

Állatorvostudományi Egyetem
Biológiai Intézet

Az asztroglia heterogenitásának vizsgálata a
humán agykéregben és nucleus caudatusban

Készítette: Hoppa Paulina

Témavezető: Dr. Adorján István
tudományos munkatárs

Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Semmelweis Egyetem

Belső konzulens: Puska Gina

Budapest, 2021

Tartalomjegyzék

Rövidítések listája.....	3
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	4
1.2 Az asztrogliá sejtök általános jellemzése	4
1.3 A neuron-gliá kapcsolat.....	4
1.4 A humán agyban található asztrogliá típusok.....	6
1.5 Az asztrogliá terület.....	8
1.6 Az asztrogliá markerei.....	8
1.6.1 GFAP.....	8
1.6.2 ALDH1L1	9
1.7 A nagyagykéreg.....	9
1.7.1 A dorzolatális prefrontális kortex.....	10
1.8 A nagyagy kéreg alatti területei.....	10
1.8.1 Nucleus caudatus	10
2. Célkitűzéseink.....	11
3.Módszertan.....	11
3.1A vizsgált alanyok	11
3.2 A metszetek immunhisztokémiai festése.....	11
3.3 Sejtszámlálás	12
3.4 Kiértékelés, statisztikai elemzés	13
4. Eredmények	14
4.1 A GFAP+ és ALDH1L1+ gliapopulációk denzitásának összehasonlítása a DLPFC és NC-on belül	14
4.2 A GFAP és ALDH1L1 immunpozitív gliapopulációk denzitásának összehasonlítása a DLPFC és NC között.....	15
4.3 Az asztrogliá populációk rétegenkénti eloszlása a DLPFC-ben	16
4.3 A GFAP és ALDH1L1 immunpozitív sejtek denzitásának aránya a DLPFC rétegeiben ...	18
4.4 Az eltérő asztrogliá populációk denzitásainak összehasonlítása a NC dorzális és ventrális régiói között.....	19
5. Diskusszió	26
6. Összefoglalás	29
7. Summary	30
8.Hivatkozáslista.....	31
9. Köszönetnyilvánítás.....	37
9. Melléklet	42

Rövidítések listája

ALDH1L1	-	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1
ASD	-	autizmus spektrum zavar
BA9	-	Brodmann area 9
Cx43	-	connexin 43
DAB	-	3,3-diaminobenzidin
DLPFC	-	dorzolaterális prefrontális kortex
GABA	-	gamma-amino-vajsav
GFAP	-	gliális fibrilláris savas fehérje
NC	-	nucleus caudatus
NMDA	-	N-metil-D-aszpartát
PBS	-	„phosphate buffer saline”, foszfátpufferes sóoldat
SCH	-	skizofrénia
TBST	-	Tris-EDTA sóoldat Triton 100X detergenssel

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

Az asztroglia sejtek és a neuronok közel azonos arányban fordulnak elő az emberi agykéregben, azonban a neuron populációkkal szemben az asztroglia sejtekről relatíve kevés információval rendelkezünk (*Morgan és mtsai, 2014*). A legújabb irodalmi adatok azt mutatják, hogy a humán agyban található asztroglia sejtek heterogenitása a korábban gondoltnál nagyobb mértékű, és a sejtek morfológiája és funkciója egy agyterületen belül is nagyon különböző lehet (*Hodge és mtsai, 2019, Zhang és mtsai, 2020*). Ennek ismeretében az egymás mellett található, de eltérő funkcióval rendelkező asztroglia populációk különböző módon reagálhatnak az idegrendszerre érő káros hatásokra (*O'Leary és mtsai, 2020*), ami fontos szerepet tölthet be az olyan neuropszichiátriai betegségek patomechanizmusában, mint a skizofrénia (SCH) és az autizmus spektrum zavar (ASD) (*Bernstein és mtsai, 2015, Morgan és mtsai, 2014*). A jelen dolgozat címében egy olyan hosszabb távú kísérletsorozat első része, amely az asztroglia heterogenitását a neuropszichiátriai betegségek kontextusában vizsgálja.

