

CB1 kannabinoid receptor eloszlásának változása temporális lebeny eredetű epilepsziában

Doktori tézisek

Karlócai Mária Rita

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zsófia Maglóczky PhD, Tudományos Főmunkatárs

A doktori értekezés hivatalos bírálói:

Dr. Takács József, PhD Tudományos Főmunkatárs

Dr. Rácz Bence PhD Egyetemi adjunktus

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Kiss József, DSc, Tudományos Tanácsdó, az MTA doktora (elnök)

Dr. Székely Andrea, PhD, Egyetemi docens

Dr. Ábrahám Hajnalka, PhD, Egyetemi docens

MTA-Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
Budapest, 2012

Bevezető

Az epilepszia

A WHO definíciója alapján az epilepszia egy krónikus agyi működészavar különböző etiológiával, mely visszatérő rohamokkal jellemezhető. Világszerte, nagyjából 5 millió ember szenved epilepsziában. A rohamok megnyilvánulása sokféle lehet egy rövid figyelem-zavartól vagy izomrángásoktól egészen a súlyos és hosszú ideig tartó eszméletvesztéssel járó eseményig (pl. erős, akarattalan izomösszehúzódások). A rohamok variálhatnak gyakoriságban is: előfordulhatnak 2-3 naponta, de akár egy nap több alkalommal is. A neuronhálózat szintjén patológiás túlaktivitásként és hiperszinkron aktivitásként manifesztálódnak a rohamok. A szinaptikus bemenetek egyensúlya felborul, kiterjedt idegi aktivitást okozva, mely végül szinaptikus reorganizációhoz (pl: sarjadzáshoz) és sejthalálhoz vezethet.

Bár napjainkban számos gyógyszer elérhető, mégis jelentős számú beteg terápia-rezisztens (vagyis nem szabályozható gyógyszeresen a rohamgyakoriság). Olyan terápia-rezisztens betegek esetén ahol súlyos következményekkel járnak a rohamok és az epilepsziás fókusz pontosan lokalizálható, a műtéti beavatkozás a lehetséges megoldás. A műtét célja a rohamok megszüntetése az epileptikus fókusz eltávolítása révén. Az epilepsziás események 85%-a a temporális lebenyből ered, így a leggyakoribb műtét az anterior temporális lobektómia.

Az endokannabinoid rendszer

Az endokannabinoid rendszer aktivációja számos élettani funkcióban fontos szereppel bír, mint például a táplálkozás, a fájdalom érzékelése és emlékezés. Az agyban az endokannabinoid rendszer talán legfőbb feladata a retrográd szinaptikus jelátvitel a CB1 receptorokon (CB1-R) keresztül. A posztszinaptikus idegsejtek szabadítják fel az endokannabinoidokat aktivitás-függő módon. Az

így felszabadított molekulák a preszinaptikusan elhelyezkedő CB1-R-okhoz kötnek, ezáltal csökkentve a jelátvivő anyag felszabadulását a preszinaptikus sejtből.

Az élettenai funkciókon túl, az endokannabinoid rendszer fontos szereppel bír patológiás mechanizmusokban is. Az endokannabinoidok epilepsziában betöltött szerepéről ellentétes eredmények jelentek meg. Egyrészt a temporális lebeny eredetű epilepszia (TLE) egy állat modelljében anti-epileptikus hatás volt kimutatható, míg más esetekben a CB1-R-ok aktivációja elősegítette, egy CB1-R antagonistá pedig megelőzte a krónikus rohamok kialakulását, ha egy megfelelő időablakban adták az akut rohamok után.

Humán anyagon végzett kísérletek azt mutatják, hogy a visszatérő rohamok az endokannabinoid rendszer abnormális reorganizációját okozhatják, ezáltal csökkentve annak neuroprotektív hatását.

Célkitűzés

Kísérleteink során az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

-Hogyan függ össze az akut rohamok erőssége a későbbi sejtpusztulással?

-Milyen anatómiai elváltozások érintik az endokannabinoid rendszert fény- és elektronmikroszkópos szinten az epilepszia akut, látens és krónikus fázisaiban?

-Milyen fiziológiai változások találhatóak az endokannabinoid rendszer működésében az akut fázisban, *in vitro* szeletek használata esetén?

