

**Ektópiás neuronok és szinaptikus reorganizáció  
morfológiai vizsgálata temporális lebeny epilepsziás betegek  
gyrus dentatusában és az agykérgi fehérállományában**

PhD tézis

**Dr. Sóki Noémi**

Pécsi Tudományegyetem

Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium



Klinikai Idegtudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Komoly Sámuel, egyetemi tanár

Programvezető: Dr. Ábrahám Hajnalka, egyetemi docens

Témavezető: Dr. Ábrahám Hajnalka, egyetemi docens

Pécs, 2024

## **BEVEZETÉS**

### **Az epilepsziás roham és az epilepszia betegség**

Epilepsziás roham egy neuron populáció kóros, szinkronizált kisülése. Epilepsziás betegeknél ismétlődő, spontán epilepsziás rohamok jelentkeznek. A teljes lakosság 0,5-1%-a szenved epilepsziában (Magyarországon 50-60 ezer fő). Az epilepszia diagnózisának felállításában elektroencefalográfia (EEG) és az agyi mágneses rezonancia képalkotó (MRI) vizsgálat a legfontosabb. Az epilepsziás rohamokat két nagy csoportra oszthatjuk: a parciális és generalizált rohamokra. A parciális rohamokat fokális indulású rohamoknak is nevezik, mivel egy adott kéregterületről indulnak ki.

A temporális lebeny epilepszia (TLE) a leggyakoribb fokális epilepszia fajta, a felnőttkori gyógyszer-rezisztens epilepsziák 60-70%-a. Az epileptogén régió elhelyezkedése alapján a TLE-t a klinikai gyakorlatban mesialis és laterális (neokortikális) formára osztják fel. A mesialis temporális sclerosist a temporális kéreg mediális struktúráinak (pl. hippocampus) „hegesedése” okozza, ami hippocampus sclerosiban (HS) jelenik meg. A felnőttkori gyógyszer-rezisztens TLE hátterében a HS a leggyakoribb hisztopatológiai rendellenesség, de emellett intrakraniális daganat, súlyos koponya trauma, stroke utáni állapot és agykérgi fejlődési rendellenesség, diszgenézis is állhat mögötte. Az epilepszia szindrómák legújabb klasszifikációja szerint a TLE az epilepszia sebészeti szindrómák közé van sorolva. Ugyanis a TLE betegeknél egy része nem válik rohammentessé antiepileptikum hatására (gyógyszer-rezisztens esetek), mely esetekben a rohamokért egy műtétilag eltávolítható agyi elváltozás (például HS) a felelős. A műtéti kezelés az összes epilepszia közül TLE esetén a legeredményesebb, amikor leggyakrabban az amygdalo-hippocampectomia vagy az anterior temporális lobektómia a választott módszer.

### **A hippocampus sclerosis**

HS-ban a hippocampus egyes sejtcsoportjainál jelentős mértékű sejtpusztulás figyelhető meg, mint például a subiculum, a CA1- és CA3c-régiók piramissejtjeinél, egyes interneuronoknál, a hiláris mohasejtekénél és a GD-ban található parvalbumin immunreaktív (PV+) gátlósejtjeinél. A sejtpusztulás mellett egyes sejtek (gliasejtek és szemcsesejtek) osztódását is megfigyelték a hippocampusban, melyek valószínűleg részt vesznek a GD hiperaktív működésében. TLE-ban leírták a szemcsesejtek rendellenes elhelyezkedését is (diszperzió), valamint az axonsarjadzást (sprouting) is, melynek következtében az érintett területeken szinaptikus reorganizáció történik, így a hippocampus külső és belső

kapcsolatrendszere megváltozik. A serkentő sejtek mellett az axo-dendritikus sejtek axonjainak sarjadzása is megfigyelhető, mint pl. a calbindin tartalmú gátlósejteké. Emellett a szomatosztatint és NPY-t expresszáló neuronok sarjadzását is leírták. TLE-ban a PV+ sejtek axonjainak a szemcsesejtek axon-iniciális szegmentumán való gyakoribb megjelenését találták. Az epilepsziás GD molekuláris rétegének belső egyharmadában fénymikroszkóppal erős, gátlósejtekre jellemző glutamát-dekarboxiláz immunpozitivitást figyeltek meg, amely alapján arra következtettek, hogy a festődést szemcsesejtek dendritjén végződő interneuronok, köztük kosársejtek axonterminálisai okozzák. A jelenséget ugyanakkor elektronmikroszkóppal nem vizsgálták és nem erősítették meg.

### **Neuronok és szinapszisok a kéreg alatti fehérállományban**

Ismert, hogy a kéreg alatti WM-ban egészséges emberben is találhatóak alacsony számban idegsejtek. Bár a szubkortikálisan és a WM mélyebb részein elhelyezkedő un. interstitialis neuronok szerepe felnőttekben még nem tisztázott, jelenlétük kapcsolatba hozható számos neurológiai és pszichiátriai betegségekkel, többek között epilepsziával is. Ismert, hogy a glutamát (serkentő neurotranszmitter) szinaptikus felszabadulása a WM-ban is jelen van. A WM-ban elhelyezkedő szinapszisok szerepet játszhatnak egyes neurológiai és pszichiátriai betegségek kialakulásában (pl. skizofrénia, Alzheimer-kór). TLE-ban nagyszámú WM neuron található a temporális neo- és archikortexben. Egyelőre nem eldöntött a kérdés, hogy a WM neuronok emelkedett száma hozzájárul-e az epilepsziás roham kialakulásához vagy fenntartásához, és az sem ismert, hogy milyen szinaptikus kapcsolatokkal rendelkeznek.

## CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során morfológiai vizsgálatokat végeztünk farmakoterápia-rezisztens különböző etiológiájú TLE betegek műtétilag eltávolított mintáin. Ennek során ektópiás sejteket, és azok szinaptikus kapcsolatait vizsgáltuk a GD-ban és a neokortex alatti WM-ban.

