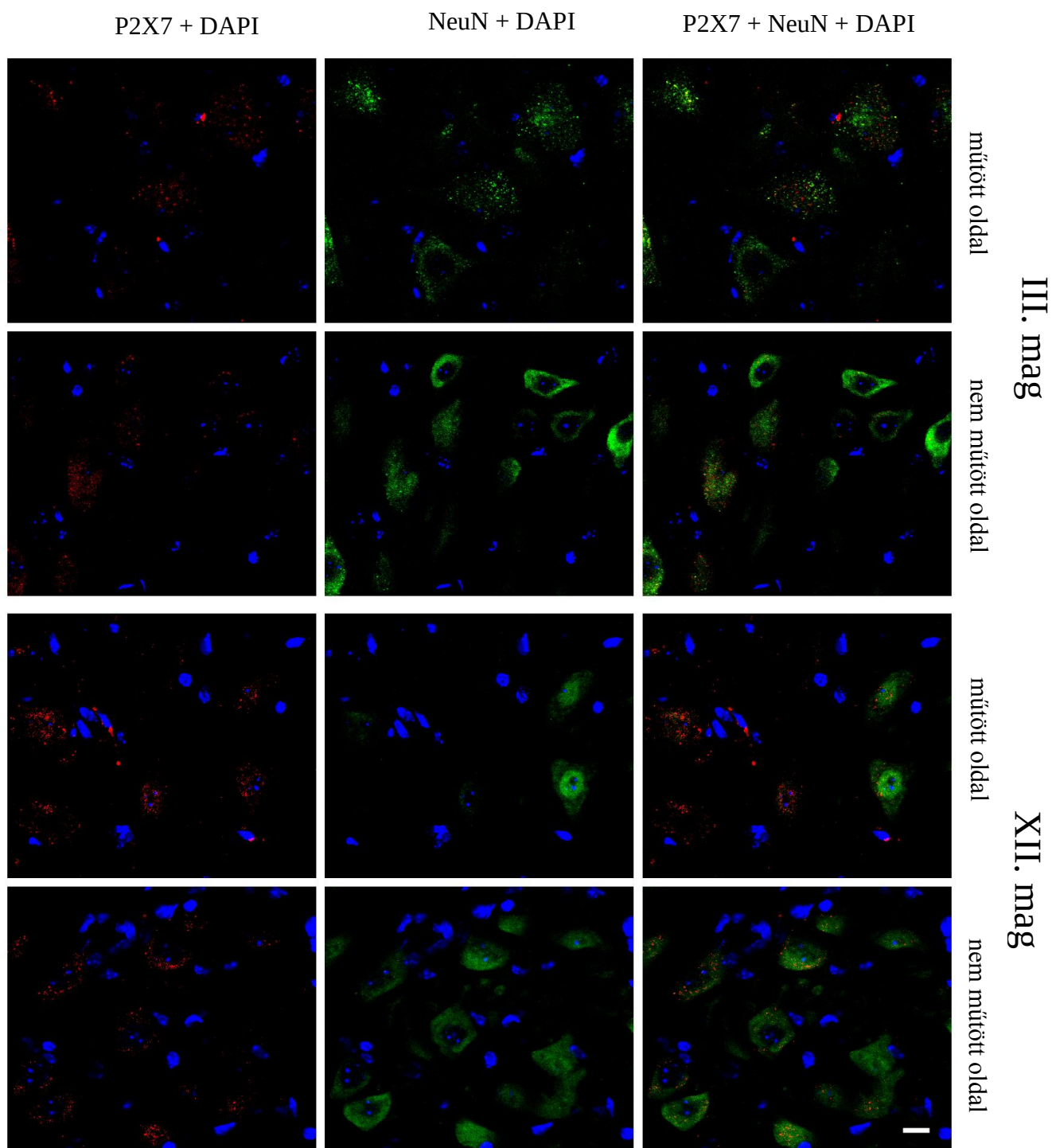
A 17β -ösztradiollal kezelt állatokban axotómia után négy nappal a III. magban mind a P2X7 receptor, mind a NeuN immunfestődés az ösztrogénnel nem kezeltékhez hasonló volt, a kontrollal összehasonlítva továbbra sem figyelhetünk meg lényeges eltérést sem a műtött, sem a nem axotomizált oldalon. A XII. magban azonban négy nappal a sérülést követően az ösztrogénnel kezelt csoportban a NeuN-től eltérő helyen detektálható P2X7 receptor immunfestődések mennyisége az ösztrogénnel nem kezelt csoporthoz viszonyítva fokozódott a műtött oldalon. A sérült oldalon tapasztalható NeuN expresszióban jelentkező csökkenést a 17β -ösztradiol nem befolyásolta. A nem axotomizált oldalon a XII. magban is a kontroll állatokhoz hasonló NeuN immunfestődést és ezzel kolokalizáló P2X7 receptor immunjelet láthattunk (5. ábra).



