

Képfeldolgozó módszerek fejlesztése neuronterképezéshez állatmodellekben

Doktori tézisek

Dr. Kornai Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Dávid Csaba, PhD, egyetemi docens
Hivatalos bírálók: Dr. Heinzlmann Andrea, PhD, egyetemi docens
Dr. Kálmán Mihály, DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kellermayer Miklós, DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Horváth Eszter,
PhD, tudományos munkatárs
Dr. Herberth-Minkó Krisztina,
PhD, egyetemi adjunktus

Budapest,
2023

1. Bevezetés

A természettudományos kutatások során cél, hogy az eredmények egymással összevethetőek legyenek, a módszerek reprodukálhatóvá váljanak. A 20. század elején az idegrendszert érintő vizsgálatokban a morfológiáé, a kvalitatív megfigyeléseké volt a főszerep. A klasszikus leíró neuroanatómiai kutatások során azonban kiderült, hogy a funkciót nem csupán az adott helyen lévő sejtek minősége, hanem mennyisége is meghatározza. Ezzel egyidőben megjelent a sztereológia folyamatosan fejlődő tudománya, mely a háromdimenziós objektumok és az arról készült képekben lévő struktúrák mennyiségi elemzésének, mintavételezési módszereinek az összessége.

A szomatoszenzoros kéreg vizsgálatára elterjedt modellállatok a rágcsálók, miután a pofájuk oldalán lévő bajuszszőrök a primer szomatoszenzoros kéregben szomatotópiásan képeződnek le, létrehozva a barrelmezőt. A név onnan ered, hogy a kéreg negyedik rétegében lévő hordó alakú struktúrákat, melyeket a talamusz *nucleus ventralis posteromedialis*ből (VPM) érkező rostok rajzolnak ki, angolul barreleknek hívják. Minden barrelnak megvan a maga bajuszszőre a pofa oldalán lévő bajuszpárnában. A bajuszpárna- barrelmező között az információ a *nervus trigeminus* ágai révén szállítódik. Az útvonal két fő részre

osztható. Egyrészt a lemniszkális pálya a talamusz VPM-án keresztül a barrelekbe, másrészt a paralemniszkális és extralemniszkális pálya a talamusz hátsó magján át a barrelek közti területre. A negyedik rétegben lévő barrelek felfelé és lefelé vetítése létrehozza a barrel asszociált oszlopot, míg a mellette lévő terület a szeptumot képezi.

Az érzőkéregben lévő idegsejtek 80-90%-át a serkentő neuronok alkotják, míg 10-20%-a gátló idegsejtek. A parvalbumin (PV+), a szomatosztatin (SST+) és a vazóaktív intesztinális polypeptidet (VIP+) expresszáló neuronok alkotják a GABAerg idegsejtek többségét (~ 40%, ~ 30% és ~ 10-15%-os megoszlásban).

A kéregt a pia matertől a fehérállományig konvencionálisan hat rétegre osztjuk (I-VI. réteg). A második és harmadik réteg a rágsálókban nem különíthető el egymástól. A gátló sejtek rétegek közötti eloszlása jól ismert. A parvalbumin sejtek a II/III-V-ös réteg között egyenletesen oszlanak el. A VIP sejtek ezzel szemben a szupragranulás, míg a SST+ sejtek az infragranuláris réteget preferálják. Míg a rétegek közötti megoszlás jól ismert, addig a rétegeken belüli megoszlásról keveset tudunk.

A primer szomatoszenzoros kéreg sejteloszlásánál a sztereológiai elvek mentén kétféle metszéstípus terjedt el. A hagyományos frontális metszetek mellett a Welker féle lapítással, tangenciálisan

szelt mintákon lehet megfigyeléseket végezni. A kísérletek során vagy az egyik, vagy a másik féle feldolgozást használják. Ennek részben oka, hogy a feldolgozás során eltérő módon deformálódnak a különböző irányban szelt metszetek, így az egyes rétegek a különböző irányú metszeteken egymásnak csak módosítással feleltethetők meg.