Kutatásunk első felében a betegek GD-ában a PV+ neuronok lokalizációját és axon-arborizációját vizsgáltuk. Szövetani eredményeink és a TLE etiológiája, valamint a betegek klinikai adatai között összefüggéseket kerestünk.

Laboratóriumunkban korábban kimutattuk, hogy a kéreg alatti WM-ban nagyszámú idegsejt van jelen, melynek területegységre eső száma magasabb TLE-ban, mint nem epilepsziás kontrollokban. Kutatásunk második felében célunk annak a feltételezésnek a megtámogatása volt, miszerint a WM neuronok funkcionálisan aktívak, és szerepük van a TLE során zajló folyamatokban. Ezért korrelációt kerestünk a területegységre eső WM neuronok száma és a WM-ban található szinapszisok denzitása között. A neuronok számát és a szinapszisok denzitását a betegek klinikai adataival, valamint kognitív teljesítményével vetettük össze. A WM neuronok láthatóvá tételére és mennyiségi meghatározására a NeuN, az idegsejtekben expresszált fehérje kimutatását, míg a szinapszisok megjelenítésére az agyi és gerincvelői neuronok preszinaptikus terminálisában jelen levő glikoprotein, a szinaptofizin (SYN) immunhisztokémiai kimutatását használtuk.

# AZ EMBERI GYRUS DENTATUS PARVALBUMIN IMMUNREAKTÍV SEJTJEINEK ÉS AXONJAINAK VIZSGÁLATA

## ANYAG ÉS MÓDSZEREK

### **Klinikai adatok**

A műtéti rezekátumok (n=35) a PTE ÁOK KK Neurológiai Klinikán diagnosztizált és az Idegsebészeti Klinikán műtött gyógyszerrezisztens TLE betegekből származtak. Huszonegy beteg esetében a TLE patológiai háttere MRI-vel igazolt HS volt, 7 betegnél kéregfejlődési rendellenesség (malformation of cortical development, MCD) okozta az epilepsziát, 4 esetben kettős patológia állt a háttérben. Három betegnél az MRI vizsgálat eredménye negatív volt, további 4 betegnél a TLE háttérében központi idegrendszeri tumor állt. Kontrollként intrakraniális tumorról diagnosztizált, nem epilepsziás betegek (n=4) hippocampusát használtuk. A szövetek vétele és használata a Helsinki Deklarációval összhangban, valamint az intézményi etikai engedélynek (PTE KK RIKEB/5342) megfelelően történt.

### **Szöveti feldolgozás és immunhisztokémia**

A rezekátumok a műtéti eltávolítást követően pufferelt 4%-os paraformaldehid (PFA) oldatba kerültek, majd a szövetblokkokat további 12 órán át fixáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően 10 mm-es blokkokat vágunk a hippocampus septotemporális tengelyére merőlegesen, majd vibratómmal 80 µm-es metszeteket készítettünk, melyeken immunhisztokémiát végeztünk. A metszetek egy részénél primer antitest monoklonális egér anti-PV (1:5000, Swant, Bellizona, Svájc), másik részénél pedig monoklonális egér anti-NeuN (1:500, Millipore, Bellarica, MA) volt. A detektáláshoz avidin-biotin-peroxidáz komplexet használtunk (Universal Vectastain ABC Elite Kit, Vector, Burlingame, CA), a kromogén a 3,3'-diaminobenzidin (DAB) volt. A metszetek egy részét krezil-ibolyával háttérfestettük. A negatív kontroll metszetekkel hasonlóképpen jártunk el, azonban a primer antitestet kihagytuk.

### **Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok**

A fentiek szerint fixált szövetblokkokból 80 µm-es metszeteket készítettünk vibratómmal, melynek egyik részén a lapos beágyazás (flat embedding) előtt PV immunreakciót (egér anti-PV antitest, 1:5000, Swant, Bellizona, Svájc) végeztünk. A metszetek utófixálásához foszfát pufferrel (0,1M PB, pH=7,4) pufferelt 2,5%-os glutáraldehid és 1%-os ozmium-tetroxid oldatot használtunk. A lapos beágyazás után a vizsgálni kívánt területet kivágtuk és zselatin kapszulába

átágyasztuk. Ugyanezt a módszert alkalmaztuk azokon a metszeteken, melyeken előzőleg nem végeztünk immunhisztokémiát. A műgyantába ágyazott blokkból ultramikrotómmal ultravékony metszeteket készítettünk, melyeket hártáival fedett egy-lyukú gridre helyeztünk, majd uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztoltuk. A metszeteket Jeol 1200 EX-II és JEM-1400Flash transzmissziós elektronmikroszkópokkal (TEM) vizsgáltuk.

### **Kvantifikáció**

A metszetekben látható normál pozíciójú (a szemcsesejtrétegben és a hilusban levő), valamint az ektópiás (molekuláris rétegben levő és fissura hippocampi mentén elhelyezkedő) PV+ neuronok számát, illetve arányát, valamint az axonsarjadzás mértékét fénymikroszkópos digitális felvételeken határoztuk meg az iTEM programmal (Olympus). Immunelektronmikroszkópos preparátumokban négy HS-os betegen kvantifikáltuk a PV+ axonterminálisok eloszlását különböző célstruktúrákon.

A kvantifikáció során nyert adatokat összehasonlítottuk a betegek klinikai adataival. Az eredmények értékeléséhez Student t-tesztet és Spearman korrelációs analízist alkalmaztunk. A statisztikai szignifikancia szintet  $p \leq 0,05$ -nél határoztuk meg.

