

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

MTA SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓINTÉZET
Biofizikai Intézet

**A stressz hatása a vér-agy gátra:
morfológiai vizsgálat patkányokban**

Mészáros Mária

Biológus MSc. II.

Témavezető:

Dr. Deli Mária
tudományos tanácsadó
MTA SZBK Biofizikai Intézet
Biológiai Barrierék Kutatócsoport

Belső konzulens:

Prof. Toldi József
tanszékvezető egyetemi tanár
Szegedi Tudományegyetem
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi
Tanszék

XXXII. OTDK
Biológia Szekció

2015

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ	2
DOLGOZATBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK	3
1. BEVEZETÉS	4
1.1. A stressz és a központi idegrendszerre kifejtett hatásai	4
1.2. Stressz szerepe a neurodegeneratív betegségek kialakulásában	5
1.3. A vér-agy gát felépítése és működése	6
1.4. A vér-agy gát szerepe központi idegrendszeri betegségekben	8
1.5. A stressz és a vér-agy gát kapcsolata	9
2. CÉLKITŰZÉSEK	10
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	11
3.1. Vizsgált csoportok	11
3.2. Immobilizációs stressz	11
3.3. Mintavétel	11
3.4. Fagyasztva metszés	12
3.5. Ellenanyagok	12
3.6. Immunhisztokémia	12
3.7. Képanalízis	13
3.8. Statisztikai kiértékelés	13
4. EREDMÉNYEK	14
4.1. Vér-agy gát specifikus fehérjék festése kontroll és stressz kezelt patkányok agyi metszeteiben	14
4.1.1. Agyi endotélsejt kapcsolófehérjék: klaudin-5	14
4.1.2. Agyi endotélsejt kapcsolófehérjék: okkludin	15
4.1.3. Glükóz-transzporter-1 immunfestés	17
4.2. Az asztroglia sejtek immunfestése	18
5. MEGBESZÉLÉS	20
5.1. Immobilizációs stressz okozta változások az agyi mikroér endotélsejtek kapcsolófehérjéinek immunfestésében	20
5.2. Immobilizációs stressz okozta változások a vér-agy gát glükóz-transzporter-1 festődésében	21
5.3. Immobilizációs stressz okozta változások az agyi hajszálerek körüli asztrocita végtagokban	21
5.4. Konklúzió	22

TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ

Napjainkban egyre több irodalmi adat hívja fel a figyelmet, hogy a stressz szervezetben létrejövő összetett, szisztémás változások kiváltása mellett fontos szerepet játszik, mint exogén tényező egyes neuropszichiátriai betegségekben, így az Alzheimer-kór kialakulásában is. Korábbi tanulmányok igazolták, hogy a különböző stresszhatások jelentős morfológiai változásokat eredményeznek az Alzheimer-kór során is jelentősen érintett hippocampális és frontális agykérgi területeken. A vér-agy gát diszfunkciója hozzájárul az Alzheimer-kór patomechanizmusához, azonban stressz hatását a vér-agy gát morfológiájára eddig nem vizsgálták.

Kísérletünkben felnőtt hím Wistar patkányokon akut (1 és 3 nap) és krónikus (21 nap) immobilizációs stresszt követő morfológiai változásokat vizsgáltuk. Hippokampusz és frontális agykérgi metszeteken az agyi endotélsejtek változását a klaudin-5 és az okkludin kapcsolófehérjék és a glükóztranszporter-1, míg az asztroglia sejteket GFAP marker immunfestésével követtük. A festést követően a konfokális mikroszkóppal (Leica SP5) készített képeket képanalizáló programmal (Image J) elemeztük.

Stressz hatására a klaudin-5 és okkludin fehérjék immunfestésének eltérő változását tapasztaltuk: amíg a klaudin-5 szignifikáns intenzitásbeli csökkenését mutattuk ki a hippocampuszban, addig az okkludin fehérje festésének intenzitásában nem tapasztaltunk szignifikáns változást egyik agyterületen sem. Az akut stressz jelentős GFAP intenzitásbeli csökkenést eredményezett asztroglia sejtekben a kortikális régióban.

Eredményeink a stressz által kiváltott morfológiai változásokat igazolták az agyi homeosztázis fenntartásában szerepet játszó vér-agy gát sejtjeire, mely összefüggésben állhat a stressz által indukált kognitív funkciók romlásával és az Alzheimer-kór kialakulásával.

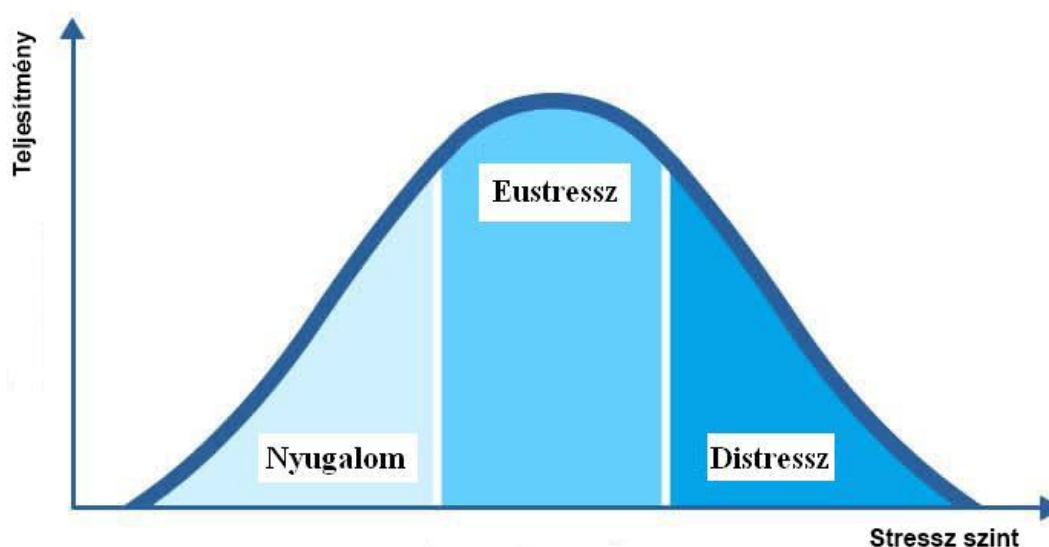
DOLGOZATBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK

CRH	kortikotropin-releasing hormon
GFAP	gliális fibrilláris savas protein
GLUT-1	glükóz-transzporter-1
HPA	hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely
PBS	foszfát puffer
ZO	zonula occludens fehérjék

1. BEVEZETÉS

1.1. A stressz és a központi idegrendszerre kifejtett hatásai

Minden élőlényt ér stressz, az emberi léthez is természetes módon hozzákapcsolódik. Több mint 70 évvel ezelőtt, 1936-ban Selye János definiálta és írta le, mint általános adaptációs szindrómát. Stresszor mindaz, ami az ember fizikai és pszichológiai jólétét veszélyeztető tényező és az ezekre az ingerekre adott válaszok a stresszreakciók. Míg rövid, enyhe, kontrollálható stresszhatások sok helyzetben erőt adnak bizonyos kihívások leküzdéséhez (eustressz) addig az erős, hosszú ideig tartó stressz negatív hatással van a szervezetre (distressz) (Selye, 1976) (1. ábra).



1. ábra. Az emberi szervezetre ható stressz-szintek.

