

Agykérgi szinapszisok összehasonlító vizsgálata és a szinapszisszám változása posztpartum depresszióban

Doktori értekezés tézisei

Baka Judith

Témavezetők:

Dr. Hajszán Tibor

Dr. Tamás Gábor

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biofizika Intézet

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi
Tanszék

Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola
Szeged
2017

Bevezetés

Az agykéreg a sejtes szerveződés legkomplexebb struktúrája. A központi idegrendszer sejtes felépítését és az idegsejtek szinaptikus kapcsoltságát a XIX. század végén fedezte fel Ramón y Cajal, Golgi-féle festési eljárásának köszönhetően. Az emberi agykéregt 10^{10} számú idegsejt és ugyanennyi gliasejt alkotja, ami az egész agy sejtes felépítésének a 90%-a. Az emberi agykéregben az idegsejtek közötti kapcsolatok száma 10^{12} és 10^{14} között van, nemtől, kortól és egészségi állapottól függően.

Agyunk fő feladata, hogy a külső és belső környezetből érkező, folyamatosan változó és hatalmas mennyiségű információt feldolgozza, tárolja és arra megfelelő választ adjon. Ezen feladatok ellátását az idegsejtek és a köztük lévő szinaptikus kapcsolatok változatossága és plaszticitása teszi lehetővé. Az agykérgi idegsejteken 5000 - 60 000 szinapszis is lehet. Ezeket a kapcsolatokat először Held és Auerbach anilin-festéssel mutatta ki, amit Sherrington szinapszisonak nevezett el, majd definiálta, mint azt a struktúrát, ahol az idegimpulzus egyik sejtről a másikra terjed. A szinapszison keresztüli jelátvitelt Castillo és Katz tanulmányozta és írta le mint a szinaptikus transzmisszió ma már széles körben elfogadott kvantális modelljét, melynek azóta az anatómiai hátterére is fény derült. A neurotranszmitter a preszinaptikus sejt axonterminálisaiban vezikulumokban raktározódik. A szinaptikus transzmisszió folyamán ezek a vezikulumok szabadítják fel a bennük lévő neurotranszmittert, ami a szinaptikus résbe ürülve a posztzinaptikus sejten fejt ki hatását. A felszabadításra váró vezikulumok a preszinaptikus aktív zónához (AZ) horgonyozódnak (dokkolt vezikulák), és az akciós potenciál hatására exocitózissal ürülhetnek. Ezek a vezikuláris neurotranszmitter-csomagok okozzák a szinaptikus transzmisszió kvantális természetét.

Az agykérgi idegsejtek két fő csoportba sorolhatóak a neurotranszmitterük alapján. A nagyobb csoportot alkotó piramissejtek serkentő hatású, glutamát neurotranszmittert termelnek. Ez a csoport az idegsejtek körülbelül 80%-át teszi ki. A másik csoportot az idegsejtek 20%-át alkotó GABAerg interneuronok változatos csoportja alkotja, amelyeket hagyományosan gátló sejteknek tekintünk. Az agykérgi piramissejtek glutamáterg szinapszisaikkal serkentik a helyi gátló sejteket. A legszélesebb körben alkalmazott rágcsáló-modellállatokon már több tanulmány is készült ezen kapcsolatok működéséről. Ezek a szinaptikus kapcsolatok átlagosan 1-4 mV amplitúdójúak, melyek általában egyedül nem képesek a posztzinaptikus interneuronon akciós potenciált kiváltani. Ezzel ellentétben, az emberi agykéregben ugyanezen szinapszisok jóval hatékonyabbak: egy piramissejt egyetlen

akciós potenciálja képes lehet a környező gyorsan tüzelő interneuronokat nyugalmi membránpotenciáljukról küszöb fölé depolarizálni és akciós potenciálba vinni. A hatékony serkentés hatására poliszinaptikus hálózatok aktiválódnak, amelyek a Hebb-féle hálózatok alapjául szolgálhatnak.

A hippokampusz, ahogy az egész agykéreg is, lamináris szerveződésű. A principális sejtei két morfológiai csoportot alkotnak. A *gyrus dentatus* (DG) *stratum granulosum* rétegében találhatóak az úgynevezett szemcsesejtek sejtteste, amelyek ahogyan a piramissejtek is, sűrűn tüskézett dendrittel és glutamát neurotranszmitterrel rendelkeznek. A másik fő serkentő sejt a piramissejt, amely sejtteste az Ammon-szarv (CA) *stratum pyramidale* rétegben helyezkedik el. A további rétegek a principális sejtek dendritszakaszait tartalmazzák. A hippokampusz sejtei az úgynevezett triszinaptikus körben kommunikálnak egymással aszimmetrikus tüskeszinapszisokon keresztül. Ennek első lépése az úgynevezett perforáns pálya, ahol az entorhinális kéregből érkező serkentő rostok a szemcsesejtek *gyrus dentatus stratum moleculare*-ba (DGsm) nyúló tüskézett dendritjein végződnek. Ezt az információt a szemcsesejtek axonjai továbbítják a CA3 piramissejtjeinek a *stratum lucidum* és a *stratum radiatum* (CA3sl/sr) rétegben lévő dendrittüskéire, majd innen a piramissejtek Schaffer-kollaterálisain keresztül az információ a CA1 piramissejtjeinek *stratum radiatum* (CA1sr) területén lévő dendritjeire érkezik, és ezen sejtek axonjain keresztül jut ki a hippokampuszból.