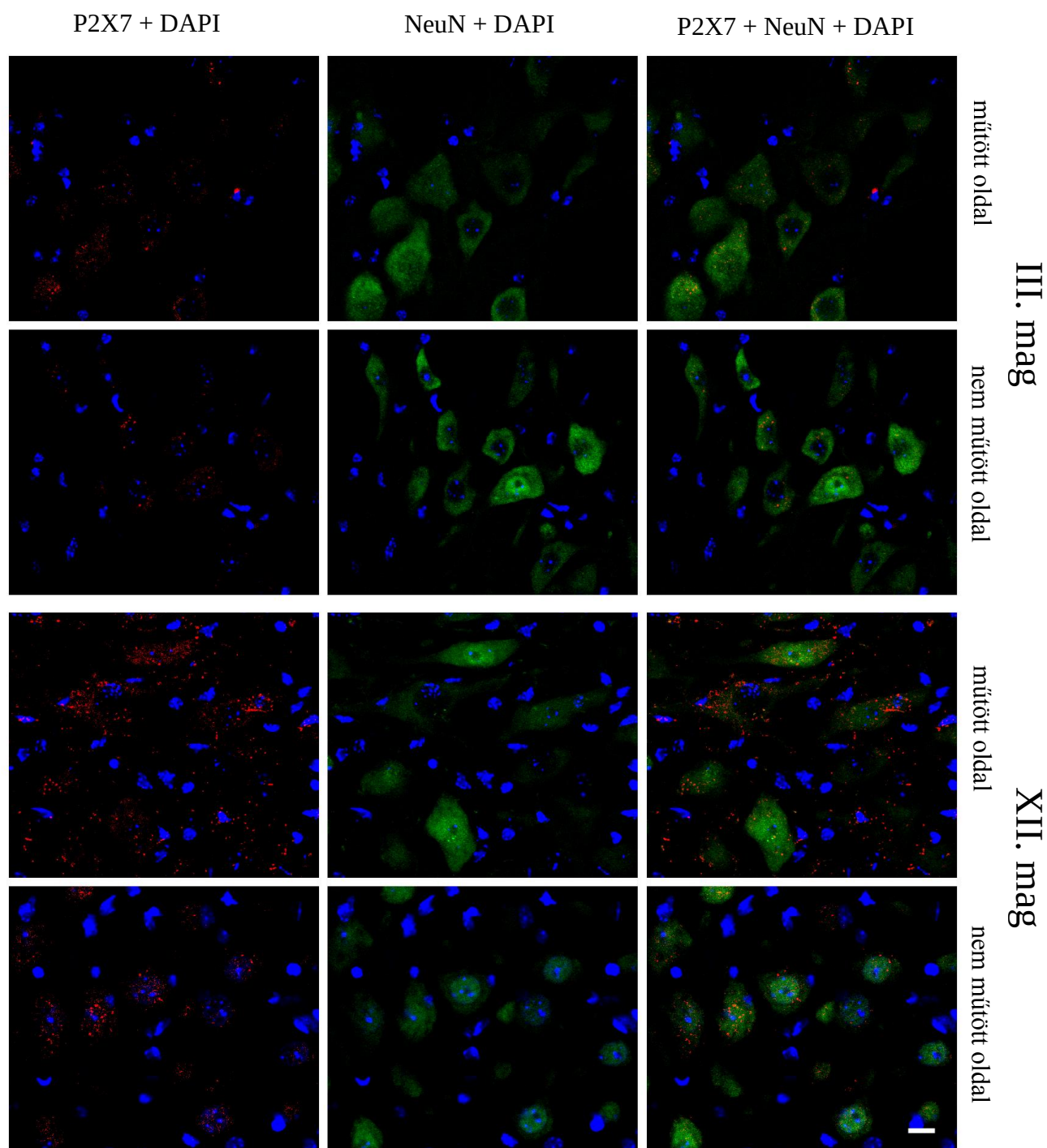
2. ábra. P2X7 receptor (piros) és NeuN (zöld) fluoreszcens kettős immunjelölés DAPI sejtmagfestéssel (kék) egy nappal perifériás axotómia után ovariectomizált nőstény eger III és XII. agyideg magjában. Lépték: 10µm



3. ábra. P2X7 receptor (piros) és NeuN (zöld) fluoreszcens kettős immunjelölés DAPI sejtmagfestéssel (kék) egy nappal perifériás axotómia után ösztrogén kezelt nőstény egér III és XII. agyideg magjában. Lépték: 10 μ m