A stressz hatását számos tényező befolyásolja, mint az egyén stresszérzékenysége, neme és a stressz típusa (De Kloet és Derijk, 2004). A stressz kísérletes vizsgálatára számos protokollt találhatunk a szakirodalomban. Az ideális stresszmodell képes reprodukálni a stresszválaszt és a betegség természetes lefolyását (Jaggi és mtsai., 2011). A stressz típusa szempontjából nehéz elkülöníteni, hogy az adott stresszprotokoll fizikai vagy pszichológiai hatást vált ki, többnyire mind a kettő egyszerre jelen van. Az egyik széles körben elterjedt stresszprotokoll az immobilizációs stressz, mely a többi modellhez képest – mint az elektromos talpsokk, vagy az erőltetett úsztatás – kevésbé fájdalmas beavatkozás, viszont stimulálja a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengelyt (HPA) (De Kloet és Derijk, 2004; Rico és mtsai., 2014). Stressz hatására a hipotalamuszban kortikotropin-releasing hormon

(CRH) szabadul fel, amely a mellékvesében katekolamin és glükokortikoid termelést vált ki (Abdel Rahman és mtsai., 2002). A glükokortikoidok tipikus stresszhormonok, melyek strukturális változásokat okoznak különböző agyterületeken (Chen és mtsai., 2008). A stressz hatásának szempontjából a két leginkább érintett terület a frontális kortex és a hippocampus (Morales Rico és mtsai., 2014). Cook és munkatársai igazolták, hogy a krónikus immobilizációs stresszre adott válasz az emelkedő glükokortikoid szintek mellett a mediális prefrontális kéreg II.-III. rétegében lévő piramissejtek dendritfa arborizációinak redukcióját okozza (Cook és mtsai., 2004). A hippocampus stresszben betöltött szerepe is igazolt: a régió CA3 és CA1 területén a piramissejtek dendritjein megtalálható a CRH 1-es típusú receptora, így az extracelluláris CRH dendrittüske szám vesztést okoz ezekben a régiókban, ezáltal kiváltja a szinaptikus plaszticitás csökkenését (Chen és mtsai., 2008).

1.2. Stressz szerepe a neurodegeneratív betegségek kialakulásában

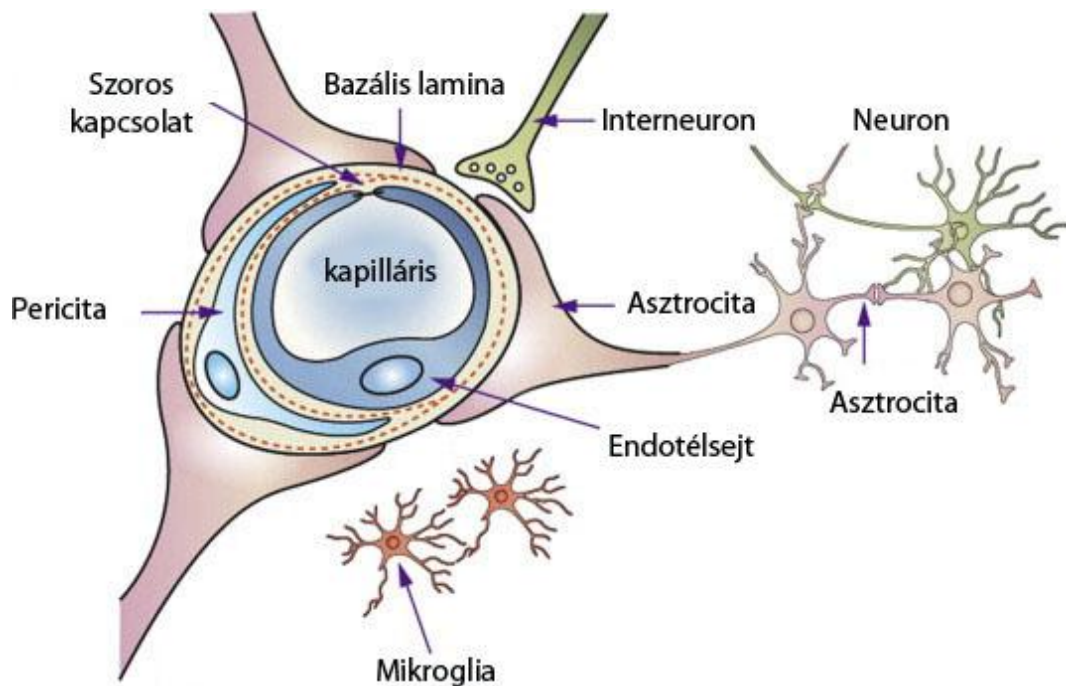
A stressznek exogén szerep tulajdonítható egyes pszichológiai és pszichiátriai betegségek kialakulásában. Klinikai tanulmányok igazolták, hogy a demencia létrejöttében és progressziójában a pszichés traumák, különböző stresszesemények fontos szerepet játszanak és hozzájárulnak neuropszichiátriai betegségek, így az Alzheimer-kór kialakulásához is (Wilson és mtsai., 2006; Wilson és mtsai., 2007).

Preklinikai vizsgálatok szerint a krónikus stressz okozta központi idegrendszerbeli strukturális változások összefüggésbe hozhatóak a depresszió és az Alzheimer-kór kialakulásával. Az Alzheimer-kórra jellemző kognitív funkciók romlása korrelál a szinapszisok és dendrittüskék számának csökkenésével (De Kosky és Scheff, 1990). Ez a morfológiai változás a hippocampus területén a jellegzetesebb, ahol a tüskék számának csökkenése 44-55% is lehet, ugyanakkor kisebb mértékben a kortikális neuronokban is megfigyelhető (Scheff és mtsai., 2007).

Akut és krónikus stressz hatására a hippocampális régióban a dendrittüskék fő citoszkeletális komponense, a β -aktin, illetve az Alzheimer-kór patomechanizmusában szerepet játszó amiloid prekursor protein vizsgálata során gén és fehérje expressziós változás figyelhető meg (Sántha és mtsai., 2012). Habár az elmúlt években egyre több tanulmány hívja fel a figyelmet a stressz Alzheimer-kórban betöltött szerepére, azonban csak néhány adatot találunk a stressz indukálta biokémiai folyamatokról és az agy szerkezeti változásáról.

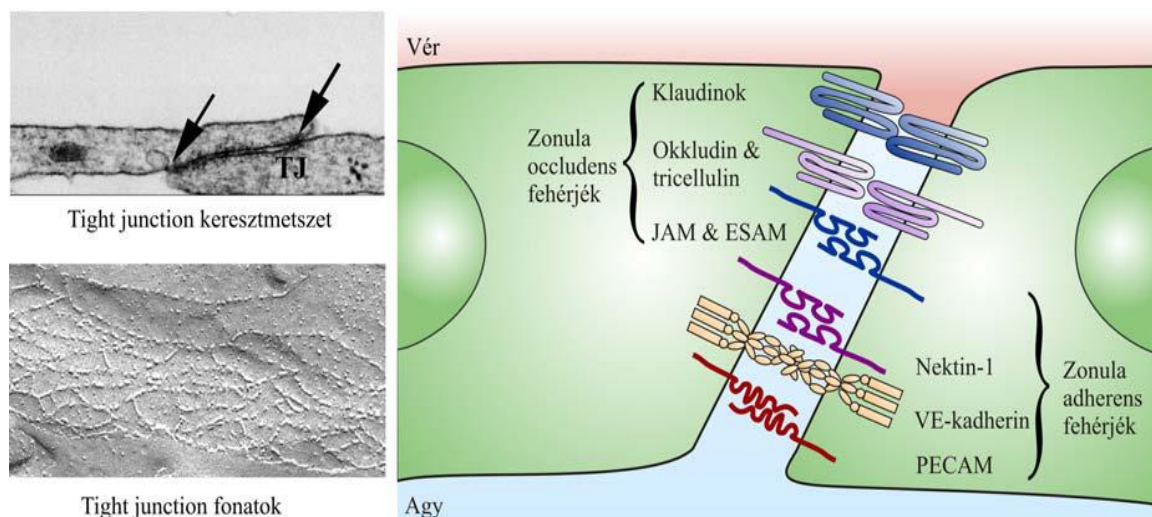
1.3. A vér-agy gát felépítése és működése

Az idegsejtek mikrokörnyezetének kialakításában és a működésükhöz elengedhetetlen ionos homeosztázis fenntartásában az agyi kapillárisok endotélsejtjei és a hozzájuk szorosan kapcsolódó periciták, asztrociták, mikroglia-, és idegsejtek fontos szerepet töltenek be (Abbott és mtsai., 2006) (2. ábra). Az agyi mikroerek endotélsejtjei képezik a vér-agy gát anatómiai alapját: dinamikus határfelületet alkotnak a vér és az agy között; biztosítják a tápanyagokat az idegi sejtek számára; védik őket a káros molekuláktól és metabolitoktól; szabályozzák a központi idegrendszer kommunikációját a perifériával (Deli, 2008).