A major depresszió patomechanizmusának egyik fő komponense a hippokampusz működésének rendellenessége. A rendellenes működéssel együtt jár a hippokampusz térfogatának csökkenése, a hippokampális neurogenesis hanyatlása és a fent említett triszinaptikus kört alkotó tüskeszinapszisok számának csökkenése, amelyek hatékony antidepresszáns-kezelésekkel visszafordíthatóak vagy megakadályozhatóak. Habár a legutóbbi kutatási eredmények beszámolnak a hippokampusz anyai stressz indukálta strukturális változásairól, közvetlen elektronmikroszkópos eredmény a hippokampusz szinaptikus változásairól posztpartum depresszióban jelenleg nincs.

Hasonlóan a major depresszióhoz, epidemiológiai kutatások kimutatták, hogy a PPD fő kockázati tényezője a stressz. Humán felmérések és rágcsálókön végzett kísérletek is bizonyítják azt a tényt, hogy a stressznek idegrendszert befolyásoló hatása van a terhesség alatti időszakban, ugyanis a terhesség alatt ért folyamatos stressz szorongásos viselkedést és a szülői gondoskodás hiányát eredményezte a terhesség után. Ez a megfigyelés a depresszió szinaptogenikus hipotézisével összhangban állhat, miszerint a terhesség alatti stressz az idegsejtek specifikus strukturális változását válthatja ki az anya központi idegrendszerében,

hozzájárulva a szülést követő megváltozott kedélyállapothoz. E hipotézis tesztelésére szükségeszerű egy olyan vizsgálat, amellyel jobban megértenénk, hogy az idegsejtek plaszticitása milyen mértékben érintheti a stressz okozta anyai hangulatváltozást.

Figyelembe véve azt a tényt, hogy a női nemi hormonok erősen befolyásolják a szervezet válaszait stresszel szemben, fennáll annak a lehetősége, hogy a stressz szinaptolitikus hatását és/vagy a szinapszisok számának összefüggését a depresszív viselkedéssel a nemi hormonok jelentősen megváltoztatják. Így a terhesség és a szülés utáni időszak kihívást jelentett a depresszió szinaptogenikus hipotézisének érvényessége szempontjából.

Célkitűzés

Disszertációm első fele a fajok között megfigyelt agykérgi szinapszisok különbségét vizsgálja fény- és elektronmikroszkópos technikákkal. A következő kérdésre kerestük a választ:

1. Mi az anatómiai háttere annak, hogy az emberi agykérgi kosársejtekre érkező helyi serkentő bemenetek hatékonysága jelentősen nagyobb, mint a rágszálók agykérgében?

Disszertációm másik felében kíváncsiak voltunk arra, hogy a stressz és a nemi hormonok milyen kapcsolatban állhatnak és hogyan hatnak egy terhességi/posztpartum modellben. A következő kérdésekre kerestük a választ:

2. Milyen viselkedésbeli hatása van a stressznek a terhességi/posztpartum modellállatainkra?
3. Van-e összefüggés a viselkedési tesztben kapott eredmények és a hippokampális tüskeszinapszisszám között ebben a modellben?

Módszerek

1. Kosársejtekre érkező aszimmetrikus szinapszisok összehasonlító vizsgálata humán és patkány agykéregben

Agyszeletkészítés

Minden vizsgálat a Helszinki Nyilatkozat értelmében és a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélyével történt. A humán agykérgi szeletek olyan kéreg alatti tumorban szenvedő betegek akut biopsziás szöveteiből készültek, akiknél a tumor sebészeti megközelítéséhez szükségzerű volt eltávolítani a frontális, parietális vagy temporális kérgi területek egy részét. A betegek (53 ± 13 év; nők és férfiak egyaránt) a műtét előtt a szövetminták ilyen jellegű kutatásra való felhasználását írásban engedélyezték. A műtétek a Szegedi Tudományegyetem Idegsebészeti Klinikáján történtek. A sebészileg eltávolított szövetblokkokat a műtőben azonnal jéghideg ($3-8$ °C) magas szacharóz tartalmú mesterséges agy-gerincvelő folyadékba helyeztük. Patkány agyszeletek készítésénél Wistar törzset használtunk (P 18-28; hím és nőstény egyaránt). A kiperparált agyszövetüket jéghideg ($3-8$ °C), magas szacharóz tartalmú, mesterséges agy-gerincvelő folyadékba helyeztük. A humán és a patkány agyszöveteket vibráló pengéjű mikrotómmal (Microm HM 650 V) $350 \mu\text{m}$ vastag szeletekre metszettük. A szeleteket a metszés során használt mesterséges agy-gerincvelői folyadékba helyeztük majd 1 órán keresztül 30 °C-on inkubáltuk.

Elektrofiziológia

Hogy jellemezhessük a humán és a rágcsáló agykérgi kosársejtekre érkező helyi serkentő bemeneteket, whole cell patch clamp technikával végeztünk szimultán elektrofiziológiai elvezetések II/III. rétegbeli piramissejt-kosársejt párokból. A sejteket biocitinnel töltöttük fel, hogy láthatókká tehesük a fény- és elektronmikroszkópos technikákhoz.

