

A gliovascularis lamina basalis funkcionális állapotainak immunhisztokémiai jellemzése a fejlődés során és patológiás körülmények között

OTKA T 60930/2006-10

Témavezető, dr. Kálmán Mihály, Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet.

A munkában résztvettek:

Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézete:

Dr. Kálmán Mihály, dr. Adorján István, dr. Adorján András,
valamint Bagyura Zsolt, Pócsai Károly, Bindics Kinga, Galgóczy Péter, Mahalek Judit, Sam Sadeghjan tudományos diákkörösök

Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézet:

Dr. Nagy Zoltán, Dr. Wappler Edina, Dr. Nardai Sándor

Kísérletes Orvostudományi Kutató Intézet:

Dr. Madarász Emília, Dr. Demeter Kornél, Dr. Szelényi Judit, Dr. Székács Inna

Rövidítések:

Db – disztrobrevin (ha másképp nem jelölt, az alfa1 forma)

Dg – disztroglikán (ha másképp nem jelölt, a béta alegység)

DGC – disztrofin-disztroglikán komplex (eredetileg: disztrofin-glikozamin komplex)

E – embrionális nap

F_n – fibronectin

GFAP – glial fibrillary acidic protein

i – immunreaktivitás, immunfestés (valamely anyagé)

Lam - laminin

P – posztnatális nap

POD – posztoperatív nap

Sy – szintrofin (ha másképp nem jelölt, az alfa1 forma)

Utr - utrofin

A munka tudományos háttérét, irodalmi összefüggéseit a pályázat részletesen tartalmazta. Itt csak egy-két dolgot említek, ami segíthet az eredmények megértéséhez.

A disztrofin-disztroglikán komplex (DGC)

A nem-integrin típusú laminin-receptorok közül a legfontosabb (legalábbis legismertebb) a disztroglikán Ennek ugyanazon prekursor peptidlánc hasításával keletkező, de kapcsolatot tartó két formája közül az α extracelluláris, és a lamininhez kapcsolódik, a β transzmembrán helyzetű, és számos intracelluláris fehérjével komplexet alkot, ezt a kapcsolatot a disztrofin közvetíti, amely egyben aktin-kötő. Így jön létre a DGC. Ide kötődik még a disztrobrevin és a szintrofin, mindkettőnek több formája (alfa, béta) van. A perivaszkuláris glia-végtalpakban lévő DGC a lamina basalishoz kapcsolódik. Ezáltal a DGC-nek mindenképpen szerepe van a fejlődő ill. sérült agyban az érzékszervekben, ill. ér-újraépzésben, az erek ill. a vér-agy gát stabilizálásában (Wolburg és mtsai, 2009). Ezenkívül a DGC a vízcsatorna akvaporinnak, valamint más csatornáknak és receptoroknak is 'horgonyzója' (Amiry-Moghaddam és mtsai, 2004). Sőt, ma az a felfogás kezd kibontakozni, hogy a DGC nem a lamina basalist köti a gliához, hanem az említett membránalkotóknak a lamina basalishoz való 'összegyűjtését végzi', ebben más lamina basalis alkotókhöz, pl. az agrinhez kötődése is fontos (Guadagno és

Moukhles, 2004, Warth és mtsai, 2004). A disztrofin autoszomális homológja, az utrofin, az erek endotéljében van, ahol viszont valószínűleg nincs disztroglikán (Knuesel és mtsai, 2000, Haenggi és Fritschei, 2006).

Az agyi lamina basalis és a laminin immunhisztokémiai kimutathatósága

Az agyi erek endotélje lamina basalisra ül. Ugyanakkor az idegszövetnek is van egy lamina basalis a leptomeninx kötőszövege felé. Ezt a lamina basalist az asztroglia termeli. Ahol az agyi erek belépnek az agyállományba, egy ideig a meningeális szövet kíséri őket (Virchow-Robin tölcser). Mihelyst ez eltűnik, az agyállományt borító, asztroglia-termelte lamina basalis hézagmentesen összefekszik az érrel. A perivaszkuláris asztrociákat és az agyi erek endotéljét ezután már egy egységes 'gliovascularis' lamina basalis választja el. Krum és mtsai (1991) ezzel magyarázzák azt, hogy – főleg fixált anyagokon – az agyi erek lam-je nem ad immunhisztokémiai reakciót: ti. az összefekvő lamina basalisok miatt a laminin epitopok fedésbe kerülnek. Hogy nem a fixálás denaturáló hatását kell okolni (ld. Jucker és mtsai, 1992), azt mutatja az ugyanígy fixált meningeális erek, valamint a fejlődő agy, a cirkumventrikuláris szervek és a sérülés környéki erek lam-i-je. Ezekben az esetekben azonban agyszerte aránylag széles perivaszkuláris rések találhatók a külső (gliális) és a belső (vaszkuláris) lamina basalisok között.

A lam-i dinamikus változásai irányították a figyelmünket a DGC komponensek esetleges hasonló tulajdonságaira. A téma aktualitását bizonyították a pályázat futama alatt más forrásokból is megjelölt cikkek (Agrawal és mtsai, 2006, Milner és mtsai, 2008), valamint egy koreai csoportnak a szintén lamina basalis-komponens nidogén immunreaktivitásának változásával kapcsolatos eredményei (Ae Sao és mtsai, 2007)

Munkánk során elsősorban a következő komponenseket vizsgáltuk:

Béta-disztroglikán, alfa1-szintrofin, alfa1-disztrobrevin, utrofin. Emellett vizsgáltuk a lamina basalis komponenseiként a laminint, fibronektint, gliamarkerekként a GFAP-t (glial fibrillary acidic protein), a glutamin-szintetázt, az S100 proteint, és az éretlen glia (főleg a radiális glia) kirajzolására a nesztint (elsősorban éretlen idegszöveti elemek intermedier fehérjéjeként fordul elő), valamint az agyban előforduló legfontosabb vízcsatorna-molekulát, az akvaporin-4-t. Disztrofinokkal foglalkoztunk egy korábbi közleményben (Szabó és mtsai, 2004)

Az egyes műtéti eljárásokat röviden ismertetjük az adott kísérletnél. Narkózishoz ketamin-xilazin injekciót használtunk (20 ill. 80 mg/kg). Fixálásként 4% paraformaldehid-perfúziót alkalmaztunk, kivéve az embrió- és újszülött agyakat, és az autopsziás vizsgálatokat, ahol immerzióval fixáltunk. Általában lebegő Vibratom-metszeteken, fluoreszcens immunhisztokémiai módszerrel dolgoztunk, ahol nem, azt megemlítem. Elektronmikroszkópos immunhisztokémiai vizsgálatoknál avidin-biotin módszert, diamnobenzidin-reakciót, majd a szokásos epoxigyantás beágyazást alkalmaztunk, de utókontrasztot nélkül.

1) A disztroglikán-disztrofin komplex (DGC) vizsgálata intakt, kifejlett állatokon (patkányokon)

A vizsgálat kiegészítette az irodalomban már megjelent adatokat a következőkkel:

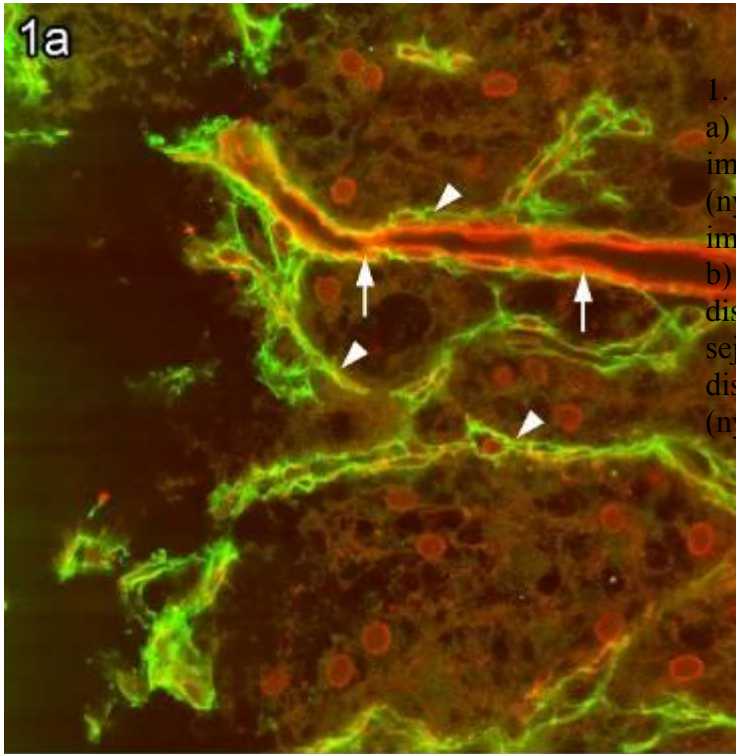
a) Az agyállományon kívül, a piában futó és az agyszövetbe lépő erek összehasonlítása: Megállapítottuk, hogy a dg-i és a db-i csak az agyállományon belüli ereket rajzolja ki, ugyanezen erek agyon kívüli szakaszán nem. Ez összefügg azzal a megállapítással (Haenggi

és Fritschei, 2006) hogy ezek a komponensek magában az érben nem, csak a környező gliavégtalpakban találhatóak meg. Az utr-i esetében éppen ellenkezőleg: az agyon kívüli erekben kimutatható, de röviddel az agyba lépés után már nem, kivéve, ha kriosztát-metszeteken dolgozunk. Tehát az agyon belül az utr nem hozzáférhető reagenseink számára. Viselkedése hasonló a lam-éhoz (Krum és mtsai, 1991).