2. ábra. A vér-agy gát szerkezete (Abbott és mtsai., 2006 alapján).

Az agyi kapillárisok eltérően a test más részein előforduló erektől nem fenesztráltak, a pinocitózis szintje alacsony bennük és a vezikuláris transzport szabályozott. Az endotélsejteket a szoros kapcsolatok (tight junction, zonula occludens) fűzik össze (3. ábra). Ezek a struktúrák mechanikai védelmet biztosítanak, megakadályozzák a vízdékony molekulák sejtek közötti szabad áramlását (Abbott és mtsai., 2006). A szoros kapcsolatokat az okkludin, a klaudin fehérjecsald tagjai és a junkcionális adhézios molekulák csoportja alakítja ki. Ezek az integráns membránfehérjék amellet, hogy jelentősen korlátozzák a paracelluláris szabad diffúziót, kijelölik az endotélsejtek polarizáltságát, azaz a luminális (vér felöli) és az abluminális oldalt, ezáltal biztosítják a speciális transzportrendszerek irányát (Abbott és mtsai., 2006).



3. ábra. Az endotélsejtek között létrejövő szoros kapcsolatok (nyíl: tight junction, zonula occludens) és a kialakításukban közreműködő fehérjék (Deli, 2011).

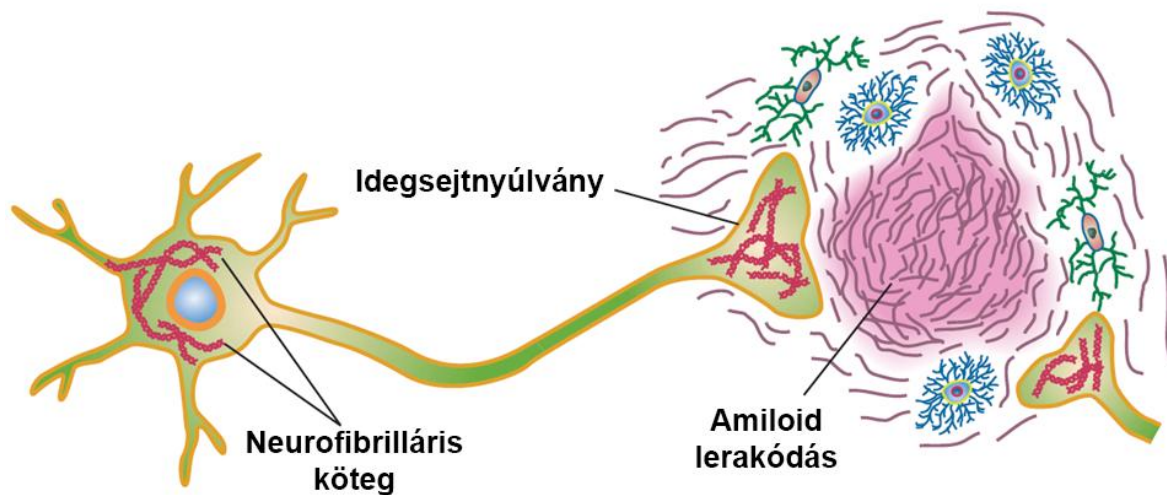
A csillag formájú asztrociták végtalpai hálózatosan borítják az agyi kapillárisok abluminális felszínét. A fehérállományban hosszabb, vékonyabb nyúlványokkal rendelkező rostos, a szürkeállományban vastagabb nyúlványos, protoplazmás asztroglia található. Az asztrocita sejtek nyúlványaiban intermedier filamentumokból álló hosszanti lefutású kötegek vannak, melyek stabilizálják a sejt szerkezetét. A filamentumok speciális markere a sejtvezázkító gliális fibrilláris savas protein (GFAP), amely csak erre a sejt típusra jellemző (Kálmán, 2008). A GFAP denzitása ott a legkifejezettebb, ahol a gliasejtek egymással, neuronokkal és az endotélsejtek lamina basalisával kapcsolódnak (Nakazawa és mtsai., 1998).

Az asztrocitáknak a vér-agy gát kialakítása mellett (Abbott és mtsai., 2006; Deli, 2008) ismert több anyagcsere-folyamatban betöltött szerepe is. Részt vesznek neuropeptidek szintézisében és lebontásában, szabályozzák a sav-bázis egyensúlyt, az ammónia- és széndioxid eltávolítását és biztosítják az idegsejtek energiaellátását (Husztai, 2008). Az idegsejtek elsődleges energiaforrása a glükóz, ezért az agyban a glükóz fiziológiás szintjének fenntartása létfontosságú, és glükóz hiányában irreverzibilisen sérül a neuronok működése. A glükóz és más hexózok átjuttatását a vér-agy gáton specifikus szállítófehérjék végzik, közülük a legfontosabb a glükóz-transzporter-1 (GLUT-1). A vérben keringő glükóz kapcsolódik a GLUT-1-hez, melyben konformációváltozást idéz elő és így jut át az endotélsejt membránján (Abbott és mtsai., 2006). Az idegsejtek és a gliasejtek között metabolikus kapcsolat áll fenn. Ennek során az asztrociták felveszik glükózt, és vagy változatlanul, vagy a glikolízis intermedierjeiként (pl. piruvát) az idegsejtekhez juttatják, vagy glikogén formájában elraktározzák azt. (Husztai, 2008).

1.4. A vér-agy gát szerepe központi idegrendszeri betegségekben

A stressz károsítja a vér-agy gátat és annak működését (Esposito és mtsai., 2002), a vér-agy gát diszfunkció pedig oxidatív stresszhez, gyulladásos folyamatokhoz és neuronpusztuláshoz vezet a központi idegrendszerben (Deli, 2005). A vér-agy gát sérülés egyaránt oka vagy következménye lehet több neurodegeneratív betegségnek, például az epilepsiának, stroke-nak, sclerosis multiplexnek és az Alzheimer-kórnak (Stanimirovic és Friedman, 2012).

Az Alzheimer-kór neurovaszkuláris hipotézise egyre inkább teret nyer (Zlokovic, 2008). Ennek központi eleme a vér-agy gát transzportereinek elégtelen működése. Az agy amiloid- β fehérje szintjének szabályozásában kulcsfontosságú szerepet játszanak az agyi endotélsejtek efflux pumpái és szállítófehérjéi, mint a P-glikoprotein, a multidrog rezisztencia fehérjék, és a kis sűrűségű lipoprotein (LDL) receptor kapcsolt fehérjék. Az efflux pumpák és szállítófehérjék szintjének és működésének csökkenése az agyi hajszálerekben az amiloid- β elégtelen eltávolítását okozza az agyi intersticiális és perivaszkuláris térből, ezáltal fokozza az amiloid- β aggregációt (Zlokovic, 2008) (4. ábra.).



4. ábra. Az Alzheimer-kórra jellemző kóros agyi elváltozások. Az amiloid lerakódások központját az amiloid fibrillumok alkotják, amelyeket asztrocita, mikroglia sejtek és pusztuló idegsejt nyúlványok vesznek körbe. A idegsejt sejttestében és nyúlványaiban neurofibrillumok (piros) halmozódnak fel (Wong és mtsai., 2002 alapján).

Az Alzheimer-kórhoz kötődő mentális retardációval kapcsolatba hozható az agyi kapillárisokon a glükóz transzportot bonyolító GLUT-1 fehérje expressziójának és aktivitásának csökkenése (Erickson és mtsai., 2013).