Fénymikroszkópos vizsgálatok

Az elektrofiziológiai kísérleteket követően a szeleteket 12 órán keresztül fixáltuk 4% pararformaldehidet, 1,25% glutáraldehidet és 15% pikrinsavat tartalmazó 0,1 M foszfátpufferoldatban (pH: 7,4). A piramis sejtek azonosítása a vastag apikális dendritjük és tüskézett apikális és bazális dendritjeik, továbbá az axonnak a szóma bazális részéről történő eredése alapján történt. Kosársejteknek tekintettük azokat az interneuronokat, melyek axonterminálisai a fénymikroszkópos megbízhatóság szintjén szinaptikus kapcsolat jelenlétét lehetővé tevő közelségbe kerültek más sejtek vagy autaptikus módon önmaguk szómájával, illetve periszomatikus régióival. A sejtek háromdimenziós rekonstrukcióját a NeuroLucida rendszer (MicroBrightField, Colchester, USA) és BX-60F (Olympus, Tokyo, Japan) fénymikroszkóp segítségével végeztük 100x olajimmerziós objektívvel. A rekonstrukciók során rekonstruáltuk a sejtek sejttestét, dendritfáját és axonját, továbbá a sejtek teljes terjedelmében meghatároztuk a lehetséges szinapszisok helyét.

Elektronmikroszkópia

A fénymikroszkóppal és elektrofiziológiai mérésekkel azonosított kosársejtek ($n = 3$ humán sejt, három különböző betegből; $n = 3$ patkány sejt, három különböző egyedből) dendritszakaszait (human: 150 μm távolságban a sejttesttől; patkány: 50 μm távolságban a sejttesttől) kivágtuk a metszetükből, és átágyasztuk epoxigyanta blokkokba. A kivágott metszetből ultramikrotómmal (RMC MTXL, Boeckler Instruments, Tucson, Arizona; Ultra 45°, Diatome) 20 nm vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk, melyeket hártásított (Formvar, TAAB), egylyukú rézgridekre emeltünk. Az ultravékony metszeteket FEI/Philips CM10 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk 120 kV feszültségen, 64000x nagyításon, és digitális képeket készítettünk róluk MegaView G2 kamerával. A dendritekről és a preszinaptikus axonterminálisokról háromdimenziós rekonstrukció készült a Reconstruct program segítségével (<http://synapses.clm.utexas.edu/>).

Elektronmikroszkópos tomográfia

Az elektronmikroszkópiára átágyazott mintákból 200 nm vékony metszeteket készítettünk ultramikrotómmal (RMC MTXL, Boeckler Instruments, Tucson, Arizona; Ultra 45°, Diatome), amiket hártásított (Formvar, TAAB), egylyukú rézgridekre emeltünk. A

metszetek pontos vastagságának meghatározására 3 : 1 arányú, kétszeresen desztillált vizes oldatban protein A-ra (ProtA) konjugált 10 nm átmérőjű arany szemcsékkel jelöltük a gridek mindkét oldalát (Cytodiagnosics – Absource Diagnostics GmbH, Munich, Germany). Kétszeresen desztillált vizes mosás és szárítás után a minták készen álltak a tomográfiára, amit FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN transzmissziós elektronmikroszkóppal 120 kV-on és Eagle 4K HS digitális kamerával, a FEI Xplore3D program segítségével (FEI Europe Nanoport, Eindhoven, The Netherlands) végeztük. $\pm 45^\circ$ döntési szögig a digitális felvételek 2° -onként készültek, majd $\pm 45^\circ$ és $\pm 65^\circ$ között 1° -onként 30000x nagyításon. Az IMOD-programcsomag segítségével készítettük el a tomogramokat a folyamatosan döntött sorozatképekből.

2. A terhesség utáni stressz vizsgálata posztpartum modellen

A vizsgált állatcsoportok

Kísérleteinkben közel azonos korú (60-70 posztnatális nap) és tömegű (200-250 g) felnőtt nőstény Sprague-Dawley patkányokat (Charles-River Laboratories, Vác, Magyarország) használtunk. Minden állatot a kísérlet első napján ovariektomizáltunk. Az ovárium eltávolításával kivédtük a ciklusbeli hormonváltozásokat, amelyek így nem befolyásolták az eredményeinket. Négy csoportot hoztunk létre. Az első csoport az abszolút kontrollcsoport (Veh, n = 20), amelynek állatai a kísérlet folyamán semmiféle hormonkezelésben nem részesültek, csak hormonmentes placebokapszulát kaptak a bőrük alá az 1. és a 21. napon. A második csoport a „terhesség utáni”, vagyis a posztpartum csoport (PpD, n = 20), mely egyedeinek az ovariektomizálás napján ösztrogén és progeszteron tartalmú kapszulát (0,5 mg 17β -ösztradiol, 50 mg progeszteron) ültettünk a bőrük alá, melyből a hormonok a vizsgálat 21 napja során folyamatosan szabadultak fel. A 21. napon a hormonkapszulákat eltávolítottuk, és hormonmentes placebokapszulákat tettünk a helyére. A harmadik csoport a „proösztroz” csoport (ProE, n = 16), amellyel az ösztroz ciklus proösztroz fázisára jellemző hormonszintek hatását vizsgáltuk. Ezek az állatok hormonmentes placebokapszulát kaptak a bőrük alá az 1. és a 21. napon. A 26. napon 3 mg/kg ösztradiol-benzoát injekciót kaptak (szezámolajban feloldva, bőrük alá) reggel, majd este megismételve 4 mg/kg-ot. A 27. napon 2 órával a stressznek kitevés (vagy stressznek ki nem