-Különbözik-e a CB1-R génkiütött (KO) állat rohamra való fogékonysága a kontroll állatétól?

-Megváltozik-e a CB1-R-pozitív terminálisok célelem eloszlása az egér modellben és humán betegekben?

Anyag és módszer

A pilokarpin modell

Az állatmodellhez 20-30 g közötti CD1, és CB1-R KO hím egereket használtunk. Az állatokat kontroll és kísérleti csoportokra osztottuk. A kísérleti csoport tagjait intraperitoneális pilocarpine-hydrochloride injekcióval kezeltük, így előidézve az akut rohamokat. 30 perccel korábban scopolamine-methyl-nitrate injekciót kaptak, hogy csökkentsük a pilokarpin perifériás hatásait. Ezt követően megfigyeltük, és osztályoztuk az állatok viselkedését. A rohamokat a módosított Racine-skála szerint osztályoztuk (1-5). A rohamok erőssége és gyakorisága szerint “erős” és “gyenge” csoportokba soroltuk az állatokat. A pilokarpin beadás után következő időszakot az epilepszia akut fázisának feleltettük meg. A kezelést követő 1-3 nap a latens fázisnak felelt meg, míg 1 hónappal az akut rohamok kiváltása utáni időszak a krónikus fázis volt.

In vivo elektrofiziológia

A kontroll és kezelt egereket (6 kontroll, 4 erős, 4 gyenge) altatás után egy sztereotaxikus keretben rögzítettük és rozsdamentes acél csavarokat ültettünk a koponyájukba. Az elektródokat és a csatlakozót fogászati cementbe ágyaztuk. Az EEG aktivitást 1 Hz-től 70 Hz-ig szűrtük, majd erősítettük. A mintavételezési frekvencia 500 Hz volt, az erősítés 20 $\mu\text{V}/\text{mm}$.

Ezt követően, minden elvezetés kiértékelését három független, tapasztalt kutató végezte, meghatározva a rohamok és az interiktális események gyakoriságát.

Emberi anyag

Terápia-rezisztens epilepsziában szenvedő betegek műtéti úton eltávolított hippocampusát vizsgáljuk (n=44). Ezen betegeken hagyományos temporális lobektómiát hajtottak végre, a temporális lebeny elülső harmadát távolították el egyéb temporomediális struktúrákkal együtt.

A kontroll agyszövet (N=4) 53-65 év közötti elhunyt emberektől származott, amely 2-4 órával a halál beállta után került fixálásra. A kontroll alanyok egyike sem szenvedett korábban neurológiai rendellenességben. Az agyak eltávolítása és a hippocampus szeparálása a Semmelweis Egyetem Igazságügyi Intézetében történt. Az agyszövetet eltávolítása után azonnal 3-4 mm-es darabokra vágtuk és immerziósan fixáltuk.

Immuncitokémia

Az agyszövetből 60 µm vastag metszeteket vágunk, majd foszfát pufferrel alaposan kimostuk. Ezt követően 30% szacharóz oldatban voltak 1-2 napig krioprotekció céljából, majd fagyasztottuk őket folyékony nitrogén fölött. Az immunfestést CB1-R, Neuron Specifikus Nucleáris Fehérje (NeuN) és 72-es Hősokk Protein (HSP72) elleni antitestekkel végeztük. H₂O₂ kezelést követően a nem-specifikus festést blokkoltuk, majd inkubáltuk a metszeteket a primer antiszérumban 2 napig. Ezt követően biotinilált másodlagos antiszérummal kezeltük a metszeteket. ABC kezelés után DAB-ban az immunperoxidáz reakció kromogénjében inkubáltuk a metszeteket.

Az így készített metszetekből ultravékony metszeteket vágunk, melyeket ólom-citráttal kontrasztoltunk, majd elektronmikroszkóppal vizsgáltunk.

Gallyas ezüst festés

A festés lépései a következők voltak: 2x5 perc 2% NaOH és 2.5% NH₄OH), 10 perc 0.8% NaOH, 2.5% NH₄OH, 0.5% AgNO₃, 3x5

perc 0.5% Na₂CO₃ és 0.01% NH₄NO₃ 30% etanolban, 1 perc 0.4–0.6% formaldehid és 0.01% citromsav 10% etanolban, (pH 5.0 –5.5), 3x10 perc mosás 0.5%-os ecetsavban.