## **EREDMÉNYEK**

### **Parvalbumin immunreaktivitás a kontroll gyrus dentatusban**

A PV+ neuronok többségében a hilusban, a szemcsesejtréteg alatti subgranuláris zónában és a GD szemcsesejtrétegében található. A PV+ axonterminálisok kiterjedt hálózatot képeztek a szemcsesejtek szómája körül. A PV+ axonok sűrűsége nagyobb volt a szemcsesejtréteg hilushoz közelebbi, belső felében, mint a réteg külső felében. Néhány axon ága kinyúlhat a szemcsesejtréteg külső felébe, de kontrollokban a PV+ axonok elágazásai a GD molekuláris rétegében ritkán fordulnak elő. Elvértve egy-egy PV+ sejtek sejttestje a molekuláris réteg szemcsesejtekhez közel eső részén is megtalálható volt.

### **Parvalbumin immunreaktivitás a TLE betegeken**

Az MCD, a tumoros és az MRI-negatív betegcsoportokban a GD PV+-itás hasonló volt a kontroll mintákban látottakhoz. A HS-os (és részben a kettős patológiával rendelkező HS+MCD-s esetekben) TLE betegek GD-ában ezzel szemben számos eltérés látszott. A PV+ sejtek szinte teljesen eltűntek a subgranuláris pozícióból és a GD hilusából. A szemcsesejtréteg

egyes részei nem tartalmaztak PV+ axonokat, míg más részeken erős PV+-ítás látszott. A szemcsesejtréteg teljes szélességében tartalmazta a PV+ axonterminálisokat. A PV+ axonok gyakran a szemcsesejtrétegre merőlegesen futottak, mélyen behatolva a GD molekuláris rétegbe. A GD molekuláris rétegében sarjadzó PV+ axonok a szemcsesejtréteg szignifikánsan nagyobb szakasza fölött volt látható, valamint az axonsarjadzás kiterjedésének mértéke is szignifikánsan nagyobb a HS-os betegek csoportjában, mint más csoportokban. Eredményeink egyértelműen jelzik a HS és a GD molekuláris rétegében található PV+ axonok jelenléte közötti összefüggést.

### **Az ektópiás parvalbumin immunreaktív sejtek és a parvalbumin immunreaktív axonok sarjadzása**

A TLE betegek különböző csoportjaiban elemeztük a normál pozíciójú és az ektópiás PV+ sejtek számát. A normál elhelyezkedésű PV+ sejtek számát tekintve szignifikáns különbség van a kontroll és a HS-os csoport, valamint a kettős patológiával rendelkező betegek csoportja között. A normál pozíciójú PV+ sejtek számának csökkenésével párhuzamosan az ektópiás PV+ sejtek számának szignifikáns növekedését figyeltük meg a HS-os betegek csoportjában a kontrollhoz képest, valamint az ektópiás / normál pozíciójú sejtek aránya a HS-os csoportokban szignifikánsan magasabb, mint a más etiológiájú csoportokban.

A korrelációs analízis szignifikáns összefüggést tárt fel a PV+ axonsarjadzás mértéke és a normál pozíciójú hiláris és subgranuláris PV+ sejtek területegységre eső számának csökkenése között a HS-os csoportban, valamint az egész TLE kohorszban. Szignifikáns összefüggést találtunk az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya és a PV+ axonsarjadzás mértéke között a HS-os betegek csoportjában, valamint a vizsgált TLE betegek teljes populációjában.

### **Korreláció a parvalbumin immunreaktív sejtek, az axonsarjadzás és a betegek klinikai adatai között**

Megvizsgáltuk az összefüggést a PV+ axonsarjadzás mértéke és a betegek klinikai adatai között (epilepszia fennállása, rohamfrekvencia, nemek aránya, HS oldalisága, életkor a TLE kezdetekor, lázgörcs az anamnézisben), majd összefüggést kerestünk az ektópiás PV+ sejtek denzitása és a betegek klinikai adatai között is. A HS-os csoportban szignifikáns összefüggést találtunk a betegség időtartama és a PV+ axonsarjadzás mértéke között, valamint szignifikáns negatív korrelációt találtunk a betegség fennállásának ideje és a normál pozíciójú PV+ sejtek denzitása között. A PV+ axonsarjadzás és az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya jelentősen nagyobb volt azoknál, akiknél az epilepszia gyermekkorban vagy serdülőkorban

kezdődött, de a különbség nem volt szignifikáns. A lázgörcsöt átélt betegekben nagyobb volt a sarjadzás mértéke, az ektópiás PV+ sejtek száma és az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya, mint azoknál, akiknél gyermekkorban nem volt lázgörcs, bár a különbség itt sem volt statisztikailag szignifikáns, amit a gyermekkori lázgörcsöt átélt betegek viszonylag alacsony száma okozhatta.

### **Szinapszisok a gyrus dentatus szemcsesejtrétegében és a molekuláris rétegben**

A szimmetrikus szinapszisok egy szemcsesejt szómára eső száma tumor indukált epilepsziában és a kontrollban hasonló volt. A HS-os csoportban kisebb volt a szimmetrikus axo-szomatikus szinapszis / szemcsesejt aránya, mint a fenti két csoportban. A PV+ axonterminálisok által képzett szimmetrikus szinapszisokat figyeltünk meg a szemcsesejtek szómáján és proximális dendritjein. Emellett PV+ szimmetrikus szinapszisok voltak jelen kis átmérőjű disztális dendriteken, valamint dendrittüskéken is. Megvizsgáltuk a PV+ axonterminálisok eloszlását a különböző célstruktúrákon. Azokon a területeken, ahol fénymikroszkóppal is látható volt a sarjadzás a periszomatikus szinapszisok aránya szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az axo-dendritikus szinapszisoké, valamint a PV+ axonterminálisok szignifikánsan több szinapszist képeztek a dendrittüskén, mint a szemcsesejtek szómáján.

## **MEGBESZÉLÉSEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK**

### **Epilepsziás betegek hippocampusában található morfológiai elváltozások a PV immunreaktív sejtek és axonok tekintetében**

Munkánk fő megállapítása, hogy a PV+ neuronok axonjainak a GD molekuláris rétegében megfigyelhető sarjadzása és a HS, valamint a PV+ idegsejtek GD-on belüli lokalizációjának változása között összefüggés mutatható ki. Megfigyeltük a PV+ axonterminálisok célstruktúrájának változását is a GD-ban. A PV+ neuronok axonjainak sarjadzása HS-ban szignifikánsan erősebb volt, mint más etiológiájú TLE betegcsoportokban vagy a kontroll csoportban, valamint szignifikánsan több ektópiás PV+ idegsejtet találtunk a GD molekuláris rétegében és a fissura hippocampi mentén HS-ban, mint a kontroll csoportban. Az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek arányát tekintve szignifikánsan nagyobb arányszámot kaptunk a HS-os betegek esetében, mint más etiológiájú TLE csoportban és a kontroll csoportban. Ezen



kívül szignifikáns pozitív korrelációt figyeltünk meg a PV+ axonok sarjadzásának mértéke és az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya között.

### **PV immunreaktív axonok sarjadzása, az ektópiás PV immunreaktív idegsejtek jelenléte és a betegek klinikai adatai**

A PV+ kosársejtek és az axo-axonikus sejtek pusztulása csak emberi HS-sal járó TLE-ban ismert. Az ektópiás PV+ sejtek jelenlétét és az általunk a molekuláris rétegben megfigyelt PV+ axonsarjadzást állatmodellekben nem írták le. Lehetséges magyarázat lehet, hogy míg az epilepszia az embereknél több évig, vagy akár évtizedig elhúzódik, a kísérleti állatokban létrehozott epilepsziás aktivitás viszonylag rövid ideig tart. Ezt alátámasztja az általunk megfigyelt összefüggés az epilepszia időtartama és a PV+ axonok sarjadzása között.

A PV+ axonok sarjadzása gyakran azokban a HS-os betegekben fordult elő, akiknél a TLE gyermekkorban vagy serdülőkorban kezdődött. Egy korábbi tanulmány kimutatta, hogy azoknál a HS-os betegek nagy százalékánál, akiknél gyermekkori lázgörcs szerepelt az anamnézisben, az epilepszia gyermekkorban vagy serdülőkorban kezdődött, ezért feltételezzük, hogy a lázgörcsnek szerepe lehet a PV+ axonok sarjadzásában. Azt találtuk, hogy a lázgörcs tekintetében pozitív anamnézisű betegeknél erősebb volt az axonsarjadzás és az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya is magasabb volt, mint azoknál a betegeknél, akiknél nem szerepelt lázgörcs az anamnézisben. A lázgörcs és a TLE betegek GD-ának molekuláris rétegében megfigyelt szemcsesejt diszperzió közötti kapcsolat régóta ismert. Feltételezhető, hogy a sarjadzó PV+ axonok a diszpergált szemcsesejteken végződnek, bár az elektronmikroszkópos megfigyeléseink ennek ellentmondanak, hiszen a sarjadzó PV+ axonok nemcsak szómán és proximális dendriten, hanem nagy arányban végződtek disztális dendriten és dendrittüskén is.

### **Az ektópiás PV immunreaktív sejtek és az axonsarjadzás lehetséges funkcionális következményei**

HS-ban a PV+ axonterminálisok célstruktúrájának változása a szemcsesejtek excitációjának változását eredményezheti. Az „alvó kosársejt” elmélet szerint az axo-szomatikus interneuronok a hilusban levő mohasejtek sérülékenysége miatt kevesebb serkentő bemenetet kapnak, de emberben a mohasejtek nem tűntek sérülékenyebbek, mint az epilepsziás hippocampus más, pl. CA1 és CA3 piramissejtjei. Az ektópiás PV+ sejtek aktivitása ugyanakkor fokozhatja a szemcsesejteken a normális lokalizációjú kosársejtek és axo-axonikus sejtek által okozott gátlást, ami a diszinhibíció teóriát támogatja.

Adataink egyértelműen anatómiai különbséget mutatnak a különböző etiológiájú TLE betegek GD-ában levő belső neuronális köreiben. Eredményeink szerint a PV+ neuronok axonjai az általuk normálisan elfoglalt területen túl, az axonális reorganizáció következtében, a GD molekuláris rétegében is megtalálhatók, valamint, hogy a sarjadzás következtében a PV+ axonok célpontjai is módosultak. Ezek a változások hozzájárulhatnak a GD-on belüli kóros neuronális kapcsolatok kialakulásához, ami az epilepsziás állapot kialakulását és fenntartását segítheti elő.

# FEHÉRÁLLOMÁNYI SZINAPSZISOK VIZSGÁLATA EMBERI MINTÁKBAN

## ANYAG ÉS MÓDSZEREK

### **Klinikai adatok**

Munkánk során a farmakoterápia-rezisztens TLE betegek középső temporális gyrusának sebészeti úton eltávolított rezekátumait (n = 14) használtuk. A patológiai háttér 10 esetben MRI-vel igazolt HS volt, míg négy betegnél az MRI vizsgálat MCD-t igazolt. Kontrollként nem epilepsziás betegek temporális lebenyének kéreg alatti WM-át használtuk. A kontrollok egyik része intrakraniális tumoros betegekből származott (n = 3), másik részük autopsziás minta volt (n = 3). A TLE betegek, és a tumoros betegek mintáit a PTE KK-ból, az autopsziás mintákat a Kísérletes Orvostudományi Kutatóintézetből kaptuk. A szövetek vétele és használata a Helsinkii Deklarációval összhangban és a regionális, valamint az intézményi etikai engedélyeknek (ETT TUKEB 15032/2019/EKU, PTE KK RIKEB/5342) megfelelően történt.