Alzheimer-kórban kimutatható a vér-agy gát kialakításában szerepet játszó periciták és asztrociták károsodása is. Az amiloid- β fehérje toxikus nem csak a neuronokra, de az agyi endotélsejtekre, pericitákra és az asztrocitákra is (Deli és mtsai., 2010; Veszélka és mtsai., 2013). Alzheimer-kóros esetekben a kortikális és hippocampális régiókban pericita degenerációt figyeltek meg (Sengillo és mtsai., 2013). Az asztrociták képesek az amiloid- β fehérjék megkötésére és hasítására, így gátolják a központi idegrendszerben amiloid plakkok kialakulását. Asztrocita diszfunkció esetén azonban az amiloid- β szint regulációja felborul így megnő a lehetősége a plakkok kialakulásának. A felhalmozódó amiloid- β lerakódások a vér-agy gát károsodását és asztrogliózist eredményeznek (Erickson és mtsai., 2013).

1.5. A stressz és a vér-agy gát kapcsolata

A stressz növeli a vér-agy gát permeabilitását (Friedman és mtsai., 1996). Ezt megerősíti, hogy a közelmúltban akut immobilizációs stressz hatására az Evans-kék festék extravazáció megemelkedését írták le egerekben (Foti Cuzzola és mtsai., 2013). Az aktiválódó HPA tengely és a felszabaduló CRH proinflammatorikus hatása közvetlenül is károsítja a vér-agy gátat. Ugyanakkor perivaszkuláris hízósejt degranuláció indul el, és ennek során olyan vazodilatátor és gyulladásos mediátorok szabadulnak fel, mint például a hisztamin. A hízósejtek által termelt vazóaktív mediátoroknak, különösképpen a hisztaminnak szerepe van a vér-agy gát permeabilitásának szabályozásában (Deli és Ábrahám, 2005). A hízósejtekből akut stressz hatására felszabaduló mediátorok a vér-agy gát permeabilitását fokozzák és az agy egyes területein neuronális gyulladást hoznak létre, ezek a folyamatok pedig hozzájárulnak számos neurodegeneratív betegség kialakulásához (Esposito és mtsai., 2001; Esposito és mtsai., 2002). Habár egyes tanulmányok igazolták a stressz vér-agy gátra gyakorolt közvetlen hatását, arról azonban keveset tudunk, hogyan változtatja meg a stressz az agyi hajszálerek morfológiáját és az agyi régiókban milyenek ezek a morfológiai változások.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A stressz jelentős morfológiai változást eredményez a központi idegrendszerben, ahol eddig elsősorban a neuronokat és gliasejteket tanulmányozták. Stressz szempontjából a két legérzékenyebb agyterület a hippocampus és a frontális kortex régió, melyek jelentősen érintettek neurodegeneratív betegségekben, különösképpen Alzheimer-kórban. Az Alzheimer-kór patomechanizmusának kialakításában fontos szerephez jut a vér-agy gát működésének károsodása. Arról azonban keveset tudunk, hogy a stressznek közvetlenül milyen hatása van a vér-agy gátat alkotó sejtek szerkezetére ezekben az érzékeny agyi területeken.

Célunk az volt, hogy nyomon kövessük az akut és krónikus immobilizációs stressz hatását az agyi kapillárisok morfológiájára a hippocampus és a frontális agykéreg területén. Az agyi endotélsejtekben az alábbi, a vér-agy gát működésében alapvető fehérjéket tanulmányoztuk: a klaudin-5 és okkludin kapcsolófehérjéket, valamint a glükóz-transzporter-1 szállítófehérjét. Az agyi hajszálereket burkoló glia végtalpak jelölésére a GFAP markerfehérjét használtuk.

Munkánk során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Milyen változásokat idéz elő az immobilizációs stressz az agyi hajszálerek endotélsejtjeiben a szoros kapcsolatokat kialakító klaudin-5 és okkludin fehérjék immunfestésének intenzitásában?
- Hogyan befolyásolja az akut és krónikus stressz a glükóz-transzporter-1 fehérje kifejeződését agyi hajszálerekben?
- Változik-e az asztrocita végtalpakat jelölő GFAP intenzitása immobilizációs stressz hatására?
- Tapasztalhatunk-e régióspecifitást – változások a frontális kéregben, illetve a hippocampusban – a vizsgált fehérjék tanulmányozása során?

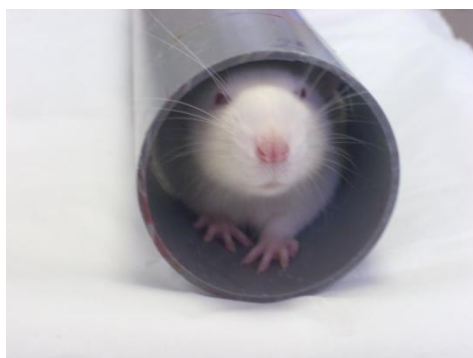
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Vizsgált csoportok

Kísérletünk során hím Wistar patkányokat (~350 g, n = 20) használtunk. Az állatokat standard körülmények között tartottuk: állandó hőmérsékleten, 12 órás világosság-sötétség periódusok, szabad víz és élelem hozzáféréssel. A stresszeljárás során a patkányokat négy csoportba osztottuk (n=5/csoport). A kontrollcsoport a többihez hasonló gondozásban és kísérleti eljárásban (handling) részesült, egyedül a stresszkezelésben volt különbség. A stressznek kitett csoportok esetében 1, 3 és 21 napig tartó immobilizációs stresszkezelést alkalmaztunk.

3.2. Immobilizációs stressz

A kísérlet során a Pitman és mtsai. (1988) által leírt standard immobilizációs stressz protokollt használtuk (Sántha és mtsai., 2012; Sántha és mtsai., 2013). A stressznek kitett csoportok 1, 3 és 21 napon keresztül napi 5 órán keresztül, 10 cm átmérőjű, 20-30 cm hosszú műanyag csövekben tartottuk táplálék és folyadék megvonása mellett. A stresszreakciót az állatok mozgásának korlátozása és a megszokott napi ritmus megváltozása váltja ki (5. ábra).



5. ábra. Immobilizációs stressz (Sántha, 2013).

3.3. Mintavétel

A kísérleti idő elteltével az állatokat intraperitoneálisan adott Avertinnel (1 ml/100g) elaltattuk, előbb hideg heparizált fiziológiás sóoldattal (100 U/ml heparin, 200-250 ml/állat), majd 3%-os paraformaldehid-foszfát puffer oldattal transzkardiálisan perfundáltuk (400-500 ml/állat). Ezt követően az agyakat felszálló cukorsorban (10-20-30% szukróz-PBS egymást követő napokon) dehidratáltuk, majd a mintákat 30%-os szukróz-PBS oldatban 4°C-on tároltuk.

3.4. Fagyasztva metszés

A dehidratálást követően az agymintáinkról cerebellumot és a szaglógumókat levágtuk, a két hemiszfériumot kettéválasztottuk. A bal féltekének frontális lebenyét Bregma 5,2 – 2,7 mm-ig és a középagyi régiót Bregma 1,8 – 6,3 mm-ig kriosztáttal (SLEE, Németország) szagittális síkban lemetszettük. A 15 µm-es metszeteket az immunhisztokémiai festések megkezdéséig 4 °C-on, 0,1%-os azidot tartalmazó PBS oldatban tároltuk.