Nissl festés

2 perc xylén, 3 perc etanol (absz.), 3 perc 90%-os etanol, 3 perc 70%-os etanol, 3 perc 50%-os etanol, 5 perc krezil ibolya festék, öblítés 70%-os etanollal, öblítés 70%-os etanol+ecetsavval, öblítés 90%-os etanollal, 3 perc etanol (absz.), 2x3 perc xilén.

Kvantitatív elektronmikroszkópos analízis

A CB1-R-t expresszázó szimmetrikus és asszimmetrikus terminálisokat 3 kontrol, 3 akut epilepsziás és 3 krónikus epilepsziás állat hippokampuszában számoltuk. A str. moleculare-ból átágyazott blokkokból sorozatmetszeteket készítettünk és elektronmikroszkóposan vizsgáltuk. A CB1-R festett terminálisokat minden tizedik metszetben vizsgáltuk, a szisztematikus random mintavételezés szabályait követve. A szignifikancia szinteket Mann-Whitney U-teszttel vizsgáltuk.

CB1-R-pozitív terminálisok célelem eloszlása

A CB1-R-immunpozitív terminálisok célelemeit a str. moleculareban vizsgáltuk kontroll és szklerotikus mintákban mind emberi (kontroll, N=105, 2 minta; szklerotikus N=175, 3 minta) mind egér (kontroll, N=169, 3 minta; szklerotikus N=178, 3 minta) hippokampuszban. A posztszinaptikus elemeket elektronmikroszkópban vizsgáltuk, majd fotóztuk és számoltuk.

Eredmények

Vizsgálataink során a CB1-R-t expresszázó, szimmetrikus (gátló) szinapszist adó terminálisokat vizsgáltuk humán epilepsziás hippokampuszban, mely minta terápiarezisztens betegek műtéti

anyagából származott (N=44), továbbá epilepsziás egér hippocampusban, mely minta pilokarpinnal kezelt állatok hippocampuszából származott. A tanulmány ezen részében felhasznált antitest csak a CB1-R tartalmú szimmetrikus szinapszisokat festette meg.

Sejtpusztulási mintázatok TLE epilepsziában

Humán TLE betegek hippocampuszában fénymikroszkóposan vizsgáltuk a sejtpusztulást. A megfigyelt anatómiai elváltozások alapján a betegeket az alábbi csoportokba soroltuk:

- (i) 1-es típus (enyhe) (n = 6): kontrollhoz hasonló, nincs számottevő piramissejt-pusztulás a CA1-ben, a rétegek jól láthatóak és épek, egyes érzékeny interneuronok pusztulnak.
- (ii) 2-es típus (foltos) (n = 16): Piramissejt-pusztulás látható foltokban a CA1 területén, bár ezek a területek sem atrófiásak. Interneuron-pusztulás jelentősebb.
- (iii) 3-as típus (szklerotikus) (n = 22): a CA1 régió összezsugorodik, atrófiás, a principális sejtek több mint 90%-a hiányzik.

Jelen tanulmányban a CB1-R előfordulását kontroll, nem-szklerotikus (1-es és 2-es típus) és szklerotikus (3-as típus) mintákban vizsgáltuk.

CB1-R tartalmú GABAerg rostok eloszlása kontroll és epilepsziás humán hippocampusban

Számos CB1-R-pozitív sejtestet találtunk elszórtan valamennyi hippocampális alrégióban. A dendritek nem festődtek, ám a CB1-R-pozitív axonterminálisok sűrűn behálózták a teljes hippocampuszt. A legerősebb festést a str. moleculare belső harmadában találtuk. Ezen túlmenően erősen jelölődtek az axon terminálisok a stratum pyramidale-ban a CA1 és a CA3 területén. Ezzel szemben nem tapasztaltunk festést a str. granulosum-ban és a str. lucidum-ban.