### **Szöveti feldolgozás és immunhisztokémia**

A TLE és tumoros betegekből eltávolított rezekátumokat az előző munkában leírtakhoz hasonlóan fixáltuk. Az autopsziás minták mélyhűtési eljárást követően lettek tárolva, majd közvetlenül a felolvasztás után fixáltuk PB-vel (0,1M, pH=7,4) pufferelt 4%-os PFA oldatban. A neokortikális WM-t és a GM-t tartalmazó szövetblokkok egy részét paraffinba ágyasztuk és 10 µm vastagságú metszeteket készítettünk, majd a deparaffinált metszeteken, antigén feltárást követően primer monoklonális egér anti-SYN antitesttel (1:400, Novocastra, New Castle upon Tyne, Egyesült Királyság) immunhisztokémiát végeztünk. A TLE betegek sebészileg eltávolított szövetblokkjainak további részéből 80 µm-es metszeteket készítettünk vibratómmal, és az úsztatott metszeteken végeztünk immunhisztokémiát. Itt a primer ellenanyag az anti-NeuN antitest (1:500, Chemicon, Temecula, CA, USA) volt.

### **Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat**

A TLE betegek neokortikális szöveteit immunelektronmikroszkópos vizsgálatra is előkészítettük az előző fejezetben leírtakhoz hasonlóan. Az immunreakciót szintén primer monoklonális egér anti-SYN antitesttel (1:400, Novocastra, New Castle upon Tyne) végeztük, majd Jeol 1200 EX-II és JEM-1400 Flash TEM-mel vizsgáltuk az immunreaktív axonterminálisokat.

## **Kvantifikáció**

Fénymikroszkópos metszeteken a WM neuronok 1 mm<sup>2</sup>-nyi területre eső átlagos számát a mély WM-ban határoztuk meg Neurolucida szoftverrel (Neurolucida 2.0, Microbrightfield Inc., Williston, VT). A különböző betegek adatait átlagoltuk és az immunreaktív sejtek denzitását „neuron / mm<sup>2</sup> ± SD”-ban fejeztük ki. A SYN immunreaktív (SYN+) struktúrák optikai denzitásának meghatározását Image J szoftverrel végeztük fénymikroszkópos digitális képeken. A felvételeken mért denzitásértékeket betegenként összevontuk, majd átlagoltuk a különböző kontrollokból és betegekből származó adatokat. A SYN+ struktúrák denzitását egy „mértékegység nélküli szám ± SD”-ban fejeztük ki.

Statisztikai módszerrel összehasonlítottuk az autopsziás és a biopsziás kontrollokban mért SYN immunreaktivitás optikai denzitását, majd a kontroll mintákban és a TLE betegek mintáiban mért SYN denzitás közötti különbséget is meghatároztuk. Összefüggést kerestünk a WM SYN és NeuN immunreaktivitás mértéke, valamint ezek és a betegek klinikai adatai között. Az eredmények kiértékeléséhez Student t-tesztet és Spearman korrelációs analízist használtunk. A statisztikai szignifikancia szintet  $p \leq 0,05$ -nél határoztuk meg.

## **Neuropszichológiai vizsgálatok**

A betegek preoperatív neuropszichológiai vizsgálata során a verbális és a vizuális memória teljesítményét mértük. A vizuális figyelmet a Corsi-kockával, a vizuális konstrukciós képességet és a memóriát a Rey-Osterrieth-féle összetett ábrateszt segítségével értékeltük. A verbális tanulást és a memóriát a Rey auditoros verbális tanulási teszt (AVLT) és a számterjedelem teszt magyar változatának felhasználásával mértük. A memória tesztek és a szövettani megfigyeléseink eredményei közötti kapcsolatot lineáris regresszió elemzéssel vizsgáltuk. A statisztikai elemzéseket az IBM SPSS szoftvercsomaggal (SPSS Inc. 25. verziója, MN) végeztük, a szignifikancia szint  $p \leq 0,05$  volt.

## **EREDMÉNYEK**

### **Szinaptofizin immunreaktivitás a fehérállományban**

A TLE betegek és a két különböző kontrollcsoport (biopsziás és autopsziás) mintáiban a SYN+ struktúrák kis pontokként jelentek meg a metszetekben. A SYN immunreaktivitás erősebb volt a GM-ban, mint a WM-ban, és egyértelműen kirajzolódott a GM és a WM közötti határ. Alacsony számban a kontrollcsoport WM-ában is megtalálhatók voltak a SYN+ pontok.

A WM és a GM közötti határ néhány HS-os és MCD-s esetben elmosódott volt. A TLE mintákban a legszembetűnőbb a SYN+ pontok nagyobb sűrűsége volt a WM-ban. A SYN+ struktúrákat TEM-mel is megvizsgáltuk: a SYN immunreaktivitás a preszinaptikus axonterminálisokban volt található.

### **A szinaptofizin immunreaktivitás kvantifikációja a fehérállományban**

A SYN immunreaktivitás kvantifikációját a mély WM-ban körülbelül 500 µm-rel a WM és a GM határa alatt végeztük mind az autopsziás, mind a biopsziás kontrollokban, és a TLE mintákban. A SYN immunreaktivitás átlagos denzitása a 14 TLE beteg neokortikális WM-ában szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll mintáké. A HS asszociált TLE betegek és a kontrollok SYN immundenzitása közötti különbség statisztikailag szignifikáns volt.

### **A neuronszám és a szinaptofizin immunreaktivitás optikai denzitása közötti összefüggés a neokortikális fehérállományban**

A 14 vizsgált TLE beteg közül 13 beteg esetében rendelkezünk adatokkal mind a SYN immunreaktivitás optikai denzitását, mind a NeuN+ WM neuronok területegységre jutó számát illetően. Spearman korrelációs analízist alkalmazva szignifikáns összefüggést találtunk a WM SYN immunreaktivitás optikai denzitása és az 1 mm<sup>2</sup>-re eső WM neuronok száma között. A HS-os TLE betegekben szintén szignifikáns korrelációt találtunk a SYN denzitása és a WM neuronok száma között. Az MCD-s csoportban a betegek alacsony száma miatt statisztikailag nem mutatható ki szignifikáns összefüggés, azonban nagyobb SYN denzitást észleltünk azokban a mintákban, amelyek területegységenként nagyobb számú neuront tartalmaztak.

