

# Neuronhálózati reorganizáció vizsgálata humán temporális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő betegek műtétilag eltávolított hippocampusában

Doktori tézisek

**Tóth Kinga**

Semmelweis Egyetem  
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Maglóczky Zsófia, PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Dobolyi Árpád, PhD, tudományos főmunkatárs

Dr. Rácz Bence, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kiss József, MD, DSc, tudományos tanácsadó, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ábrahám Hajnalka, MD, PhD, egyetemi docens

Dr. Székely Andrea, MD, PhD, egyetemi docens

Budapest, 2012

## BEVEZETÉS

Számos jelenség utal arra, hogy a substance P-nek (SP) - mely egy neuromodulátor peptid - fontos szerepe van a hippocampális principális sejtek aktivitásának szabályzásában és az epileptogenezisben. Állatmodellben a perforáns pálya stimulálás vagy kainát által kiváltott rohamok jóval előbb jelentkeznek és erőteljesebbek, ha előtte az állatok SP kezelést is kaptak. Status epilepticus alatt a principális sejtek SP-t bocsátanak ki, melynek szerepe van a rohamok iniciálásában és fenntartásában, a megnövekedett SP szint hozzájárulhat a túlserkentéshez. Mivel nagyon sok SP receptor (SPR)-immunreaktív gátlósejt található a humán hippocampusban, melyeket más neurokémiai markerrel nem sikerült láthatóvá tenni, és e sejtek az előzetes tanulmányok szerint plasztikusan reagálnak epilepsziára, ezért célul tűztük ki az SPR-t expresszáló sejtek epilepsziás reorganizációban betöltött szerepének vizsgálatát a humán hippocampus CA1 régiójában. Az SPR-immunpozitív sejtek eloszlásbeli és morfológiai változásait epilepsziában a gyrus dentatusban leírták. De kvantitatív vizsgálatok és szinaptikus borítottság mérés nem történt. Ezekhez a vizsgálatokhoz választásunk a CA1 régióra esett, mert itt tapasztalható a principális sejtek nagy tömegben való pusztulása, melynek hatására az interneuronok szinaptikus bemenete megváltozhat. Mivel az SPR-immunreaktív sejtek legnagyobb része valószínűleg a piramissejtek dendritikus régióját innerválja, ezért fontos tudni, hogyan változik e sejtek mennyisége, eloszlása az epilepsziás szövetben. Az axonjelölődés hiányában e sejtek kimenetének esetleges változásairól sajnos nem kapunk információt, de a szinaptikus bemenetük vizsgálatából indirekt következtetéseket levonhatunk működésükre.

A calretinin (CR)-tartalmú hippocampális sejtek érzékenysége epilepsziában vitatott. A publikációk többsége nagyfokú pusztulásukról számol be, mind humán mintákban, mind állatkísérletes modellekben. Az ischaemiára való érzékenységük szintén ismert. Ezzel szemben mások azt találták, hogy mennyiségük nem változik, vagy megnő epilepsziában. A patkány hippocampus CA1 régiójában a CR-tartalmú interneuronok interneuron-szelektív gátlósejtek, és egy részük a humán hippocampusban is ebbe a funkcionális csoportba tartozik. Így módon fontos szerepük lehet a dendritikus gátlósejtek működésének szinkronizálásában, mely elengedhetetlen ahhoz, hogy a dendritikus gátlás hatékony legyen. A dendritikus gátlás hatékony működése kulcsfontosságú, hiszen a piramissejtek serkentő bemeneteik zömét a sejttestől távol, a disztális dendritek tüskéire kapják. Ezért felmerül a kérdés, hogy megváltoznak-e a CR-tartalmú interneuronok szinaptikus célelemei az epilepsziás CA1 régióban. Korábbi megfigyeléseink alapján a CR-tartalmú sejtek és/vagy a CR-immunfestés érzékenynek bizonyult a post mortem idő hosszára, ezért jelen tanulmányban részletesen megvizsgáltuk a CR-immunreaktív sejtek eloszlását mind rövid, mind hosszú post mortem idejű kontroll mintákban.