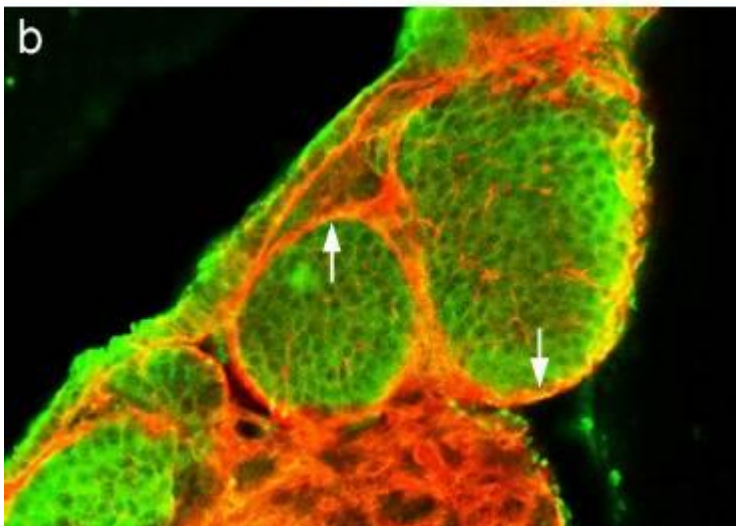
b) A circumventrikuláris szervekben (szubfornikális szerv, area postrema, organon vasculosum laminae terminalis, eminentia mediana) nemcsak dg-i és db-i, de utr-i is kirajzolta az ereket, megintcsak ahhoz hasonlóan amit a lam esetében már ismertek (Krum és mtsai., 1991). Ugyanakkor utr-i nem jelölte a szubkommisszurális szerv ereit, ebben is hasonlítva a lam-i-ra. Megjegyzendő, hogy az utóbbi szerv ereit szorosan körülveszi a perivaszkuláris glia, és megalálható bennük a vér-agy gát, míg az előbb felsorolt szerveknél nem ez a helyzet. Ezeket az eredményeket belefoglaltuk egyik benyújtott közleményünkbe (**Kálmán és mtsai, a**, ld. lejjebb).

c) Részletesebben vizsgáltuk a tobozmirigyét és a neurohipofízist. A tobozmirigyben a sejtcsoportok körül ill. az erek mentén dg-i és utr-i-t találtunk. Ugyanakkor teljesen hiányzott a db-i és a sy-i. Nemcsak a perivaszkuláris gliára jellemző alfa1-db (amit általában vizsgáltunk), hanem a neuronokra jellemző béta-db – amelyet az agy neuronjaiban ki is tudtunk mutatni – sem volt megtalálható. Ebben a szervben vizsgáltuk az asztrogliamarker GFAP (glial fibrillary acidic protein) és az akvaporin-4 (az agyra jellemző sejmembrán-vízcsatorna molekula) eloszlását is. A vizsgálat megerősítette, hogy, mint azt korábban is közöltük (Goren, Adorján és Kálmán, 2006), a szerv ezen anyagok eloszlása alapján két részre (GFAP-t és akvaporint kolokalizáltan tartalmazó proximális, ill. egyiket sem tartalmazó disztális) részre oszlik, de a lam, fn, dg, utr eloszlása ezt nem tükrözi. Eredményeinket közöltük (**Bagyura, Pócsai, Kálmán, 2010**).

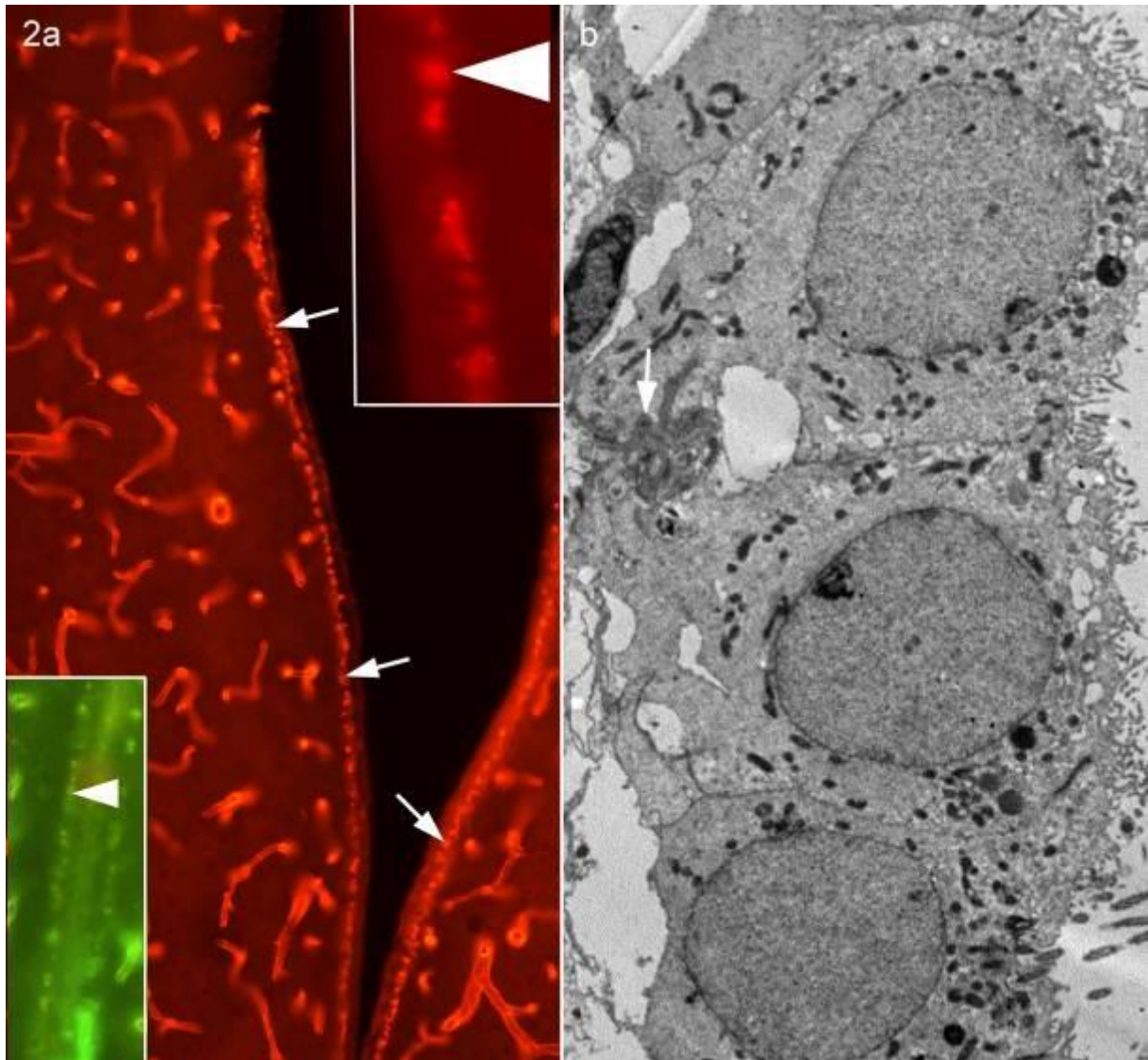
d) A neurohipofízisben a lam-i bonyolult kettősfalú labirintusrendszert mutatott ki. Itt az erek a két 'fal' között mélyen benyomultak a szervbe. A lam-réteghez a 'vaszkuláris' oldalon utr, a 'parenchymás' oldalon Dg kapcsolódott, megfelelően annak, hogy előbbi az erekben, utóbbi az érkörüli gliában található az agyban is (Haenggi és Fritschi, 2006). A neurohipofízishez szorosan tapadó intermedier lebeny nem kerülhetett ki figyelmünket. Itt a Dg-i-t a sejtcsoportok felszínén találtuk meg (akárcsak a laminint, melynek receptora) mintegy nagyszemű hálót képezve a csoportok körül. Ugyanakkor db-i és sy-i a sejtcsoport minden tagját teljesen megfestette, helyzetétől függetlenül. Eredményeinket közöltük (**Pócsai, Bagyura, Kálmán, 2010**). **Ld. 1. ábra.**



1. ábra. Részletek a hipofízisből:
 a) hátsó lebeny. A laminin-immunpozitív (zöld) sővényrendszer (nyílhegy) részében utrofín-immunpozitív (piros) ér. (nyíl)
 b) középső lebeny. Az alfa1-disztrobrevin-immunpozitív (zöld) sejtek csoportjait közös béta-disztroglikán (piros) réteg veszi körül (nyíl).



e) Az endimasejtek bázisánál egy gömb alakú testet észleltünk dg-i-val, majd db-i, utr-i, és sy-i-al is. Elektronmikroszkópos (pre-embedding) dg-immunhisztokémiai vizsgálattal ez a sejtek bázisán található labirintusszerű sejtmembrán-betüremkedésnek bizonyult, azonosnak a rendszerrel, amelyet Leonhardt és mtsai (1970) már régebben leírtak, de jelentőségét nem ismerték (**2. ábra**). A mostani eredmény arra utal, hogy ez lehet az endimális 'horgonyzóhelye' a Mercier-féle 'fracton'-oknak (Mercier és mtsai, 2002, 2003), az agyba benyomuló érhurkok lamina basalisából az endimáig húzódó, fraktálszerűen szétágazó laminin-szálcsáknak. Ez a rendszer átjárja a szubventrikuláris zónát is ahol a tartaléksejtek (össejtek is) elhelyezkednek, és ahonnan – bizonyos területeken – neuronutánpótlás történhet, és meghatározza ennek szerkezetét, a sejtészkek kialakulását (Doetsch és mtsai, 2001) **Ld. 3. ábra**. Ezekből az eredményekből közleményt jelentettünk meg (**Adorján és Kálmán, 2009**).



