

**AZ AGYI MIKROEREK ULTRASTRUKTÚRÁLIS ELVÁLTOZÁSAI
PATOLÓGIÁS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT - ELEKTRON
MIKROSZKÓPOS TANULMÁNY**

című doktori (Ph.D.) értekezés összefoglalója

Süle Zoltán

Kísérletes és Klinikai Idegtudomány Doktori Program
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezetők:

Dr. Farkas Eszter

Prof. Dr. Mihály András

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Szeged

2010

1. BEVEZETÉS

Az agyban lezajló folyamatok fenntartásához nélkülözhetetlen a megfelelő tápanyag-és oxigénellátás, amihez elengedhetetlenül szükséges az agyi vérátáramlás állandósága. Az agyszövet vérellátási problémái két fő forrásból tevődnek össze. Egyrészt az agyat ellátó nagy átmérőjű rezisztenciaerek átjárhatósága csökkenhet az erek falában lerakódó atheroscleroticus plakkok miatt, másrészt a mikroereket és kapillárisokat felépítő sejtes és nem-sejtes elemek szenvedhetnek sérülést. Az agyi mikrokeringés sérülései központi helyet látszanak elfoglalni, vagy átfedésben vannak a különböző eredetű patofiziológiai folyamatok (pl. gyulladás, hyperlipidemia) lezajlásában. A kis erek sérülései a bazális membrán megvastagodásában, kollagén rostok lerakódásában, asztrocitavégtalpak duzzadásában és az endotélsejtek nyúlványosodásában öltenek formát. A kapilláris degeneráció kimenetelét tekintve végeredményben ahhoz vezet, hogy a vér-agy gáton át zajló transzportfolyamatok zavart szenvednek, illetve a kis ereket érintő szabályozó mechanizmusok kevésbé hatékonyak. Egyrészt nőhet a vér-agy gát átjárhatósága (vér-agy gát megnyílása), másrészt az agy számára nélkülözhetetlen tápanyagok (glükóz, aminosavak) facilitált diffúziója szenvedhet kárt. Így nőhet annak az esélye, hogy az agy számára veszélyes anyagok jutnak be a vér-agy gát megnyílása révén, illetve az idegszövet szuboptimális tápanyagellátása miatt romolhat az idegrendszeri funkció hatékonysága.

Az Alzheimer-kór kialakulásában a genetikai összetevők, és a hibás fehérjemódosítások mellett az agyi erek elváltozásainak kitüntetett szerepe van; a szakirodalom cerebrális amyloid angiopáthia néven számol be az erek falában lerakódott amyloid plakkokról. Humán *post-mortem* agyi fehérállományi minták mikroereinek elektronmikroszkópos vizsgálata írta le a természetes idősődéssel együtt járó ultrastrukturális elváltozásokat. Emellett állatkísérletes eredmények igazolták, hogy az agyi vérátáramlás regionális krónikus csökkenése memóriazavarokhoz vezet, ezzel hozzájárulva a demencia kialakulásához és súlyosbodásához, megerősítve a megváltozott agyi keringés és az Alzheimer-kór kapcsolatát.

A központi idegrendszerben illetve a periférián végzett kutatások is leírtak összefüggéseket a gyulladásos folyamatok során az immunvédekezésben résztvevő sejtekből felszabaduló citokinek és az Alzheimer-kór között. Bár a hyperlipidemia és az Alzheimer-kór között konkrét kapcsolat egyelőre nem bizonyított, a magas koleszterinszint növeli, statinokkal való terápia pedig csökkenti a betegségre való hajlamot. A hiperkoleszterolemia igazolt támadáspontja a nagy erek falára irányul atheroscleroticus plakkok lerakódásának formájában, aminek indirekt hatásai lehetnek a mikroerek szintjén a megváltozott véráramlási jellemzők következtében.