3.5. Ellenanyagok

Kísérletünk során a klaudin-5, okkludin és a GLUT-1 vér-agy gát markereket festettük meg agyi endotélsejtekben, míg a gliasejteket GFAP immunfestéssel jelöltük. Az elsődleges és másodlagos ellenanyagok listáját és hígításuk mértékét az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat. Elsődleges és másodlagos ellenanyagok listája

	Ellenanyagok	Hígítás mértéke
Elsődleges ellenanyag	Anti-klaudin-5 (Sigma–Aldrich)	1:100
	Anti-okkludin (Life Technologies)	1:50
	Anti-GLUT-1 (Sigma–Aldrich)	1:100
	Anti-GFAP (Sigma – Aldrich)	1:200
Másodlagos ellenanyag	ALEXA 488 anti-rabbit (Life Technologies)	1:400
	ALEXA 555 anti-mouse (Life Technologies)	1:400
	CY3 anti-rabbit (Sigma – Aldrich)	1:1000

3.6. Immunhisztokémia

A frontális kéreg és hippokampusz mintákat festés előtt PBS pufferrel mostuk. A GLUT-1 és GFAP festések előtt az agyi metszeteket forrásig melegített 10 mM-os citrát pufferrel (1 mM citromsav, 10 mM nátrium-citrát) tártuk fel 70°C-os vízfürdőben. A

kapcsolófehérjék festése előtt 10 µg/ml pronázt tartalmazó CaCl₂ oldatban 7 percig kezeltük a metszeteket. Ezt követően szobahőmérsékleten 0,5 % -os Triton X-100 detergenst tartalmazó PBS oldattal permeabilizáltuk a mintákat. A nem specifikus kötőhelyeket 1 % borjú szérum albumint (Sigma) és 2 % borjúsavót (Sigma) tartalmazó PBS oldattal blokkoltuk egy óráig szobahőmérsékleten. Az elsődleges antitesteket blokkoló oldatban hígítottuk és a mintákat egy éjszakán keresztül 4 °C– on inkubáltuk. Másnap 3 × 5 perces PBS mosás után a mintákat 1 órán át szobahőmérsékleten blokkoló oldatban kihígított másodlagos antitesttel inkubáltuk (1. táblázat), amit 5 × 5 perces mosás követett. A sejtmagokat bis-benzimid festékkel (Sigma, 1 µg/ml végső hígítás) festettük meg. Újbóli 5 perces PBS mosás után a mintákat desztillált vízzel öblítettük, majd a tárgylemezre történő kihúzást követően speciális fluoreszcens mikroszkópiához kifejlesztett fedőanyaggal (Fluoromount-G, Southern Biotech) fedtük le. A következő napon a tárgylemezeket CoverGrip Coverslip Sealent (Biotium) szigetelő lakkal kentük körbe, hogy a mintákat védjük a kiszáradástól. Minden immunfestés esetében régióként 2 és kezelési csoportonként legalább 4 metszetet használtunk egyszerre. A festéseket 2-5 alkalommal ismételtük.

3.7. Képanalízis

A megfestett agymintákat az SZBK Mikroszkópos Sejtanalízis Laboratóriumában Leica SP5 (Leica Microsystems GmbH) konfokális mikroszkóppal 63 × nagyítású olajimmerziós objektívvel vizsgáltuk. Minden sorozatot a festés után egy héten belül egyszerre mikroszkópoztunk azonos beállítási paraméterekkel. A fluoreszcens festések intenzitásának összehasonlításához a digitális képek (512 × 512 pixel, n = 6-14) mind a frontális kéreg mind a hippokampusz CA1 régiójában nem átfedő területekről, azonos beállítások mellett készültek. A képeken a fluoreszcens immunfestések intenzitásának meghatározása az Image J (National Institutes of Health, USA) program segítségével történt. A kontroll csoport festési intenzitását 100 %-nak tekintettük és a különböző kezelési csoportokat ehhez viszonyítottuk.

3.8. Statisztikai kiértékelés

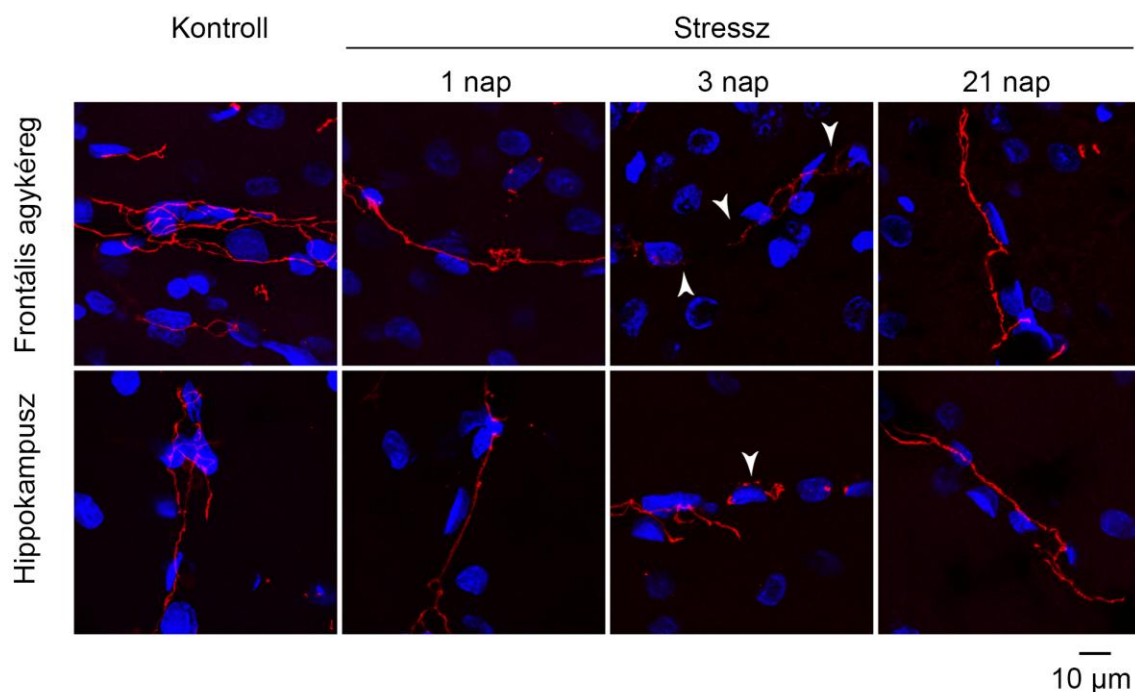
Minden adatot átlag ± S.D. értéként adtuk meg. A különböző adatsorokon Graphpad Prism program (GraphPad Software Inc., USA) segítségével variancia analízist követően Bonferroni *post hoc* tesztet végeztünk. A $P < 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

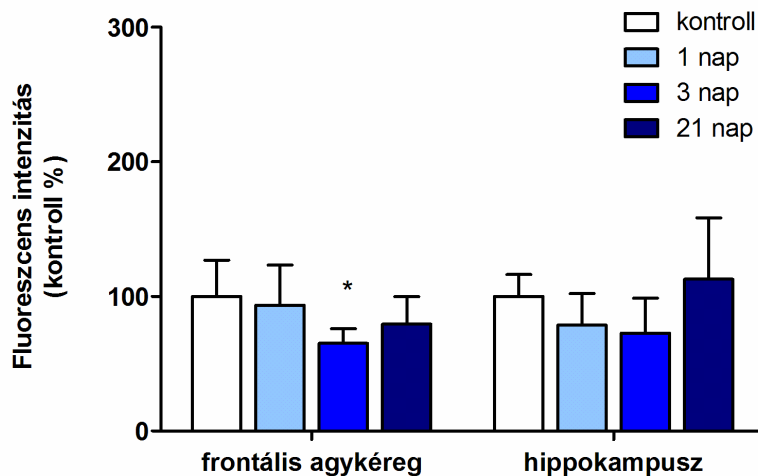
4.1. Vér-agy gát specifikus fehérjék festése kontroll és stressz kezelt patkányok agyi metszeteiben

4.1.1. Agyi endotélsejt kapcsolófehérjék: kladin-5

A kladin-5 immunfestés mindkét agyterületen jól jelölte az agyi erek endotélsejtjeinek kapcsolóstruktúráit. A sejtek határán kontroll állatokban komplex, többszörösen elágazó fonatok láthatóak (6. ábra). Immobilizációs stressz hatására az agyi mikroerek endotélsejtjeiben a kladin-5 fehérje immunfestésében változásokat találtunk: mind a frontális agykérgi, mind a hippocampális metszetekben a kladin-5 immunfestődés komplexitása és intenzitása csökkent. Ez különösen a 3 napos stressz kezelésnél volt szembevető, ahol a kladin-5 festődés kifejezett felszakadozását figyeltük meg (6. ábra, nyílhegyek). Morfológiai szempontból egyik kezelési csoportban sem volt megfigyelhető a kontroll metszeten látott sejtkapcsolati komplexitás.