Az idegrendszer sejtjeinek karakterizálása többnyire metszeteken tett megfigyelések alapján történik. A szövettani feldolgozás során a metszetek deformálódnak, megnehezítve ezzel az összehasonlítást. A különböző anatómiai területek vizsgálatára az adott területre speciálisan alkalmazható eljárások fejlődtek ki. Munkánk során különböző anatómiai régiókat vizsgáltunk, s hasonló megoldásmódokat kerestünk, melyek régiótól függetlenül használhatóak. Megfigyeléseket végeztünk a rágcsálók primer szomatoszenzoros kérgében, valamint cukorbeteg állatok retináin. Míg a szomatoszenzoros kérget a már említett frontális és tangenciális metszeteken tanulmányozhatjuk, addig a speciális alakú retinára egy egészen más feldolgozási eljárást hoztak létre. A retinát is lehet frontális-hoz hasonlóan, azaz radialisan metszeni, azonban az egész retina kiterítve ún. wholemount technikával dolgozható fel. A whole mount során a retinát egészben távolítják el, majd radialisan végzett széli

bemetszéseket követően lapítanak. A széli bemetszések esetenként szabálytalanul tovább szakadnak, megnehezítve a különböző retinák összevetését.

PhD munkám során a diabéteszes retináról készült metszetek fotodokumentációján történő mintavételezés kidolgozásában és képi megjelenítésén dolgoztam. Munkám az egyéb részfolyamatokra nem terjedt ki. A módszertani tapasztalatokat felhasználva végeztünk megfigyeléseket az egér szomatoszenzoros kérgében. A feldolgozás minden részfolyamatában részt vettem, így ennek ismertetésére részletesebben kitérek a következőkben.

2. Célkitűzés

Munkám során azt vizsgáltam, hogy a különböző biológiai vizsgálatok esetén a sztereológiai módszereket milyen módon alkalmazhatjuk eltérő anatómia területeken és fajokban. Az alábbi kérdéseket foglalmaztuk meg.

- Hogyan csökkentjük a kiértékelés szubjektivitását és különböző biológiai mintákon mely elvek használhatóak?
- Az eredmények vizualizálása hogyan lehet a legvalóságosabb, a műtermékek milyen módon távolíthatóak el?

- Hogyan korrigálhatóak a mintavételi zsugorodás okozta deformitásokból adódó hibák?
- Az adott módszer univerzálisnak tekinthető-e?

A módszerek kidolgozásának tanulságait felhasználtuk az egérszomatosszenzoros kérgében található interneuronok térbeli eloszlásának vizsgálatára. A retinán kialakított módszereket alkalmazva a barrelkortexben az alábbi kérdésekre kerestünk választ.

- Van-e különbség a barrelasszociált oszlop és az őket elválasztó szeptum között a gátló interneuronok tekintetében?
- Ha van eloszlásbeli különbség, akkor az milyen funkcióbeli következményekre utalhat az irodalmi adatok alapján?

3. Módszerek

3.1 Kísérleti állatok ismertetése

Megfigyeléseinket háromféle állatfajon végeztük. A diabétesz hatásait Shaw - versenyegerének és ZDF patkányok retináján vizsgáltuk. A ZDF patkányok esetén a leptin gén mutációját homozigóta módon öröklő hímek (n=8) alkották a vizsgálati csoportot, míg kontrollként a heterozigóta genotípusú egyedek (n=8) szerepeltek. A megfigyeléseket 6 hetes kortól a 32. hétig

végeztük. Shaw versenyegerének 3 és 7 hónapos egyedein, csoportonként 10 állaton vizsgáltuk a cukorbetegség hatásait. A retinákon végzett munkám a képanalízis és a képeken történő sejtszámítás metodikai részére korlátozódott, így a szövettani feldolgozás részleteit jelen keretek között nem ismertetem.