tevés) előtt ismételten 3 mg/kg 17 β -ösztradiol injekciót kaptak, viszont ezen a napon 2 mg/kg progeszteront is kaptak (szezámolajban feloldva, bőrük alá) a stressznek kitevés (vagy stressznek ki nem tevés) előtt 5 órával. A negyedik csoport a „terhesség utáni kezelt”, vagyis a hormonkezelt csoport (Horm, n = 20), mely egyedeinél szintén beültetésre kerültek a három hétig adagoló hormonkapszulák, amiket a 21. napon ugyanolyan hormontartalmú kapszulákra cseréltünk. A 27. napon csoportonként három állat nem lett stressznek kiteve (NS) a többi állattal szemben, amelyeket elkerülhetetlen stresszkezelésnek (IS) vetettünk alá. A 28. napon a stressznek kitétt állatok közül csoportonként három állatot és a stressznek nem kitétt állatokat elektronmikroszkópos analízisre használtuk fel. A megmaradt állatokon magatartástesztet (aktív menekülési teszt - AE) végeztünk és szérumhormonszinteket mértünk.

Magatartásvizsgálat

A magatartásvizsgálatok egy külön erre a célra kialakított ketrecben, az ún. shuttle boxban történtek (Med Associates, St Albans, Vermont, USA). Ezek a ketrecek patkányokra méretezettek, amelyek egy számítógépesen vezérelt guillotine-ajtóval két egyforma részre vannak felosztva. Az elkerülhetetlen stressz (IS) kivitelezése az állatok talpára adott áramütés formájában történik a ketrec alján lévő fémrácsozaton keresztül. Az első napon az állatok IS kondicionálást kapnak, ami a shuttle boxok egyik felében történik 0,85 mA áramerősségen. A guillotine-ajtó a kondicionálás teljes időtartama alatt zárva marad. Az IS-kondicionálás 60 áramütésből áll. Egy áramütés átlagosan 15 s időtartamú váltakozó áramimpulzust és átlagosan 45 s szünetet jelent. A patkányok „helpless” viselkedésének súlyosságát az ún. aktív menekülési (active escape - AE) teszttel vizsgáljuk ugyanabban a shuttle boxban, amelyben az IS-t is végrehajtottuk. A menekülési teszt 30 elkerülhető áramütésből áll, ahol minden egyes áramütés egy maximum 35 s-ig tartó 0,65 mA-os áramimpulzus. Minden egyes áramütés kezdetével egy időben a guillotine-ajtó kinyílik, és az állat a másik oldalra átszaladva elmenekülhet a stresszhatás elől. Az első 5 próbán az állatoknak a guillotine-ajtón kell átmenniük ahhoz, hogy megszűnjön az áram, azonban az ezt követő 25 próbán egy oda-vissza út szükséges. A sikeres meneküléshez szükséges időt mérjük (menekülési latencia) és rögzítjük. Amennyiben az állat 35 s alatt nem teljesíti a menekülési kritériumot, akkor az hibának minősül (menekülési hiba).

Hisztológia és elektronmikroszkópia

Transzkardiálisan 4%-os paraformaldehid és 0,1%-os glutáraldehid fixáló oldattal perfundáltuk az állatokat, majd a kipreparált agyakon 24 órás utófixálást végeztünk 4 °C-on 4%-os paraformaldehiddel. A fixált agyszövetekből kipreparáltuk a hippokampusz régiót. Ezekből 100 µm-es koronális metszeteket készítettünk, melyeket 0,1 M-os foszfátpufferben feloldott 1%-os OsO₄-val utófixáltuk. Ezt követően többszörös 0,1 M-os foszfátpufferes mosás után a metszeteket felszálló alkoholsorral dehidráltuk, közbeiktatva a 70%-os etanolban feloldott 1%-os uranyl-acetátos kontrasztosítást. Végezetül epoxigyantában (Durcupan, Fluka) polimerizáltattuk. A metszetekből kivágtuk a hippokampusz CA1sr, CA3sl/sr és DGsm régióit, majd ezeket gyantablokkokra ragasztva ultramikrotómmal (Ultracut UCT, Leica) 70 nm-es sorozatmetszeteket készítettünk, melyeket hártásított (Formvar, TAAB), egylyukú rézgridekre emeltünk. Az ultravékony metszeteket elektronmikroszkóppal (Zeiss CEM 902) vizsgáltuk 11000x nagyításon, majd a szinapszisokról, az egymást követő metszeteken digitális képeket készítettünk.