Nem-szklerotikus mintákban a CB1-R eloszlása a gyrus dentatusban (GD) nem különbözött jelentősen a posztmortem kontrollokban találtakhoz képest. Ezzel szemben a szklerotikus betegek hippocampuszában erős növekedést tapasztaltunk a globális CB1-R immunfestésben. Az immunpozitív interneuronok életben maradtak mind a GD, mind pedig a CA1 és CA3 területén. A festett rostok sűrűsége megnőtt a CA1 és a GD str. moleculare területén, eloszlása egyenetlenné vált, sűrű szövedéket alkotva a túlélő elemek körül.

A növekedést denzitometriával kvantifikáltuk 3 kontroll és 10 szklerotikus mintában. Fluoreszcens immunfestés után konfokális lézer scanning mikroszkóppal vizsgáltuk a denzitást, és annak szignifikáns növekedését találtuk a szklerotikus mintákban.

Elektronmikroszkópos vizsgálataink során meggyőződünk róla, hogy az általunk használt antitest csak szimmetrikus szinapszist adó terminálisokon található CB1-R-okat jelöl. A festett elemek celluláris és szubcelluláris elhelyezkedése nem különbözött az epilepsziás mintákban kontrollhoz képest. Ezt követően a CB1-R immunpozitív terminálisok célelem-eloszlását vizsgáltuk kontroll és szklerotikus hippocampuszok str. moleculare-jában. A fehérje jelenlétét jelző aranyszemcsék a membránban helyezkedtek el, a szinaptikusan aktív zónán kívül. Mind kontroll (N=105, 2 alany), mind epilepsziás mintákban (N=175, 3 alany) a CB1-R-pozitív terminálisok posztszinaptikus elemei dendritek, tüskék és sejttestek voltak. Ezek arányában nem találtunk különbséget a két csoport között (dendritek: 75 v. 72,5 %, tüskék: 13,2 v. 15,5 %, és sejttestek: 11,8 v. 13 %, kontroll és epilepsziás mintában).

CB1-R tartalmú GABAerg rostok eloszlása kontroll és epilepsziás egér hippocampuszban

Ezt követően a CB1-R tartalmú szimmetrikus (gátló) szinapszisok számának változásait vizsgáltuk epilepsziás egerek hippocampuszában (a modell részletes leírása a következő részben

található). A felhasznált antitest csak a CB1-R tartalmú szimmetrikus szinapszisokat festette meg.

Humán mintákhoz hasonlóan, az egér modellben is megerősödött a CB1-R festés a teljes hippocampusz területén. Egerek esetében is megvizsgáltuk a CB1-R-pozitív elemek célelemeloszlását, annak eldöntésére, hogy a változások humán-specifikusak, vagy általánosan igazak az epilepsziás hippocampuszra. Humán mintákhoz hasonlóan nem találtunk eltérést a célelemek eloszlása között kontroll (N=53) és szklerotikus (N=48) állatok str. molacualre-jában. A jelölt terminálisok célelemei dendritek (77.4 v. 77.1%), tüskék (22.6 v. 20.8%) és sejttetek (0 v. 2.1 %) voltak.

A sejtpusztulás mintázata az epilepszia egér pilokarpin-modellben

A CB1-R expresszió változásait részletesen kívántuk vizsgálni az epilepszia különböző fázisaiban, így egy egér modellt alkalmaztunk. Az akut rohamok során megfigyelhető viselkedések alapján az állatokat „erős” és „gyenge” epilepsziás csoportokba soroltuk a módosított Racine-skála segítségével. A Racine 1-4-ig terjedő rohamerősséget mutató állatok a gyenge csoportot alkották, míg a drasztikus, tónusos-klónusos rohamokat is mutató állatok az erős csoportba kerültek. A sejtpusztulási mintázatot az akut rohamok után különböző időpontokban vizsgáltuk NeuN-immunfestéssel, GluR2/3-immunfestéssel és Nissl festéssel.

Az akut fázisban (2 órával a pilokarpin kezelés után) nem találtunk sejtpusztulást sem az erős, sem a gyenge állatokban. A látens fázisban (1-3 nappal a pilokarpin után) bizonyos érzékeny interneuronok (pl. a calretinin tartalmúak) és néhány piramisajt pusztult a CA1 és CA3-as régiókban erős állatok esetén. A krónikus fázisban, ritkán, foltos sejtpusztulást tapasztaltunk a gyenge állatok hippocampuszában, de szklerózis nem fordult elő. Ezzel szemben az erős állatok hippocampusza az esetek egy jelentős részében (70%)

mutatott szklerózist, mely azt jelenti, hogy a CA1 és CA3-as régiók rétegei összezsugorodtak, a strata oriens, pyramidale és radiatum nem voltak elkülöníthetőek, és a principális sejtek több mint fele elpusztult.