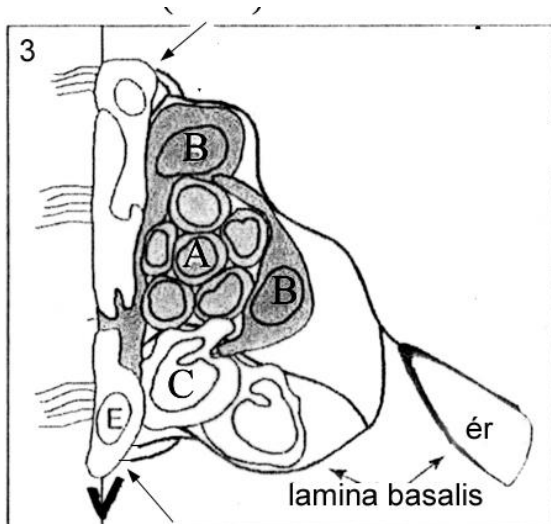
2. ábra. DGC-rendszer az ependima bazális részén:

a) béta-disztroglikán immunpozitív gömböcskék (nyíl) sora a 3. kamra fala mentén.

Felső inset: ugyanez (nyílhegy) utrofin reakciójával.

Alsó inset: ugyanez alfa-1 disztrobrevin reakciójával (nyílhegy, a kamra itt összenyomott)

b) ependimasejtek EM-képe, a bázisukon béta-disztroglikán-immunpozitív résrendszer (nyíl).

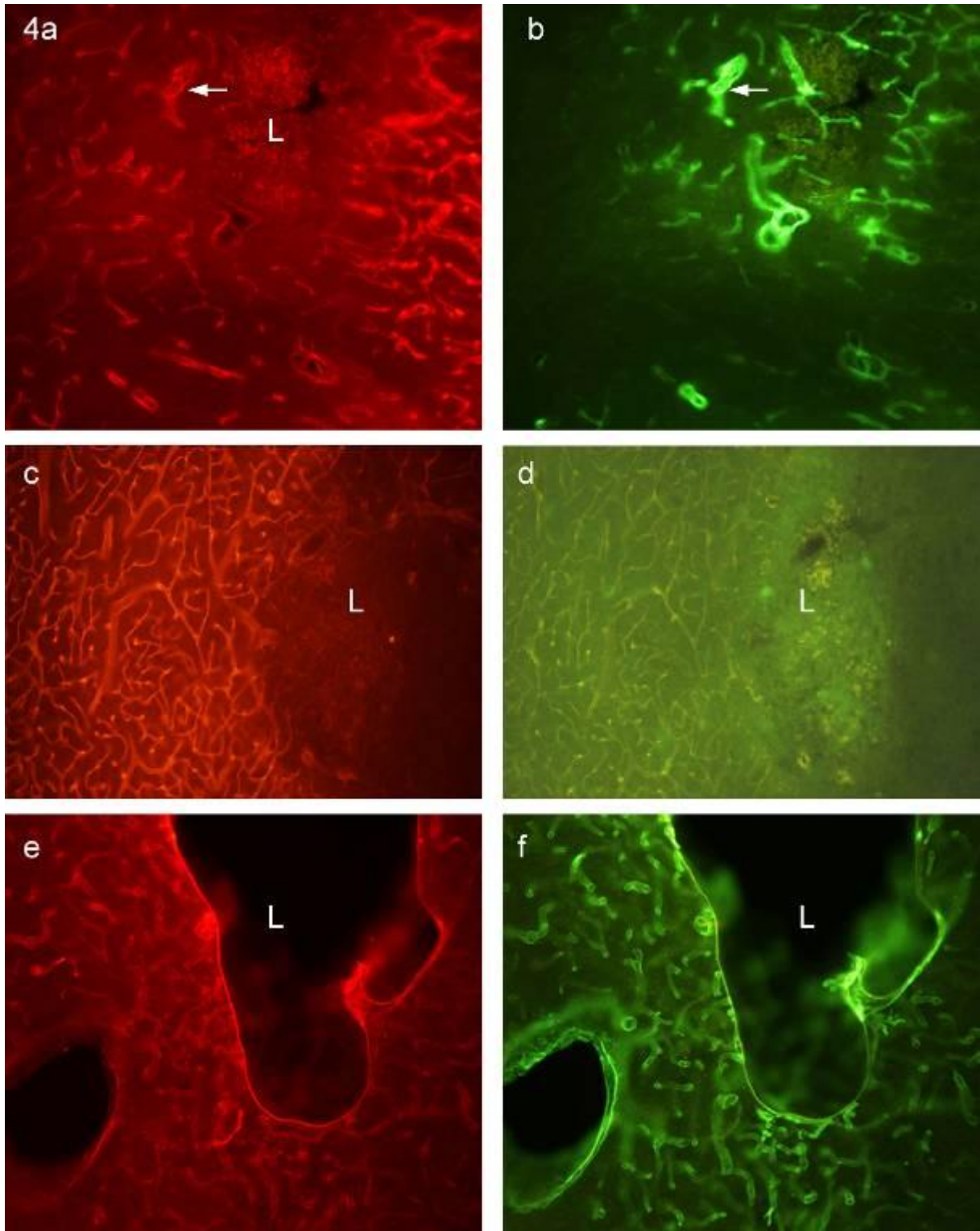


3. ábra. (Doetsch és mtsai, 2000 nyomán) Az erek lamina basalisából kiinduló 'fonalrendszer' (Mercier és mtsai, 2002, 2003: 'fractonok') az endodermia bazális részén rögzül (nyilak).

2) A mechanikus (szúrt: 'stab wound') és fagyasztásos léziók utáni gliá- és érreakciók vizsgálata.

A műtéteket ketamin-xilazin altatásban végeztük, a koponya megnyitása után tűszúrással (kb. 0.2 mm, a parietalis cortexen, hippocampuson és a thalamusom át), vagy szénsavhóval hűtött rézrúdnak az agyhoz szorításával (kb. 1 mm, a parietális cortex dorzális részén, 21 mp-ig). Ez utóbbi technikát dr. Madarász Emília csoportja vezette be. A túlélési időket ld. lejjebb, a táblázatban.

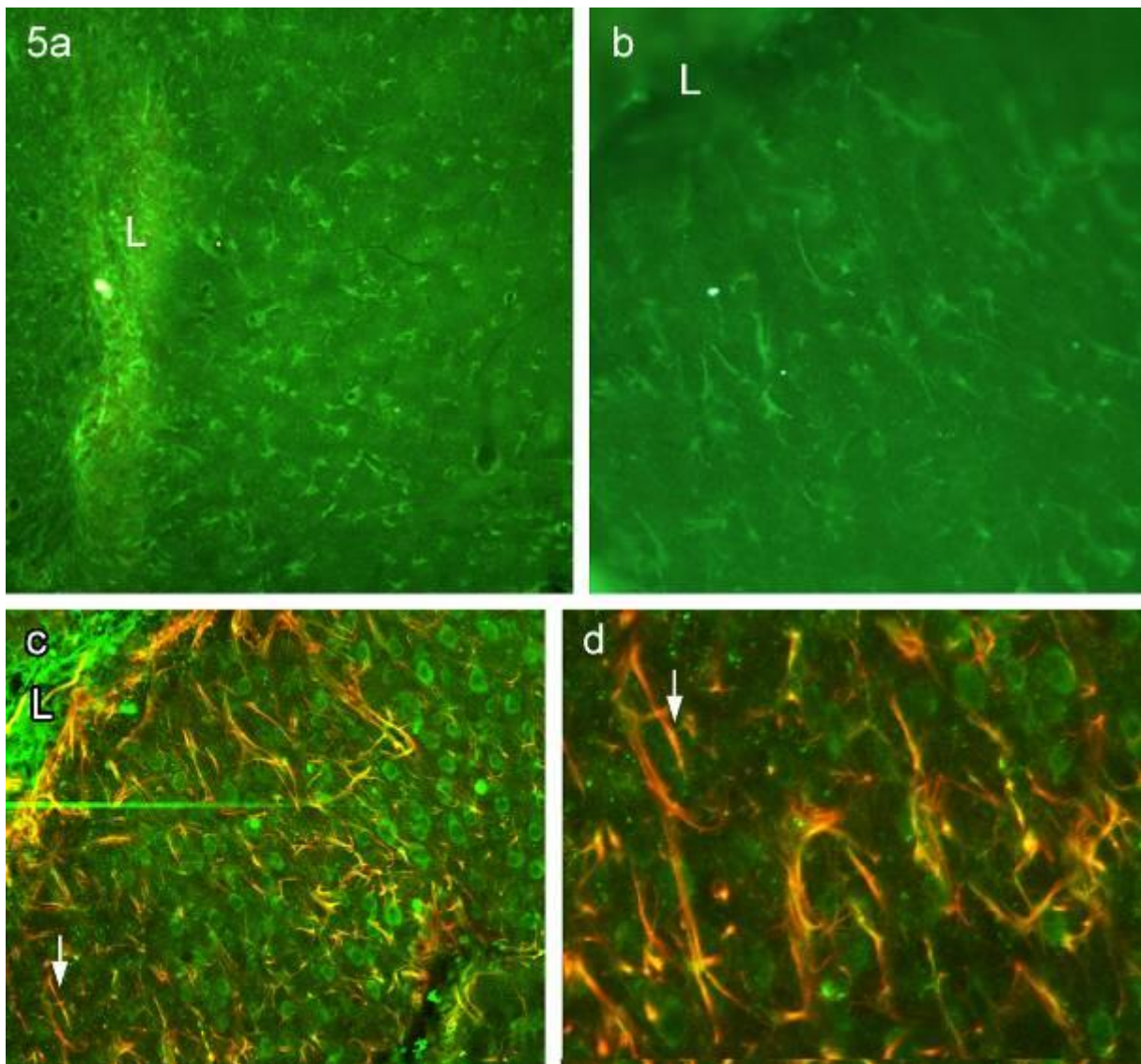
1) Szúrássos sérülés vizsgálata. A laminin esetében az említett Krum és mtsai (1991) már megfigyelte, hogy sérülés hatására az egyébként immunhisztokémiailag nem detektálható, az ér lamina basalisában elhelyezkedő lam egy bizonyos ideig immunhisztokémiai reakciót ad. (Magyarázatát ld. feljebb) Korábbi vizsgálatunk mutatta, hogy a laminin újbóli 'eltűnése' a gliareakcióval, ill. a gliovaszkuláris kapcsolatok újbóli kialakulásával kapcsolatos (Szabó és Kálmán, 2004). A pályázat keretében kimutattuk, hogy a sérülés körül az erek átmenetileg elvesztik dg-i-kat, mégpedig általában azok az erek, amelyek lam-i-vá válnak. A jelenség összefügg a sérülés utáni gliareakció fázisaival is. Eredményeinket közöltük (**Szabó és Kálmán, 2008**) Kb. velünk egyidőben vizsgálva a jelenséget, Miller és mtsai (2008) mechanizmusként a dg sejten kívüli részének a sérüléskor felszaporodó/aktiválódó mátrix-metalloproteázok általi emésztését állapította meg, amely a dg-lam kapcsolat ill. ezzel a gliovaszkuláris kapcsolat felbomlásához vezet. (A mátrix metalloproteáz-aktivitás egyébként a lamina basalis lam-i-ját is kiváltja.) Ehhez képest új eredményünk a dg-i- térbeli és időbeli viszonyának leírása a lam-i-hoz és a gliareakcióknál megszokott GFAP-i-hoz képest. **Ld. 4. ábra a-b.**