A GABAerg neuronok eloszlását *Cre/loxP* génmódosított egereken tanulmányoztuk. Fluorofórként zölden világító *eGFP* (enhanced green fluorescent protein) és pirosan fluoreszkáló dTomato termelődött VIP/PV/SST fehérjét expresszáló sejtekben. Az állatok 6-8 hetesek voltak. A PV és VIP tartalmú sejtek eloszlását 6, míg az SST tartalmú neuronok lokalizációját 7 agyféltekén tanulmányoztuk.

3.2. Izodenzitás térképek Shaw-versenyegere és ZDF patkányok esetén

Shaw versenyegere esetén a mikroszkópos felvételeken Neurolucida programban a retina kontúrját, a nervus opticus pozícióját bejelöltük, majd 200x200 µm-es mintavételi négyzeteket helyeztünk el szisztematikus random elrendezésben. A mintavevő négyzetek létrehozásához *Microsoft Word Visual Basic for Applications* programnyelven írtuk meg a szükséges

szkriptet. Az így létrehozott négyzetekben a munkacsoport megszámlolta a ganglionsejteket, majd meghatároztuk a denzitást. Ezt követően a MATLAB „cubic interpolation” módszer segítségével a „griddata” funkciót használva a kép összes pixelére interpoláltuk a denzitásértékeket. Az így létrejött ábra az izodenzitás térkép.

A ZDF patkányok esetén a körvonalak és a ganglionsejtek számának meghatározása is FIJI-ben történt. A denzitásértékeket MATLAB segítségével a Shaw- versenyegerénél leírtak szerint hoztuk létre. A mintavevő négyzetek helyének meghatározása random módon történt. A képpontok helyzetének meghatározásához két viszonyítási pontot használtunk: a felső pólust és a látóidegfőt. A látóidegfőtől mért távolság és a felső pólushoz tartozó szög minden pixel helyét meghatározta. Egyrészt feltételeztük, hogy a lapítás nem befolyásolja az egyes képpontok helyét a középponthoz viszonyítva. Másrészt, ha azokat a pixeleket nézzük, amik azonos körön helyezkednek el, akkor a szakadások szélén lévő pixelek szomszédok. Ezt követően a pixeleket a szög és a köríven lévő helyzete alapján egy x-y koordináta rendszerbe transzformáltuk, a sötét pixeleket kitöröltük. Az így létrejött térkép Shaw-versenyegével ellentétben már szakadásmentes. Meghatároztuk a maximum és

minimum intenzitás projekcióikat. A maximum intenzitás projekciók az ideális retinaméretet, míg a minimum intenzitás projekciók az átlagos retinaméretet adta meg.

3.3. VIP/PV/SST állatok szövettani feldolgoása

Az állatokat ketaminnal túllaltattuk, majd a vért 0,9%-os NaCl oldattal kimostuk. A kimosást 4%-os paraformaldehid, 0,1 M-os foszfát puffer oldattal történő fixálás követte. A bal agyféltekét Welker módszere szerint lapítottuk és két órán át lapítva fixáltuk. A jobb féltekék utófixálása változatlan formában történt, szintén két órán át. Mindkét féltekét 50 µm-es nominális vastagságúra metszettük. A bal agyféltekékből tangenciálisan, a jobb féltekékből koronális síkban készítettük a metszeteket.

A PV+ állatok metszeteit anti-GFP, majd Alexa488-al kapcsolt anti-nyúl IgG oldatban inkubáltuk. A PV+ sejtek elegendő mennyiségben expresszáltak dTomatot, így további jelerősítésre nem volt szükség.

Az SSTcre/dTomatot expresszáló, valamint a VIPcre/dTomatot termelő állatok metszetei egyaránt vGlut2 (anti-vezikuláris glutamát transzporter 2) oldatban, majd Alexa488-al kapcsolt tengerimalac elleni IgG oldatban inkubáltuk a barrelek

identifikálása céljából. A sejtmagokat DAPI-val (4',6-diamidino-2-fenil-indol) festettük meg.