### **A szövettani eredmények összefüggése a TLE betegek klinikai és kognitív adataival**

A korrelációs analízis nem mutatott szignifikáns összefüggést a neokortikális WM-ban mért SYN immunreaktivitás és a betegek következő klinikai adatai között: életkor és nem, életkor az epilepszia kezdetekor, a betegség időtartama, a rohamfrekvencia és a gyermekkori lázgörcs előfordulása. A betegek posztoperatív kimenetelét illetően az Engel osztályozást alkalmaztuk. Tizenkét TLE betegünk vált rohammentessé a műtétet követően, akik az Engel 1. osztályába kerültek. Egy beteg a 2. osztályba került, ami valamivel rosszabb műtét utáni eredményre utal. Egyetlen betegnél nem történt jelentős javulás, ő a 4. osztályba került. Az Engel 1. osztály további alosztályokra osztható. Külön vizsgáltuk azokat a betegeket, akik antiepileptikumok nélkül váltak teljesen rohammentessé (1A osztály), valamint az Engel 1B-D osztályába tartozó betegeket. Más Engel osztályok esetében az alosztályokat nem vettük

figyelembe. Elemzésünk kimutatta, hogy a posztoperatív eredmény és a SYN immunreaktivitás optikai denzitása között szignifikáns összefüggés van a teljes TLE populációban. A HS-os csoportban, ahol a SYN immundenzitás a legmagasabb volt, minden beteg rohammentessé vált, és az Engel 1. osztályba tartozott. A WM NeuN+ sejtek sűrűségét vizsgálva hasonló eredményre jutottunk.

A szövettani eredmények és a betegek kognitív teljesítménye közötti lineáris regressziós elemzés azt mutatta, hogy a neuronok sűrűsége és a szinapszisok denzitása a WM-ban összefügg a verbális memóriával. A SYN immunreaktivitás optikai denzitása szignifikánsan korrelált az AVLT-nél mért interferenciával. A rövid távú verbális memória tekintetében szignifikáns korrelációt figyeltünk meg a számterjedelem teszt pontszámai és a SYN immunreaktivitás, valamint a neuronok sűrűsége között. A vizuális figyelem és memória tesztek pontszámai nem mutattak szignifikáns korrelációt a SYN immundenzitással és a NeuN+ sejtek sűrűségével. A HS-os betegek WM neuronjainak sűrűsége és verbális memória teljesítménye közötti összefüggést elemezve szignifikáns lineáris regressziót találtunk a NeuN+ sejtek sűrűsége és a számterjedelem teszt pontszámai között.

## **MEGBESZÉLÉSEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK**

Kimutattuk, hogy a TLE betegek neokortex alatti WM-ában szignifikánsan nagyobb a szinapszisok denzitása, mint a kontrollokbán, valamint szignifikáns pozitív összefüggést figyeltünk meg a szinapszisok és a neuronok denzitása között az epilepsziás betegek WM-ában. A szinapszisok denzitása szignifikánsan korrelált a betegek posztoperatív kimenetelével. Emellett a neuronok száma, a szinapszisok denzitása és a betegek verbális memória teljesítménye között szignifikáns pozitív regressziót láttunk. A szinapszisok denzitását külön vizsgáltuk a HS-ban és az MCD-ben szenvedő TLE betegek csoportjaiban. HS esetén a szinapszisok denzitása szignifikánsan magasabb volt a WM-ban, mint a kontrollokbán, valamint HS-ban szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a szinapszisok denzitása és a neuronok sűrűsége között.

Ismert, hogy epilepsziás betegekben nagyobb a WM-ban található neuronok száma a nem epilepsziás kontrollokhöz képest, de ezeknek a neuronoknak a funkcionális jelentőségéről, valamint szinaptikus kapcsolatairól korábban nem álltak rendelkezésre egyértelmű információk. Vizsgálatunkban ezért a szinapszisokat tanulmányoztuk, és immunhisztokémiával tettük láthatóvá őket a preszinaptikus axonterminálisok SYN fehérjetartalma alapján. SYN+

struktúrákat mind a TLE betegek, mind a kontroll minták WM-ában megfigyelhetünk. Fénymikroszkóppal a SYN+ terminálisokat kis pontokként láttuk, de immunelektronmikroszkópos vizsgálattal igazoltuk a SYN lokalizációját a preszinaptikus axonterminálisokban.

### **Neuronok és szinapszisok a fehérállományban**

A neokortex alatti WM neuronok szerepét a rohamok kialakulásában és fenntartásában még nem bizonyították. A TLE betegekben szignifikáns pozitív lineáris korrelációt láttunk a WM neuronok területegységre eső száma és a SYN immunreaktivitás optikai denzitása között, ami arra utal, hogy a WM neuronok funkcionálisan aktívak és szerves részét képezhetik a temporális lebeny neuronális köreinek TLE-ban. A WM-ban levő SYN+ terminálisok kortikális és/vagy szubkortikális neuronokból is származhatnak, de SYN+ preszinaptikus terminálisok forrásai WM neuronok is lehetnek. A neuronok számának és a SYN immunreaktivitás optikai sűrűségének korrelációja a betegek neuropszichológiai adataival – ezen belül is a verbális memóriára vonatkozó értékekkel - szignifikáns pozitív összefüggést mutatott. Ezek az adatok egyértelműen jelzik a WM szinapszisok funkcionális jelentőségét a temporális lebenyben.