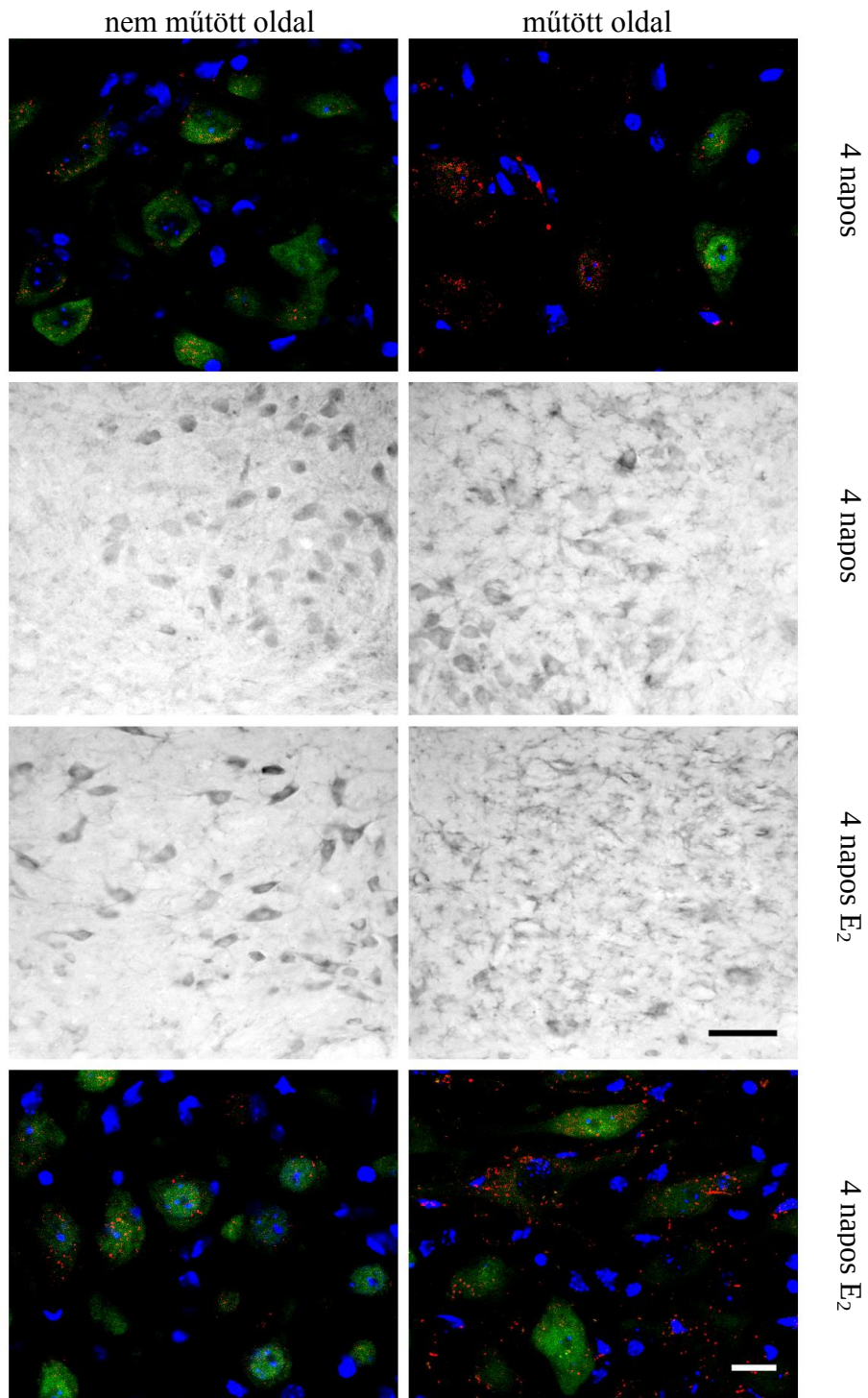


4. ábra. P2X7 receptor (piros) és NeuN (zöld) fluoreszcens kettős immunjelölés DAPI sejtmagfestéssel (kék) négy nappal perifériás axotómia után ovariectomizált nőstény egér III és XII. agyideg magjában. Lépték: 10 μ m



5. ábra. P2X7 receptor (piros) és NeuN (zöld) fluoreszcens kettős immunjelölés DAPI sejtmagfestéssel (kék) négy nappal perifériás axotómia után ösztrogén kezelt nőstény egér III és XII. agyideg magjában. Lépték: 10µm

A sérülésre rezisztens mozgó idegsejteket tartalmazó *nucleus oculomotorius* területén tehát sem a NeuN, sem a P2X7 immunreaktivitásban nem volt kimutatható változás sem axotómia, sem ösztrogén kezelés hatására. A *nucleus hypoglossus*-ban azonban, ahol sérülés után nagy arányban elpusztuló motoneuronok találhatók, az irodalmi adatokkal összhangban (Obál és mtsai 2006) az axotomizált oldalon jelentős mértékű NeuN immunreaktivitás csökkenést tapasztaltunk. Jelen eredményeink arra utalnak, hogy ezt a NeuN expresszió csökkenést az ösztrogénkezelés nem változtatja meg. A P2X7 receptor expressziójában ugyancsak eltérés volt megfigyelhető a XII. magban a III. maghoz képest: a sérült oldalon NeuN-nel nem kolokalizáló immunfestődés jelent meg négy nappal axotómia után, mely a 17 β -ösztradiollal kezelt csoportban nagyobb mértékű volt. A NeuN-nel nem kolokalizáló P2X7 receptor immunfestődés magyarázata részben a NeuN expresszió csökkenése, részben a P2X7 nem neuronális elemeken történő megjelenése lehet. Mivel a NeuN-től eltérő helyen látható P2X7 immunfestődés egy részéről a szakirodalmi adatok, valamint a festődés mintázata alapján feltételeztük, hogy aktivált mikroglia sejteken van jelen, megkíséreltük a P2X7 immunjelet mikroglia markerrel kolokalizálni. Sajnos, ez a kísérletünk technikai okok miatt nem vezetett eredményre, ugyanis a birtokunkban levő P2X7 antitest patkányban termelt, ezért a szintén patkányban termelt CD11b mikroglia markerrel nem lehetett kettős festést végezni. A másik mikroglia markerünk, a nyúlban termelt Iba-1, pedig csak Triton-X 100 jelenlétében adott értékelhető jelet, de a detergens kezelés a sejtfelszíni, membránban lokalizálódó P2X7 immunhisztokémiai detektálását nem tette lehetővé. Ezért egyszeres P2X7 immunhisztokémiát végeztünk, ahol az immunjelet peroxidázos reakcióval tettük láthatóvá. A fluoreszcens kettős festésnél tapasztaltakhoz hasonlóan itt is látható volt négy nappal axotómia után a műtött oldalon nem neuronon lokalizálódó immunjelölődés. Ezek az immunjelölt nem neuronális elemek morfológiailag mikrogliaira emlékeztettek. A nem sérült oldalon a P2X7 immunreakció morfológiailag neuronoknak tekinthető sejteket jelölt. Ösztrogénkezelést követően a műtött oldalon a nem ösztrogén kezelthez képest nagyobb mértékű peroxidázos P2X7 immunjelölődés volt látható olyan sejteken, melyek morfológiájuk alapján valószínűleg mikrogliaik. A nem sérült oldalon, hasonlóan az ösztrogénnel nem kezelt egerekhez, az ösztrogén kezelt csoportban is neuronális morfológiájú sejteket jelölt a P2X7 immunreakció termék (6. ábra).

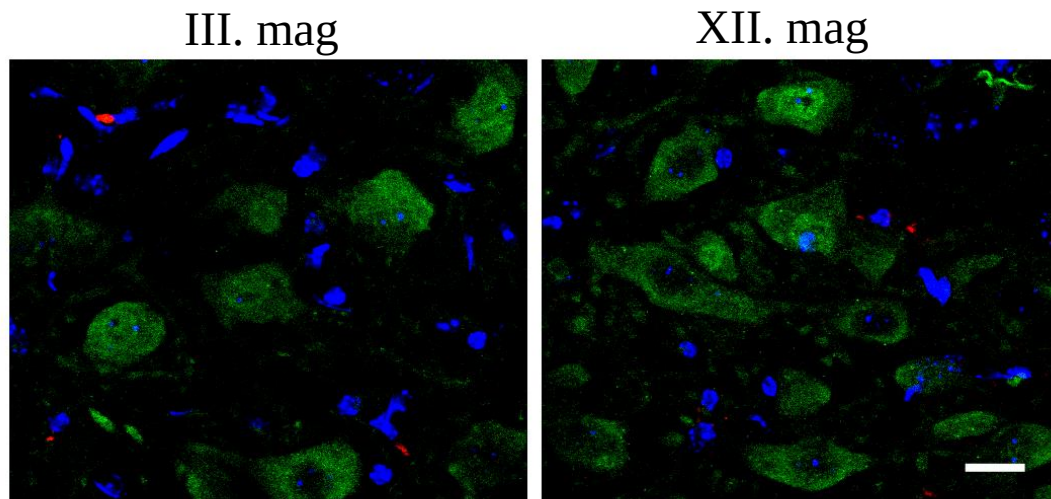


6. ábra. P2X7 receptor (piros) és NeuN (zöld) fluoreszcens kettős immunjelölés DAPI sejtmagfestéssel (kék), valamint P2X7 receptor egyszeres peroxidázos immunfestés négy nappal perifériás axotómia után ösztrogén kezelés nélkül, ill. ösztrogén kezeléssel nőstény egér XII. agyideg magjában. Lépték: 10 μ m a fluoreszcens képeken, 50 μ m a peroxidáz jelölt P2X7 receptor immunreakciót ábrázoló képeken.

