

A kutatás eredményei:

1. Az szomatosztatin 2-es típusú receptorát (sst2) expresszáló neuronok jellemzése a patkány agykérgében

Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy agonista hatására a sejt felszíni sst2 receptorok *in vivo* internalizációja következik be neuronokban. Az agonista-indukált internalizáció tanulmányozása során megfigyeltük, hogy az sst2 receptorok sejt felszínéről a korai endoszómákba történő koncentrációja a receptor immunreaktivitás eloszlásának fénymikroszkóppal is megfigyelhető megváltozásához vezet: míg kontroll állatokra a neuropil diffúz festődése a jellemző, addig az internalizáció sejtek és sejtnyúlványok jelölődését eredményezi, lehetővé téve a sejtek elhelyezkedésének pontos meghatározását.

Kísérleteinkben az sst2 receptor agonista oktreotid *in vivo* intracorticalis beadását sztereotaxiás készülékkel végeztük és tanulmányoztuk a receptor eloszlását egyes és kettős immunfluoreszcens jelölések hagyományos fénymikroszkópos és konfokális mikroszkópos vizsgálatával. Kontroll állatokban a neuropil diffúz festődése volt jellemző a parietális cortex V.-VI. rétegében, ami fénymikroszkópos szinten nem tette lehetővé a receptorok elhelyezkedésének pontos (neuron, glia; perikaryon, dendrit, axon) meghatározását, illetve a receptort expresszáló sejtek neurokémiai jellemzését. Harminc perccel az oktreotid intracorticalis beadását követően a diffúz immunjelölés intenzitása csökkent és számos sejt (perikaryonok és proximalis dendritek) vált láthatóvá a pontszerű intracelluláris immunjelölődés következtében a kéreg V.-VI. rétegében. Az sst2 receptor eloszlásának oktreotid hatására bekövetkező megváltozása igen gyors volt, már 10 perccel az agonista beadását követően megjelentek az immunjelölt sejtek az agykéreg mély rétegeiben, így kizárható, hogy az sst2 receptor immunreaktivitás a sejtekben az agonista hatására bekövetkező fehérjeszintézis eredménye lenne.

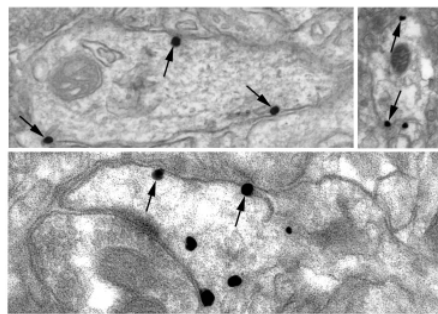
Az sst2 receptor-pozitív sejtek az V. rétegben nagy pyramisisejtek morfológiai jellegzetességeit mutatták, míg a VI. rétegben a jelölt sejtek kisméretű, multipoláris neuronok voltak. A VI. réteg sst2 receptor-pozitív neuronjai a szomatosztatin-, parvalbumin- vagy calretinin-immunjelölt, GABAerg sejtekhez hasonló elhelyezkedéssel és morfológiai jellegzetességekkel bírtak, azonban a kettős immunfluoreszcens vizsgálatok nem mutatták ki az sst2 receptor kolokalizációját egyik sejtpopulációval sem. Eredményeink arra utalnak, hogy a szomatosztatin sst2

receptorát a parietális agykéregben feltételezhetően elsősorban glutamaterg idegsejtek expresszálják.

2. Az sst2 receptor dendrit törzseken és tüskéken való megoszlásának vizsgálata, szinapszisokhoz és szomatosztatinerg végződésekhöz való viszonyának feltérképezése a hippocampusban és hypothalamusban

A szomatosztatinerg idegvégződések és a szomatosztatin sst2 típusú receptorának szubcelluláris eloszlását tanulmányoztam a gyrus dentatusban, továbbá a hypothalamusban a nucleus paraventricularis és nucleus arcuatus területén.

A gyrus dentatus molekuláris rétegének külső részében a szomatosztatinerg axon terminálisok szemcsesejtek dendrit törzsein illetve tüskéin végződnek, míg az sst2 receptorok szemcsesejtek dendrit törzsein és tüskéin a sejtmembránon helyezkednek el (1. ábra).