A sejtpusztulás erőssége alapján osztályoztuk az adott régióban (CA1, CA3, GD) történő pusztulást. 1-es típus (enyhe pusztulás), a piramissejtek kevesebb, mint 10 %-a pusztul, 2-es típus (foltos pusztulás) a piramissejtek 11-50%-a pusztul, 3-as típus: a principális sejtek több mint 50%-a pusztul (szklerózis).

Statisztikai analízissel szignifikáns korrelációt találtunk a sejtpusztulás erőssége és az állatra jellemző Racine-érték között ($p < 0.05$, Pearson korreláció) (105 állat). Tehát az akut rohamok során mutatott viselkedésből megjósolható a későbbi sejtpusztulás.

In vivo elektrofiziológia

16 egérből (6 kontroll, 4 gyenge és 6 erős epilepsziás) EEG elvezetést végeztünk a krónikus fázisban. Úgy tapasztaltuk, hogy a pilokarpin-kezelt állatok EEG-je jelentősen eltér a kontrollokétól: erős szinkronizációt és számos interiktális tüskét figyeltünk meg. A gyenge állatokban roham csak egy esetben volt megfigyelhető, ám interiktális tüskék (gyakoriság 2.2 ± 2.26 Hz, amplitúdó 581 ± 160 μ V) minden állatban megjelentek. Az erős csoport tagjai esetén majdnem az összes állat (6-ból 5) mutatott visszatérő rohamokat (az iktális tüskék gyakorisága 5.9 ± 2.3 Hz volt, amplitúdójuk 546 ± 112 μ V).

2 kontroll és 2 erős állat esetén 24 órás EEG elvezetést végeztünk az esetleges éjszakai roham aktivitás vizsgálatára. Nem találtunk olyan állatot, amely csak éjszaka rohamozott volna, rohamok leggyakrabban a délutáni órákban fordultak elő.

Anatómiai változások a látens fázisban (1, 3 nap)

Az excitotoxikus stresszre érzékeny sejteket 72-es hő-sokk protein (HSP72) elleni immunfestéssel vizsgáltuk. Kontroll hippocampusban és az akut fázis esetén nem találtunk Golgi-

szerűen kifestődő sejteket, legfeljebb némi háttér-emelkedés volt tapasztalható a principális sejtek rétegében. Hasonló festést tapasztaltunk gyenge állatok hippokampuszában a látens fázisban. Ezzel szemben egy nappal a pilokarpin beadás után az erős állatok hippokampuszában bizonyos principális sejtek (mohasejtek, szemcsesejtek, CA3 és CA1 piramissejtek) Golgi-szerűen kifestődtek. Három nappal a beadás után már nagyobb számban találtunk pozitív sejteket a CA1, CA3 (főleg CA3c) és a hilus területén.

A visszafordíthatatlanul pusztuló sejteket Gallyas-féle ezüst festéssel tettük láthatóvá. Gyenge állatokban nem találtunk eltérést a kontrolloktól sem 1, sem 3 nappal a pilokarpin beadás után. Ezzel szemben, erős állatok hippokampuszában, 1 nappal a kezelés után sötét ezüst felhalmozódást láttunk a hilus sejtjeiben és ritka esetekben a CA1 és CA3 str. oriensében is.

Három nappal a kezelést követően további területeken is megjelentek pusztuló sejtek. A CA str. oriensén túl a str. pyramidale és radiatum területén is előfordultak degenerálódó sejtek és dendritek.

A CB1-R eloszlása az epilepszia különböző fázisaiban, pilokarpin modellben

A CB1-R expressziója kontroll egér hippokampuszban

Munkánk következő részében használt antitest a CB1-R-pozitív szimmetrikus és asszimmetrikus szinapszisokat is megfestette. Kontroll mintákban intenzív CB1-R immunfestést találtunk a hippokampusz teljes területén. Festett sejttestek minden régióban előfordultak, leginkább a CA1 és CA3 str. radiatumában és lacunosum-moleculare-jában, valamint a hilusban. Az Ammon szarv piramissejtek rétegében és a GD molekuláris rétegében erősen festett rostköteget találtunk, melyek kosár-szerűen körbefonták a

principális sejtek sejttestjeit. Ezzel szemben gyengén festődött a str. lucidum és a str. granulosum.