A P2X7 receptor neurotranszmitter felszabadulást segítő fiziológiai funkciói mellett részt vesz olyan patológiai folyamatokban is, ahol reaktív mikrogliózis és sejthalál történik (Domercq és mtsai, 2013). A reaktív mikrogliózis során a P2X7 a mikroglia osztódási folyamatait serkenti. Az irodalmi adatok többsége arra utal, hogy a P2X7 receptor tartós aktiválódása annak a sejtnak a pusztulásához vezet, melyen expresszálódik, legyen az neuron, oligodendroglia, asztroglia vagy mikroglia. Ebből következően feltételezhető, hogy a reaktív mikroglia sejteken történő expressziója nem csak a mikroglia reakció előrehaladásában vesz részt, hanem előmozdítja a reaktív mikrogliózis lecsengését is. Mindezek alapján az ösztrogén kezelés a P2X7 receptor feltehetően mikrogliális expressziójának fokozása révén a XII. magban a mikroglia reakciót csökkentheti. Ennek a feltételezésnek a bizonyítására további, hosszabb túlélésű állatok vizsgálatára is kiterjedő kísérletekben kerülhet sor.

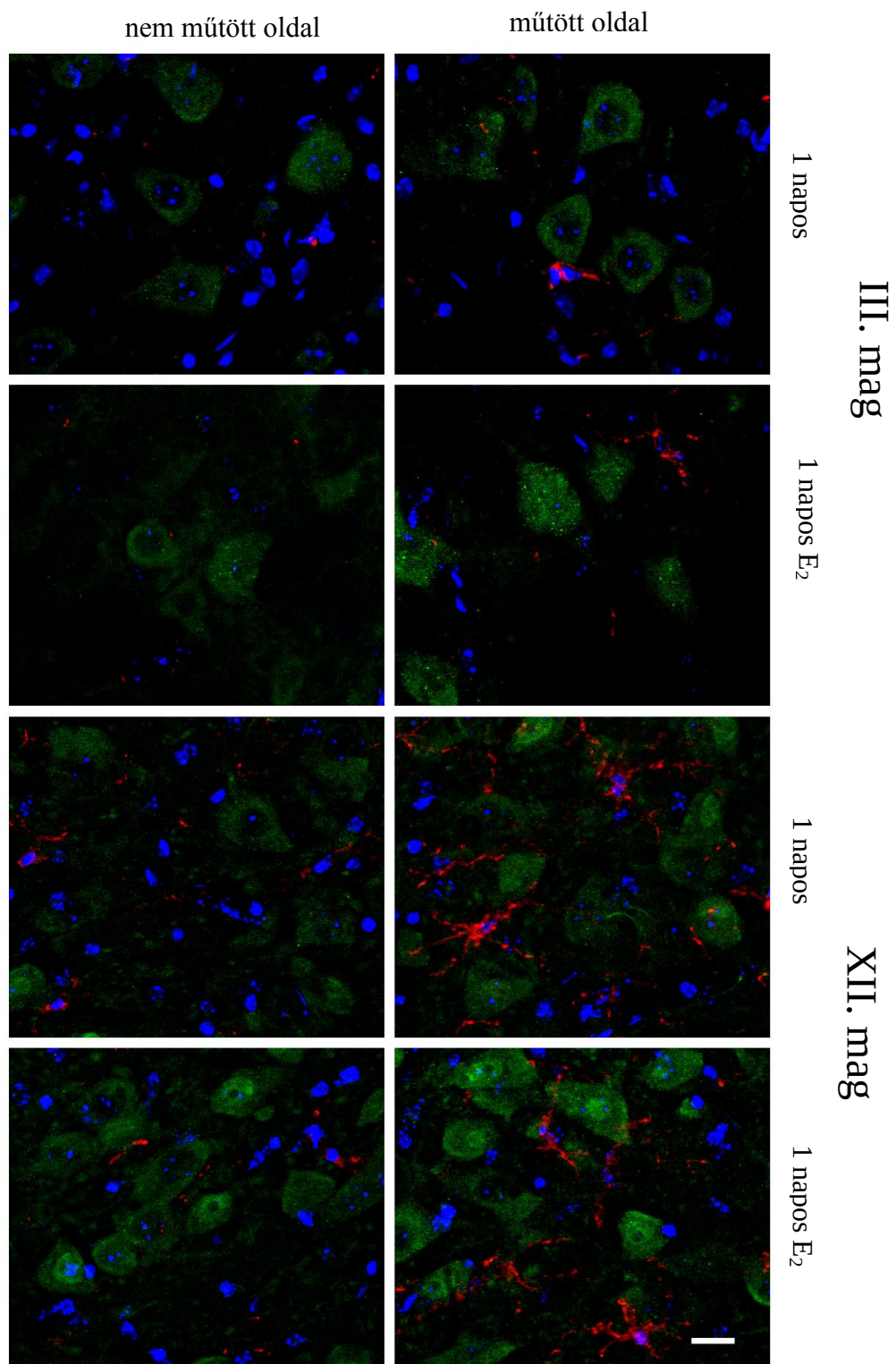
4.2. Az ER β immunhisztokémiai lokalizálása