A funkcionális neurális hálózatok WM-on belüli létezését MRI-vizsgálatok is alátámasztják. Az fMRI vizsgálattal a WM hálózatok funkcionális zavarát mutatták ki mesialis temporális sclerosisban.

A temporális kéreg neokortex alatti WM-ában levő szinapszisok jelentőségét a SYN immunreaktivitás optikai denzitása és a TLE betegek posztoperatív kimenetele közötti összefüggés is jelzi. Szignifikáns korrelációt figyeltünk meg a TLE betegek posztoperatív kimenetele és a SYN immunreaktivitás optikai denzitása között, ami azt mutatja, hogy minél nagyobb a SYN immunreaktivitás denzitása, annál jobb a betegek posztoperatív eredménye. Ez az összefüggés azt mutatja, hogy a WM szinapszisok jelentős szerepet játszhatnak az epilepsziás rohamok kialakulásában és fenntartásában, és a WM neuronokat és szinapszisokat tartalmazó terület eltávolítása nagymértékben hozzájárult a betegek kedvező posztoperatív kimeneteléhez.

A WM szinapszisok WM neuronokon való kialakulásának pontos módja és ideje nem tisztázott, és két magyarázat vetődik fel. Egyik az agykéreg kóros fejlődése, melyet alátámasztanak a kutatási eredményeink (neuronok megnövekedett száma és összefüggése a szinapszisok denzitásával). A vizsgálatunkban talált megnövekedett SYN optikai denzitás a WM-ban arra utal, hogy a WM-ban található neuronok szinaptikus bemenetet kapnak, és axonjaik eredete a normál pozíciójú kortikális neuronokon kívül a WM neuronok is lehetnek.

A WM neuronok egymáson végződve rendellenes szubkortikális köröket képezhetnek és szerepet játszhatnak az epilepsziás roham kialakulásában és fenntartásában. A WM szinapszisok nagy denzitásának másik magyarázata lehet a szinaptikus átrendeződés jelensége, mely ismert jellemzője az epilepsziának.

Munkánk rámutat a WM neuronok és szinapszisok funkcionális jelentőségére, bár a TLE-ban betöltött szerepük további kutatást igényel. A funkcionális hálózatok jelenléte a WM-on belül új utakat nyithat meg a kognitív és klinikai idegtudományi kutatásokban.



## ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

### **Az epilepsziás betegek gyrus dentatusában talált eredmények összefoglalása**

1. HS-ban az ektópiás és a normál pozíciójú PV+ sejtek aránya és a PV+ axonsarjadzás mértéke szignifikánsan nagyobb, mint más etiológiájú TLE betegcsoportban.
2. HS-ban szignifikáns pozitív korrelációt találtunk az axonsarjadzás mértéke és az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya között.
3. Az immunelektronmikroszkópos eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy azokon a területeken, ahol fénymikroszkóppal axonsarjadzást láttunk, HS esetén a PV+ neuronok posztszinaptikus célstruktúrája részlegesen megváltozik: a szemcsesejt szómája helyett a disztális dendriten vagy dendrittüskén végződnek az axonterminálisok.
4. HS-ban a szinaptikus reorganizáció következtében a GD molekuláris rétegében is megtalálhatók a PV+ neuronok axonjai, és megváltozik a célstruktúrát érintő szelektivitásuk.
5. Ezek a változások hozzájárulhatnak a GD-on belüli aberráns neuronális hálózatok kialakulásához és ezzel az epilepsziás állapot kialakulását és fenntartását támogatják.

### **Az epilepsziás betegek neokortex alatti fehérállományában talált eredmények összefoglalása**

1. Megállapítottuk, hogy TLE betegekben szignifikánsan magasabb a SYN immunreaktivitás optikai denzitása, mint kontrollokban.
2. Összefüggést találtunk a WM neuronok területegységre eső száma és a SYN immunreaktivitás optikai denzitása között.
3. Szignifikáns korrelációt találtunk a TLE betegek posztoperatív kimenetele és a SYN denzítés között.
4. A TLE betegek szövettani eredményei és a verbális memória között is összefüggést találtunk. A rövid távú verbális memória szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a betegek WM-ában levő neuronok területegységre eső számával és a SYN immunreaktivitás optikai denzitásával.
5. Eredményeink arra utalnak, hogy a TLE betegekben talált WM neuronok funkcionálisan aktívak, hiszen nagyszámú szinaptikus bemenetet kapnak más kérgi, szubkortikális vagy WM-on belül elhelyezkedő idegsejtektől, és feltételezhető, hogy részét képezik az epilepsziás neuronhálózatoknak.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Ábrahám Hajnalkának a tanulmányaim során nyújtott szakmai útmutatásért és támogatásért. Hálás vagyok Prof. Dr. Seress Lászlónak a szakmai tanácsaiért és javaslataiért. Nagyra értékelem a Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumban dolgozó kollégák szakértelmét és segítségét, melyet a technikai folyamatok során nyújtottak.

Köszönet illeti a PTE KK Idegsebészeti Klinika sebészeit, különösen Prof. Dr. Dóczi Tamást és Dr. Horváth Zsoltot, akik a műtéti rezekátumokat biztosították a számunkra, valamint a PTE KK Neurológiai Klinika munkatársait, Prof. Dr. Janszky Józsefet, Dr. Bóné Beátát, Dr. Gyimesi Csillát, Dr. Horváth Rékát és Dr. Lőrincz Katalint, akik a rendelkezésünkre bocsátották a klinikai adatokat. Szeretném megköszönni Dr. Barsi Péternek és Dr. Nagy Szilviának, hogy értékes adatokkal járultak hozzá munkánkhoz. Hálás vagyok Dr. Karádi Kázmérnak a betegek neuropszichológiai vizsgálatának elvégzéséért. Köszönöm Dr. Farkas Kornéliának az adatok statisztikai értékelésében nyújtott segítségét.