A CB1-R expressziójának változása az akut fázisban (2 óra)

Gyenge állatok hippokampuszában nem találtunk eltérést a kontroll-szövethez képest ebben a fázisban. Ezzel szemben, erős állatok esetén robusztusan lecsökkent az immunfestett elemek denzitása; a strata oriens-t, pyramidale-t és radiatum-ot behálózó axon szövedék sűrűsége jelentősen csökkent, továbbá a principális sejtek rétegében megfigyelhető kosár-szerű boutonok alig voltak megfigyelhetőek fénymikroszkópos szinten.

A következő lépésben vizsgálni kívántuk ezen anatómiai változások élettani következményeit, így túlélő agyszeleteket készítettünk kontroll és erős állatok agyából. Elsőként megfestettük a szeleteket azonnal a vágást követően, illetve 2 óra inkubáció után, hogy az ezen idő alatt végbemenő esetleges változásokat megismerhessük. Meglepő módon 2 óra inkubálás után a CB1-R expresszió újra kontroll-szerű volt az erős állatok hippokampuszában is, bár az azonnal lefixált szeletek továbbra is mutatták a leírt csökkenést (azonos agyból készült szeletek).

Mivel *in vitro* fiziológia módszerekkel nem tudtuk megállapítani a CB1-R hiányának élettani hatását, génkiütött állatok rohamra való érzékenységét vizsgáltuk. Kontroll állatokhoz (N=22) hasonlítottuk a KO (N=22) és vad típusú alomtársaik (N=21) érzékenységét a rohamokra. CB1-R KO állatok igen erős rohamokat kaptak (erős csoport tagjaira jellemzőket), fogékonyabbnak bizonyultak a rohamokra, összesen 3 állat mutatott gyenge rohamokat, a maradék 19 erőseket, ezen állatok nem éltek túl az akut rohamokat.

A gyenge rohamokat mutató KO állatok életben maradtak, és a krónikus fázisban semmilyen eltérést nem mutattak a vad típusú gyenge állatokhoz képest.

A CB1-R expressziójának elektronmikroszkópos változása az akut fázisban

Elektronmikroszkópos szinten számos degenerálódó (ödémás) profilt találtunk a hippocampusban, ám ezek nem bizonyultak szelektíven CB1-R-pozitívnak. A festett elemek változásit kvantifikálni kívántuk, így szisztematikus random mintavételezéssel számoltuk azokat.

Összesen 298 terminálist fotóztunk (169 kontroll, 129 erős epilepsziás) és analizáltunk. Először a festett szimmetrikus és asszimmetrikus szinapszisok arányát hasonlítottuk össze kontroll és epilepsziás mintákban (a mintát a str. molaculare-ból vettük, terület $> 40.000 \mu\text{m}^2$). Az analízis során nem találtunk különbséget ezen arányok között (kontroll: $79.6 \pm 7.6 \%$ asszimmetrikus és $20.4 \pm 7.6 \%$ szimmetrikus szinapszisoknál; erős epilepsziás: $80 \pm 4 \%$ asszimmetrikus és $20 \pm 4 \%$ szimmetrikus szinapszisoknál, $p > 0.05$; Mann-Whitney U-teszt). Bár az arányokban nem találtunk különbséget, a konkrét számok megváltozhattak, így megszámoltuk a jelölt terminálisokat a str. molaculare teljes szélességében (a szemcses sejtek rétegétől a stratum lacunosum-molaculare-ig), majd normalizáltuk az értékeket egységnyi területre ($40\,000 \mu\text{m}^2$). A kontroll szövethez képest szignifikáns csökkenést találtunk a festett szimmetrikus és a festett asszimmetrikus szinapszisok esetében is (kontroll, asszimmetrikus: 18.9 ± 2.3 ; szimmetrikus: 6 ± 0.2 ; erős epilepsziás asszimmetrikus: 11.8 ± 3.7 , szimmetrikus: 3.2 ± 0.7 ; $p < 0.05$; Mann-Whitney U-teszt).