Második kísérlet sorozatunkban arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a 17 β -ösztradiol közvetlenül hat-e a mikroglia sejtekre, azaz eger III. és XII. agyideg magjában az irodalmi adatokból ismert neuronális expresszió mellett nyugalmi állapotú, ill. aktivált mikrogliában is kimutatható-e ösztrogén receptor. Ehhez ösztrogén receptor és mikroglia marker CD11b fluoreszcens kettős immunjelölést végeztünk, a metszeteket az első kísérlet sorozathoz hasonló módon konfokális mikroszkóppal elemeztük. Munkacsoportunk lokalizálta mind az ER α , mind az ER β expressziót a vizsgált két agyideg magban. Jelen dolgozatban csak az általam kivitelezett ER β + CD11b fluoreszcens kettős immunjelölés eredményeit mutatom be. Kontroll állatokban a CD11b immunjelölés mind a III., mind a XII. magban csak kismértékben detektálható az optikailag 1 μ m vastag konfokális metszeten. A nem stimulált mikroglia vékony nyúlványainak részletei láthatók helyenként az idegsejtek között. Az ER β immunreaktivitás az irodalmi adatokkal megegyező módon kimutatható volt morfológiájuk alapján neuronnak tekinthető sejtekben. Az immunjelölés nem kizárólag a klasszikus szteroid receptorra jellemző sejtmagi lokalizációt mutatta, hanem jelen volt a citoplazmában és feltehetően a sejt membránjában is. Ugyanez az antitest más agyterületeken, azaz a pozitív kontrollként szolgáló *bulbus olfactorius* ill. *nucleus arcuatus* területén elsősorban sejtmagi festődést adott, mely megfelel a szakirodalomban leírtaknak. A CD11b immunjelölődés egyik magban sem kolokalizált az ER β immunreaktivitással (7. ábra).

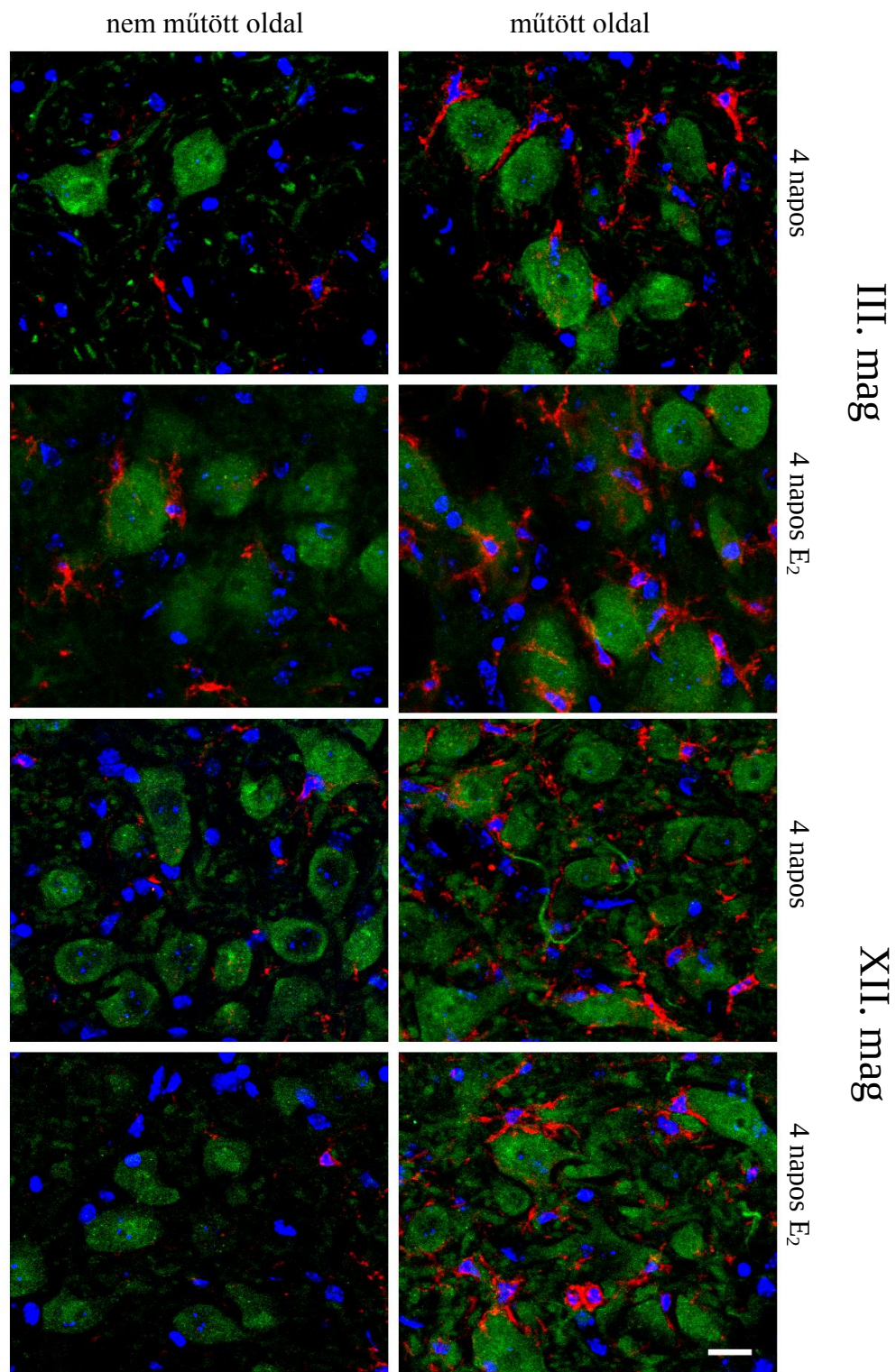


7. ábra. CD11b (piros) és ER β (zöld) fluoreszcens kettős immunjelölés DAPI sejtmagfestéssel (kék) kontroll nőstény egér III és XII. agyideg magjában. Lépték: 10 μ m

Perifériás axotómiát követően egy nappal a III. magban a kontrollhoz képest valamivel nagyobb mértékű CD11b immunreaktív mikroglia volt látható a műtött oldalon, míg a nem műtött oldalon a CD11b immunreaktivitás a kontrollhoz képest nem változott. A XII. magban egy nappal a sérülés után szintén kismértékű CD11b immunreaktivitás fokozódást detektáltunk a műtött oldalon, mely a III. magban megfigyelténél intenzívebbnek tekinthető volt. A nem sérült oldalon a CD11b immunfestődés a kontrollhoz hasonló maradt. A reaktív mikrogliózis kezdeti fázisában levő mikroglia sejtekben sem mutattunk ki ER β immunjelölődést. A 17 β -ösztradiol kezelést kapott állatok axotómia után egy nappal mindkét agyideg magjában az ösztrogénnel nem kezelt csoporthoz hasonló ER β és CD11b immunreaktivitást mutattak (8. ábra).