2. CÉLKITŰZÉSEK

- a. Elsőként arra kerestük a választ, hogy az agyi kamrakörnyéki fehérállomány mikroerei sérülnek-e Alzheimer-kór esetében, valamint, hogy ez a sérülés egyformán érinti-e a frontális, parietális illetve occipitális lebenyek fehérállományi területeit is.
- b. Következő célunk annak megállapítása volt, hogy egy proinflammatorikus citokin (tumor nekrozis faktor- α ; TNF- α) által létrehozott gyulladásozó folyamat milyen hatást fejt ki a vér-agy gát ultrastruktúrájára, illetve mediálja-e ezen kiváltott elváltozások kialakulását a nitrogén-monoxid.
- c. Végül szeretnénk volna megállapítani, hogy a hyperlipidemia önmagában eredményez-e elváltozásokat az agyi kapillárisok ultrastruktúráján, és erősíti-e az iszkémia által okozott kapilláris degenerációt.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az Alzheimer-kórral összefüggő elváltozások megállapításához a frontális, a parietális és az occipitális lebenyek kamrakörnyéki régióiból származó *post-mortem* humán fehérállományi mintákat gyűjtöttünk (n=17). A betegek mintáit három csoportra osztottuk az Alzheimer-kór definiálására használt Braak-skála alapján (1-2:transzientorhinális, 3-4:limbikus, 5-6:neokortikális), kontrollként azonos korú nem-demens páciensekből származó agyszövetet szolgált. Ezt követően a mintákat standard elektronmikroszkópos beágyazási folyamatnak vetettük alá és megvizsgáltuk a bennük található mikroerek és környezetük ultrastruktúráját. A vizsgálat a mikroerek átmérőjére, valamint az érfalban és környezetében lerakódott kollagént irányult. Eredményeink statisztikai értékelésénél a csoportösszehasonlításokat nem-parametrikus Mann-Whitney analízissel végeztük, a korrelációvizsgálat az életkorral együttjáró összefüggések felismerésére Pearson-teszttel történt.

A gyulladásozó folyamatok agyi kapillárisok ultrastruktúráján megmutatózó hatásainak modellezésére patkánykísérleteket végeztünk felnőtt, hím Wistar patkányokon (n=50). Az állatok 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dózisban TNF- α -t, illetve kontrollként fiziológiás sóoldatot kaptak a jobb oldali a. carotis communis-on keresztül. Harminc állat nitrogén-monoxid szintetáz gátló N(G)-nitro-L-arginin-metil-észter (L-NAME) előkezelésben részesült 20mg/kg dózisban. Különböző túlélési időpontokat választva (45 perc, 4 óra, 8 óra) a frontoparietális kéregből mintavétel történt elektronmikroszkópos vizsgálatra.

A hyperlipidemia agyi kapillárisokra gyakorolt lehetséges hatásainak vizsgálatához genetikailag módosított (humán apolipoprotein B-100 overexpresszáló) egereket használtunk

(n=49), kontrollként vad típusú alomtársaik szolgáltak. Hat hetes koruktól kezdve az egerek felét koleszterindús diétán tartottuk, míg társaik standard laboratóriumi rágcsálótápot kaptak. Huszonnégy hetes korukban az egereken egyoldali a. carotis communis tartós lekötést hajtottunk végre globális előagyi, azonos oldali agyféltekét érintő iszkémia létrehozására, majd 24 órás túlélés után került sor elektronmikroszkópos mintavételre a frontoparietális kéregből.

A rágcsálókísérletek esetében vizsgáltuk az asztrocitavégtalpak és az endotélsejtek morfológiai elváltozásait, valamint kapillárisátmérőt- és denzitást mértünk. Kapott eredményeinket statisztikailag 2-, illetve 3-utas varianciaanalízissel elemeztük.

4. EREDMÉNYEK

A humán mintákon végzett kísérletek eredményei alapján szembeötlő kollagén lerakódás volt megfigyelhető minden vizsgált csoportban egyrészt a mikroerek környezetében, másrészt az ereket körülvevő bazális membránban, amely az életkor-növekedéssel mutatott korrelációt. Kitüntetett mértékben a frontális, és a parietális lebenyekhez tartozó területek voltak érintettek a demens betegek csoportjában, míg a kontrollcsoport mintáinak csupán 20%-ában volt detektálható ilyen elváltozás. A parietális fehérállományi mintákban ezen felül pozitív korrelációt találtunk a kor és az érátmérő növekedés között.