4. ábra. Szúrt sérülés (L) környéke. A laminin (b)- és a disztroglikán-pozitív erek (a) más-más területen helyezkednek el (a nyíl mindét esetben ugyanarra a kettősen jelöltött határterületi érre mutat). A disztroglikán (c)-és disztrobrevin-immunpozitvak (d), ill.a laminin- (f) és utrofín-pozitívak (e) egybeesnek.

2) A továbbiakban vizsgáltuk a db, utr, és sy viselkedését. A db változásai párhuzamosak voltak a dg-éval és ugyanazon erekben jelentkeztek (kettős-jelzéses vizsgálatok alapján): azaz

átmeneti kiesés után újbóli megjelenés, csak ez utóbbi késett kissé amazéhoz képest. Az utr-i (amely nem az alfa1-db-el a gliában, hanem béta-db-el az endothelben foglalhelyet) nem a dg-i, ill. a db-i, hanem a lam-i-alakulásával mutatott hasonlóságot. Ugyanazokban az erekben jelent meg, de később, viszont később is tűnt el. Eleinte (a kettős-jelzések szerint) a lam-i erek egyrészében jelentkezett utr-i. Később minden ér kettősen jelölődött. Ezután viszont a lam-i az utr-i ereknek csak egyrészében volt megtalálható. Érdekes, hogy még ugyanazon ér esetében is a lam-i a nekrotikus idegszövet területén volt intenzívebb, míg az utr-i épp ellenkezőleg. Ez arra utal, hogy detektálásához élő, de legalábbis nem súlyosan károsodott szövet szükséges (nem így a lam esetében!). A sy-i meglepetésre nem az erek körül változott, hanem a reaktív asztrocitákban jelent meg, mint azt a kettősjelzéses, konfokális képek is bizonyították. Nem manifestálódott azonban olyan kiterjedten, és nem állt fenn olyan sokáig, mint a GFAP. **Ld. 4-5. ábrák.** Végül az utr-i és a sy-i eltűnt a sérülés területéről.



5. ábra. Szintrofin-pozitív asztrociták. (a) szűrt sérülés (L) körül. (b) fagyasztott sérülés (L) alatt. (c és d) GFAP-val kolokalizáltan (konfokális felvétel, a kolokalizációt sárgás szín jelzi), a nyíl mindkét esetben ugyanarra az asztrocitára mutat.

3) A fagyaszásos léziók hasonló eredményeket adtak, bár a változások rövidebb ideig tartottak (a túlélési idők hasonlóak voltak az előző kísérletéhez). Elvégzésük két szempontból volt hasznos: először is, a szúrásos sérülés esetén leírtakat általánosabb érvényűvé tette, másrészt a sérülés nagyságát, alakját jobban lehetett reprodukálni, így a térbeli viszonyokat világosabbá tette, és lehetőséget adott szöveti mintavételre szemikvantitatív Western-blot vizsgálathoz, amely igazolta, hogy a db szintje csökken, míg a sy-é nő sérülés után. Itt tehát nem az immunhisztokémiai 'hozzáférhetőség', hanem ténylegesen az illető anyagok mennyisége változik. Utr esetében a Western-blot vizsgálat nem volt sikeres. Mivel azonban fagyasztott metszetekben, a lamininhez hasonlóan, kimutatható volt, feltételezhető, hogy itt viszont a 'hozzáférhetőség' változik, pl. a molekula térbeli helyzetének, más molekulákkal való összekapcsolódásának függvényében.

E jelenségeknek magyarázatát még csak találgatjuk. A db esetében lehetséges, hogy a dg hasítása a metalloproteázok által a DGC komplex széteséséhez, ez pedig a szabaddá váló 'gazdátlan' db intracelluláris lebontásával járhat. Az utr-i megjelenése talán az erek ill. lamina basalisuk újraépülésének jele. A sy-i megjelenése a DGC újraszerveződésének lehet előkészülete (egyesekek a DGC 'scaffold proteinjének' tartják (Bragg és mtsai, 2006). A jelenségek vizsgálata módot ad a sérülés utáni érelváltozások ill. érreakciók fázisokra bontására (ld. **1. táblázat**). Ezekből az eredményekből egy közleményt nyújtottunk be (**Kálmán és mtsai, a**).

1. táblázat

A vizsgált ágensek szúrásos lézió utáni relatív immunreaktivitás-változásainak összefoglalása

	POD2	POD4	POD7	POD14	POD21	POD28
laminin	+	+	+	+-	+-	-
β -dystroglycan	-	-	-	+-	+	+
α 1-dystrobrevin	-	-	-	+-	+	+
α 1-syntrophin	+-	+-	+	++	+-	-
utrophin	-	-	+-	+	++	+-

++ relative legerősebb, + állandó, erős, +- változó, gyenge, - hiányzik

3) Ischaemiás károsodások vizsgálata.

A modelleket az OPNI kutatói végezték, csak a szöveti feldolgozás történt az Anatómiai Intézetben, a tervek szerint. Három modellt használtunk, amelyek más-más klinikai kórképeket modelleznek. Mindhárom modellnél a szúrásos és fagyasztásos sérülésekhez hasonló elváltozások történtek, bár a db-i esetében a kiesés nem volt teljes. A változások időbeli lefutása azonban eltérő volt.

a) Kétoldali végleges a. carotis communis lekötés.

A tartós ischemia okota lassú neuronpusztulásnak felel meg emberben. (Patkány esetében a circulus arteriosus képes pótolni a carotis-lekötés miatt kieső vérátáramlás egy részét). A túlélési idő 1, 2, 4, 7, 10, 13, 17, vagy 30 nap volt. Ál-műtéteket is végeztek. Legtöbb eredmény e modell esetében keletkezett. A vizsgálatokat a kéreg mellett kiterjesztették a hippocampusra is, az eredmények hasonlóak voltak, mint a cortexnél, kivéve, hogy a GFAP reaktív növekedése kevésbé volt feltűnő (nyilván, mivel ez az agyterület a kéregnél eleve több

GFAP-t tartalmaz). Western-blot vizsgálatra is sor került, amely szerint az utr-i és a dg-i változásai mögött tényleges fehérjeszint-változások állnak. Ezenkívül rodaminos módszerrel vizsgálták a vér-agy gátat, amelyet nem találtak károsodottnak, és kvantitatívan mérték az érsűrűséget, amely növekedett. Ebből az anyagból közleményt adtunk le (**Wappler és mtsai**).