Eredmények és tárgyalás

1. Kosársejtekre érkező aszimmetrikus szinapszisok összehasonlító vizsgálata humán és patkány agykéregben

A páros elvezetésekéből kiderült, hogy a humán mintákban mérhető EPSC-k átlagosan nagyobb amplitúdójúak ($258,8 \pm 272,8$ pA), mint a patkány mintákban mértéké ($75,8 \pm 58,7$ pA) ($p < 0,001$; MW U-teszt). Annak eldöntésére, hogy a humán mintákban előforduló nagy amplitúdójú EPSC-k összefüggésben állnak-e a szinapszisok számával, fénymikroszkóp segítségével meghatároztuk mindkét fajban a piramis sejtek axonjai és a kosársejtek dendritjei között létesített potenciális szinaptikus kapcsolatok számát. A humán piramis sejtek átlagosan $3,3 \pm 1,5$ fénymikroszkóposan azonosított szinapszist létesítettek a velük szinaptikusan kapcsolt kosársejtek dendritjeire, ami nem különbözött szignifikánsan a patkány piramis sejtek esetében mért értékektől ($2,9 \pm 1,5$ fénymikroszkóposan azonosított kapcsolat; $p = 0,35$; MW U-teszt). A szinapszisok számának hasonlósága a két fajban arra utal, hogy az elektrofiziológiai mérésekben tapasztalt fajspecifikus különbség a szinapszisokon belül

keresendő, ezért a kosársejtekre érkező serkentő bemeneteket elektronmikroszkópos technikákkal tovább vizsgáltuk.

Az agykérgi idegsejtek axonterminálisai (bouton) számos vezikulumot tartalmaznak. Ezek közül csak néhány helyezkedik el közvetlenül a preszinaptikus aktív zóna membránjánál, érintkezve azzal (dokkolt vezikulák). Valószínűleg ezek a dokkolt vezikulák azok, amelyek az axonterminálisba érkező akciós potenciál hatására tartalmukat a szinaptikus részbe üríthetik, és így szinaptikus potenciált alakíthatnak ki a posztzinaptikus sejten. A vezikulák gömb alakúak és átlagosan 40 nm átmérőjűek, ezért, hogy a kosársejtekre érkező serkentő bemenetek dokkolt vezikuláinak a pontos számát meghatározhassuk, 20 nm vastagságú sorozatmetszetek készítésére volt szükségünk. Ezeket a vizsgálatokat három humán és három patkány agykérgi, II/III. rétegbeli kosársejtekre érkező aszimmetrikus szinapszist formáló axonterminálisokon végeztük el. A biocitinnel töltött, elektrofiziológiailag azonosított sejtpárok szinaptikus kapcsolatainak a vizsgálatát ellehetetlenítette az axonterminálisokban lévő DAB-csapadék, ezért ezeket a vizsgálatokat biocitinnel töltött kosársejtek dendritszakaszaira érkező jelöletlen aszimmetrikus szinapszison végeztük. A két fajban a kosársejtekre érkező azonosított serkentő bemenetek a fénymikroszkópos vizsgálatok alapján humán mintákban átlagosan $149,01 \pm 137,42 \mu\text{m}$, míg patkány mintákban $47,6 \pm 25,88 \mu\text{m}$ távolságra érkeztek a kosársejtek szómájától. Így az elektronmikroszkópos vizsgálatokat a sejtestektől ilyen távolságokban végeztük.

A 20 nm vastagságú sorozatmetszetekből készített háromdimenziós rekonstrukciók alapján először a serkentő bemenetek aktív zóna (AZ) területét, majd az egyes aktív zónákra eső dokkolt vezikulák számát határoztuk meg. Az aktív zónák a preszinaptikus axonterminális membránjának azon része, ahol a szinaptikus rés jellegzetesen kiszélesedik. Az eredmények mindkét faj esetén nagy szórást mutattak, azonban elmondható, hogy a humán mintákban mért aktív zónák ($n = 22$; $0,077 \pm 0,051 \mu\text{m}^2$) szignifikánsan nagyobbak, mint a patkány mintákban mérték ($n = 19$; $0,041 \pm 0,017 \mu\text{m}^2$) ($p = 0,002$; MW U-teszt). Míg az aktív zóna területek esetében kétszeres különbséget találtunk, addig a dokkolt vezikulák számában négyszeres különbséget állapítottunk meg a két faj összehasonlításánál ($p < 0,001$; MW U-teszt). A humán aktív zónákban ($n = 21$) számlált dokkolt vezikulák mennyisége $4,2 \pm 2,2$, míg a patkány esetében ($n = 18$) ez $1,3 \pm 0,8$. Az aktív zónák területe és a hozzájuk tartozó dokkolt vezikulák száma között pozitív korrelációt találtunk mindkét faj esetén (Spearman-féle korreláció; ρ humán = 0,71; ρ patkány = 0,54). Az aktív zónák mellett a humán mintákban lévő boutonok térfogata is nagyobb volt ($n = 20$; $0,14 \pm 0,09 \mu\text{m}^3$), mint a patkány mintákban ($n = 17$; $0,05 \pm 0,02 \mu\text{m}^3$) ($p < 0,01$; MW U-teszt).