A gyulladásmediátor TNF- α vér-agy gáttra kifejtett hatásainak vizsgálatára tervezett patkánykísérlet adatainak elemzése alapján elmondható, hogy a perikapilláris asztrocitavégtalpak duzzadása szignifikáns növekedést mutatott a TNF- α kezelést követően 4 órás túlélésnél, amely elváltozás az L-NAME előkezelés hatására mérsékelt formában mutatkozott meg minden vizsgált időpontban. Habár statisztikailag kimutatható szignifikáns eltérés nem volt a kapillárisok átmérőjében az egyes vizsgált csoportokat valamint túlélési időket figyelembe véve, az megállapítható, hogy a TNF- α önmagában adva már a legkorábbi vizsgálati időpontban is érátmérő-csökkenést eredményezett (4,56 μm -ról 4,08 μm -re), és további redukciónak okozott a későbbi időpontokban (3,86 μm 4 óránál, illetve 3,61 μm 8 óránál).

A hyperlipidemia agykérgi kapillárisokra gyakorolt lehetséges elváltozásainak vizsgálatát célul kitűző egérkísérletünk adatai alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a koleszterindús táplálkozás önmagában nem okozott számottevő ultrastruktúrális elváltozást a hajszálereken. Mind a szignifikánsan kimutatható asztrocitavégtalp-duzzadásért, illetve az endotélsejteken megjelenő mikrovillus jellegű kitüremkedésekért önmagában az iszkémia tehető felelőssé. A genetikai módosítás eredménye pedig az érarchitektúra módosulásában öltött formát: a transzgen egerek ritkább, de nagyobb átmérőjű kapillárisokból álló agykérgi érhálózattal rendelkeztek.

5. MEGBESZÉLÉS

A jelen tanulmányban az agyi kapillárisok ultrastruktúrájának vizsgálata történt meg több, az Alzheimer-kór rizikófaktoraként számon tartott patológiás körülmény során (gyulladásos folyamatok, iszkémia, hyperlipidemia). A hyperlipidemia kivételével az összes esetben a vér-agy gát sérülése volt megfigyelhető. Mivel a vér-agy gát a szelektív anyagtranszport helye a vérkeringés és az agyszövet között, ezért ezen rendszer épségének fenntartása kritikus a funkciója végrehajtásához. A transzportfolyamatok gátlása a mikroerek falának elváltozásai révén az érintett területeken csökkent tápanyag- és oxigénellátását von maga után, valamint a bomlástermékek eltávolításának zavarát, ami az agyszövet pusztulását eredményezi. A transzportfolyamatok zavara ellen léphet fel az a kompenzáló mechanizmus, amelynek végkimenetele a hajszálerek lumenének tágulásában valósul meg. A kapillárisok sűrűségének lecsökkenése változatlan feltételek mellett az ellátandó területek károsodásához vezet, de a kitágult erek nagyobb felületén keresztül hatékonyabb lehet a tápláló funkciók megvalósulása.

Az Alzheimer-kór kialakulásának oka egyelőre nem nyert egyértelmű bizonyítást. Széleskörűen elfogadott nézet, hogy az agyi erek patológiás elváltozása (amyloid angiopátia) és az ebből következő krónikus agyi vérátáramlás-csökkenés a betegséget súlyosbítja. A csökkent agyi véráramlás előjele az Alzheimer-kórnak, és ez a rizikófaktor hozzájárul a kognitív funkciók romlásához a betegség időtartama alatt. Jelen tanulmányban közvetlen megerősítést nyert az Alzheimer-kóros agy mikroereinek sérülése, illetve sikerült olyan kórfolyamatokat találni (iszkémia, gyulladás), amelyek az agyi mikroerek, illetve összességében a vér-agy gátat érintő károsodások kifejlődésében szerepet játszanak. Habár a vizsgálataink során felhasznált minták különböző eredetűek voltak, valamint eltérő patológiai állapotokat elemeztünk, az megállapítható, hogy az agyi erek intaktsága kitüntetett szereppel bír az egészséges agyi működés fenntartásában.