6. ábra. Konfokális mikroszkópos felvételek a kladin-5 kapcsolófehérje immunfestéséről patkány agymetszeteken kontroll állatokban, valamint 1, 3, és 21 napos immobilizációs stresszkezelést követően. Piros: kladin-5 immunfestés; kék: sejtmagok. Nyílhegyek: kladin-5 festődés felszakadozása agyi hajszálerek endotélsejtjeiben; mércé: 10 µm.

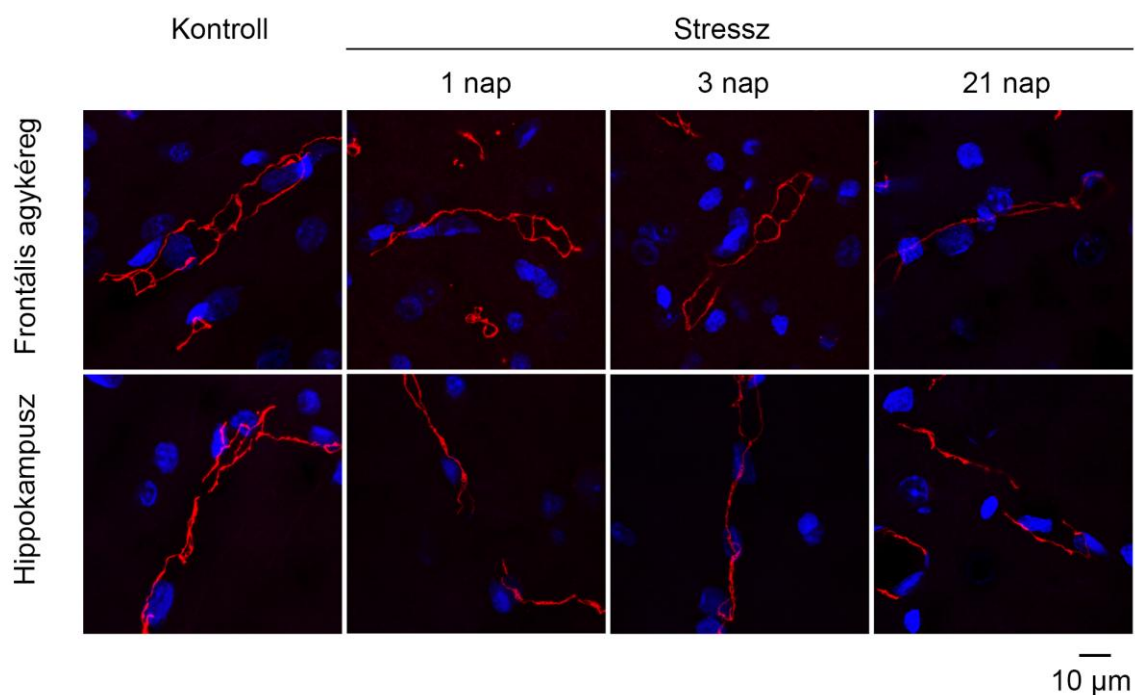


7. ábra. Klaudin-5 immunfestés fluoreszcens intenzitásának kvantifikálása frontális agykéreg és hippokampusz agyterületeken. * kontroll csoporttól szignifikánsan különböző érték, $P < 0,05$.

A klaudin-5 fehérje festődési intenzitása statisztikailag szignifikáns módon csökkent 3 napos stresszkezelés után a kontrollhoz képest frontális agykérgi metszetek agyi ereiben ($P < 0,05$; 7. ábra). Ugyan morfológiai változás a sejtkapcsolatok komplexitásában a többi stresszkezelési csoportban mindkét agyterületen látható volt (6. ábra), de az Image J program intenzitásmérési módszerével nem kaptunk szignifikáns változásokat (7. ábra).

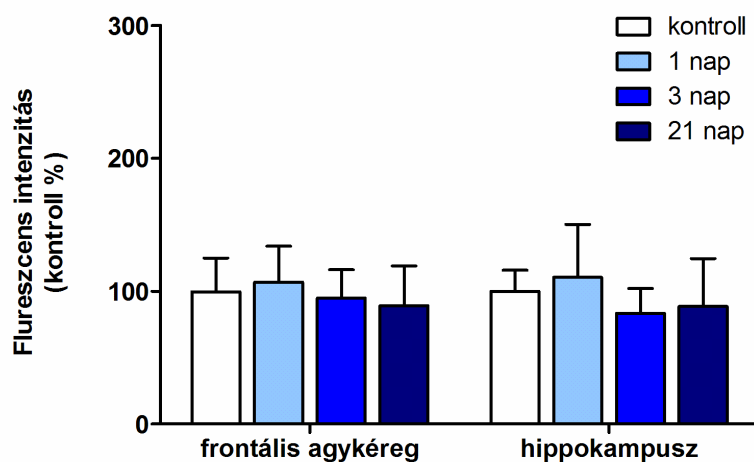
4.1.2. Agyi endotélsejt kapcsolófehérjék: okkludin

A pronázos feltárás alkalmazásával sikerült kellő intenzitással megfesteni az agyi endotélsejtekben az okkludin kapcsolófehérjét is (8. ábra). A klaudin-5 festéshez hasonlóan az agyi mikroerekben az okkludin festődés is jól láthatóvá tette a szoros kapcsolatokat mindkét agyterületen. Az akut stresszkezelés a kontrollhoz viszonyítva nem okozott látható változást a kapcsolatok komplexitásában a frontális kéregben. A hippokampuszban a stresszkezelés után az egyes csoportokban az okkludin festődési mintázatnál a klaudin-5 festéshez hasonlóan a sejtkapcsolatok komplexitásának csökkenését figyeltük meg.



8. ábra. Konfokális mikroszkópos felvételek az okkludin kapcsolófehérje immunfestéséről patkány agymetszeteken kontroll állatokban, valamint 1, 3, és 21 napos immobilizációs stresszkezelést követően. Piros: okkludin immunfestés; kék: sejtmagok; mércé: 10 µm.

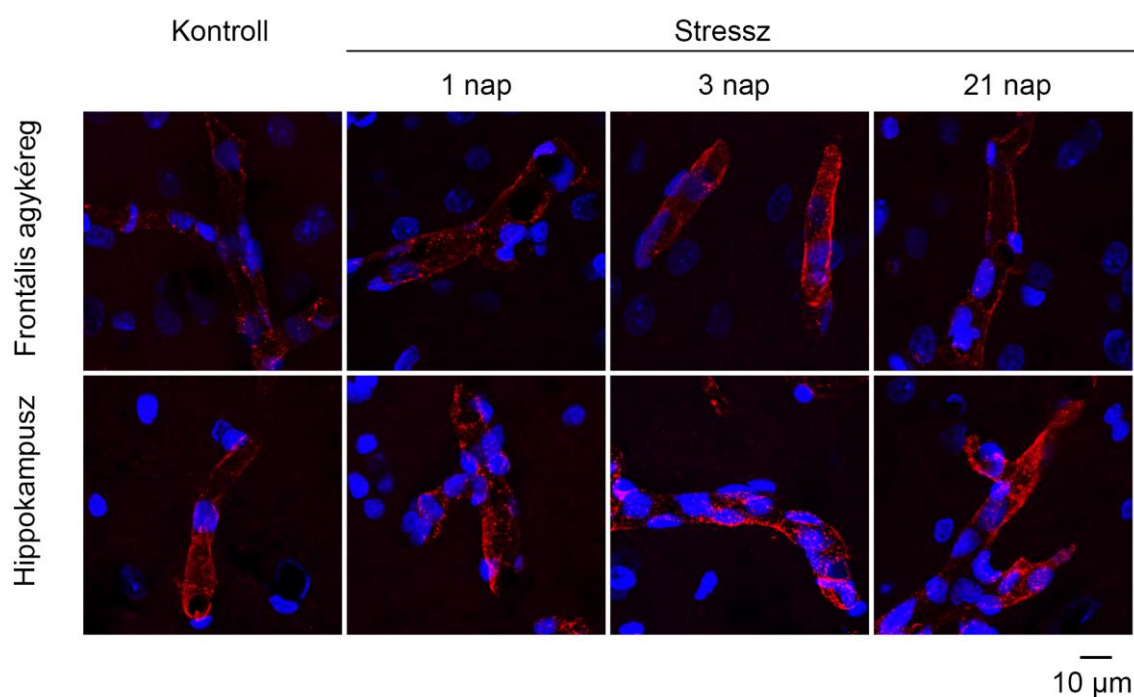
Az okkludin fehérje immunfestődési intenzitásában a kontrollhoz viszonyítva nem tapasztaltunk az immobilizációs stresszkezelés által kiváltott statisztikailag szignifikáns változást sem a frontális agykéregben, sem pedig a hippocampusban (9. ábra).