## **CÉLKITŰZÉS**

Jelen tanulmányban két egymással nem átfedő interneuron populációt – SPR-pozitív és CR-tartalmú sejtek - vizsgáltunk humán kontroll és epilepsziás hippocampusban.

Kísérleteink célja:

- az SPR-t expresszáló interneuronok eloszlásának, mennyiségének és morfológiájának vizsgálata kontroll és epilepsziás humán hippocampus CA1 régiójában
- az SPR-t expresszáló interneuronoknak a humán hippocampus gátlórendszerében betöltött funkcionális szerepének tanulmányozása kolokalizációs kísérletekkel
- az SPR-t expresszáló interneuronok szinaptikus bemenetének összehasonlítása humán kontroll és epilepsziás hippocampus CA1 régiójában
- a CR-tartalmú sejtek mennyiségi és morfológiai változásainak tanulmányozása rövid és hosszú post mortem idejű kontroll mintákban és az epilepsziás humán hippocampusban
- a CR-tartalmú interneuronok szinaptikus reorganizációjának vizsgálata az epilepsziás humán CA1 régióban és összehasonlítása kontroll mintákkal

## **MÓDSZEREK**

Az SPR- és a CR-tartalmú interneuronok morfológiai változásait vizsgáltuk 72 gyógyszerrezisztens temporális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő páciens agyából műtéti úton eltávolított és 11 kontroll humán agyból származó hippocampusban. A kontroll idegszövetet a Lenhossék program bocsátotta rendelkezésünkre, olyan elhunytakból származik, akiknek ismert neurológiai megbetegedése nem volt. A post mortem idő a

vizsgálatba bevont kontroll idegszövet esetében 2-10 óra volt. Vizsgálatainkat a Kutatásetikai Bizottság rendelkezéseinek megtartásával végeztük (TUKEB 5-1/1996, kiterjesztve 2005).

Az epilepsziás idegszövetet a sebészeti eltávolítás után 4% paraformaldehidet, 0,05% glutáraldehidet és 0,2% pikrinsavat tartalmazó 0,1 M foszfát puffer alapú oldattal fixáltuk. A 11 kontroll agyból 9 esetén ugyanezt az eljárást követtük. A másik két kontroll agyat a halál beállta után kettő illetve négy órával a koponyából kiszedve, a két-két arteria carotis internán, és vertebralison keresztül perfundáltuk, először fiziológiás sóoldattal, majd fixáló oldattal.

### **Immunhisztokémia**

A blokkokból 60 $\mu$ m vastag metszeteket vágunk és immunfestettük. A következő primer ellenanyagokat használtuk: poliklonális nyúl-anti SPR, monoklonális egér-anti CR, poliklonális egér-anti CR, monoklonális egér-anti calbindin (CB), monoklonális egér-anti parvalbumin, poliklonális egér-anti cholecystokinin, monoklonális patkány-anti somatostatin. DAB reakció esetén biotinilált szekunder szérumot tettünk a metszetekre 2 órára, majd ezt követte az avidin-biotin-tormaperoxidáz komplexszel történő inkubáció (ABC) 1,5 óráig. DABNi reakció esetén Elite ABC-t alkalmaztunk. A metszeteket DAB és/vagy DABNi kromogénnel hívtuk elő. A fluorescens kettős immunfestéshez CY3-, Alexa-488- és FITC-konjugált szekunder szérumokat használtunk.