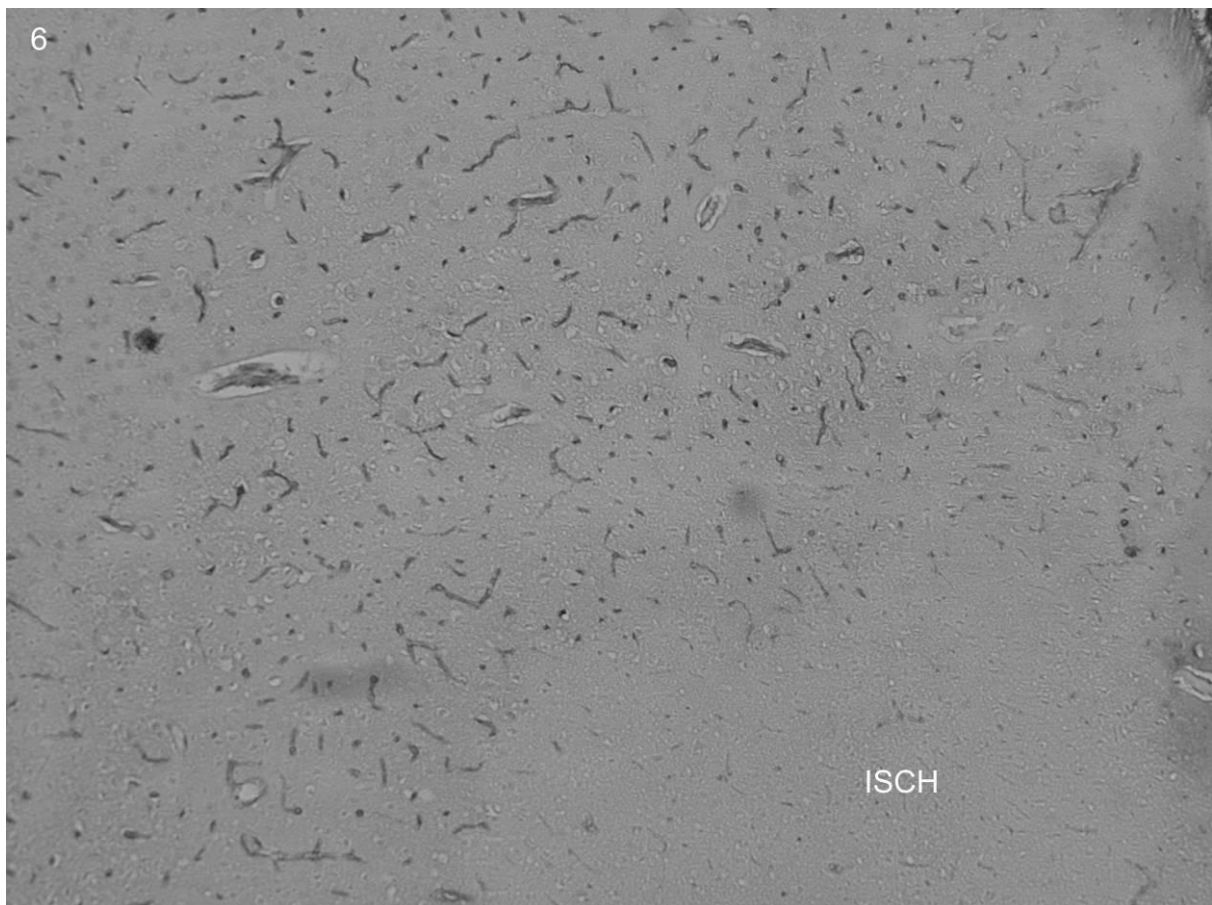
b) Kétoldali átmeneti a. carotis communis lekötés.

Ezt mongóliai ugróegéren (gerbil, *Merionyx unguicularis*) végeztük. Ennek a rágcsálónak ui. nem zárt a circulus arteriosus, így nem képes a kieső carotis-keringés pótlására. 10 min elzáródást 2,4,7,14 napos túlélések következtek (egyenként 3 állattal). A legnagyobb elváltozást mutató 4-napos túlélést ál-műtétként is megismételtük (feltárás elzárás nélkül). A második modellből szintén tervezzük közlemény készítését.

c) Egyoldali tartós a. cerebri media lekötés.

Szintén patkányon végezték. Ezen a modellen nem tudtunk elegendő vizsgálatot végezni. Ugyanakkor jól mutatta az immunfestéseknek az ischaemiás részre korlátozó változását.

Ld. 6. ábra.



6. ábra. Egyoldali a. cerebri ant. lekötés. Az ischaemiás területen (ISCH) az erek nem béta-disztroglikán-pozitívak. Paraffinbeágyazás, peroxidázreakció.

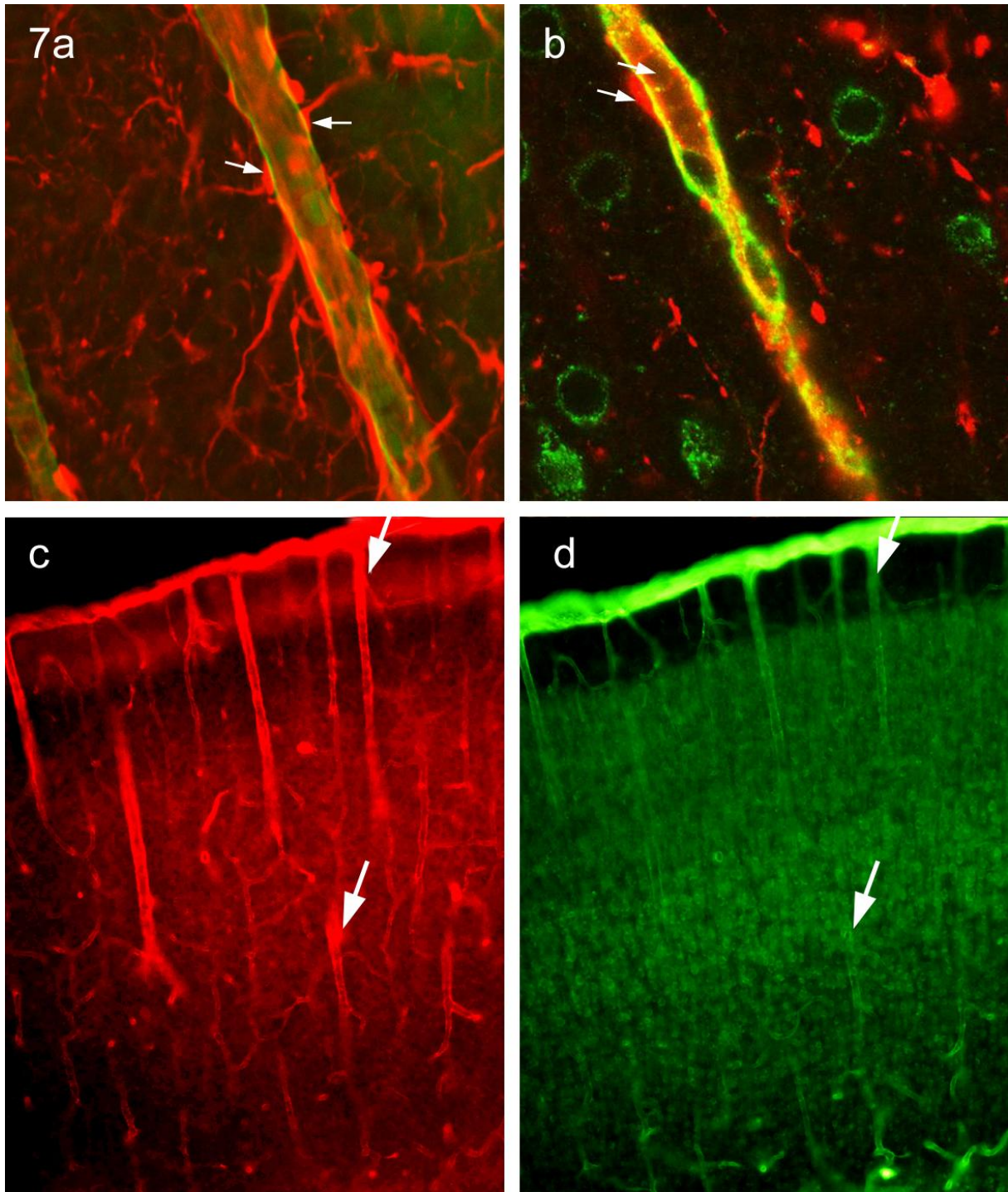
4) A DGC komponenseinek immunhisztokémiai reakciója a fejlődés során.

Az embrionális (E) 12. naptól (kb. a vaszkularizáció ideje a patkány neopalliumban) a születés utáni (posztnatális, P) 20. napig vizsgáltuk, amikor az érrendszer és a gliaszervezet

(vele a perivaszkuláris glia) már a felnőttéhez hasonlított. Elsősorban a neopalliumot vizsgáltuk, kétnapos időközökben.

- a) A DGC komponenseinek megjelenése, és a nesztin-pozitív perivaszkuláris glia kialakulása. E12-E20