1. ábra: Az sst2 receptor szubcelluláris elhelyezkedése a gyrus dentatus molekuláris rétegének külső részében

A receptor dendrit tüskéken való jelenléte felvetette annak a lehetőségét, hogy a korábban feltételezett, a neuropeptid receptorokra általában jellemző extraszinaptikus elhelyezkedéssel szemben az sst2 receptor periszinaptikus vagy/és szinaptikus lokalizációjú is. Kettős preembedding immuncitokémia elektronmikroszkópos vizsgálatával kimutattuk, hogy az sst2 receptorok egyenletesen oszlanak el a dendrit törzsek és tüskék sejtmembránján, túlnyomó többségük extraszinaptikus elhelyezkedésű, receptorok szinaptikus koncentrációját vizsgálataink során nem figyeltük meg. Ennek megfelelően szomatosztatinerg idegvégződésekkel szemben, a posztzinaptikus membránon sst2 receptorok csak elvétve voltak megfigyelhetőek.

Hasonló eredményekre jutottunk a hypothalamus tanulmányozása során is, ahol mind a nucleus paraventricularisban, mind a nucleus arcuatusban az sst2 receptorok idegsejtek perikaryonján és dendriteken helyezkedtek el, egyenletes eloszlásban a

sejtmembránon. A receptorok nem specifikusan szinaptikus vagy periszinaptikus elhelyezkedésűek, ennek megfelelően szomatosztatinerg idegvégződésekkel szemben, a posztszinaptikus membránon sst2 receptor nem volt megfigyelhető.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy az sst2 receptor endogén ligandja az extracelluláris térben diffundálva és nem közvetlenül szinaptikusan éri el a receptorokat. Mivel az sst2 receptor specifikusan periszinaptikus vagy/és szinaptikus elhelyezkedését vizsgálataink nem támasztották alá, ezért az sst2 és AMPA receptorok egymáshoz viszonyított térbeli elhelyezkedésének szubcelluláris szintű vizsgálatára már nem került sor.

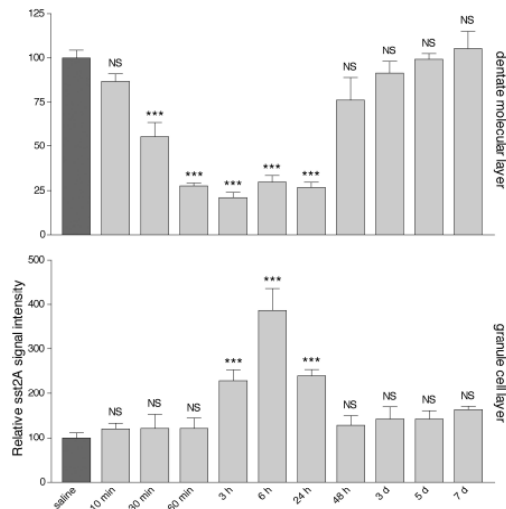
3. Az sst2 receptor sejten belüli mozgásainak vizsgálata a hippocampusban

Korábbi kísérleteinkben tanulmányoztuk az sst2 receptor agonista oktreotid szubkrónikus hatását (órák – napok) patkány hippocampusban *in vivo*. Konfokális és elektronmikroszkópos immunhisztokémiával és szemikvantitatív PCR-rel vizsgáltuk a receptor lokalizációjának és expressziójának változásait az agonista hippocampalis beadását követően, 10 perctől 7 napig terjedő idő intervallumban. Kontroll állatokban az sst2 receptor a pyramis- és szemcsesejtek felszínén, továbbá a CA1 stratum radiatumában és oriensében és a gyrus dentatus molekuláris rétegében fősejtek dendritjein volt található. Agonista hatására a szemcse- és pyramissejtek sejttesteiben és dendritjeiben az sst2 receptorok internalizációja következett be, majd a receptorok a sejttestben halmozódtak fel. Két nappal az agonista beadását követően a receptorok újból megjelentek a dendritek plazmamembránján, feltételezésünk szerint a intracelluláris vezikulákból történő recirkuláció eredményeképpen, mivel a receptor szintézisében nem volt megfigyelhető változás.