Végül pedig szeretném kifejezni hálámat a férjemnek és a szüleimnek az elmúlt évek során nyújtott támogatásukért.

A munkát a Nemzeti Agykutatás Program KTIA\_13\_NAP-A-II/11, a Nemzeti Agykutatás Program 2.0 (2017-1.2.1-NKP-2017-00002), a PTE EFOP-3.6.1.-16-2016-00004, az EFOP-3.6.2.-16-2017-00008, a 20765/3/2018/FEKUSTRAT, NKFIH K125436, a TKP2020-IKA-08, a 2020-4.1.1-TKP2020 és az Innovációs és Technológiai Minisztérium Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Programja a Pécsi Tudományegyetem 5. tematikus programja támogatta. Az intézetünkben található JEOL JEM-1400Flash TEM elektronmikroszkóp beszerzését a GINOP-2.3.3-15-2016-00026 támogatta.

## **PUBLIKÁCIÓS LISTA**

### **Értekezéssel kapcsolatos közlemények**

Ábrahám H, Molnár JE, **Sóki N**, Gyimesi C, Horváth Z, Janszky J, Dóczi T, Seress L. Etiology-related degree of sprouting of parvalbumin-immunoreactive axons in the human dentate gyrus in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2020; 448: 55-70. IF: 3, 59

**Sóki N**, Richter Z, Karádi K, Lőrincz K, Horváth R, Gyimesi C, Szekeres-Paraczký C, Horváth Z, Janszky J, Dóczi T, Seress L, Ábrahám H. Investigation of synapses in the cortical white matter in human temporal lobe epilepsy. *Brain Research* 2022; 1779: 1477-87. IF: 2, 9

### **Az értekezés alapját nem képező közlemény**

Boros M, **Sóki N**, Molnár A, Ábrahám H. Morphological study of the postnatal hippocampal development in the TRPV1 knockout mice. *Temperature* 2023; 10:102-120. IF: 4, 69

### **Az értekezés alapját képező konferencia prezentációk**

**Oláh N.**, Richter Zs., Janszky J., Lőrincz K., Dóczi T., Seress L., Ábrahám H. A szinaptofizin immunreaktivitás vizsgálata a kéreg alatti fehérállományban temporális lebeny epilepsziában. Házi TDK Konferencia, PTE-ÁOK, 2018. Előadás.

**Sóki N.**, Richter Zs., Janszky J., Lőrincz K., Dóczi T., Seress L., Ábrahám H. A szinaptofizin immunreaktivitás vizsgálata a kéreg alatti fehérállományban temporális lebeny epilepsziában. Magyar Epilepszia Liga XIV. Kongresszus, Balatonkenese, 2018. Poszterbemutató.

**Sóki N.**, Richter Zs., Janszky J., Lőrincz K., Dóczi T., Seress L., Ábrahám H. A kéreg alatti fehérállományban levő szinapszisok vizsgálata halánték lebeny epilepsziában. 1st. MEDPÉCS, Pécs, Szentágothai János Kutatóközpont, 2018. Előadás.

**Sóki N.**, Richter Zs., Janszky J., Lőrincz K., Dóczi T., Seress L., Ábrahám H. A szinaptofizin immunreaktivitás vizsgálata a kéreg alatti fehérállományban temporális lebeny epilepsziában. PTE Idegismereti centrum PhD és TDK Konferencia, Pécs, 2018. Előadás.

**Sóki N.**, Richter Zs., Janszky J., Lőrincz K., Dóczi T., Seress L., Ábrahám H. Investigation of synapses in the neocortical white matter in human temporal lobe epilepsy. 16th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society (MITT), Debrecen, 2019. Poszterbemutató.

**Sóki Noémi**, Lőrincz Katalin, Paraczkyc Cecília, Janszky József, Dóczy Tamás, Seress László, Ábrahám Hajnalka. A szinaptofizin immunreaktivitás vizsgálata a kéreg alatti fehérállományban temporális lebeny epilepsziában. Magyar Kísérletes és Farmakológiai Társaság, Magyar Anatómus társaság, Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság, Magyar Élettani Társaság közös Vándorgyűlése (FAMÉ), Budapest, 2019. Poszterbemutató.

Karádi Kázmér, **Sóki Noémi**, Paraczkyc Cecilia, Janszky József, Ábrahám Hajnalka. Cortikális fehérállományi szinapszisok és neuronok számának kapcsolata a memória funkcióval temporális lebeny epilepsziában. Út a reziliens jövő felé. A Magyar Pszichológiai Társaság XXIX. Országos Tudományos Nagygyűlése: Kivonatkozó, Sass Judit szerk. Magyar Pszichológiai Társaság, Budapest, 2021. 150.

Ábrahám Hajnalka, **Sóki Noémi**, Richter Zsófia, Karádi Kázmér, Lőrincz Katalin, Horváth Réka, Gyimesi Csilla, Szekeres-Paraczkyc Cecília és mtsai. Fehérállományi neuronok és szerepük a temporalis lebeny epilepsziában. Ideggyógyászati szemle 2022; 7: 8.

### **Egyéb prezentációk**

**Noémi Sóki**, Alexandra Stayer-Harci, Bálint Balogh, Melinda Boros, Mónika Vecsernyés, György Sétáló, László Seress, Hajnalka Ábrahám. Development of Parvalbumin-immunoreactive neurons in organotypic slice culture. IBRO WORKSHOP, Szeged, 2020. Poszterbemutató.

Alexandra Stayer-Harci, Katalin Götzer, Bálint Balogh, Mónika Vecsernyés, **Noémi Sóki**, Abigél Molnár, György Sétáló Jr., László Seress, Hajnalka Ábrahám. Effect of Urocortin 2 on the maturation of parvalbumin-immunoreactive neurons in organotypic hippocampal slice culture. IBRO WORKSHOP, Budapest, 2022. Poszterbemutató.

**Összesített impakt faktor: 11, 18**