Felmerült a kérdés, hogy változik-e egyetlen terminális CB1-R tartalma epilepszia hatására, így megszámoltuk az aranyszemcséket a CB1-R-festett terminálisok membránjában, majd normalizáltuk az értéket egységnyi kerületre (szemcse / $1 \mu\text{m}$). Nem találtunk különbséget a kontrollhoz képest sem szimmetrikus (kontroll: 0.69 ± 0.29 , erős epilepsziás: 0.59 ± 0.34), sem asszimmetrikus szinapszis esetén (kontroll: 0.64 ± 0.27 , erős epilepsziás: 0.63 ± 0.33).

Az immunpozitív terminálisok mérése során növekedést találtunk azok kerületében szimmetrikus szinapszisoknál (kontroll: 2 ± 0.67 μm , erős epilepsziás: 2.63 ± 0.87 μm), ami a fokozott aktivitásból adódó növekedés eredménye lehet. Ehhez hasonló változást nem tapasztaltunk asszimmetrikus szinapszisok esetén (kontroll: 1.9 ± 0.76 μm , erős epilepsziás: 2.12 ± 0.9 μm). Mindez arra utalhat, hogy a CB1-R festés csökkenésének oka nem az axon terminális degeneráció, ám a változások folytán a transzmitter felszabadulás jelentősen változhat.

A CB1-R expressziójának változása a látens fázisban (1 és 3 nap)

Egy nappal a pilokarpin beadás után a CB1-R szintek kontroll-szerűek voltak ismét mind erős, mind gyenge állatokban. Három nappal a beadást követően egy gyenge erősödés jelent meg egyes erős állatok hippokampuszában.

A CB1-R eloszlásának vizsgálata a krónikus fázisban (1 és 2 hónap)

A CB1-R eloszlását hosszú távon, 1-2 hónappal a pilokarpin kezelés után vizsgáltuk a krónikus fázisban. A gyenge állatokban a CB1-R-ok előfordulása kontroll-szerű volt, vagy enyhén növekedett a CA1 str. pyramidale területén. Ezzel szemben az erős, szklerotikus állatokban az általános CB1-R immunfestés megerősödött a teljes hippokampuszban. A festett rostok sűrűsége nőtt a túlélő elemekben, elsősorban a CA1 str. radiatum-ban és str. pyramidale-ban. Hasonló növekedés volt tapasztalható a GD -ban, sűrű CB1-R-pozitív axonköteget láttunk a strata moleculare-ban és granulosum-ban. Immunpozitív interneuron sejttestek jelen voltak mind a GD-ban, mind a CA1 és CA3 területén.

A CB1-R expressziójának elektronmikroszkópos változása a krónikus fázisban

Elektronmikroszkópos szinten számos gliális elemet, és degenerálódó profilt találtunk, melyek megjelenése jellemző az epilepsziás szövetre. A CB1-R-pozitív elemek általános ultrastruktúrája nem változott, ám a festett elemek száma szignifikánsan megnőtt ($p < 0.05$). A jelölt szimmetrikus és asszimmetrikus szinapszisok arányát vizsgáltuk (169 kontroll, 178 erős epilepsziás). Kontrollhoz képest szignifikáns változást találtunk ezen arányban (kontroll: $79.6 \pm 7.64\%$ asszimmetrikus és $20.4 \pm 7.6\%$ szimmetrikus, erős epilepsziás: $51.4 \pm 3.9\%$ asszimmetrikus és $48.6 \pm 3.9\%$ szimmetrikus ($p < 0.05$; Mann-Whitney U-teszt). A változás oka lehet a jelölt asszimmetrikus szinapszisok számának a csökkenése, a szimmetrikusok számának a növekedése, vagy a kettő együtt.

E kérdés megválaszolására az akut fázisban leírtakhoz hasonlóan számoltuk a jelölt terminálisokat. Kontroll szövethez képest szignifikáns növekedést találtunk a CB1-R-pozitív asszimmetrikus és szimmetrikus szinapszisok számában is (kontroll asszimmetrikus: 18.9 ± 2.3 szimmetrikus: 6 ± 0.2 ; epilepsziás asszimmetrikus: 34.9 ± 10.9 , szimmetrikus: 32.3 ± 18.5 , $p < 0.05$; Mann-Whitney U-teszt). Az analízis során megfigyeltük, hogy bizonyos epilepsziás szövetből származó terminálisok membránjában nagy számú arany szemcse található.