A fotódokumentációt epifluorescens mikroszkóppal végeztük. Apotome feltétellel 5x-ös nagyítású felvételeket készítettünk.

A rekonstrukciót Neurolucida programmal végeztük.

A rekonstrukciókat és a nyers immunfluoreszcens negyedik rétegben (LIV) magasságában készített felvételek azonos méretű barreljeit egymásra vetítettük. A különböző csatornák a barrel asszociált oszlop és szeptum határát, illetve a sejtek eloszlásbeli különbségét jobban mutatta. Analízisre ezek az új képek nem alkalmasak, tekintve, hogy csak kiválasztott barreleket tartalmaz. A számszerű eredményeinket azonban jobban szemlélteti, mint egy-egy metszetről készített, egy optikai síkot tartalmazó felvétel.

3.4. GABAerg neuronok denzitásának meghatározása

A metszetekről készült felvételeken Neurolucida programmal meghatároztuk a pia mater és a fehérállomány határát, bejelöltük a barrelek körvonalát, illetve a teljes posteromedialis barrelmező határát. Frontális metszeten meghatároztuk továbbá a barrelasszociált oszlopot és a köztük elhelyezkedő szeptumot. Az így létrehozott körvonalakban bejelöltük az adott sejttípus sejttesteinek helyzetét.

A frontális metszetek pia-fehérállomány távolsága medio-laterális irányban változik. Az átlagos vastagságot meghatározva (ez kerekítve 1000 μm) a sejtestek helyzetét újra definiáltuk. A réteghatárokat Pohlkamp által korábban kialakított módszer szerint határoztuk meg.

A frontális metszetek 1000 μm -es rétegvastagságát és az 50 μm -es nominális rétegvastagságot véve alapul, a tangenciális metszeteket virtuálisan 20 metszetre transzformáltuk, újraosztva a korábban meghatározott sejtszámokat.

A virtuális újrametszést követően kiszámoltuk az egyes kompartmentekben lévő sejtek denzitásait.

Az eredmények eloszlásának meghatározására Shapiro-Wilk tesztet használtunk. Az adatok nem normál eloszlást követtek, így a különbségek szignifikáns voltát Kruskal-Wallis tesztel vizsgáltuk.

4. Eredmények

A retinán végzett vizsgálatok biológiai eredményei nem kerülnek ismertetésre. Munkám mint azt a módszertannál említettem a képfeldolgozásra korlátozódott. Ebben az esetben eredmények

tekinthető, hogy elsőként hoztunk létre olyan izodenzitás térképet, mely által a különböző retinák egymással pontról pontra összevethetőek. Míg Shaw- versenyegere esetén a különböző állatok retinái egymásra nem vetíthetőek, egymással nehezen vethetőek össze, addig a ZDF patkányok esetén ezt a problémát a transzformált izodenzitás térkép kiküszöbölte.

A GABAerg neuronok eloszlásvizsgálatánál a retina transzformációjából kiindulva szintén egy utólagos transzformációt hoztunk létre, melynek eredményeként a frontális és tangenciális metszetek denzitásai jól korreláltak. A különböző mintákat egy csoportnak vehettük. A tangenciális és frontális metszés eredményeinek egyezésének meghatározása céljából korrelációs koefficienszt számítottunk.

4.1. PV+ neuronok eloszlása

A parvalbumin tartalmú sejtek lamináris eloszlását tekintve elmondható, hogy az első réteget a sejtek elkerülik, illetve az LII/III rétegben és az LVI rétegben is jóval kisebb számban helyezkednek el, mint az LIV, LVa és LVb rétegében. Ugyanakkor az LIV és LV területén egyenletesen oszlanak meg. A sejtek $26,17 \pm 2,73\%$ -a az LIV, $14,84 \pm 1,94\%$ -a az LVa és $27,15 \pm 1,49\%$ -a az

LVb-ben helyezkedik el. Az LI, LII/LIII és LVI rétegekben mindössze a neuronok $31,83 \pm 1,99\%$ -át találtuk. A rétegeken belül a sejtek nem mutattak eloszlásbeli különbséget.