1.2 Az asztroglia sejtek általános jellemzése

Az asztroglia sejtek csillag alakú kiterjedt nyúlványrendszerrel rendelkező sejtek, amelyek a központi idegrendszer legnépesebb glia populációját alkotják (*Matias és mtsai, 2019*). Elnevezésük az ógörög *ástron*, „csillag” szóból ered és morfológiájukra utal. Nyúlványaikkal képesek szinapszisokhoz, vérerekhez és más gliasejtekhez kapcsolódni, valamint az endothel sejtekkel kialakított kapcsolat segítségével részt vesznek a vér-agy gát formálásában (*Kettenman és Ransom, 2014*). Az asztroglia sejtek felelősek a neuronok metabolizmusának támogatásáért. Olyan, a neuronhálózatok működéséhez szükséges metabolitokkal látják el őket, mint a glükóz és a laktát, valamint trófikus faktorokat bocsátanak ki (*Clarke és Barres, 2013*). Az asztroglia sejtek fontos szerepet töltenek be a kéri mikrokörnyezet fenntartásában, ionok felvételével és leadásával szabályozzák az agyi homeosztázist, és fenntartják az extracelluláris pH szintet.

1.3 A neuron-glia kapcsolat

A központi idegrendszerben található szinapszisok legalább felét periszinaptikus asztroglia membrán borítja, amely az asztroglia periférikus nyúlványainak meghosszabbítása (*Verkhratsky és Nedergaard, 2018*). Egyes hipotézisek szerint az asztroglia nyúlványok egyfajta „bölcsőt” képeznek a szinapszis körül, amely segítségével elkülönítik ezeket a környezettől, és specifikusan képesek befolyásolni a neurotranszmitterek és ionok homeosztázisát a szinaptikus résben, elősegítve ezzel a jelátvitelt (*Matias és mtsai, 2019*).

Az asztroglia sejtek képesek a szinaptikus részből a glutamát felvételére, elkerülve ezzel a magas extracelluláris glutamát szintet, ami excitotoxicitást okozhat (Magi és mtsai, 2019). A glutamát az asztrogliaiban glutamin-szintetáz segítségével glutaminná alakul. Ezután egy glutamin transzporterrel keresztül a glutamin visszakerül az idegsejtbe és ismét glutamáttá alakul, és újra felhasználhatóvá válik jelátviteli molekulaként (Magi és mtsai, 2019). Az asztrocita-neuron laktát sönt hipotézis szerint az asztrogliaiban a felvett glutamát stimulálja a glükózfelvételt az erekből, és a glükóz laktáttá történő átalakítását (Falkowska és mtsai, 2015). A laktátot az asztroglia tápanyagként továbbítja a neuronnak egy monokarboxilát transzporterrel keresztül. A neuronok aktivitása tehát nagyban függ a tápanyag ellátottságuktól, és ez az aktivitás is stimulálja az asztroglia által biztosított ellátást (Pellerin és mtsai, 2007).

A legújabb szakirodalmi adatok szerint a neuronok mellett az asztroglia is ingerelhető és képesek a Ca^{2+} hullámok továbbítására a szomszédos asztroglia sejtek felé a Cx43 (connexin 43) gap junction csatornákon keresztül (De Bock és mtsai, 2017). Ezek a Ca^{2+} hullámok sokkal lassabban terjednek, és tovább tartanak, mint az idegsejtek akciós potenciálja (Oberheim és mtsai, 2009). Az asztroglia Ca^{2+} jel hatására gliotranszmittereket bocsát ki. Ezek közé tartozik a glutamát, a D-serin, a GABA és az ATP (Volterra és Meldolesi, 2005).