8. ábra. CD11b (piros) és ER β (zöld) fluoreszcens kettős immunjelölés DAPI sejtmagfestéssel (kék) egy nappal perifériás axotómia után, ösztrogén kezelés nélkül, ill. ösztrogén kezeléssel nőstény egér III és XII. agyideg magjában. Lépték: 10 μ m



9. ábra. CD11b (piros) és ER β (zöld) fluoreszcens kettős immunjelölés DAPI sejtmagfestéssel (kék) négy nappal perifériás axotómia után, ösztrogén kezelés nélkül, ill. ösztrogén kezeléssel nőstény egér III és XII. agyideg magjában. Lépték: 10 μ m

Négy nappal a perifériás axotómia után mindkét agyideg magban a nem műtött oldalhoz viszonyítva jelentős CD11b immunreaktivitás fokozódást figyeltünk meg a műtött oldalon. Az ER β immunfestődés továbbra is kizárólag neuronális morfológiát mutató sejtekben volt látható, a mikroglia marker CD11b-vel nem kolokalizált. A CD11b-vel jelölt mikroglia sejtek a sérült oldalon aktivált fenotípusúak voltak mindkét magban, azonban a neuron mikroglia kapcsolatban eltérést tapasztaltunk a két mag között. A III. magban a reaktív mikroglia sejtek vastag, elágazó nyúlványainak nagy része az ER β immunreaktív idegsejtek közelében helyezkedett el, kisebb részben közvetlenül kapcsolódott a motoneuronok membránjához. A nem műtött oldalon mikroglia aktiváció nem volt megfigyelhető. A XII. magban a sérült oldalon a reaktív mikroglia sejtek CD11b immunreaktív vastag nyúlványai általában a III. magban tapasztaltnál nagyobb mértékben kapcsolódtak az ER β immunfestett neuronokhoz a műtött oldalon, míg a nem műtött oldal mikrogliai a kontrollhoz hasonló képet mutattak. Ösztrogénkezelést követően a III. magban az aktivált mikroglia sejtek nyúlványai nagyobb mértékben borították az idegsejteket a műtött oldalon, mint az ösztrogénnel nem kezelt állatok esetében. Érdekes módon a III. mag nem műtött oldalán is láttunk néhány aktivált morfológiájú mikrogliait, melynek nyúlványai szoros kapcsolatban voltak a neuronokkal. Ösztrogén kezelés hatására bekövetkező neuron-mikroglia kapcsolatfokozódást már megfigyeltek a nucleus arcuatus-ban (Brawer és mtsai, 1980). A III. agyideg magjában azonban ilyen típusú változást még nem írtak le. Mivel kísérleteinkben a nem sérült oldalon is megfigyelhető volt a mikroglia ösztrogén hatására bekövetkező morfológiai változása, a továbbiakban indokoltnak látjuk, hogy nem axotomizált, ovariectomizált állatokban is megvizsgáljuk az ösztrogén kezelés mikroglia morfológiára gyakorolt hatását a *nucleus oculomotorius*-ban. Jelen kísérleteinkben az axotómia és az ösztrogén hatása feltehetően összeadódik, ez lehet a magyarázata a műtött oldalon megfigyelhető reaktív mikroglia - neuron kapcsolódás fokozódásának. A XII. magban a 17 β -ösztradiol kezelés az ösztrogénnel nem kezelt állatokban látható szoros neuron - aktivált mikroglia kapcsolatot nem befolyásolta. További különbség a III. maghoz képest, hogy a XII. magban a nem műtött oldalon a kontrollhoz hasonló morfológiájú, nyugalmi állapotú mikroglia volt kimutathatók, vagyis ebben a magban az ösztrogén feltehetően nem befolyásolja a mikroglia morfológiai változását (9. ábra).

A két kísérletsorozat eredményeit értékelve arra következtethetünk, hogy az ösztrogén eltérő hatást fejt ki a két agyideg magban: a XII. magban a P2X7 receptor expressziót fokozza feltehetően reaktív mikroglia, míg a III. magban a neuronok mikroglia borítását mozdítja elő. Ösztrogénhatásban megmutatkozó regionális különbségeket már dokumentáltak a

szakirodalomban: pl. a 17β -ösztradiol a preoptikus area szexuálisan dimorf magjában neuroprotektív, ugyanakkor az AvPv magban sejtpusztító hatású (Arai és mtsai 1996). Az általunk megfigyelt mikroglialis változásokra gyakorolt 17β -ösztradiol hatás valószínűleg a neuronok közvetítésével jöhet létre, mivel sem az ER β , és munkacsoportunk egyéb adatai alapján az ER α sem volt kimutatható a vizsgált agyterületeken mikroglia sejtekben.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben a neuroprotektív tulajdonságú 17β -ösztradiol egyik célpontjának, az ER β -nak, valamint a neurodegeneratív folyamatokban szerepet játszó P2X7 receptornak az expresszióját vizsgáltuk meg immunhisztokémiai módszerek segítségével két olyan agyterületen, melyek annak ellenére, hogy azonos típusú idegsejteket tartalmaznak, eltérő módon reagálnak az őket ért sérülésre. A III. agyideg magjában levő motoneuronok ellenállnak a károsodásnak, ezzel szemben a XII. agyideg magjában található motoneuronokról ismert, hogy perifériás axotómia után nagy arányban elpusztulnak. Mivel a P2X7 receptor az idegi sérüléskor felszabaduló nagy mennyiségű ATP hatására aktiválódik és részt vesz a sejtek elpusztításában, feltételeztük, hogy a két agyidegmag sérülésre történő eltérő reakciójában szerepe lehet a P2X7 receptornak. Kíváncsiak voltunk továbbá, hogy a P2X7 receptor expressziója befolyásolható-e 17β -ösztradiollal, valamint az ER β kifejeződik-e a neuronokon kívül mikroglia sejtekben is ezen a két agyterületen. Ennek kapcsán a sérülést követő mikroglia reakciót is összehasonlítottuk a két agyideg magban.