Hogy validáljuk a 20 nm vastagságú sorozatmetszetek megbízhatóságát, a beágyazott mintáinkból 200 nm vastagságú metszeteket is készítettünk, és azokat elektronmikroszkópos-tomográfiával vizsgáltuk meg. Mivel a vizsgált szinapszisok axiális mérete meghaladja az elektronmikroszkópos-tomográfiával vizsgált metszeteink vastagságát, ezzel az eljárással nem tudtuk meghatározni a szinapszisokban jelen levő dokkolt vezikulák abszolút számát, csak a dokkolt vezikulák sűrűségét. Hogy a két elektronmikroszkópos módszert összehasonlítsuk, mindkét eljárással megmértük a dokkolt vezikulák sűrűségét. A 20 nm vastagságú sorozatmetszeten mérte eredmények azt mutatják, hogy lényeges különbség van a humán ($58,5 \pm 24,6 / \mu\text{m}^2$; $n = 21$ AZ) és a patkány ($32,5 \pm 199 / \mu\text{m}^2$; $n = 18$ AZ) mintákban ($p = 0,002$; t-teszt). Ugyanezt a különbséget kaptuk ($p < 0,001$; MW U-teszt) az elektronmikroszkópos-tomográfiára használt mintákból is (humán: $49,5 \pm 23,8 / \mu\text{m}^2$; $n = 33$ AZ; patkány: $24,3 \pm 16,0 / \mu\text{m}^2$; $n = 31$ AZ). A két technikából származó eredmények között nincs lényegi különbség.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok kiértékelése alapján elmondhatjuk, hogy fajspecifikus különbséget találtunk a serkentő preszinaptikus bemenetekben. A különbség megmutatkozik mind az aktív zóna méretében, mind a jelátvitelben részt vevő dokkolt vezikulák számában, valamint a boutonok térfogatában. Az aktív zónák átlagos mérete humán mintákban kétszer nagyobb, mint a patkány mintákban mértéké. Továbbá a dokkolt vezikulák sűrűségében is kétszeres különbség látható a két faj között, így összességében szinapszisonként átlagosan négyszer több dokkolt vezikula található egy kosársejtre érkező serkentő boutonban emberben, mint ugyanez patkányban. Az aktív zóna mérete és a hozzájuk tartozó dokkolt vezikulák mennyisége pozitívan korrelálnak egymással mindkét fajban. Továbbá a humán mintákban mért boutonok térfagata is nagyobb (háromszor), mint a patkány mintákban mért serkentő axonterminálisoké.

A kapott eredményekből azt láthatjuk, hogy amíg egy patkány kosársejtre érkező serkentő szinapsziséban átlagosan csak egy dokkolt vezikula vesz részt, addig a humán mintákban mért serkentő szinapszisokban a dokkolt vezikulák átlagos száma négy. Ebből a négyszeres különbségből és a hozzájuk tartozó aktív zóna területből meghatározható az egy dokkolt vezikulára eső aktív zóna terület, mely a humán mintákban körülbelül fele akkora ($0,012 \mu\text{m}^2$), mint a patkány mintákban ($0,025 \mu\text{m}^2$). Tudomásunk szerint a mi munkánk ad először becslést a Katz-féle funkcionális szinaptikus felszabadulási helyek területére az emberi agykéregben és ad lehetőséget a rágsálókkal való összehasonlítására. Összehasonlító munkánk érdekes kérdést vet fel: vajon miért igényel kisebb helyet az emberi agyban az egy vezikula felszabadításáért felelős molekuláris gépezet? Ennek a kérdésnek a megválaszolására

ezen aktív zónák további ultrastrukturális vizsgálata szükséges. Érdekes lenne megvizsgálni, hogy ez a fajspecifikus különbség érvényes-e minden központi idegrendszeri sejtkapcsolatban, vagy esetleg ez csak az agykérgi mikrohálózatok egyedi jellemzője.

2. A terhesség utáni stressz vizsgálata posztpartum modellen

Kontrollcsoport (Veh): A kontrollcsoportnál az ovárium eltávolításával megszüntettük a nemi hormonok (ösztrogén és progeszteron) stresszel szemben való befolyását a szervezetre. A nemi hormonok megvonása következtében az elkerülhetetlen stressz (IS) erős berögződést hagyott ezekben az állatokban. A menekülési latencia átlaga a csoportban $22,89 \pm 1,87$ s, míg a menekülési hiba $13,04 \pm 2,37$. A stressznek kitett állatoknál (Veh-IS) szignifikánsan kevesebb tüskeszínapszist találtunk, mint a stressznek ki nem tett állatoknál (Veh-NS) minden vizsgált hippokampális régióban ($p < 0,04$; TK-teszt). Ez azt mutatja, hogy az elkerülhetetlen stressz hatására lecsökken a tüskeszínapsziszok száma a CA1sr, CA3sl/sr és a DGsm régiókban.