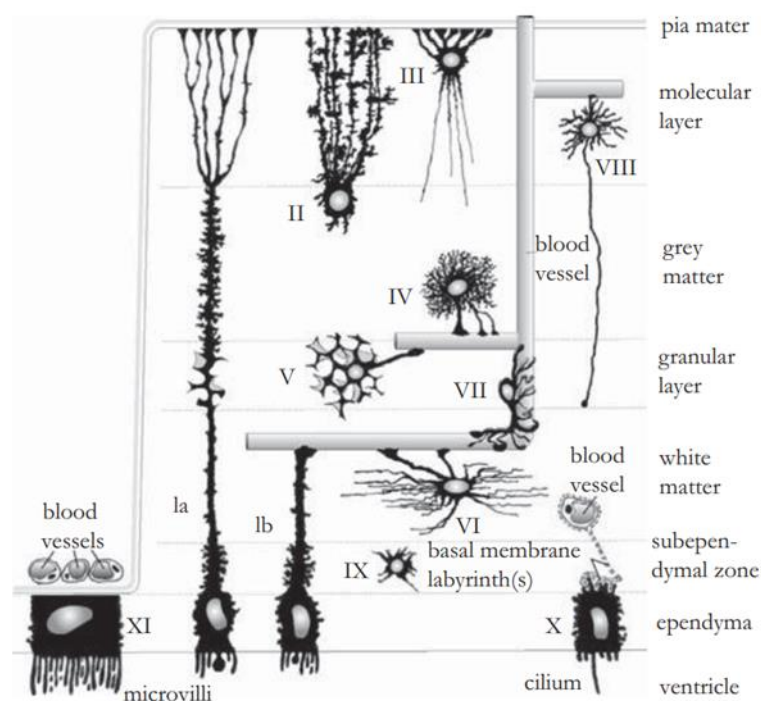
Az asztroglia az intracelluláris Ca^{2+} szint növekedésének hatására glutamátot bocsát ki, amely aktiválja a környező piramis sejtek NMDA (N-metil-D-aszpartát) receptorait (Hamilton és mtsai, 2010). Ez befelé tartó Ca^{2+} áramlást eredményez, ami növeli a neuronok ingerelhetőségét (Hamilton és mtsai, 2010). A D-serin képes ligandként a neuronok NMDA (GluN1, GluN2C, GluN2D, GluN3) receptoraihoz kötődni, és elősegíti azok aktiválását a glutamát kibocsátásakor (Yang és mtsai, 2003). Az asztroglia a GABA gliotranszmitter kibocsátásával képes tónusos gátlást okozni, ami csökkenti a neuronok ingerelhetőségét (Kettenman és Ransom, 2014). Az ATP (amelyet az extracelluláris térben az ATP-áz enzimek adenozinná alakítanak át) a neuronok preszinaptikus receptorainak aktiválásával serkenti a szinaptikus vezikulumok kibocsátását. Az asztroglia sejtek az idegsejtek működésének ilyenfajta szabályozásával képesek GABA-erg, kolinerg és dopaminerg pályákra hatni (Farhy-Tselnicker és Allen, 2018). A gliotranszmitterek hatnak az erek falában található simaizomra is, amely által befolyásolják az agyi vérkeringést. (Bazargani és Attwell, 2016)

A központi idegrendszer érző sérülés esetén az asztroglia sejtek reagálnak az idegszövetet ért ártalomra (pl.: fizikai, kémiai, iszkémiás) (Kálmán, 2004). A reaktív asztrogliózis során nő a GFAP, a vimentin és a nestin termelődése (Kálmán, 2004). A súlyos sérülések esetében fellépő asztrogliózis hipertrófiával és gyulladással jár együtt (Sofroniew, 2009).

Ennek következményeként az egymással szomszédos asztroglia sejtek nyúlványrendszerei átfedővé válnak (Sofroniew, 2009). Ezeknek a hatásoknak a következtében a sérült területen szöveti átrendeződés megy végbe, és glia- hegszövet alakul ki (Kálmán, 2004).