Kísérletsorozatunk eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy mind a *nucleus oculomotorius*-ban, mind a *nucleus hypoglossus*-ban az ER β nem kolokalizált a mikroglia marker CD11b-vel: sem a nyugalmi állapotú, sem a perifériás axotómia után megjelenő reaktív mikrogliaiban nem volt kimutatható, viszont a motoneuronokban jelen volt.

Elmondhatjuk továbbá, hogy a perifériás axotómia után bekövetkező mikroglia reakció és az ösztrogén hatás regionális eltéréseket mutatott: a XII. magban intenzívebben jelent meg a perifériás axotómia által kiváltott CD11b immunreaktivitás fokozódás, mint a III. magban, és a XII. magban kialakuló szoros neuron-mikroglia kapcsolódás nem változott ösztrogén kezelés után. A nem sérült oldalon a XII. mag mikroglia sejtjei nem aktiválódtak. Ezzel szemben a sérülésnek ellenálló III. magi motoneuronok lazább kapcsolatban voltak a reaktív mikrogliaikkal. Ösztrogénkezelés után ezeken a neuronokon kifejezettebb mikroglia

borítás volt látható, sőt, a nem műtött oldalon is megfigyelhetők voltak aktivált morfológiájú mikroglia sejtek az axotómiát követő negyedik napon. A 17β -ösztradiollal nem kezelt csoportban a nem sérült oldalon nem tapasztaltunk mikroglia aktivációt.

A P2X7 receptor expressziójában szintén eltérést tapasztaltunk. A *nucleus oculomotorius*-ban a P2X7 receptor immunhisztokémiai festődésében nem láttunk változást sem axotómia, sem ösztrogénkezelés után: a P2X7 immunjelölés kolokalizált a neuronális marker NeuN-nel. A *nucleus hypoglossus*-ban viszont négy nappal perifériás axotómia után NeuN-nel nem kolokalizáló P2X7 receptor expresszió is kimutatható volt, mely ösztrogénkezelés után fokozottabbá vált. A P2X7 + NeuN fluoreszcens kettős immunjelölést egyszeres P2X7 peroxidáz jelölt immunfestéssel összehasonlítva arra következtettünk, hogy a P2X7 receptort kifejező, de nem NeuN immunreaktív sejtek reaktív mikrogliaik.

Eredményeink összességében arra utalnak, hogy a 17β -ösztradiol mikrogliaira gyakorolt hatása a mikroglia-neuron kommunikáción keresztül nyilvánul meg, ugyanis munkacsoportunk az ER α -t is kizárólag neuronokban lokalizálta a két agyideg mag területén. A sérülésre eltérő módon reagáló motoneuronok a két agyideg magban valószínűleg más- más jeleket küldenek a mikroglia sejteknek, és az ösztrogénkezelés is eltérő módon befolyásolja a mikroglia reakciót.

IRODALOMJEGYZÉK

- Arai Y, Sekine Y, Murakami S. Estrogen and apoptosis in the developing sexually dimorphic preoptic area in female rats. *Neurosci Res.* (1996) 25:403-7.
- Arbeloa J, Pérez-Samartín A, Gottlieb M, Matute C. P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. *Neurobiol Dis.* (2012) 45:954-61.
- Azcoitia I, DonCarlos LL, Garcia-Segura LM. Estrogen and brain vulnerability. *Neurotox Res.* (2002) 4:235-45.
- Baker H, Kawano T, Margolis FL, Joh TH. Transneuronal regulation of tyrosine hydroxylase expression in olfactory bulb of mouse and rat. *J Neurosci.* (1983) 3:69-78.
- Ballerini P, Rathbone MP, Di Iorio P, Renzetti A, Giuliani P, D'Alimonte I, Trubiani O, Caciagli F, Ciccarelli R. Rat astroglial P2Z (P2X7) receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuroreport.* (1996) 7:2533-7.
- Brändle U, Kohler K, Wheeler-Schilling TH. Expression of the P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina. *Brain Res Mol Brain Res.* (1998) 62:106-9.
- Brawer JR, Schipper H, Naftolin F. Ovary-dependent degeneration in the hypothalamic arcuate nucleus. *Endocrinology.* (1980) 107:274-9.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science.* (2003) 302:113-7.
- Crain JM, Watters JJ. Estrogen and P2 Purinergic Receptor Systems in Microglia: Therapeutic Targets for Neuroprotection. *Open Drug Discov J.* (2010) 2:148-167.
- Das A, Smith JA, Gibson C, Varma AK, Ray SK, Banik NL. Estrogen receptor agonists and estrogen attenuate TNF- α -induced apoptosis in VSC4.1 motoneurons. *J Endocrinol.* (2011) 208: 171-182.
- Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, Musa H, Milligan CJ, Batten TF, Buckley NJ, Parson SH, Deuchars J. Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci.* (2001) 21:7143-52.
- Díaz-Hernández M, Díez-Zaera M, Sánchez-Nogueiro J, Gómez-Villafuertes R, Canals JM, Alberch J, Miras-Portugal MT, Lucas JJ. Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J.* (2009) 23:1893-906.
- Domercq M, Vázquez-Villoldo N, Matute C. Neurotransmitter signaling in the pathophysiology of microglia. *Front Cell Neurosci.* (2013) 7:49.