9. ábra. Okkludin immunfestés fluoreszcens intenzitásának kvantifikálása frontális agykéreg és hippocampusz agyterületeken.

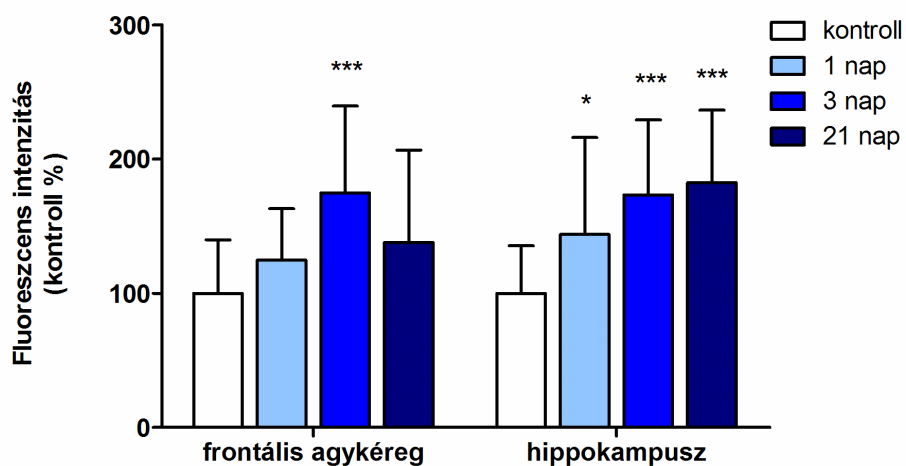
4.1.3. Glükóz-transzporter-1 immunfestés

Az agyi kapillárisok endotélsejtjeinek egyik fontos transzportere a GLUT-1, ami vér-agy gát specifikus markerként is használatos. Kontroll állatok agymetszetein a GLUT-1 immunfestés csak az agyi endotélsejteket jelöli, azonban a kapcsolófehérjével szemben az endotélsejtekben a lumenális és ablumenális membránokban helyezkedik el (10. ábra). Az akut és krónikus immobilizációs stressz mind a frontális agykéregben, mind a hippocampusban szemmel láthatóan megnöveli a GLUT-1 fehérje intenzitását. A kontrollhoz viszonyítva ez a változás a hippocampális régióban még kifejezettebb a különböző időtartamú stresszkezelések hatására.



10. ábra. Konfokális mikroszkópos felvételek a GLUT-1 fehérje immunfestéséről patkány agymetszeteiken kontroll állatokban, valamint 1, 3, és 21 napos immobilizációs stresszkezelést követően. Piros: GLUT-1 immunfestés; kék: sejtmagok; mérce: 10 µm.

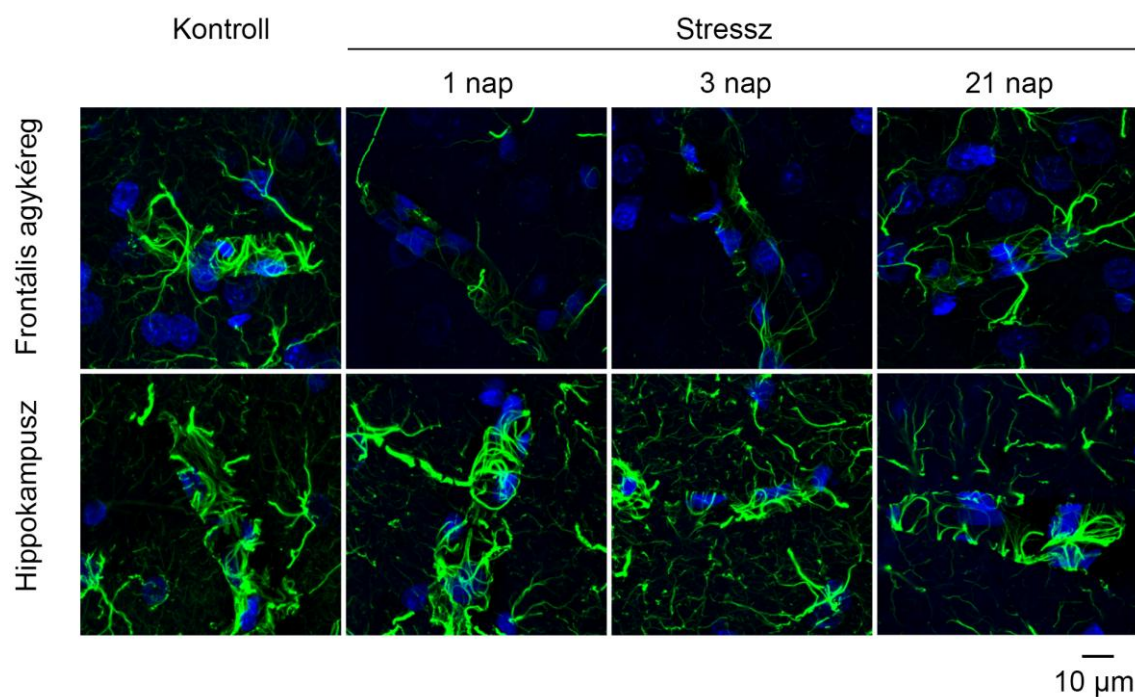
Az immunfestés intenzitásának növekedését a statisztikai kiértékelés is igazolta (11. ábra). A frontális agykéregben a három napos stresszkezelés fokozta a GLUT-1 immunfestést a kontrollhoz képest ($P < 0,001$). A hippocampális metszeteiken mindhárom stresszkezelt csoportban szignifikáns a kontrollhoz viszonyított intenzitásemelkedés. Az egy napos stresszkezelés esetében $P < 0,05$; a három és huszonegy napos stressznél $P < 0,001$ volt a változás szignifikanciájának mértéke. A frontális kéreggel szemben a hippocampusban az intenzitásemelkedésben növekvő tendencia látható.



11. ábra. GLUT-1 immunfestés fluoreszcens intenzitásának kvantifikálása frontális agykéreg és hippokampusz agyterületeken . A kontroll csoporttól szignifikánsan különböző értékek: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

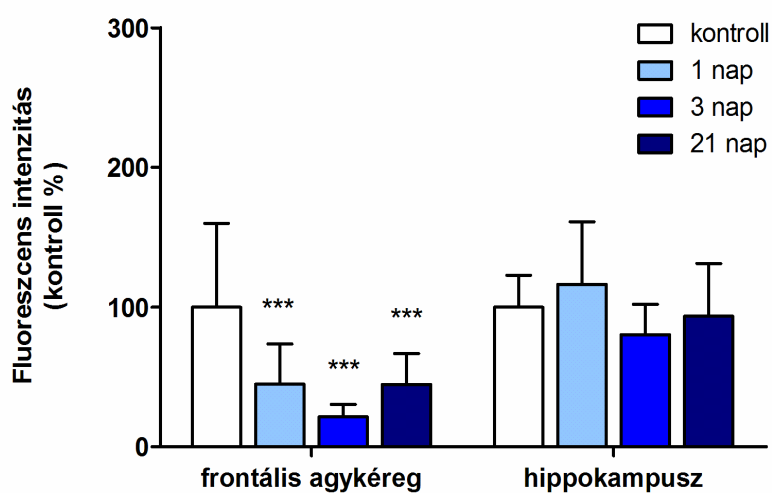
4.2. Az asztroglia sejtek immunfestése

Az asztrocitasejtek markerfehérjéje a GFAP különösen jól mutatja az agyi hajsálereket körbeölelő glia végtalpak morfológiáját (12. ábra). A frontális agykéregben a végtalpak GFAP festődése erős és jellegzetes fibrilláris mintázatot ad kontroll állatokban. Stresszkezelés után a GFAP immunfestés intenzitása az agykérgi metszetekben szemmel láthatóan gyengébb lett. Ezzel szemben a hippokampális régióban az asztrocita végtalpak GFAP festődési mintázatában vagy intenzitásában nem láttunk különbségeket stressz hatására.