A metszeteket ozmifikáltuk, felszálló etanol sorban (1% uranil-acetátot tettünk a 70%-os alkoholba) és propilénoxidban dehidráltuk, majd Durcupanba ágyasztuk. A fénymikroszkópos vizsgálat után a részletes

vizsgálatot igénylő területeket átágyztuk, 60 nm vastag sorozatmetszeteket készítettünk belőlük és elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

### *Kvantitatív analízis*

#### *Az SPR- és a CR-pozitív sejtek denzitásának meghatározása*

Kontroll (n=7) és epilepsziás mintákból (n=25) camera lucida segítségével kirajzoltunk 2-4 metszetet az összes jelölt sejtrel. Az egyes régiók területét NIH Image J program segítségével határoztuk meg. A sejtszámot területegységre vonatkoztatva adtuk meg (mm<sup>2</sup>). A CA1 régió esetében a sejtszámot a régió egységnyi hosszára (mm) is megadtuk a szklerotikus CA1 radiális zsugorodása miatt. Az adatokat Statistica 6.0 programmal értékeltük ki. Mivel az adatok nem voltak normális eloszlásúak, ezért a nem parametrikus Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk a kontroll és az egyes epilepsziás mintákból származó adatok összehasonlítására (p<0,05).

#### *SPR-pozitív interneuronok dendritelágazási pontjainak meghatározása*

Camera lucida rajzokat készítettünk a CA1 régió egy-egy szegmensébe eső összes SPR-tartalmú sejtről (kontroll: n=2; epilepsziás: n=7). Meghatároztuk a sejtek dendritelágazási pontjainak számát. Az adatokat Statistica 6.0 programmal értékeltük ki. Mivel az adatok nem voltak normális eloszlásúak, ezért a nem parametrikus Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk a kontroll és az egyes epilepsziás mintákból származó adatok összehasonlítására (p<0,05), valamint a nem parametrikus Kruskal-Wallis ANOVA-t több csoport adatainak az összehasonlítására (p<0,05).

#### *SPR-pozitív interneuronok szinaptikus borítottságának meghatározása*

A stratum oriens, pyramidale-t és radiatumot átágyztuk a CA1 régióból kontroll (n=2) és epilepsziás mintákból (n=8) és lemetsztettük

elektronmikroszkópos vizsgálat céljára. Metszetenként az összes SPR-jelölt dendritet lefényképeztük. A dendrit profilok területét és a szinaptikus aktív zónák hosszát NIH ImageJ program segítségével határoztuk meg. A szinaptikus borítottságot „ $\mu\text{m}$  szinapszishossz/100  $\mu\text{m}$  dendritkerület” egységben adtuk meg. Az adatokat Statistica 6.0 programmal értékeltük ki. Mivel az adatok nem voltak normális eloszlásúak, ezért a nem parametrikus Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk a kontroll és az egyes epilepsziás mintákból származó adatok összehasonlítására ( $p < 0,05$ ), valamint a nem parametrikus Kruskal-Wallis ANOVA-t több csoport adatainak az összehasonlítására ( $p < 0,05$ ).

#### A CR-pozitív interneuronok posztzinaptikus célelem eloszlásának meghatározása

A stratum oriens, pyramidale-t, radiatumot és lacunosum-moleculare-t átágyaztuk a CA1 régióból, és lemetszettük elektronmikroszkópos vizsgálat céljára (kontroll:  $n=2$ ; epilepsziás:  $n=6$ ). Metszetenként az összes CR-pozitív terminálist lefényképeztük és meghatároztuk a CR-pozitív terminálisok posztzinaptikus célelemeit.

## **EREDMÉNYEK**

### Az immunfestés minősége az életkor, a fixálás és a post mortem idő függvényében

A post mortem perfundált kontroll minták (HK10, 11) és az immerziós fixáláson átesett rövid post mortem idejű minták elektronmikroszkópos megőrzöttsége hasonló volt a rögtön fixálóra került epilepsziás minták és perfundált állati szövetek megőrzöttségéhez. A hosszú

post mortem idő befolyásolta a CR-festés minőségét és mennyiségét. Korábbi vizsgálatokban a CR-immunfestés érzékenynek bizonyult a hosszú post mortem időre és ischaemiára. Egy másik tanulmány azonban rezisztensnek mutatta a CR-pozitív sejteket epilepsziában. Jelen dolgozatban kvantitatív módszerekkel is megvizsgáltuk a hosszú post mortem idő hatását a CR-immunpozitív elemek eloszlására, mennyiségére, az epilepsziás szöveteket különböző post mortem idejű kontroll mintákkal vetettük össze.