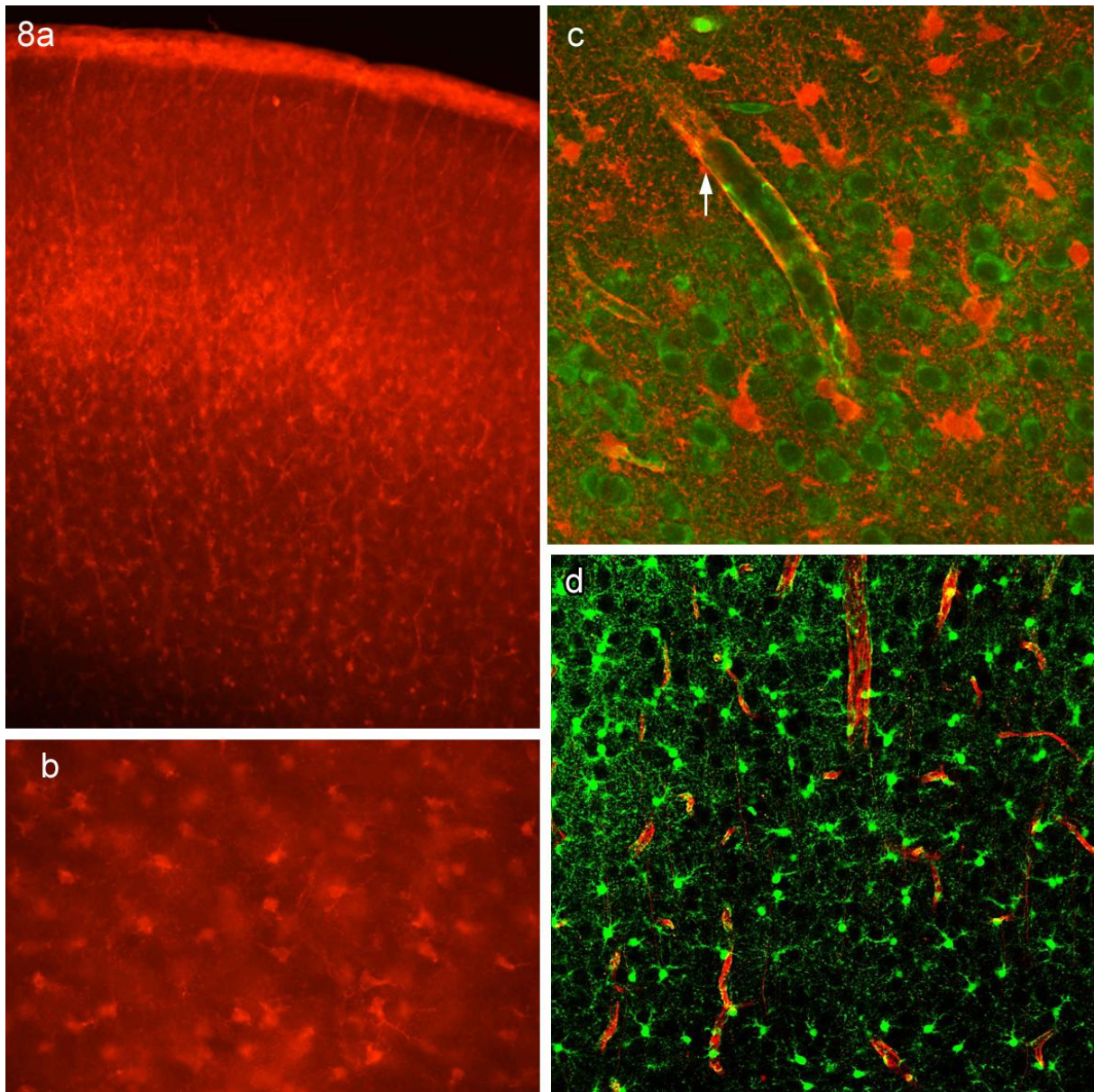
A vizsgálatok kezdetén a patkányembrió érrendszerét a lam-i ill. a fn-i már jól kirajzolja. A DGC komponensek csak jelentős késéssel mutatkoztak. Utr-i E14, dg-i E16 (egy-egy subpallialis területeken, pl. a gangliondombban már E15 is), db-i E16, sy E16-E18 között. Glia végtalpakat, a nestin (éretlen központi idegszöveti elemek, közte radiális glia intermedier fehérje) immunfestésével, csak E18-tól észleltünk, E20 napon értek el olyan sűrűséget, hogy az érfelszín jelentős részét beborították. Mivel a dg-t az irodalmi adatok a gliavégtalpakba lokalizálják, nem pedig az érfalba, ellentmondásosnak látszott, hogyan rajzolhatja ki az erek lefutását a glia végtalpak megjelenése előtt. Mivel a kettősjelzéses, konfokális mikroszkópos vizsgálat sem adott egyértelmű eredményt, elektronmikroszkópos (pre-embedding) immunhisztokémiát alkalmaztunk. Eszerint az erekkel szélesen érintkező sejtek, amelyek még nem nyúlványosak, tartalmaztak dg-i-t. Feltételezzük, hogy ezek a kontaktusok alakulnak át 'végtalppá', úgy, hogy a környező, egyre sokasodó sejtek a vaszkuláris érintkezés és a sejt többi része közötti érintkezést összenyomva elvékonyítják (tehát nem a nyúlvány 'nő oda' az érhez), és a nesztin ekkor jelenik meg mint 'szilárdító' (vagy sűrűsödik össze, és válik kimutathatóvá). Ez azonban még további vizsgálatokat kíván. E20-tól kezdve az ereket a nesztin immunfestése is jól kirajzolta. Ez azonban nem annyira a végtalpakban, hanem az erek endotéljében lévő nesztinnek tulajdonítható, amelyet többen is észleltek, látható még a kifejlett állatok agyi ereiben is. **Ld. 7. ábra.**



7. ábra. (a) nesztin-pozitív végtalpak (nyíl) a laminin-pozitív érfelszínen (E20). (b) maga az érfal is nesztin pozitív a laminin-immunpozitív rétegen (= lamina basalis) belül (nyíl, a másik nyíl egy végtalpra mutat, P6). (c) disztruglikán és laminin (d) immunfestése, kéreg, P6. A nyilak azonos pontokat jelölnek. A kéreg középső részében már nincs laminin-immunfestődés az erekben (de a sejtekben igen, ez ismert jelenség).

b) A laminin, fibronectin és az utrofin immunreaktivitásának eltűnése.

Az első kettőt már Krum és Rosenstein (1991) is észlelték, magyarázatul azt tételezték fel, hogy a szöveti fejlődés, 'érés' során a szoros gliovaszkuális kapcsolatok létrejötte, a glia-ill. az ér-eredetű lamina basalisok fúziója, az ún 'composite basal lamina' (Sixt és mtsai, 2001) kialakulása elrejti az immunhisztokémiai kimutatáshoz szükséges epitopokat. Kérdés, miért előbb a fn-i, majd utána a lam-i tűnik el, mint ahogyan azt észleltük. Ezenkívül miért kezdődik az 'eltűnés' a kéreg középső mélységében, ahol éppenséggel a fiatalabb rétegek foglalnak helyet, és GFAP-pozitív gliát nem találni. Ugyanakkor az 'eltűnés' kb. egybeesik a radiális rostok nagyrészének eltűnésével, a nesztin (és vimentin)-tartalmú radiális gliának GFAP-tartalmú asztrocitákkal való felváltásával. Vizsgálataink szerint a kéreg középső részén jelennek meg azok a GFAP-negatív, ám glutamin-szintetáz ill. S100-protein immunfestésével jól kimutatható asztrociták, amelyek felelősek lehetnek az erek lamininjának 'elfedéséért'. Érdekes, hogy az utr-i itt is a lam-i-hoz hasonlóan viselkedik, párhuzamosan veszne el. Egyes kéregalatti területeken néha napokkal később (P16-20), mint a kéregben (P10-11). **Ld. 8. ábra.** Az erek immunfestődése alapján szöveti fejlődésük szakaszokra osztható (**ld. 2. táblázat**). Ebből az anyagból egy közlemény benyújtás előtt van (az írásos jelentésben már 'elküldött' lesz, **Kálmán és mtsai, b**)



8. ábra. (a) glutamin-szintetáz pozitív asztriciták P4 kéregben, a középső zónában. (b) ugyanezen sejtek, nagyobb nagyítással. (c) glutamin-szintetáz pozitív asztriciták végtalpai (nyíl) egy éren. A laminin-immunpozitivitás csaknem eltűnt (P10, a felszín alatt) (d) S100-pozitív asztriciták (P6) borítják az ereket, kevésbé alul, a kéreg mély részén, jobban felül, a középső zónában.

2. táblázat

A vizsgált ágensek immunreaktivitása E12-P12 között

	E12	E14	E16	E18	E20	P0	P2	P4	P6	P8	P10	P12
fibronectin	+	+	+	+	+	+	+	+-	-	-	-	-
laminin	+	+	+	+	+	+	+	+	+-	+-	-	-
utrophin	-	+	+	+	+	+	+	+	+-	+-	-	-
β -dystroglycan	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+-	+	+
α 1-dystrobrevin	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+-	+
nestin	-	-	-	+-	+	+	+	+	+	+	+	+

+ ereket mindenütt kirajzolja, +- helyenként kirajzolja, - erek nem rajzolódnak ki