12. ábra. Konfokális mikroszkópos felvételek a GFAP markerfehérje immunfestéséről patkány agymetszeteken kontroll állatokban, valamint 1, 3, és 21 napos immobilizációs stresszkezelést követően. Zöld: GFAP immunfestés; kék: sejtmagok; mércé: 10 µm.

A GFAP markerfehérje festődési intenzitásában az immobilizációs stresszkezelés a kontrollhoz viszonyítva a frontális kortikális régióban minden vizsgált időpontban szignifikáns $P < 0,001$ csökkenést okozott (13. ábra). A hippocampális régióban a stresszkezelés nem váltott ki szignifikáns változást az egyes csoportokban.



13. ábra. GFAP immunfestés fluoreszcens intenzitásának kvantifikálása frontális agykéreg és hippocampusz agyterületeken. A kontroll csoporttól szignifikánsan különböző érték: *** $P < 0,001$.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Immobilizációs stressz okozta változások az agyi mikroér endotélsejtek kapcsolófehérjéinek immunfestésében

A vér-agy gát barrier funkciójának kialakításában kulcsfontosságú szerep jut az agyi kapillárisok endotélsejtjei közötti szoros kapcsolatoknak. Ezek kialakításában a klaudin-5 és okkludin kapcsolófehérjék a legfontosabbak és ezek expresszálódnak a legmagasabb szinten agyi endotélsejtekben (Abbott és mtsai., 2006). Idegrendszeri betegségekben, így epilepsiában, vagy Alzheimer-kórban is fokozódik a vér-agy gát átteresztőképessége, gyengül a gátműködés és a vérfehérjék bejutnak az agyszövetbe, ami hozzájárul a másodlagos idegsejt pusztuláshoz (Deli, 2005; Zlokovic, 2008). Nagymértékű akut stressz esetén is leírták a vér-agy gát barrier működésének károsodását (Friedman és mtsai., 1996), azonban a vér-agy gát morfológiájának változásáról stressz esetében kevés adat áll rendelkezésre. Mindössze egy közlemény található a szakirodalomban, amely az immobilizációs stressz hatását vizsgálja a vér-agy gátra egerekben (Foti Cuzzola és mtsai., 2013). Egyszeri akut immobilizáció (2,5 óra) azonnali hatására az Evans-kék jelzőanyag agyi extravázációja megnőtt, a klaudin-1 és -3, és a ZO-1 sejtkapcsoló fehérjék immunfestése pedig csökkent agyi metszeteken (Foti Cuzzola és mtsai., 2013). Ez a munka azonban nem a legrelevánsabb kapcsolófehérjéket vizsgálta, illetve nem tanulmányozta sem az ismételt stressz hatását, sem a stressz szempontjából legfontosabb agyi régiókat.

Kísérleteinkben a klaudin-5 immunfestés szakirodalmi adatoknak megfelelően agyi metszeteken csak a vaszkuláris endotélsejteket jelölte (Nitta és mtsai., 2003). Nagy elemszámban értékeltük a frontális kortex és hippokampusz területéről készült konfokális mikroszkópos képeken a klaudin-5 immunfestés fluoreszcens intenzitását, és szignifikáns csökkenést csupán a frontális kortexben az akut, 3 napos stresszkezelés eredményezett. A mikroszkópos felvételeken a kontroll agymetszetek hajszálereiben a sejtkapcsolatok festése övszerű, folyamatos, elágazó mintázatot adott, ami szinte minden kezelési csoportban megváltozott. A szemmel látható komplexitás csökkenést ugyanakkor az ImageJ programmal történő intenzitáskiértékelés nem támasztotta alá. Hasonlóképpen az okkludin sejtkapcsoló fehérje festődésénél is csökkent a sejtkapcsolatok komplexitása, azonban a festődési intenzitás kvantifikálása nem mutatott változást a kezelt csoportokban egyik régióban sem. A kapott eredmények az agyi endotélsejtek közötti kapcsolatok fellazulására és a vér-agy gát barrier működésének sérülésére utalnak. Folyamatban van a sejtkapcsoló-fehérjék immunfestésének egy másik programmal (MATLAB) való kiértékelése, amelynél a festés komplexitását – a

sejtkapcsolatok hosszát és az elágazások számát – és azok változását jobban tudjuk kvantifikálni.

5.2. Immobilizációs stressz okozta változások a vér-agy gát glükóz-transzporter-1 festődésében

A sejtkapcsolófehérje változásokkal szemben az immobilizációs stresszkezelés felnőtt patkányokban jelentősen megemelte a GLUT-1 immunfestés intenzitását agyi mikroerekben. Hasonló változást írtak le prenatális stressz esetében patkányokban, ahol a GLUT-1 expresszió megemelkedett a frontális agykéregben és a hippocampusban (Detka és mtsai., 2014). Ezzel összhangban egy másik vizsgálatban igazolták szintén patkányokban, hogy dexametazon kezelés hatására megnő az agyi mikroerekben a GLUT-1 szintje és a vér-agy gáton keresztüli glükóz transzport is (Chipkin és mtsai., 1998). Ugyanakkor a GLUT-1 expresszió és aktivitás csökken Alzheimer-kórban és a vér-agy gáton keresztüli csökkent glükóz transzport jelentősen hozzájárul az idegsejtek működési zavarához és pusztulásához (Erickson és mtsai., 2013). Ezek az adatok arra utalnak, hogy az akut stressz esetén még működő kompenzációs mechanizmusok a neurodegeneratív folyamatok következtében már kimerülnek, illetve irreverzibilisen károsodnak a vér-agy gáton.

5.3. Immobilizációs stressz okozta változások az agyi hajszálerek körüli asztrocita végtalpakban

Akut, illetve krónikus immobilizációs stresszkezelés hatására az agyi mikroerek körüli gliavégtalpakban a GFAP immunfestődés intenzitásának csökkenését találtuk a frontális kéregben, míg a hippocampusban nem volt változás. Mind humán, mind állatkísérletes adatok alátámasztják, hogy a depresszió az asztrocita sejtek működési zavarával társul. Ezzel összhangban depresszió hatására szignifikáns GFAP csökkenést írtak le prefrontális kortexben és hippocampusban patkányokban (Gosselin 2009). Ugyan a GFAP szerkezeti fehérje pontos szerepét nem ismerjük gliasejtekben, a GFAP deficiens egerekből származó asztrocita sejtek vér-agy gát indukciós hatása károsodott (Pekny és mtsai., 1998). Feltételezzük, hogy a GFAP csökkenés asztrocita végtalpakban a frontális kortexben hozzájárulhat a klaudin-5 csökkenéshez agyi endotelsejtekben és ezzel a barrier működés gyengüléséhez.

5.4. Konklúzió

Vizsgálataink során igazoltuk, hogy az akut és krónikus immobilizációs stressz megváltoztatja az agyi mikroerek morfológiáját. A frontális kéregben a klaudin-5 kapcsolófehérje immunfestődésének intenzitása csökken párhuzamosan az asztrocita végtalpak GFAP festődésével. Az okkludin esetében nem tapasztaltunk változást. Ez a hatás régióspecifikus, mivel a hippocampusban nem volt megfigyelhető. A junkcionális fehérjékkel szemben a stressz hatására a glükóz-transzporter-1 festődés intenzitása a vér-agy gáton megemelkedett. Mindezek az adatok arra utalnak, hogy már akut, 1-3 napos stressz is jelentős változásokat okoz a vér-agy gát sejtjeiben, ami pedig befolyásolhatja az agyi homeosztázist és hozzájárulhat neurodegeneratív folyamatok kialakulásához.