4.2. SST+ neuronok eloszlása

Az SST+ sejtek a többi sejtípussal ellentétben az infragranuláris réteget preferálják. A sejttestek $73,69 \pm 5,37\%$ -át találtuk az LV és LVI rétegekben. Az LVa, LVb és LVI sejtrétegekben egyenletesen oszlanak el a sejtek, és szignifikánsan több neuront találtunk, mint az LI, LII/III, illetve LIV-ben. A rétegeken belüli eloszlást tekintve az LIV rétegben találtunk különbséget a szeptum és a barrel asszociált oszlop tekintetében. A szeptumban szignifikánsan több sejtet találtunk, mint a barrel asszociált oszlopban ($p < 0,0001$).

4.2. VIP+ neuronok eloszlása

A neuronok $70,24\%$ -a helyezkedett el az LII/LIII, míg $29,76\%$ pedig a többi rétegben lokalizálódott. A rétegek közül az LII/III-ban szignifikánsan több sejtet találtunk, mint a többi

rétegben. LIV-től LVI-ig csökkenő sejtdenzitásokat észleltünk, s az egyes rétegek között a különbségek szignifikánsnak bizonyultak.

A rétegeken belül a sejtek egyenletesen oszlottak el az LIV kivételével. LIV-ben a szeptumban közel kétszer több sejtet találtunk, mint a barrelben ($p < 0,0001$).

5. Következtetések

A retinák vizsgálata során a bemutatott transzformált izodenzitás térképek egymásra vetítése lehetővé teszi az azonos területek összehasonlítását. A határok behúzása a transzformált képeken egyszerűbb, vizsgálótól kevésbé függ. Ezáltal a szubjektivitás csökken. Egy további előnye, hogy a különböző minták esetén a minták mérete közötti különbség is leolvasható, így egy eddig meg nem jelenített információt ábrázol, növelve a kép információtartalmát.

Maga a módszer univerzálisnak nem mondható, hiszen különböző állatfajok retináján használható, más anatómiai területek esetén azonban helyzetspecifikusan módosításra szorul. Ilyen módosítást mutattunk be a GABAerg neuronok esetén. A probléma a retinánál észlelthez hasonló volt, azaz különböző

méretű, deformált mintákat szerettünk volna összehasonlítani. A megoldás itt is az adatok új koordináta rendszerbe transzformálása volt, azaz a virtuális újraosztás.

Amikor metszetekről vonunk le következtetéseket, akkor egy-egy metszetről készített felvétel nem feltétlenül tükrözi a számszerű eredményeket. Ezt láthattuk a GABAerg neuronok esetén, ahol az immunfluoreszcens képeken az LIV-ben a barrel asszociált oszlop és szeptum közötti különbség nem volt jól látható. Ezt küszöbölte ki a barrelek egymásra vetítése.

A szomatoszenzoros kéreg vizsgálata során munkacsoportunk elsőként vont le következtetéseket egyszerre különböző metszési síkban készített mintákról. A GABAerg neuronok vizsgálata során a rétegek közötti különbségek az irodalomban leírtak megfeleltek. Ebből kiindulva feltételezhetjük, hogy a transzformációnk nem torzította az eredményeinket, s az új eredmények is valósnak tekinthetők.

A PV+ sejtek esetén a LII-LV között találtuk a legtöbb sejtet, a szeptum és a barrel között nem volt különbség. Ez azért érdekes, hiszen a PV elleni festést, illetve a PV+ jelölést használják a barrel identifikálására. Ez úgy lehetséges, hogy a barrelt valójában a PV+ sejtek axonjai és a talamokortikális rostok axonjai rajzolják ki, amelyek sűrűn fonják át ezt a területet.