Az OTKA pályázat keretében egyes korábban elvégzett kísérletek kvantitatív elemzésén és statisztikai analízisén dolgoztam, valamint további vizsgálatokat végeztem a receptor sejten belüli mozgásainak pontosabb feltérképezése érdekében.

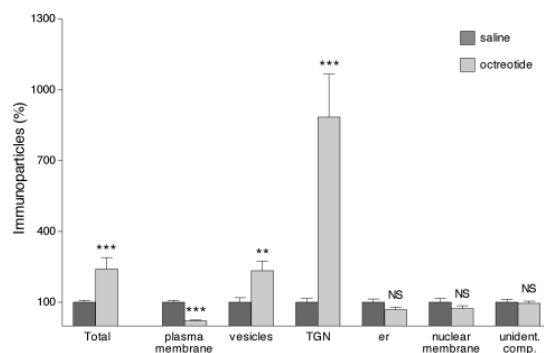
Az sst2 receptor immunhisztokémia konfokális mikroszkóppal történő vizsgálata és az ehhez kapcsolódó kvantifikáció során megállapítottuk, hogy a sst2 receptor immunfluoreszcencia intenzitásának szignifikáns csökkenése következik be a gyrus dentatus molekuláris rétegében 30 perccel (-45%, $P < 0.001$), 60 perccel (-72%, $P < 0.001$), 3 órával (-79%, $P < 0.001$), 6 órával (-70%, $P < 0.001$) és 24 órával (-72%, $P <$

0.001) az agonista beadását követően és ezzel párhuzamosan az immunfluoreszcencia intenzitásának szignifikáns megnövekedését figyeltük meg 3 órával (+129%, $P < 0.001$), 6 órával (+287%, $P < 0.001$) és 24 órával (+140%, $P < 0.001$) az agonista beadását követően (2. ábra).



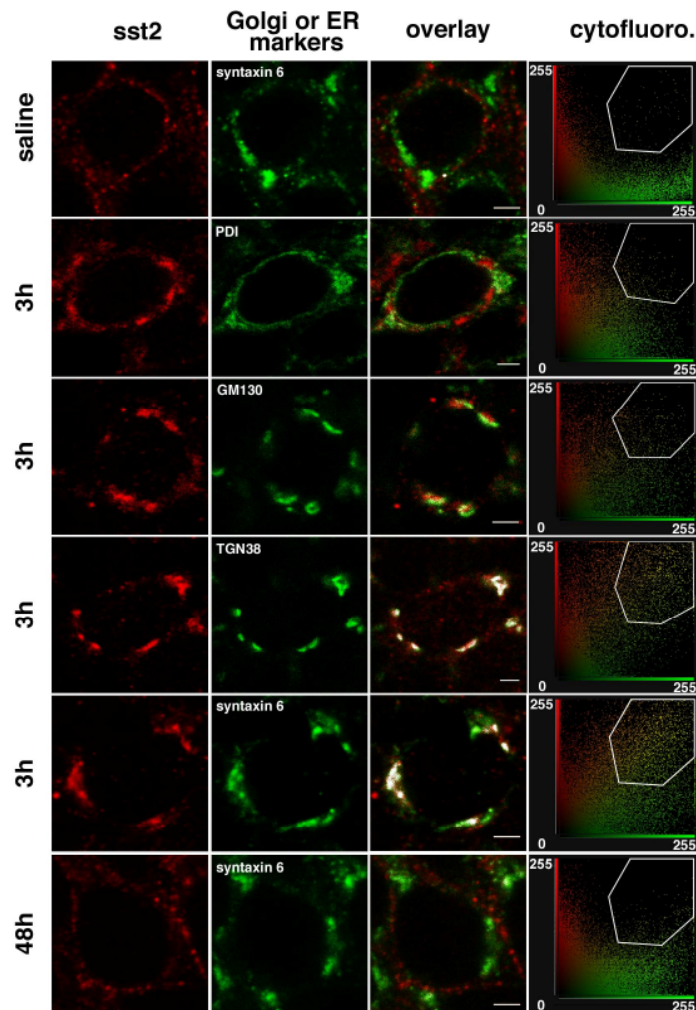
2. ábra: Az sst2 receptor immunreaktivitás denzitásának kvantitatív analízise oktreotid adását követő 10 perctől 7 napig terjedő idő intervallumban