- Duan S, Neary JT. P2X(7) receptors: properties and relevance to CNS function. *Glia*. (2006) 54:738-46.
- Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci*. (1999) 19:6385-93.
- Eyo UB, Wu LJ. Bidirectional microglia-neuron communication in the healthy brain. *Neural Plast*. (2013) 2013:456857.
- Ferrari D, Villalba M, Chiozzi P, Falzoni S, Ricciardi-Castagnoli P, Di Virgilio F. Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. *J Immunol*. (1996) 156:1531-9.
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol*. (2001) 63:29-60.
- Garcia-Segura LM, Melcangi RC. Steroids and glial cell function. *Glia*. (2006) 54:485-98.
- Garcia-Segura LM. Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *J Neuroendocrinol*. (2008) 20: 705-12.
- Gatson JW, Maass DL, Simpkins JW, Idris AH, Minei JP, Wigginton JG. Estrogen treatment following severe burn injury reduces brain inflammation and apoptotic signaling. *J Neuroinflammation*. (2009) 6:30.
- Gerstner B, Lee J, DeSilva TM, Jensen FE, Volpe JJ, Rosenberg PA. 17 β -estradiol protects against hypoxic/ischemic white matter damage in the neonatal rat brain. *J Neurosci Res*. (2009) 87:2078-86.
- Goldmann T, Prinz M. Role of microglia in CNS autoimmunity. *Clin Dev Immunol*. (2013) 2013:208093.
- Harada K, Hide I, Seki T, Tanaka S, Nakata Y, Sakai N. Extracellular ATP differentially modulates Toll-like receptor 4-mediated cell survival and death of microglia. *J Neurochem*. (2011) 116:1138-47.
- Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*. (2012) 43:3063-70.
- Ireland MF, Noakes PG, Bellingham MC. P2X7-like receptor subunits enhance excitatory synaptic transmission at central synapses by presynaptic mechanisms. *Neuroscience*. (2004) 128:269-80.
- Izumo N, Ishibashi Y, Ohba M, Morikawa T, Manabe T. Decreased voluntary activity and amygdala levels of serotonin and dopamine in ovariectomized rats. *Behav Brain Res*. (2012) 227:1-6.

- Kawamura MF, Yamasaki R, Kawamura N, Tateishi T, Nagara Y, Matsushita T, Ohyagi Y, Kira J. Impaired recruitment of neuroprotective microglia and T cells during acute neuronal injury coincides with increased neuronal vulnerability in an amyotrophic lateral sclerosis model. *Exp Neurol.* (2012) 234:437-45.
- Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological Reviews* (2011) 91: 461-553.
- Kim JE, Ryu HJ, Yeo SI, Kang TC. P2X7 receptor differentially modulates astroglial apoptosis and clasmotodendrosis in the rat brain following status epilepticus. *Hippocampus.* (2011) 21:1318-33.
- Koliatsos VE, Price DL. Axotomy as an experimental model of neuronal injury and cell death. *Brain Pathol.* (1996) 6:447-65.
- Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev.* (2005) 48:196-206.
- Mader K, Andermahr J, Angelov DN, Neiss WF. Dual mode of signalling of the axotomy reaction: retrograde electric stimulation or block of retrograde transport differently mimic the reaction of motoneurons to nerve transection in the rat brainstem. *J Neurotrauma.* (2004) 21:956-68.
- Matute C, Torre I, Pérez-Cerdá F, Pérez-Samartín A, Alberdi E, Etxebarria E, Arranz AM, Ravid R, Rodríguez-Antigüedad A, Sánchez-Gómez M, Domercq M. P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci.* (2007) 27:9525-33.
- Miller MM, Hyder SM, Assayag R, Panarella SR, Tousignant P, Franklin KB. Estrogen modulates spontaneous alternation and the cholinergic phenotype in the basal forebrain. *Neuroscience.* (1999) 91:1143-53.
- Murphy E. Estrogen signaling and cardiovascular disease. *Circ Res.* (2011) 109: 687-96.
- Nelson ER, Wardell SE, McDonnell DP. The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of estrogens, SERMs and oxysterols: implications for the treatment and prevention of osteoporosis. *Bone.* (2013) 53: 42-50.
- Nilsen J, Brinton RD. Mitochondria as therapeutic targets of estrogen action in the central nervous system. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* (2004) 3: 297-313.
- Obál I, Engelhardt J, Siklós L. Axotomy induces contrasting changes in calcium and calcium-binding proteins in oculomotor and hypoglossal nuclei of Balb/c mice. *J Comp Neurol.* (2006) 499: 17-32.
- Raivich G, Jones LL, Kloss CU, Werner A, Neumann H, Kreutzberg GW. Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration. *J Neurosci.* (1998) 18:5804-16.

- Sárvári M, Kalló I, Hrabovszky E, Solymosi N, Liposits Z. Ovariectomy and subsequent treatment with estrogen receptor agonists tune the innate immune system of the hippocampus in middle-aged female rats. *PLoS One*. (2014) 9:e88540.
- Soustiel JF, Palzur E, Nevo O, Thaler I, Vlodavsky E. Neuroprotective anti-apoptosis effect of estrogens in traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. (2005) 22:345-52.
- Sribnick EA, Wingrave JM, Matzelle DD, Ray SK, Banik NL. Estrogen as a neuroprotective agent in the treatment of spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci*. (2003) 993:125-33.
- Sribnick EA, Ray SK, Nowak MW, Li L, Banik NL. 17 β -Estradiol attenuates glutamate-induced apoptosis and preserves electrophysiologic function in primary cortical neurons. *J. Neurosci Res*. (2004) 76: 688-96.
- Sur P, Sribnick EA, Wingrave JM, Nowak MW, Ray SK, Banik NL. Estrogen attenuates oxidative stress-induced apoptosis in C6 glial cells. *Brain Res*. (2003) 971: 178-188.
- Wu WF1, Tan XJ, Dai YB, Krishnan V, Warner M, Gustafsson JÅ. Targeting estrogen receptor β in microglia and T cells to treat experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2013) 110:3543-8.
- Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell IP, Naylor A, Bountra C, Banati RR, Anand P. COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol*. (2006) 6:12.
- Yu Y, Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Inoue K, Kyaw Nyunt A, Umemura A, Mase M, Yamada K, Shimada S. Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res*. (2008) 1194:45-55.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Hoyk Zsófia témavezetőmnek és Dr. Kis Zsolt konzulensemnek a dolgozat során adott hasznos ötleteit és jó tanácsait. Hálával tartozom a munkacsoportnak, akik a dolgozat megírásához tanácsaikkal, odafigyelésükkel, eszközökkel és kedvező légkörrel járultak hozzá. Nem utolsó sorban köszönet illeti Ferhan Ayaydint és Kószó Zsuzsannát, akik a konfokális mikroszkópiában nyújtottak nagy segítséget.

Tiszta szívvel köszönöm szüleimnek a sok gondoskodást, és erőt, amivel mindig is támogattak tanulmányaim során. Hálásan köszönöm kedvesem kitartó türelmét és a mindennapi feladatokban nyújtott segítségét.

Lezárás dátuma: 2014. 04. 18.