1.4 A humán agyban található asztroglia típusok

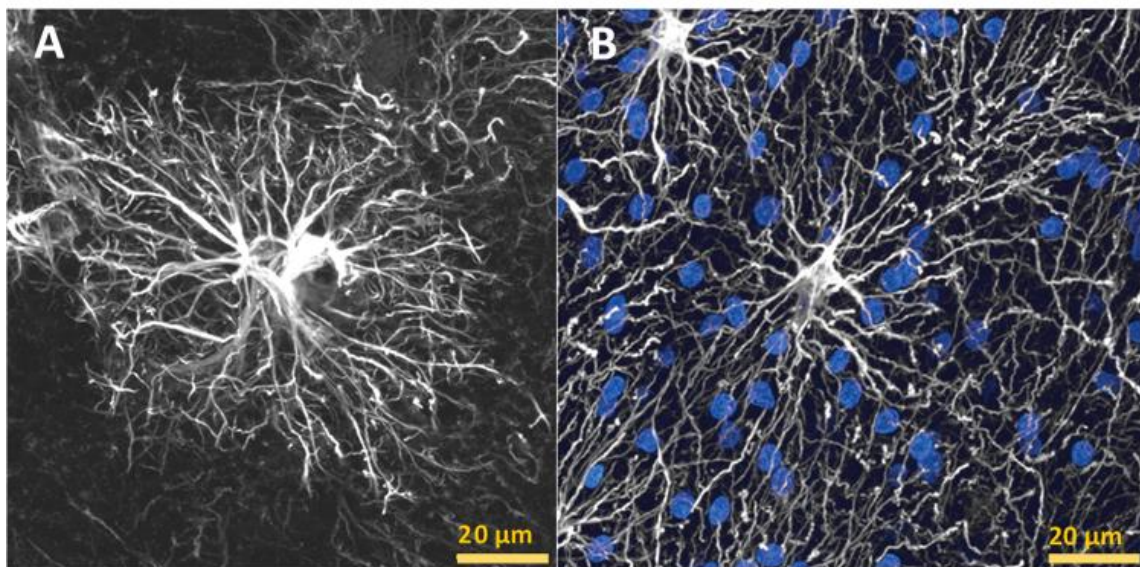
A humán agyban számos asztroglia típus különíthető el (1.ábra), ezek közé tartozik a Bergmann glia, a Müller glia, a tanycita (piális és vaszkuláris), a marginális asztroglia, a vitorlás assztroglia, a protoplazmás asztroglia, a fibrózus asztroglia, az interlamináris asztroglia és a perivaszkuláris asztroglia (Kettenman és Ransom, 2014). Az általánosan elfogadott nézet szerint az agykéregben található két fő asztroglia típus a szürkeállományban lévő protoplazmás asztroglia, valamint a fehérállományban található fibrózus asztroglia (Kettenman és Ransom, 2014).



1. ábra - A fő asztroglia típusok, és a központi idegrendszerben való elhelyezkedésük sematikus ábrája I, tanycita (a, piális; b, vaszkuláris); II, radiális asztroglia (Bergmann glia); III, marginális asztroglia IV, protoplazmás asztroglia; V, velate asztroglia; VI, fibrózus asztroglia; VII, perivaszkuláris asztroglia; VIII, interlamináris asztroglia; IX, glioblasztóma; X, ependymocita; XI choroid plexus sejt. (Kettenman és Ransom, 2014)

A protoplazmás asztroglia sejtek (2. ábra, A) jellemzően az agykéreg második és hatodik rétege között fordulnak elő. A humánban előforduló protoplazmás asztroglia sejtek a rágcsálók és a főemlősök agykérgében találhatóéhoz képest nagyobb sejttesttel, kiterjedtebb és komplexebb nyúlványrendszerrel rendelkeznek (Oberheim és mtsai, 2009). Ugyanezen csoport eredményei szerint a humán agykéreg protoplazmás asztroglia populációjának egy része gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) immunpozitív.

A fibrózus, vagy más néven rostos asztroglia sejtek (2. ábra, B) csak az agy fehérállományában fordulnak elő, és elsősorban a neuronok axonjaival (Allen és Barres, 2009), és az érrendszerrel állnak kapcsolatban (Oberheim és mtsai, 2009).



2. ábra – GFAP+ protoplazmás asztroglia (A) és fibrózus asztroglia (B) a humán agykéregben, skála 20 µm, a felvételek konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készültek. (Oberheim és mtsai, 2009)

Az agykéregben ezen kívül három GFAP+ immunpozitív asztroglia típus található meg, az interlamináris, a polarizált és a marginális asztroglia (Colombo és mtsai, 1995, Oberheim és mtsai, 2009, Kettenman és Ransom, 2014).

A GFAP+ interlamináris asztroglia sejtek sejttestei az első rétegben helyezkednek el, hosszú nyúlványaik pedig a második és negyedik réteg között végződnek (Colombo és mtsai, 1995). Ez az asztroglia típus rágcsálókban nem található meg.

A marginális asztroglia sejtestjei közvetlenül a piális réteg alatt helyezkednek el, és egy határréteget alkotnak a pia mater alatt (membrana limitans gliae externa). Az interlamináris asztrogliahoz hasonlóan hosszú nyúlványok ágaznak ki belőlük a neuropilbe (*Kettenman és Ransom, 2014*).