Az sst2 receptor immuncitokémia elektronmikroszkópos kvantifikációja során megállapítottuk, hogy 3 órával az agonista beadását követően az sst2 receptor-pozitív immunszemcsék száma a szemcsesejtek perikaryonjában szignifikáns mértékben emelkedett (+140%, $P < 0.001$). Jelentős átrendeződést figyeltünk meg az sst2 receptor szubcelluláris eloszlásában is; a receptor denzitása a plazmamembránon szignifikáns mértékben csökkent (-78%, $P < 0.0001$), míg szignifikáns mértékben emelkedett a Golgi apparátusban (+785%, $P < 0.001$) és endoszómákban (+134%, $P < 0.01$). Ezzel szemben az endoplazmás retikulumban a receptorok száma nem változott (3. ábra).



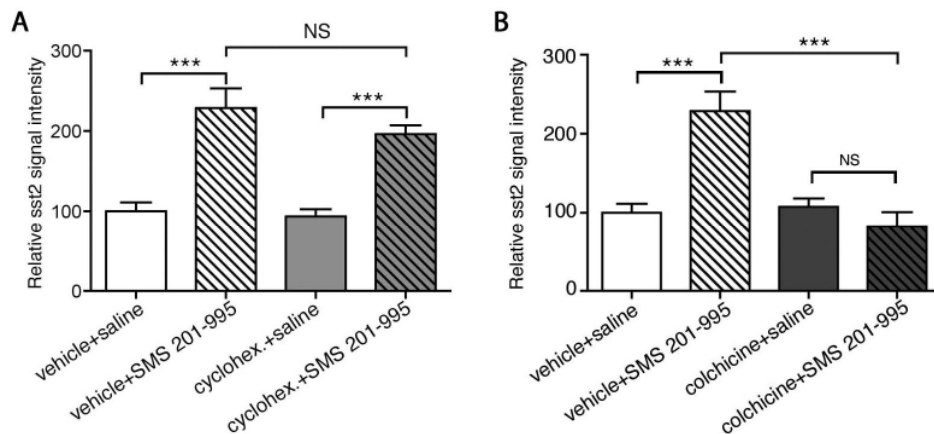
3. ábra: Az sst2 receptor szubcelluláris eloszlásának kvantitatív analízise 3 órával oktreotid beadását követően

Kettős immunfluoreszcens jelölések konfokális mikroszkópos vizsgálatával az sst2 receptor és különböző szubcelluláris markerek kolokalizációját elemeztük. Ezen vizsgálatok során megállapítottuk, hogy az agonista beadását követően az sst2 receptor kolokalizációt mutat a syntaxin 6 és TGN38 *transz*-Golgi hálózat markereivel, ezzel szemben a *cis*-Golgi marker GM130-vel és az endoplazmás retikulum marker PDI-vel nem kolokalizál (4. ábra).



4. ábra: Az sst2 receptor és szubcelluláris markerek eloszlásának konfokális mikroszkópos analízise oktreotid beadását követően

Kvalitatív és kvantitatív vizsgálatokkal megállapítottuk továbbá, hogy az sst2 receptor agonista hatására bekövetkező sejten belüli felhalmozódására a fehérjeszintézis inhibitor cikloheximid nincs hatással (5A. ábra), míg a mikrotubulusok dezorganizációját okozó kolchicin meggátolta azt (5B. ábra).



5. ábra: Az sst2 receptor immunreaktivitás denzitásának kvantitatív analízise cikloheximid (A) és kolchicin (B) kezelést követően