5) *Post-mortem* anyag vizsgálata

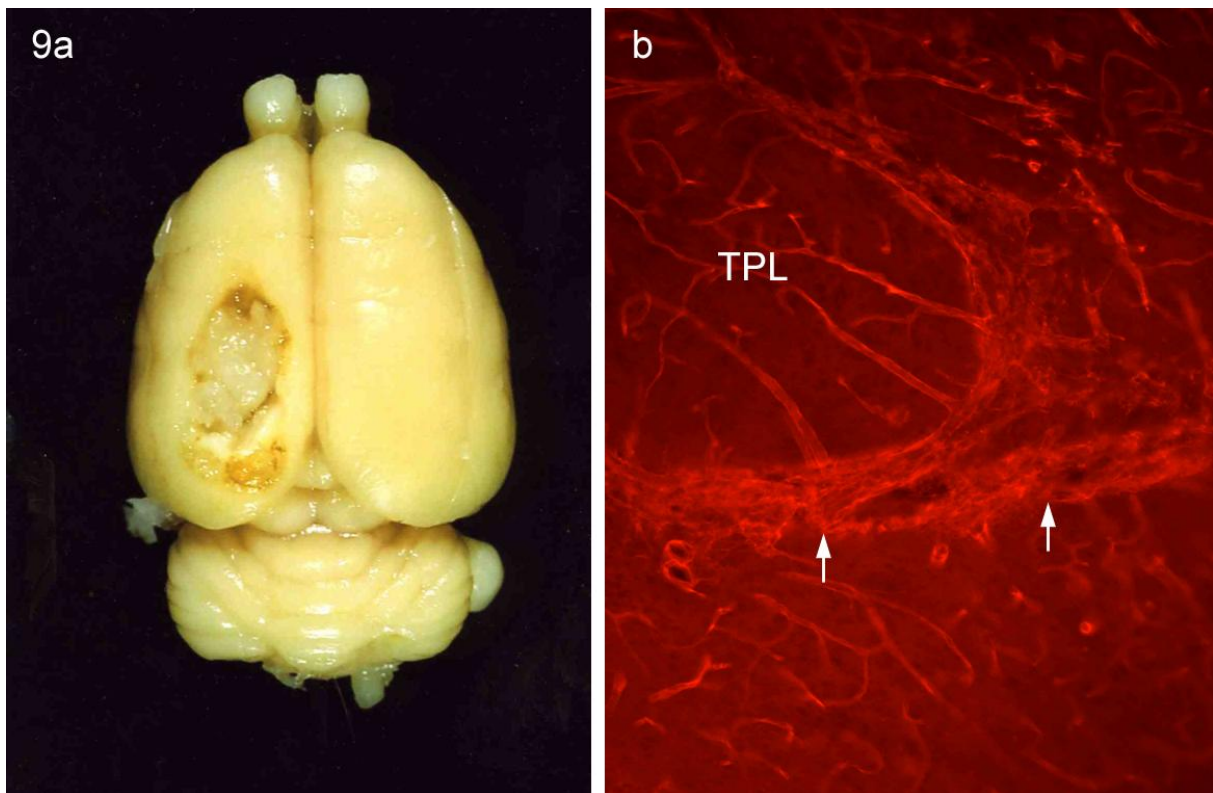
a) Állati eredetű: a patkányok agyát a leölés után 1-10 órával vettük ki, és immerzióval fixáltuk. Így kívántuk megtudni, milyen posztmortális elváltozások zavarhatják a fenti anyagok immunfestésének autopsziás hisztopatológiai alkalmazását. Eredményeink szerint kb. 3 óra elteltével még hasonlóak a reakciók a perfundált anyagéhoz, utána a *post-mortem* változások a jellegzetes reakciókat egyre inkább elfedik. Ez csak előkísérletnek tekinthető, mivel a patkányagy kisebb mérete miatt gyorsabban hűl le, és gyorsabban járja át a fixáló, mint az emberit.

b) Emberi autopsziás anyag vizsgálata Az OPNI-ből kapott paraffinos neuropathológiai blokkokon végeztünk néhány vizsgálatot, amelyek azt mutatták, hogy a DGC komponensei ilyen emberi anyagon vizsgálhatók, bár nem olyan könnyen, mint az állatkísérletes anyag. Az OPNI megszűntével a forrás elakadt, ezért azt, hogy kórismézett és datált (azaz: mennyi ideig volt beteg) mintákat egymással és állati kontrollal összehasonlítva vizsgáljunk, nem tudtuk megvalósítani. Más intézetekhez hiába fordultunk.

6) **Transzplantáltan fejlődő agyszövet vizsgálata**

A vizsgálat célja az volt, befolyásolja-e a transzplantáció az erek lamina basalisában ill. a DGC-ben a fejlődés során bekövetkező változásokat. Donorként E14 embriók telencephalonját, recipiensként kifejlett patkányoka használtunk, a telencephalon-darabkákat óvatos szívással (vízlégszivattyúval kialakított üregbe helyeztük, a koponyát a belőle kiemelt csomntlemezzel zártuk, mint azt laborunkban már korábban is végeztük (ld. pl. Kálmán és Tuba, 1998). A túlélési időket úgy választottuk meg, hogy a szövet 'elméleti kora' (a műtéti életkor+ a túlélés) a lam-i eltűnésénél rövidebb (E14+POD16=P8, 22 napos terhességgel számolva) vagy hosszabb (E14+POD20=P12) legyen. A lam-i előbbiben még nem, utóbbiban már eltűnt. Tehát a transzplantáció nem okozott zavart. Dg-i megjelent. Nem gyűlt azonban

össze elég adat (pl. a db, sy, utr viselkedésére), ezért ebből egyelőre közleményt nem tervezünk. **Ld. 9. ábra.**



9. ábra. Transzplantáció. (a) a transzplantátum egy gödörben, (b) béta-disztrogén pozitív erek, jól látható a gazdaszövet és a transzplantátum (TPL) határa (nyíl).

7) Sérülések helyére beültethető őssejtek vizsgálata.

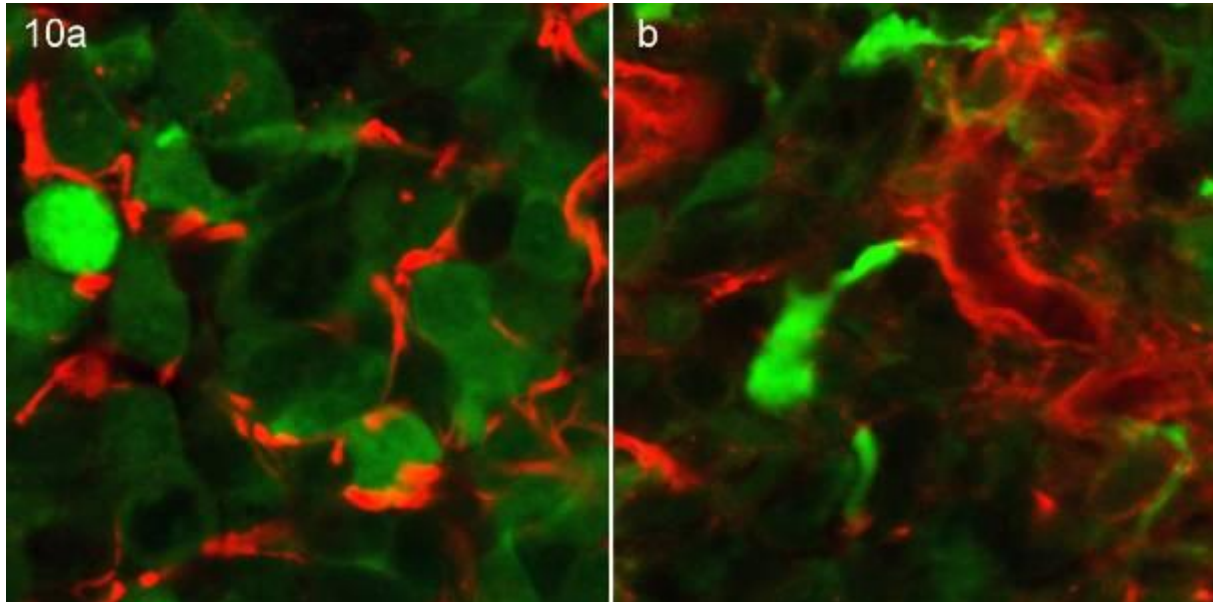
a) Őssejtek esetleges hatása az erek sérülés utáni változásaira

Az őssejteket a KOKI (Madarász Emília munkacsoportja biztosította (E-4C : p53-deficiens E9 egérembrió elülső agyhólyagjaiból klónozott, Schlett, Madarasz 1997). (American Tissue Type Collection (ATTC) katalógusszám: CRL-2925 = NE-4C, CRL-2936 = NE-GFP-4C).. Génbeültetéssel (GFP – egy medúzából származó zöld fluoreszcens protein) zölden fluoreszkálóvá tették őket. Szűrásos ill. fagyasztásos léziók helyére ültettünk be állatonként kb. 500.000 sejtet. Szúrt sérülés esetén nem találtuk meg a sejtet, fagyasztásos esetében azonban igen. Nem hatoltak azonban be az agyszövetbe, és csak ritkán küldtek nyúlványokat a közeli erekhez. Ez akkor sem változott, ha hosszabb túlélési időt (egészen egy hónapig) engedtünk. **Ld. 10. ábra.**

b) Kutatás megfelelő extracelluláris matrixot termelő, így jobban megtapadó sejtek után.

Korábban őssejtek beültetése esetén azt tapasztalták, hogy az agyszövetben csak igen kevés sejt marad életben. A jelen pályázat keretében vizsgálták a letapadásához, vándorlásához szükséges extracelluláris mátrix (ECM)-komponenseket és a környezet hatásait a sejtek saját ECM termelésére. Az őssejteket szérum-mentes közegben ültették ki kedvező letapadást biztosító, szintetikus, adhezív peptid-konjugátummal fedett felületre, majd a felület felé vezető mikro-áramlásos csatornában laminin-gradiens felszínt alakítottak ki. Az őssejtek helyi indukciója után, a fejlődő idegsejt-alakok a növekvő denzitású laminin-felület vándoroltak, és

nyúlványaikat irányítottan a laminin felszíneken növesztették. Az *in vitro* differenciálódó idegi őssejtek mindegyike – bár változó mértékben – termel és szecernál laminint. A laminin-termelés mértékét azonban a sejtek differenciációs állapota és jelentősen befolyásolja. Az egeragyból klónozott radiális gliasejtekről (RG-1, E14,5, CD1) egy kézirat (Markó és mtsai) benyújtás előtt van.



10. ábra. (a) Őssejtek (zöld) nyúlványokat küldenek egy érhez (b).