### **Az epilepsziás minták patológiai csoportosítása**

Az epilepsziás hippocampusokat a fénymikroszkópos szinten megfigyelhető principális sejt pusztulás és az interneuronokat érintő változások alapján osztályoztuk a következőképpen: 1. típus (enyhe) (N=12): kontrollhoz hasonló, nincs számottevő principális sejt pusztulás a CA1 régióban, a rétegek épek, a határok elkülöníthetőek. 2. típus (foltos) (N=22): a CA1 régióra a foltokban történő piramissejt pusztulás jellemző, de ezek a részek nem atrófiásak, a rétegek jó elkülöníthetőek. Egyes interneuronok érzékenysége megfigyelhető. 3. típus (szklerotikus) (N=38): a CA1 régió összezsugorodott, atrófiás, a piramissejtek több, mint 90%-a elpusztult. A rétegek elkülönítése nem lehetséges, csak a stratum lacunosum-moleculare alkot egy elkülöníthető réteget. Az interneuronok eloszlásában, morfológiájában bekövetkező markáns változások jellemzőek erre a típusra.

### **Az SPR-immunreaktív sejtek száma, eloszlása és morfológiája**

Alakjuk és elhelyezkedésük alapján a humán hippocampus SPR-t expresszáló sejtjei interneuronok, a hippocampus összes alrégiójában megtalálhatóak. Morfológiailag heterogének: multipoláris, csepp alakú, „bitufted” és orsó alakú sejtek is találhatóak köztük. Az immunfestés a



sejttest és dendrit membránokat teszi láthatóvá, axon-jelölést nem kaptunk. A CA1 régió SPR-pozitív sejtjeinek többsége hosszú, sima dendritekkel rendelkezik.

A kontroll cornu Ammonisban a sejtek többsége a CA1 és CA3 a, b régiókban helyezkedik el, legnagyobb számban a stratum pyramidale-ban és radiatumban. Az epilepsziás nem-szklerotikus esetekben („enyhe” és „foltos”) az SPR-immunpozitív sejtek megfigyelhetők hasonló mennyiségben és eloszlásban, mint kontrollban. A szklerotikus mintákban azonban nagyon kevés sejt marad meg. A CA1 régió SPR-pozitív sejtjeit vizsgáltuk meg részletesen. Camera lucida rajzokon meghatároztuk a sejtek területegységre eső számát kontroll és epilepsziás CA1 régióban. Az SPR-pozitív sejtek mennyisége változatlan volt a nem-szklerotikus hippocampusokban (kontroll:  $12,5 \pm 2,14$  sejt/mm<sup>2</sup>, enyhe:  $11,53 \pm 1,01$  sejt/mm<sup>2</sup>, foltos:  $12,68 \pm 1,84$  sejt/mm<sup>2</sup>). Azonban a szklerotikus mintákban szignifikánsan lecsökken az SPR-immunoreaktív sejtek száma ( $4,97 \pm 1,25$  sejt/mm<sup>2</sup>).

Az epilepsziás szövetekben az SPR-immunfestett dendritek morfológiája megváltozik, gyakoriak a varikóz, vagy torz dendritek. A foltos típusú mintákban a sejtek dendritfája kiterjedtebb, több elágazást tartalmaz, mint kontroll esetekben, a szklerotikus mintákban azonban a dendritfa kiterjedése lecsökken. Kvantitatív vizsgálattal igazoltuk hogy ezen változások szignifikánsak.