Az arany szemcsék számolása során (125 kontroll terminális és 177 erős epilepsziás) szignifikáns növekedést találtunk szimmetrikus szinapszisok esetén (kontroll: 0.69 ± 0.29 , erős epilepsziás: 0.99 ± 0.49 , $p < 0.05$, Mann-Whitney U-teszt), ám ehhez hasonló változást nem tapasztaltunk asszimmetrikus szinapszisoknál (kontroll: 0.64 ± 0.27 , erős epilepsziás: 0.633 ± 0.46 , $p > 0.05$, Mann-Whitney U-teszt). Ezen túlmenően a szimmetrikus szinapszist adó jelölt terminálisok kerülete is szignifikánsan megnőtt (kontroll: $1.99 \pm 0.67 \mu\text{m}$, erős epilepsziás: $2.7 \pm 0.9 \mu\text{m}$), ám az asszimmetrikus szinapszist adó terminálisok esetén változatlan volt (kontroll: $1.89 \pm 0.8 \mu\text{m}$, erős epilepsziás: $2.22 \pm 0.93 \mu\text{m}$).

Konklúzió

A modellünkben megfigyelhető sejtpusztulás és reorganizáció igen hasonló a humán TLE betegekben megfigyelhetőhöz. A TLE betegek esetén a szklerózis a leggyakoribb sejtpusztulási mintázat, így a hasonló változásokat mutató állat modell alkalmas az epilepsziára jellemző változások vizsgálatára.

Mivel a HSP72-festés különbséget mutatott az erős és gyenge állatok hippocampuszában található sokknak kitett sejtek számában, elmondható, hogy az akut rohamok erőssége alapján következtethetünk a későbbi sejtpusztulás erősségére. CB1-R-festés során csak erős epilepsziás állatok esetén találtunk jelentős változásokat, a gyenge állatok hippocampuszában többnyire elhanyagolható volt a változás (beleértve a sejtpusztulást is). Ezzel szemben erős állatokban az akut fázisban a GABAerg és glutamáterg szinapszisokban kifejeződő CB1-R-ok mennyisége erősen csökkent, míg a krónikus fázisban erősen nőtt. A CB1-R génkiütött állatok epilepsziára való rendkívüli érzékenysége felhívja a figyelmet a CB1-R-ok szerepére a kezdeti rohamok kontrollálásában: e receptorok aktivációja meggátolhatja, hogy a rohamok elérjenek egy olyan intenzitást, amit nem él túl az állat. Tehát az akut fázisban megjelenő csökkenés egy túlzott transzmitter-felszabaduláshoz vezethet, mely később visszatérő rohamok kialakulását, reorganizációt és sejtpusztulást okozhat. Ezzel szemben a krónikus fázisban látható növekedés egy protektív mechanizmus eredménye lehet, mely a túlzott transzmitter-felszabadulást csökkenteni képes. Az epilepsziás hippocampuszban található változatlan célelem-eloszlás arra utal, hogy a megemelkedett endokannabinoid funkcióval az idegsejtek mind szomatikus, mind dendritikus részein számolni kell, vagyis az epilepsziára jellemző megerősödött bemeneti aktivitás e régiókat egyaránt érinti.

A JELÖLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEI

Redistribution of CB1 cannabinoid receptors in the acute and chronic phases of pilocarpine-induced epilepsy.

Karlócai MR, Tóth K, Watanabe M, Ledent C, Juhász G, Freund TF, Maglóczky Z.

PLoS One. 2011;6(11):e27196. Epub 2011 Nov 4.

Dynamic changes of CB1-receptor expression in hippocampi of epileptic mice and humans.

Maglóczky Z, Tóth K, **Karlócai R**, Nagy S, Eross L, Czirják S, Vajda J, Rásonyi G, Kelemen A, Juhos V, Halász P, Mackie K, Freund TF.

Epilepsia. 2010 Jul;51 Suppl 3:115-20