A jelentésben idézett közlemények

- Ae Seo, In. Kyoung Lee, Hyun. Mi Park, Yu. Jin Ahn, Kyoung. Tae Park, Hwan (2007) Acute changes of nidogen immunoreactivity in the basal lamina of the spinal cord vessels following dorsal hemisection without correlative changes of nidogen gene expression. *Acta Histochem.* 109(6):446-453
- Agrawal, S, Anderson, P, Durbeej, M, van Rooijen, N, Ivars F, Opendakker, G, Sorokin, LM. (2006) Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *JEM* 203 (4): 1007-1019.
- Amiry-Moghaddam, M, Frydenlund, DS, Ottersen, OP. (2004) Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience* 129: 999-1010.
- Bragg AD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Adams ME, Froehner SC (2006) Assembly of a perivascular astrocyte protein scaffold at the mammalian blood–brain barrier is dependent on α -syntrophin. *Glia* 53:879–890
- Doetsch F. 2003. A niche for adult neural stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development* 13:543-550.
- Goren O, Adorján I, KÁLMÁN M Heterogeneous occurrence of aquaporin-4 in the circumventricular organs in rat and chicken. *Anat Embryol* (2006) 211:155-172.
- Guadagno E, Moukhles K (2004) Laminin-induced aggregation of the inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, and the water permeable channel, AQP4 via a dystroglycan-containing complex in astrocytes. *Glia* 47: 138-149.
- Haenggi T, Fritschy JM. (2006) Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cell Mol Life Sci.* 63:1614-1631
- Jucker, M, Bialobok, P, Hagg, T, Ingram, DK. (1992) Laminin immunohistochemistry in brain is dependent on method of tissue fixation. *Brain Res* 586: 166-70.
- Leonhardt H. 1970. Subependymale Basalmembranlabyrinth im Hinterhorn des Seitenventrikels des Kaninchengehirns. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 105(4):395-404.
- Kálmán M, Tuba A Differences in myelination between spinal cord and cortical tissue transplanted intraocularly in rats. *Int J Devel Neurosci* (1998) 16:115-121

- Knuesel I, Bornhauser BC, Zuellig RA, Heller F, Shaub MC, Fritschy JM (2000) Differential expression of utrophin and dystrophin in CNS neurons: an in situ hybridization and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 422:594-611
- Krum, JM, More, NS, Rosenstein, JM. (1991) Brain angiogenesis: variations in vascular basement membrane glycoprotein immunoreactivity. *Exp Neurol* 111: 151-165.
- Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI. 2002. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol* 451:170-188.
- Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI. 2003. Fractones and other basal laminae in the hypothalamus. *J Comp Neurol* 455:324-340.
- Milner, R, Hung, S, Wang, X, Spatz, M, del Zoppo, GJ. (2008) The rapid decrease in astrocyte-associated dystroglycan expression is protease dependent. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:812-823.
- Szabó A, Jancsik V, Mornet D, Kálmán M (2004) Immunofluorescence mapping of dystrophin in rat brain: astrocytes contain the splice variant Dp71f but confined to subpopulations. *Anat Embryol* 208:463-477.
- Warth, A, Mittelbronn, M, Wolburg, H. (2004) Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropath* 107:311-318.
- Wolburg, H, Neuhaus, J, Kniesel, U, Krauß, B, Schmid, EM, Öcalan, M, Farrell, C, Risau, W. (1994) Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* 107: 1347- 1357.

Közlemények a pályázatból:

- Marko K., Ligeti M., Mező G., Mihala K., Kutnyinszky E., Kiss E., Hudecz F., Madarasz E. A: (2008) A novel synthetic peptide polymer with cyclic RGD motifs supports serum-free attachment of anchorage-dependent cells, *Bioconjugate Chemistry* 19: 1757-1766,
- Szabó A, Kálmán M (2008) Post traumatic lesion absence of β -dystroglycan-immunopositivity in brain vessels coincides with the glial reaction and the immunoreactivity of vascular laminin. *Curr Neurovasc Res*, 5: 206-213 **IF: 3,571**
- Adorjan I, Kalman M (2009) Distribution of β -dystroglycan immunopositive globules in the subventricular zone of rat brain. *Glia*, 57:657-666. **IF: 5.599**
- Bagyura Zs, Pocsai K, Kalman M (2010) Distribution of components of basal lamina and dystrophin-dystroglycan complex in the rat pineal gland: differences from the brain tissue and between the subdivisions of the gland *Histol Histopathol* 25:1-14. **IF: 2.194**
- Pocsai K, Bagyura Zs, Kalman M (2010) Components of the basal lamina and the dystrophin-dystroglycan complex in the neurointermediate lobe of rat pituitary – different localizations of β -dystroglycan, dystrobrevins, α 1-syntrophin and aquaporin-4., *J Histochem Cytochem*, **IF: 2.823**
- Wappler EA, Adorján I, Gál A, Galgóczy P, Bindics K, Nagy Z
Dynamics of dystroglycan-complex proteins and laminin immunoreactivities and expression due to angiogenesis in the rat brain following permanent bilateral carotid occlusion. *Microcircular Res*, **beküldve**
- Kálmán M, Mahalek J, Adorján A, Adorján I, Pócsai K, Bagyura Z, Sadeghian S,
Alterations of the perivascular dystrophin-dystroglycan complex following brain lesions. An immunohistochemical study in rats. **Közlésre beküldve**
- Kálmán M, Szabó A, Adorján I, Horváth Oszwald E, Bagyura Z, Pócsai K,
Alterations of dystrophin-dystroglycan complex and thew formazion of gliovascular connections in developing rat brain (E12-P20). An immunohistochemical study. **Beküldés előtt**

Előadások (ahol absztrakt megjelent, feltüntetve)

2006:

- Adorjan I, Szabo A, Kálmán M Immunohistochemical milestones of cerebrovascular maturation 36th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Atlanta, 2006 SFN Abs 488.20, 2006

2007

- Bagyura, Zs., Adorján, I., Pócsai, K., Kálmán, M. Lamina basalis-komponensek és laminin-receptorok vizsgálata patkányagyon: Intakt agy erei és burkai. Magyar Idegtudományi Társaság XI. Konferenciája, Szeged, 2007, *Clin Neurosci* 60 Suppl 1: 7
- Pócsai, K., Bagyura Zs., Adorján, I., Kálmán, M. Lamina basalis-komponensek és laminin-receptorok vizsgálata patkányagyon: Fejlődő és sérült agy vizsgálata. Magyar Idegtudományi Társaság XI. Konferenciája, Szeged, 2007, *Clin Neurosci* 60 Suppl 1: 53

- Adorján I., Pócsai K., Bagyura Zs., Kálmán M. Lamina basalis-komponensek és laminin-receptorok vizsgálata patkányagyon: III. Ependyma. Magyar Idegtudományi Társaság XI. Konferenciája, Szeged, 2007, Clin Neurosci 60 Suppl 1: 6
- Kálmán, M. Functional relevance of the immunoreactivity of adhesive factors in brain vessels. Magyar Idegtudományi Társaság XI. Konferenciája, Szeged, 2007, Clin Neurosci 60 Suppl 1: 31
- Kálmán M., Adorján I., Pócsai K., Bagyura Zs., Szabó A. Divergent immunoreactivities of dystroglycan and utrophin in developing and post-lesion cerebral vessels. 5th World Congress of Neuroscience, International Brain Research Organization, Melbourne, 2007
- Kálmán M., Adorján I., Pócsai K., Bagyura Zs., Different members of the dystroglycan-dystrophin complex display different changes of immunoreactivities following brain lesions. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, 2007 SFN Abs 262.2, 2007
- Adorján I; Kálmán M. Laminin-receptor dystroglycan and its associate proteins occur along the ventricular system except tanycyte-lined part of the third ventricle. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, 2007, SFN Abs 459.18, 2007

2008

- Adorján I, Kálmán M Laminin-receptor dystroglycan and its associate proteins occur along the ventricular system except tanycyte-lined part of the third ventricle. 5th Forum of the European Neuroscience Associations, Geneve, 2008, FENS Abs. 207.2, 2008.
- Pócsai, K., Bagyura Zs., Adorján, I., Kálmán, M. Functional relevance of the immunoreactivity of basal lamina components and laminin receptors following lesion – a study in rat brain. 4th Pannon Symposium on Neurotraumatology, Pécs, (2008) Clin Neurosci 60:339127.
- Adorján I, Wappler E, Gal A, Bindics K, Galgóczy P, Nagy Z, Kálmán M: Changes in dystrophin-dystroglycan complex protein expression in rat brain following permanent bilateral carotid occlusion. 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington, 2008, SFN Abstracts

2009

- Székács,I., Környei,Zs., Szelényi,J., *Szendrő,I., Madarász,E. Kinetics of cell adhesion: video-microscopic and OWLS assays on substrate – cell interactions. ESF Biosurface. 2009. Costa-Brava, Spain.
- Bagyura Zs, Pócsai K , Kalman M (2009) Immunohistochemical study on the rat corpus pineale. Magyar Idegtudományi Társaság XII. Konferenciája, Budapest, 2009, Frontiers in Systems Neuroscience. *. doi: 10.3389/conf.neuro.01.2009.04.105
- Bagyura Zs, Pócsai K , Kalman M (2009) Immunohistochemical study on the neurointermediate lobe of the rat pituitary. Magyar Idegtudományi Társaság XII. Konferenciája, Budapest, 2009, *Frontiers in Systems Neuroscience.. doi: 10.3389/conf.neuro.01.2009.04.232

2010

- Mahalek J, Sabeghjan S, Kálmán M Post-lesional alterations of dystrophin-dystroglycan complex detected by fluorescent immunohistochemical reactions following freezing lesions in rat brains. 105. Versammlungen der Anatomischen Gesellschaft, Hamburg, 2010, Annals of Anat Suppl