### **Az SPR-pozitív sejtek kolokalizációja funkcionálisan különböző interneuronok markereivel**

Az SPR-immunfestés nem eredményez axonjelölést. Annak érdekében, hogy kiderítsük az SPR-t expresszáló interneuronoknak a

hippocampális gátlórendszerben betöltött funkcionális szerepét, kolokalizációs vizsgálatokat végeztünk dendritikus, periszomatikus és interneuron-specifikus markerekkel. A patkánnyal ellentétben az SPR-pozitív sejtek többsége a humán hippocampusban nem vagy csekély átfedést mutat a vizsgált neurokémiai markerekkel. A legnagyobb mértékű átfedés a CB-tartalmú interneuronokkal volt megfigyelhető: 8,7%-a az SPR-immunpozitív sejteknek CB-ra is pozitív volt a CA1 régióban, míg 20,8 %-a a CB-tartalmú gátlósejteknek SPR-t is expresszált. Az epilepsziás mintákban a CB tartalmú SPR sejtek aránya nem változik az enyhe típusban (9,6 %), viszont megnő a foltos és a szklerotikus hippocampusban (14,5 % és 16,9 %). Továbbá, az SPR-pozitív CB tartalmú sejtek aránya is megnő mindhárom patológiai típusba sorolt minták esetén.

### **Az SPR-pozitív elemek elektronmikroszkópos vizsgálata**

#### **Az SPR-pozitív elemek ultrastruktúrája a CA1 régióban**

A receptor a sejttest és a dendritek membránjában helyezkedik el. A szinaptikus bemenetek a dendritekre korlátozódtak, többségük (~90%) aszimmetrikus volt (feltételezhetően serkentő) mind a kontroll, mind az epilepsziás mintákban. Az epilepsziás esetekben alkalmanként zona adherentia is előfordult SPR-pozitív dendritek között. A szklerotikus epilepsziás mintákban elektronmikroszkópos szinten számos degenerálódó SPR-immunfestett elem figyelhető meg, degenerálódó mitokondriumokkal és citoplazmatikus mátrix-szal.

#### **Az SPR-pozitív sejtek szinaptikus borítottsága a CA1 régióban**

Megvizsgáltuk az SPR-immunpozitív sejtek szinaptikus borítottságát kontroll és epilepsziás mintákban annak érdekében, hogy kiderítsük, részt

vesznek-e ezen sejtek az epilepsziás hippocampusra jellemző szinaptikus reorganizációban. Szinaptikus borítottság alatt  $\mu\text{m}$  szinapszishossz/ $100\mu\text{m}$  dendritkerületet értünk. A teljes szinaptikus borítottságot (szimmetrikus + aszimmetrikus) illetően nem mutatható ki szignifikáns különbség az epilepsziás mintákban (kontroll,  $n=257$ :  $6,02\pm 0,6$ ; enyhe,  $n=168$ :  $6,07\pm 0,9$ ; foltos,  $n=377$ :  $5,73\pm 1,71$ ; szklerotikus,  $n=205$ :  $7,1\pm 1,8$ ). Hasonló mondható el az aszimmetrikus, tehát serkentő borítottságról is (kontroll:  $5,54\pm 0,54$ ; enyhe:  $5,26\pm 0,66$ ; foltos:  $5,32\pm 1,64$ ; szklerotikus:  $6,08\pm 1,59$ ). A szklerotikus mintákban azonban szignifikánsan megnőtt a gátló szinapszisok aránya (kontroll:  $0,48\pm 0,07$ ; 1. típus:  $0,81\pm 0,24$ ; 2. típus:  $0,42\pm 0,07$ ; 3. típus:  $1,02\pm 0,21$ ).

### **A CR-immunoreaktív sejtek száma, eloszlása és morfológiája**

A CR-tartalmú sejtek heterogén sejtpopulációt alkotnak, legjellemzőbb sejtípusok a következők: nagy, multipoláris sejtek a hilusban, horizontális, orsó alakú sejtek a stratum moleculare-ban és az oriensben, kisméretű sejtek populációja az egész gyrus dentatusban és multipoláris sejtek elszórtan a CA1-3 rétegeiben. A CA1 régió sejtjeire a hosszú, síma, radiálisan elhelyezkedő dendritek jellemzőek, melyek gyakran közel egymáshoz párhuzamosan futottak, és pontokban érintkeztek. Elektronmikroszkópos szinten ezeken a pontokon gyakran volt megfigyelhető puncta adherentia.