Terhesség utáni csoport (PpD): Szülés után az anya szervezetében drámaian lecsökken a nemi hormonok mennyisége. Ezért ennek a jelenségnek a modellezésére ennél a csoportnál a három hétig folyamatosan adagoló hormonkapszulákat a 21. napon placebo-, hormonmentes kapszulára cseréltük. Hasonlóan a kontrollcsoportéhoz, a hormonok megvonása és a stressz hatása itt is jól látható, vagyis az elkerülhetetlen stressz jelentős teljesítménycsökkenéshez vezetett. A menekülési teszt menekülési latencia átlaga a csoportban $22,16 \pm 1,97$ s, míg a menekülési hiba $12,75 \pm 1,99$. Ez az eredmény a kontrollcsoport eredményétől nem különbözik szignifikánsan sem latenciában ($p = 0,989$; TK-teszt), sem hibaszámában ($p = 0,482$; MW U-teszt). A stressznek kitett állatok (PpD-IS) CA1sr, CA3sl/sr és a DGsm tüskeszínapsziszszáma szignifikánsan kisebb volt a csoportban lévő stressznek ki nem tett állatok (PpD-NS) ugyanazon régiói színapsziszai számánál ($p < 0,01$; TK-teszt). Összehasonlítva a Veh-NS állatait a PpD-NS állataival, nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget ($p > 0,2$; TK-teszt), ugyanúgy, mint a Veh-IS állatai és a PpD-IS állatai között sem ($p > 0,25$; TK-teszt). Vagyis a PpD csoportban alkalmazott hormonkezelésnek majd hormonmegvonásnak nem volt hatása sem az alap, sem a stressz után mérhető tüskeszínapszisz mennyiségre.

Proösztroz csoport (ProE): A szervezet az ösztrogén szint maximumát a proösztrozban és az ösztroz reggelén éri el. Ezért ez a csoport az elkerülhetetlen stresszt

megelőző napon és a stresszhatás napján magas dózisú ösztrogéninjekciót kapott. A csoport menekülési teszt eredménye ugyan javult a kontrollcsoportéhoz képest, mégsem szignifikánsan (menekülési latenciában $p = 0,367$; TK-teszt; menekülési hibaszámában $p = 0,43$; MW U-teszt). A menekülési latencia átlaga a csoportban $18,71 \pm 1,21$ s, míg a menekülési hiba $12,00 \pm 1,16$. A stressznek kitett állatok (ProE-IS) és a stressznek ki nem tett állatok (ProE-NS) tüskeszínapszisszámái a CA1sr, a CA3sl/sr és a DGsm régiókban szignifikánsan különböztek egymástól ($p < 0,01$; TK-teszt). Minden vizsgált régióban kevesebb tüskeszínapszist számláltunk a stressznek kitett állatok esetében, mint a stressznek ki nem tett állatoknál. Összehasonlítva a Veh-NS állatokat a ProE-NS állatokkal, minden vizsgált területen szignifikáns különbséget láthatunk ($p < 0,02$; TK-teszt), míg a Veh-IS és a ProE-IS állatok tüskeszínapsziszainak száma csak a CA3sl/sr régióban mutatott szignifikáns különbséget ($p < 0,001$; CA1sr régióban $p = 0,054$; DGsm régióban $p = 0,063$; TK-teszt). Mindkét esetben a ProE állatok nagyobb színapszismennyiséggel rendelkeztek az adott agyterületeken.

Terhesség utáni kezelt csoport (Horm): Terhesség alatt az anya szervezetében megnő a nemi hormonok termelődése. Ez a csoport négy héten át tartó, folyamatos magas dózisú ösztrogén- és progeszteronkezelés alatt állt, aminek hatása jól látható a menekülési teszt eredményeiben. A rövidebb menekülési latencia ($13,56 \pm 1,39$ s) és a kisebb hibaszám ($3,71 \pm 0,83$) egyértelműen azt mutatja, hogy a női nemi hormonok kivédik a stressz depresszív viselkedést kiváltó hatását. Az eredmények szignifikánsan különböznek a többi csoport eredményeitől mind a menekülési latenciában ($p < 0,01$; TK-teszt), mind a menekülési hiba számában ($p < 0,002$; MW U-teszt). Egyedül a proösztrozusz csoporttal való összehasonlításnál nem találtunk szignifikáns különbséget a menekülési latenciában ($p = 0,196$; TK-teszt). A stressznek kitett (Horm-IS) és a stressznek ki nem tett állatok (Horm-NS) színapszisszáma a hippokampális régiók közül egyikben sem mutat különbséget ($p > 0,15$; TK-teszt). Ez azt jelenti, hogy a folyamatosan magas szintű női nemi hormonok jelenléte védelmet biztosított a stresszel szemben, ugyanis megakadályozta a tüskeszínapsziszok számának csökkenését. Összehasonlítva a Veh-IS és Horm-IS csoportokat, szignifikáns különbség látható a CA3sl/sr és a DGsm régiókban ($p < 0,01$; TK-teszt), míg a CA1sr régióban az eredményeink szerint nincs különbség ($p = 0,412$; TK-teszt). A Veh-NS és Horm-NS összehasonlításnál a CA3sl/sr és a DGsm régiókban szignifikáns különbséget nem kaptunk ($p > 0,6$; TK-teszt). A CA1sr régióban különbséget találtunk a két csoportnál, mivel a Horm-NS csoportnál kevesebb színapsziszist számláltunk, mint a Veh-NS csoportnál ($p < 0,02$; TK-teszt). Ez a kevesebb

szinapszisszám közel azonos volt a Veh-IS állatainál mért szinapszisszámmal ($p = 0,647$; TK-teszt).