A polarizált asztroglia sejteket (angol nevükön varicose projection astrocytes) először 2009-ben írták le a humán és a csimpánz agykéregben (*Oberheim és mtsai, 2009*). Ezek a tüskeszerű, milliméteres nagyságrendű nyúlványokkal rendelkező asztroglia sejtek az ötödik és a hatodik kortikális rétegben helyezkednek el, és nyúlványaikon 10 μm -ként varikozitások találhatók (*Oberheim és mtsai, 2009*). A polarizált asztroglia sejtek funkciója egyelőre nem ismert, de hosszú nyúlványrendszerük fontos szerepet tölthet be a kortikális rétegek, vagy akár a szürke és fehérállomány közötti kommunikációban (*Oberheim és mtsai, 2009*).

1.5 Az asztroglia territórium

A humán agykéregben található asztroglia sejtek nyúlványrendszerei egy közel azonos nagyságú, nem átfedő területet fednek le, amelyeket asztroglia territóriumoknak nevezünk (*Bushong és mtsai, 2002*). Ennek a territóriumnak az átlagos átmérője a humán agyban $142.6 \pm 5.8 \mu\text{m}$ (*Oberheim és mtsai, 2009*). Ez a territórium a posztnatális fejlődés 3-4. hete között éri el végleges méretét (*Freeman, 2010*). A szomszédos sejtek nyúlványrendszerei a fejlődés korábbi szakaszában még átfedő módon helyezkednek el (*Freeman, 2010*). Az még nem tisztázott, hogy a territórium előre determinált-e. Egyes feltételezések szerint az asztroglia territórium egyfajta „szinaptikus szigetként” működik, amelyen belül egy adott asztroglia sejt kizárólagosan hat a szinapszisok működésére (*Halassa és mtsai, 2007*).

1.6 Az asztroglia markerei

A sejtípusokkal foglalkozó idegtudomány (cellular neuroscience) egyik legalapvetőbb törekvése, hogy az agyszövet neuron és asztroglia populációit specifikus markerek segítségével elkülöníteni, vizsgálni lehessen. Az újabb és újabb markerek felfedezése a mai napig az agykutatás és ezen belül a gliakutatás szerves részét képezi, amelyet nagyban elősegít a molekuláris biológiai módszerek (úm. egysejtszintű RNS szekvenálás) fejlődése.

1.6.1 GFAP

A GFAP (gliális fibrilláris savas fehérje) a leggyakrabban használt asztroglia specifikus marker, amely egy III. típusú intermediér filamentum fehérje, és szorosan kapcsolódik más, a sejt citoszkeletonját alkotó fehérjéhez, például a dezminhez és a vimentinhez.

A GFAP-t 1971-ben írták le, mint asztrogliá specifikus markert (*Eng és mtsai, 1971*). Ezután immunhisztokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatokkal is megerősítették a GFAP asztrogliá specifikus lokalizációját (*Bignami és Dahl 1977, Mucke és mtsai, 1991*). A GFAP termelése és a GFAP+ asztrogliá fontos szerepet tölt be a reaktív asztroglíózisban, így használata igen elterjedté vált a neuropatológiai diagnosztikában (*Preston és mtsai, 2019*).

In vivo és vitro kísérletek során kimutatták, hogy a GFAP expresszió csökkenése hibához vezet a szinapszisok működésében (*Kettenman és Ransom, 2014*). A GFAP elsősorban a sejtek citoszkeletonjában és nyúlványrendszerében fordul elő, így feltételezhető, hogy hiányában nem alakul ki megfelelő mennyiségű asztrogliá nyúlvány, ami a normális funkcióhoz lenne szükséges. (*McCall és mtsai, 1996, Shibuki és mtsai, 1996*).