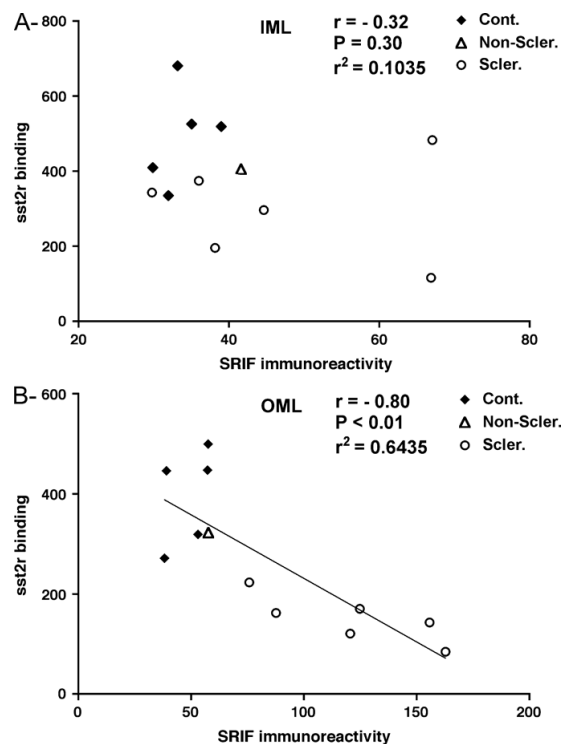
Eredményeinkből azt a következtetést vontuk le, hogy agonista hatására a hippocampus pyramis- és szemcsesejtjeinek dendritjein elhelyezkedő receptorok retrográd úton, mikrotubulus-dependens transzporttal a sejttestbe jutnak, ott a *transz*-Golgi hálózatban és a közelében elhelyezkedő vezikulákban tárolódnak, majd visszakerülnek a dendritek sejtmembránjára.

4. Krónikus szomatosztatin felszabadulás hatása az sst2 receptor expressziójára a humán hippocampusban

Korábban megkezdett vizsgálatainkban tanulmányoztuk a szomatosztatin és a szomatosztatin receptorok eloszlását humán hippocampusban, és a szomatosztatinerg neurotranszmisszió plasztikus változásait temporális lebeny epilepsziában (TLE). Vizsgálatainkat autopsiás kontroll hippocampuson, továbbá hippocampalis sclerosissal járó (HS) és hippocampalis sclerosissal nem járó (NHS) temporális lebeny epilepsziás betegekből származó hippocampuson végeztük.

Az OTKA pályázat keretében a szomatosztatin-immunreaktív idegrostok és az sst2 receptor autoradiográfiás ligand-kötőhelyeinek kvantitatív elemzését végeztem el a gyrus dentatus molekuláris rétegének belső illetve külső részében. Kimutattuk, hogy a szomatosztatin immunreaktivitás denzitása a stratum moleculare belső és külső részében nem különbözik szignifikáns mértékben az NHS-TLE betegeknél a kontrollokhoz képest. Ezzel szemben a HS-TLE betegek gyrus dentatusában a szomatosztatin immunreaktivitás denzitása szignifikánsan növekedett a stratum moleculare külső részében a kontrollokéhoz képest (+148%, $P < 0.01$), míg nem

változott a molekuláris réteg belső részében. Az autoradiográfiás sst2 receptor típusú kötőhelyek denzitása a gyrus dentatus molekuláris rétegében nem változott szignifikáns mértékben az NHS-TLE betegekben a kontrollokhöz képest. Ezzel szemben a HS-TLE betegekben az autoradiográfiás sst2 receptor típusú kötőhelyek denzitása szignifikáns mértékben csökkent a gyrus dentatus molekuláris rétegének külső részében a kontrollokhöz képest (-54%; $P < 0.001$), de nem változott a molekuláris réteg belső részében. A szomatosztatin immunreaktivitás és az autoradiográfiás sst2 receptor típusú ligand-kötőhelyek denzitásainak korrelációs analízise autopsiás kontroll, NHS-TLE és HS-TLE mintákban szignifikáns negatív korrelációt mutatott ki a gyrus dentatus molekuláris rétegének külső részében (Pearson $r = -0.80$; $P < 0.01$), de nem a belső részében (Pearson $r = -0.32$; $P = 0.30$) (6. ábra).



6. ábra: Szomatosztatin immunreaktivitás és sst2 receptor kötőhelyek denzitásának korrelációs analízise a gyrus dentatus molekuláris rétegének belső (A) és külső (B) részében temporális lebeny epilepsziában

Ezen kvantitatív vizsgálatok alátámasztották korábbi kvalitatív megfigyeléseinket, és arra utalnak, hogy a HS-TLE betegek gyrus dentatusában a szomatosztatinerg idegrostok hipertrófiájának megfelelően, feltételezésünk szerint a krónikusan megnövekedett szomatosztatin felszabadulás hatására a szomatosztatin sst2 típusú receptorának helyi down-regulációja következik be.