Megvizsgáltuk a CR-tartalmú interneuronok mennyiségét, eloszlását és morfológiáját különböző post mortem idejű kontroll és az egyes patológiai csoportokba tartozó epilepsziás mintákban. A rövid post mortem idejű kontroll mintákban (2-4 óra) a hippocampus összes alrégiójában megtalálhatók a CR-immunfestett sejtek. A hosszú post mortem idejű

kontroll mintákban (8-10 óra) szignifikánsan kevesebb immunfestett sejt volt látható minden alrégióban (stratum granulosum+moleculare: 34,3%, hilus: 43,9%, CA1: 23,5%, CA3: 28% a rövid post mortem idejű kontroll mintákhoz viszonyítva). A nem-szklerotikus epilepsziás hippocampusban a CR-pozitív sejtek mennyisége hasonló volt a rövid post mortem idejű kontroll mintákhoz, egyedül a CA3 régióban és a hilusban volt kimutatható szignifikáns csökkenés (stratum granulosum+moleculare: 74,9%, hilus: 65,4%, CA1: 66,7%, CA3: 60,5% a rövid post mortem idejű kontroll mintákhoz viszonyítva). A szklerotikus epilepsziás esetekben a CR-jelölt sejtek száma szignifikánsan lecsökkent (stratum granulosum+moleculare: 35,2%, hilus: 32,1%, CA1: 34,1%, CA3: 21,9% a rövid post mortem idejű kontroll mintákhoz viszonyítva). A stratum moleculare és a fissura határán elhelyezkedő, CR-pozitív, feltételezhetően részben Cajal-Retzius sejtek mennyisége is szignifikánsan lecsökkent mind a hosszú post mortem idejű kontroll mintákban, mind a szklerotikus és a nem-szklerotikus epilepsziás hippocampusban (24,8%, 46,4% és 56,8% a rövid post mortem idejű kontroll mintákhoz viszonyítva).

A nem-szklerotikus epilepsziás esetekben a CR-pozitív sejtek megőrződnek ugyan, de alakjuk jelentősen megváltozik. A dendritek gyöngyözöttek, szegmentáltak, és a degenerálódás jeleit mutatják. Különböző CR-pozitív sejtek közötti kontaktusokat ritkábban lehetett látni az epilepsziás mintákban.

### **A CR-pozitív elemek elektronmikroszkópos vizsgálata**

#### **A CR-pozitív elemek ultrastruktúrája**

A CR-tartalmú sejtek ultrastruktúrális jellemzői: a citoplazma általában vékony, kevés mitokondriumot tartalmaz. A szinaptikus bemenetek

többsége a dendritekre korlátozódott. A CR-pozitív dendritek szinaptikus bemenete gyér volt mind a kontroll, mind az epilepsziás mintákban. Zona adherentia-jellegű kapcsolatok gyakran voltak megfigyelhetők a CR-pozitív dendritek között. A szklerotikus epilepsziás esetekben számos degenerálódó CR-pozitív sejttest volt látható erősen karéjos, vagy részben felszeldelt sejtmaggal. A gyöngyözött, szegmentált CR-pozitív dendritek még a nem-szklerotikus mintákban is a degeneráció jeleit mutatták. A CR-pozitív dendritek között zona adherentia-jellegű kapcsolatok ritkábban voltak megfigyelhetőek az epilepsziás mintákban.

#### *A CR-pozitív terminálisok posztzinaptikus célelem eloszlása*

Megvizsgáltuk, hogy változik-e a CR-pozitív interneuronok szinaptikus célelem eloszlása az epilepsziás hippocampusban. Kétféle CR-pozitív terminálist találtunk a CA1 régióban: az egyik típus szimmetrikus szinapszist adott és a CA1 régió minden rétegében fellelhető volt, a másik aszimmetrikus kapcsolatot hozott létre és zömmel a stratum lacunosum-moleculare területére korlátozódott. Az előbbieket a lokális CR-tartalmú interneuronok axonterminálisai, míg az utóbbiak feltehetően a thalamikus reuniens magból származnak. Jelen dolgozatban a lokális CR-tartalmú interneuronokra fókuszáltunk, így a szimmetrikus szinapszist adó CR-pozitív terminálisok célelemeit vizsgáltuk meg részletesen.