1.6.2 ALDH1L1

Az ALDH1L1 (aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1) a GFAP-hoz hasonlóan asztrogliá specifikus marker (*Cahoy és mtsai, 2008*), azonban még nem terjedt el a neuropatológiai diagnosztikában. Az aldehid-dehidrogenáz egy enzim, amely fontos szerepet tölt be a folsav metabolizmusában. A GFAP-val ellentétben nem a citoszkeletont, hanem a sejttestet és a fő nyúlványokat jelöli (*Srinivasan és mtsai, 2016*). Az ALDH1L1 előfordul a humán agykéreg protoplazmás asztrocitáiban, azonban a fibrózus asztroglíát nem jelöli (*Waller és mtsai, 2016*). Rágcsálókból származó adatok alapján az ALDH1L1 expressziója nagyobb asztrogliá populációt érint, mint a GFAP (*Cahoy és mtsai, 2008*).

1.7 A nagyagykéreg

A nagyagykéreg, más néven a neocortex, a telencephalon felszíne alatt elhelyezkedő 2-3 mm vastag idegszövet, amelyet az agy legfiatalabb területének is szoktak nevezni. A régió evolúciós eredete kb. 220 millió évvel ezelőtre vezethető vissza (*O'Leary és mtsai, 2013*). Az emlősök evolúciója során jelentősen kiterjedt, elsősorban az emberszabású majmokban (*Florio és Huttner, 2014*). Az emberi neocortex az agy teljes tömegének körülbelül egyharmadát teszi ki, és 16 milliárd idegsejtet tartalmaz (*Azevedo és mtsai, 2009*). A kéreg hat rétegre tagolódik, alapegysége pedig a kis agykérgi oszlop, egy függőleges irányú henger alakú agykérgi modul (*Réthelyi és mtsai, 2006*). A legújabb szakirodalmi adatok azt mutatják, hogy az asztroglíasejtek a neuronokhoz hasonlóan réteges mintázatban helyezkednek el (*Lanjakornsiripan és mtsai, 2018*).

A neocortex számos különböző funkciót ellátó régióra tagolódik, kutatásunk ezeken belül elsősorban a dorzolaterális prefrontális kortexre irányult, amely bizonyítottan érintett az általunk vizsgált neuropszichiátriai betegségekben (SCH: *Hirao és mtsai, 2008*, ASD: *Fujii és mtsai, 2010*).

1.7.1 A dorzolaterális prefrontális kortex

A dorzolaterális prefrontális kortex (DLPFC) egy funkcionálisan elkülönülő terület. Anatómiailag a gyrus frontalis medius, a gyrus frontalis superior és a gyrus frontalis inferior laterális részén helyezkedik el. A kortex egyes területeit általában Brodmann-mezők szerint lokalizáljuk. Brodmann az agykérget citoarchitektonikai vizsgálatok alapján 47 areára (mezőre) osztotta fel (*Brodmann, 1909*), amelyek között később funkcionális különbségeket is kimutattak (*Tsuchida és Fellows, 2009*). A DLPFC magában foglalja a Brodmann area 8, 9, 10 és 46-ot, amelyek közül kutatásunk a 9-es area (BA9) területére irányult.

A DLPFC összeköttetésben áll a dorzális kognitív pályarendszerrel (*Réthelyi és mtsai, 2006*) és szorosan kapcsolódik a thalamushoz, a hippocampushoz és a törzsdúcokhoz. Korábbi kutatásokban kimutatták, hogy a BA9 a SCH-ban (*Hirao és mtsai, 2008, Choi és mtsai, 2008, Potkin és mtsai, 2009*) és az ASD-ben (*Fujii és mtsai, 2010, Hashemi és mtsai, 2017*) leginkább érintett agyterületek közé tartozik, ezért fókuszáltunk kutatásunkban erre a régióra.

1.8 A nagyagy kéreg alatti területei

A neokortikális eredetű, de kéreg alatt elhelyezkedő területek (úm., nucleus caudatus, putamen, amygdala stb.) asztroglia szerkezetéről még kevesebb adat áll rendelkezésünkre, mint a nagyagykéreg esetén.

1.8.1 Nucleus caudatus

A farkos mag (nucleus caudatus) egy közepes méretű tövises neuronokból, és interneuronokból álló kéreg alatti magcsoport, amely a putamennel együtt a striatum részét képezi, és corticostriatalis pályák útján kapcsolatban áll a premotoros kéreggel és a DLPFC-vel (*Williams, 2016*). A nucleus caudatus a motivációt, a tervezést és egyéb fontos kognitív funkciókat irányító pályarendszer részét képezi és kapcsolatban van a dopaminerg rendszerrel is. A dopaminerg, és egyéb neuronok működési zavara több neuropszichiátriai betegségben (skizofrénia, autizmus) is kimutatható (*Slifstein és mtsai, 2015*). Érdekes kérdés, hogy a neuronok károsodása vonja-e maga után az asztroglia működési zavarát vagy az asztroglia hibás működése okozza-e a neuronok károsodását.