Jelen tanulmányunkban bemutattuk, hogy a pszeudoterhesség utáni időszakban, a hormonmegvont csoport (PpD) állatai hippocampális szinapszisszám-csökkenéssel reagáltak az elkerülhetetlen stresszre. Ez az eredmény megegyezik egy korábbi eredményünkkel, ahol a depresszió kialakulását vizsgáltuk nőstény patkányokon (Hajszan *et al.*, 2010). Ezen korábbi tanulmányunkban a kezeletlen kontrollcsoport teljesített hasonlóképpen a magatartásteresztben, mint a jelen tanulmány PpD csoportja. Ezek az adatok azt a hipotézisünket támasztják alá, miszerint a szülés után bekövetkező stressz a hippocampus tüskéire érkező szinapszisok számának csökkenésével jár. Azt is bemutattuk kísérleteinkben, hogy a stressz ellen a női nemi hormonok magas szinten tartása védelmet biztosított a hippocampális tüskeszinapszisoknak, vagyis a stressz nem okozott szinapszisszám-csökkenést. Meg kell említenünk, hogy a hippocampális CA1sr régióban a stressznek ki nem tett hormonkezelt csoport (Horm-NS) szinapszisainak száma megegyezett a kontrollcsoport stressznek alávetett állatainak (Veh-IS) a szinapszisszámával. Ez az eredmény nem támasztja teljes mértékben alá a női nemi hormonok által közvetített szinapsziszvédő hatást. Továbbá, a szérumkortikoszteron-koncentrációk alapján úgy tűnik, hogy a szinapsziszvédő hatás, legalábbis részben, a stresszválasz mérséklésén keresztül megy végbe. Munkánkban azt is bemutattuk, hogy a nemi hormonok a proösztroz fázisra jellemző koncentrációban nem képes kifejteni a stresszel szembeni szinapsziszvédő hatását.

A kísérleteinkben alkalmazott aktív menekülési teszt eredménye szépen korrelál a stresszt követő hippocampális tüskeszinapszisok számával. Ebben a magatartásvizsgálatban a magasabb menekülési latencia és a több menekülési hiba kevesebb szinapszisszámmal párosult (PpD és Veh csoportokban), a kisebb latencia és kevesebb hibaszám több hippocampális szinapszisszámmal kapcsolódott össze (Horm csoport a Veh csoporthoz viszonyítva), míg egy közepes teljesítmény is a magatartásteresztben egy közepes szinapszismennyiséget mutatott (ProE csoport a Veh és a Horm csoporthoz viszonyítva). Ezek az eredmények igazolják azt a hipotézisünket, miszerint a hippocampális szinapszisszám-csökkenés és a depressziós magatartás között kapcsolat áll fenn és ez a kapcsolat a terhesség utáni stressz esetén is kimutatható.

Tehát elmondható, hogy az általunk felvetett szinaptogenikus hipotézis mindkét sarkalatos pontja igaznak bizonyul a posztpartum modellünkben. Ez a két fontos aspektus a stressz okozta szinapszisszám-csökkenés valamint a szinapszisszám-csökkenés és a depresszív viselkedés közti korreláció.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Molnár, G., Rózsa, M., **Baka, J.**, Holderith, N., Barzó, P., Nusser, Z., & Tamás, G. (2016) Human pyramidal to interneuron synapses are mediated by multi-vesicular release and multiple docked vesicles. *Elife*, **5**, 1–12.

IF: 8,303

Baka, J., Csakvari, E., Huzian, O., Dobos, N., Siklos, L., Leranth, C., MacLusky, N.J., Duman, R.S., & Hajszan, T. (2017) Stress induces equivalent remodeling of hippocampal spine synapses in a simulated postpartum environment and in a female rat model of major depression. *Neuroscience*, **343**, 384–397.

IF: 3,231

Egyéb közlemények

Rózsa, M., **Baka, J.**, Bordé, S., Rózsa, B., Katona, G., & Tamás, G. (2017) Unitary GABAergic volume transmission from individual interneurons to astrocytes in the cerebral cortex. *Brain Struct. Funct.*, **222**, 651–659.

IF: 5,811

Faragó, N., Kocsis, Á.K., Braskó, C., Lovas, S., Rózsa, M., **Baka, J.**, Kovács, B., Mikite, K., Szemenyei, V., Molnár, G., Ozsvár, A., Oláh, G., Piszár, I., Zvara, Á., Patócs, A., Barzó, P., Puskás, L.G., & Tamás, G. (2016) Human neuronal changes in brain edema and increased intracranial pressure. *Acta Neuropathol. Commun.*, **4**, 78.

IF: -

Összesített impaktfaktor: 17,345

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott nyilatkozom, hogy a Jelölt, mint társszerző hozzájárulása a megnevezett közlemények elektronmikroszkópos és magatartásvizsgálati részéhez jelentős volt. Kijelentem, hogy ezeket az eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, és a jövőben sem fogom felhasználni:

Molnár, G., Rózsa, M., **Baka, J.**, Holderith, N., Barzó, P., Nusser, Z., & Tamás, G. (2016) Human pyramidal to interneuron synapses are mediated by multi-vesicular release and multiple docked vesicles. *Elife*, **5**, 1–12.

Baka, J., Csakvari, E., Huzian, O., Dobos, N., Siklos, L., Leranath, C., MacLusky, N.J., Duman, R.S., & Hajszan, T. (2017) Stress induces equivalent remodeling of hippocampal spine synapses in a simulated postpartum environment and in a female rat model of major depression. *Neuroscience*, **343**, 384–397.