A posztzinaptikus célelemeket az elektronmikroszkópos morfológiájuk vagy CR tartalmuk alapján osztályoztuk piramissejt dendritként, jelöletlen interneuron dendritként, CR-pozitív interneuron dendritként és tüskeként. A kontroll mintákban a CR-tartalmú interneuronok leggyakoribb posztzinaptikus célelemei CR-pozitív dendritek (23%) és piramis sejt dendritek (22,4%) voltak. Jelöletlen interneuron dendritek és

tüskék ritkábban voltak megfigyelhetők a célelemek között (7,6% és 2,12%). Az epilepsziás mintákban szignifikánsan kevesebb CR-pozitív dendrit (5,13% a nem-szklerotikusban és 3,16% a szklerotikusban) és piramisajt dendrit (10,3% a nem-szklerotikusban és 0% a szklerotikusban) fordult elő a célelemek között. A jelöletlen interneuron dendritek beidegzése megnőtt (35,9% a nem-szklerotikusban és 44,19% a szklerotikusban).

### **A CR-tartalmú interneuron-szelektív gátlósejtek célelemeinek azonosítása**

A patkány hippocampus CR-pozitív sejtjei interneuron-szelektív gátlósejtek, melyek főként a CB-tartalmú interneuronokat idegzik be a CA1 régióban. A humán hippocampusban található CR-pozitív sejtek egy része szintén ebbe a funkcionális típusba tartozik. CR-CB kettős immunfestést alkalmaztunk DAB-DAB-Ni módszerrel annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy a CB-pozitív interneuronok – melyek nagyrészt a piramisajt dendritikus régióját idegzik be és nagyszámban túlélnek az epilepsziás hippocampusban – a humán hippocampusban is célelemei-e a CR-tartalmú interneuronoknak.

A CR-tartalmú axonterminálisok sokszor létesítettek kontaktusokat CB-pozitív interneuron dendritekkel mind a kontroll, mind a nem-szklerotikus epilepsziás esetekben. Ezek feltehetően a lokális CR-tartalmú interneuronoktól származó gátló szinaptikus kapcsolatok voltak, tekintve hogy a vizsgált CB-pozitív dendritek a stratum oriensben vagy a stratum radiatumban, közel a stratum pyramidale-hoz helyezkedtek el, és ezekről a rétegekről elektronmikroszkópos vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy aszimmetrikus szinapszist adó CR-pozitív terminálisokat nem tartalmaznak. Tehát bizonyítottuk, hogy patkányhoz hasonlóan a humán hippocampus CR-pozitív interneuronjai is végződnek CB-tartalmú gátlósejteken.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Összefoglalásként elmondható, hogy az általunk vizsgált mindkét interneuron populáció sejtjei – SPR-pozitív interneuronok és CR-tartalmú interneuronok – megőrződnek a nem-szklerotikus epilepsziás humán hippocampusban, azonban számuk jelentősen lecsökken a szklerotikus esetekben. Annak ellenére, hogy ezek a sejtek változatlan mennyiségben vannak jelen a nem-szklerotikus mintákban, mégsem tekinthetők kontrollszerűnek. Ezek a sejtek plasztikusan megváltoznak epilepsziában, mely változás korrelál a principális sejtpusztulás mértékével. A sejtek morfológiája megváltozik: az SPR-pozitív interneuronok dendritarborizációja megnő, a nyúlványok gyöngyözté válnak, a CR-tartalmú sejtek dendritjei pedig a degenerálódás jeleit mutatják.