Staiger és munkatársai tanulmánya szerint a belépő talamikus rostok a serkentő sejtek mellett a barrel belsejében nagy számban található PV+ sejteket célozzák meg. Mease munkacsoportja ugyanakkor kimutatta, hogy a talamusz hátsó magjának ingerlése során is a barrelmezőben a PV+ sejtekben váltódott ki válasz. Mint az ismert, a hátsó mag a szeptális, a VPM pedig a barrel asszociált oszlopba projiciál. Emellett kimutatták, hogy a PV+ sejteken mindkét útvonal rostjai végződnek, ezért nem meglepő, hogy a rétegen belül nem találtunk eltérést.

A SST+ sejtek esetén az irodalomban leírtaknak megfelelően az infragranuláris rétegekben találtunk több sejtet. Munkacsoportunk ugyanakkor elsőként mutatta ki, hogy a IV. rétegben a sejtek a szeptális területet preferálják a barrellel szemben. Brecht kimutatta, hogy a receptív terület a szeptális neuronok esetében nagyobb méretű, mint a barrelben lévő társaiké. Ismert ugyanakkor, hogy az SST+ sejtek a piramissejteket hatékonyan gátolják, s ez a gátlás ébrenlét során, az aktív letapogató mozgáskor megszűnik. Ezáltal az SST+ sejteket a barrel asszociált oszlopok magasabb rétegeibe feljutó információ szomszéd oszlopoktól való elektrofiziológiai mérésekből ismert izolálására lehetne alkalmas. Ha ehhez hozzávesszük, hogy az SST+ sejteken a barrelbe projiciáló,

VPM-ből érkező rostok sokkal kisebb mennyiségben végződnek, mint a PV+ sejtek esetén, akkor a rétegben észlelt eloszlásbeli különbség érthető.

VIP+ sejtek vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a szupragranuláris rétegben helyezkednek el legnagyobb számban a sejtek. Rétegeken belüli megoszlás esetén elsőként írtuk le, hogy a IV. rétegben a szeptumban szignifikánsan több sejt helyezkedik el, mint a barrelben. Zilles munkacsoportja szerint a barrel központi részén a perifériához képest kevesebb VIP+ bouton található. Más munkacsoportok a VIP+ sejtek régekhez köthető dendrit és axonarborizáció különbségéről számoltak be. Elektrofiziológiai kutatások kimutatták, hogy VIP+ sejtek az SST+ sejtek aktív gátlói. Ez lehetővé teszi az SST+ sejtek által gátolt piramis sejtek diszinhibícióját, például az aktív tapintás idejére. A VIP+ sejtek szeptális lokalizációja utalhat a barrel asszociált oszlopok közti információfeldolgozás integrálására is, bár ennek eldöntése további vizsgálatokat igényel.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

Hammoum I, Benlarbi M, Dellaa A, Szabó K, Dékány B, Dávid Cs, **Almási Zs**, Hajdú RI, Azaiz R, Charfeddine R, Lukáts Á, Ben Chaouacha-Chekir R. (2017) Study of retinal neurodegeneration and maculopathy in diabetic Meriones shawi: A particular animal model with human-like macula. J Comp Neurol, 525(13): 2890-2914.

IF: 3,4

Hajdú R I., Laurik Lenke K., Szabó K, Dékány B, **Almási Zs**, Énzsöly A, Szabó A, radovits T, Mátyás Cs, Oláh A, Szél Á, Somfai G. M, Dávid Cs, Lukáts Á. (2019) Detailed Evaluation of Possible Ganglion Cell Loss in the Retina of Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rats. Scientific Reports, (1):10463.

IF: 3,998

Almási Zs, Dávid Cs, Witte M, Staiger JF. (2019) Distribution Patterns of Three Molecularly Defined Classes of GABAergic Neurons Across Columnar Compartments in Mouse. Barrel Cortex; Frontiers in Neuroanatomy.

IF: 3,292

6.2. Egyéb közlemények

Rosta E, **Almási Zs**; Karácsony I, Konkoly Thege B, Hegedűs K. (2012) Orvostanhallgatók egészség-magatartása. Mentálhigiénés készségfejlesztés a hazai orvosképzésben. Orvosi Hetilap, 153: 1153-1157.