Patkányban kimutatták, hogy az SP és agonistái direkt hatnak az SPR-immunpozitív interneuronokra, és így indirekt módon erősítik a gátló szinaptikus hatást a piramissejteken. Egy ilyen nagyobb aktivitást kompenzáló mechanizmus emberben is magyarázná az SPR-immunpozitív sejtek életben maradását epilepsziában. A kiterjedtebb dendritfa által, a nagyobb mennyiségű aktivitásnak megfelelően az SPR sejtek receptív felülete megnő. Ezek a megfigyelések erősítik azt a hipotézist, hogy interneuronokat érintő, intenzív szinaptikus reorganizáció a nem-szklerotikus CA1 régióban is jelen van, noha jelentős principális sejtpusztulás nincs bennük. Az SPR sejtek erőteljes morfológiai változása egy megváltozott funkcióra és az SP-rendszer hatékonyságának növekedésére utal a nem-szklerotikus epilepsziás humán hippocampusban. Ezért az SP-rendszer egy új terápiás célpontot jelenthet az epilepszia kezelésében.

Míg az SPR sejtek hatékonysága valószínűleg fokozódik a nem-szklerotikus humán hippocampusban, addig a CR-tartalmú interneuronok működéséről az ellenkezője látszik bebizonyosodni, a nem-szklerotikus esetekben is a degenerálódás jeleit mutatják. Ezzel valószínűleg a hiperaktivitás irányában tolják el a rendszert, hiszen az interneuron specifikus CR sejtek sérülése folytán a dendritikus gátlósejtek szinkronizációja csökkenhet, másrészt a dendritikus gátlósejtek közé tartozó CR sejtek is nagy valószínűséggel sérültek, tovább csökkentve ezzel a dendritikus gátlás hatékonyságát. Ehhez járul még hozzá az, hogy a CR sejtek célelemei megváltoznak, a nem-szklerotikus esetekben is: az interneuronok innervációja megnőtt, míg a piramis sejtek beidegzése csökkent, ami szintén vezethet a dendritikus gátlás csökkenéséhez. Ez magyarázhatja, hogy miért vannak jelen súlyos rohamok a nem-szklerotikus epilepsziás betegekben is, ahol jelentős hippocampális sejtpusztulásról nem beszélhetünk, viszont szinaptikus reorganizáció jellemző a szövetre. A CR-tartalmú interneuronok mellett a somatostatin és a neuropeptid Y-tartalmú dendritikus gátlósejtek érzékenységét is megfigyelték epilepsziában, ami szintén hozzájárulhat a dendritikus gátlás csökkenéséhez. Elképzelhető, hogy ezeket a jelenségeket részben kompenzálja az SPR-pozitív gátlósejtek fokozódó bemenetérzékenysége a nem-szklerotikus esetekben. A hippocampális neuronhálózat reorganizációja már a nem-szklerotikus betegekben is megfigyelhető, mindamelllett a hippocampus fő kimenetété képező CA1 piramis sejtek jelen vannak, melyek együttesen lehetővé teszik, hogy a régió egy epileptogén fókuszként viselkedjen.



## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Toth K, Wittner L, Urban Z, Doyle WK, Buzsaki G, Shigemoto R, Freund TF, Maglóczy Z

*Morphology and synaptic input of substance P receptor-immunoreactive interneurons in control and epileptic human hippocampus.*

Neuroscience, 2007 Jan 19;144(2):495-508. Epub 2006 Nov 13.

Kinga Tóth, Loránd Eröss, János Vajda, Péter Halász, Tamás F. Freund and Zsófia Maglóczy

*Loss and reorganization of calretinin-containing interneurons in the epileptic human hippocampus.*

Brain. 2010 Sep;133(Pt 9):2763-77. Epub 2010 Jun 24.

### Disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

Zsófia Maglóczy, Kinga Tóth, Rita Karlócai, Sára Nagy, Loránd Eröss, Sándor Czirják, János Vajda, György Rásonyi, Anna Kelemen, Vera Juhos, Péter Halász, Ken Mackie, Tamás F. Freund

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

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

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

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

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