2. Célkitűzéseink

Kutatásunk célja a humán agy szürkeállományában található asztroglia populációk pontos topográfiai leírása és előfordulásuk denzitáértékekkel történő jellemzése volt. Ez a munkaegy olyan hosszabb távú kísérletsorozat első része, amely az asztroglia heterogenitását a neuropszichiátriai betegségek (úm. skizofrénia és autizmus spektrum zavar) kontextusában vizsgálja.

A dolgozatban megválaszolandó főbb kérdéseink:

- Van-e különbség a GFAP+ és az ALDH1L1+ asztroglia denzitása és topográfiai elhelyezkedése között a DLPFC-ben?
- Van-e különbség a GFAP+ és az ALDH1L1+ asztroglia denzitása között a nucleus caudatusban?
- Van-e különbség a GFAP+ és az ALDH1L1+ asztroglia sejtestestjeinek átmérőjében?

3. Módszertan

3.1 A vizsgált alanyok

A vizsgálat során hat, neuropatológiai elváltozást nem mutató alany agyszövet mintáját dolgoztuk fel, amelyek a Netherlands Brain Bankból származtak. A minták a dorzolaterális prefrontális kortexen belül a Brodmann area 9-ből (gyrus frontalis medius), és a nucleus caudatus-ból származtak. A kutatási projekt az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével folyik (45102-2/2016/EKU).

3.2 A metszetek immunhisztokémiai festése

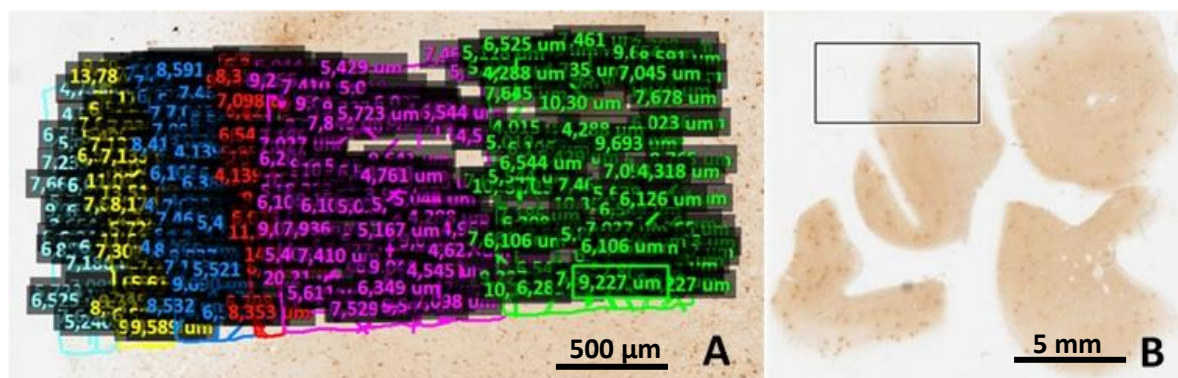
A paraffinba beágyazott agyszöveti mintákból 6 µm-es vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket szobahőmérsékleten tárgylemezre szárítottunk. A metszeteket leszálló alkoholsorban deparaffináltuk, kétszer 5 percre xilolba, majd 1-1 percre 96%-os, 70%-os és 50%-os alkoholba helyeztük ezeket. A metszeteket ezután 3%-os H₂O₂ oldatban inkubáltuk (foszfát puffer sóoldatban, pH=7.4), hogy minimalizáljuk az endogén peroxidáz aktivitást. Ezután autoklávus szövetfeltáró előkezelést alkalmaztunk, a metszeteket citrát-pufferbe helyezve (pH = 6,0) 121 °C-on 10 percig.

Az immunhisztokémiai jelöléshez anti-GFAP (nyúl, 1:500, DAKO, Z0334) és anti-ALDH1L1 (egér, 1:1000, Encor, MCA-4A12) primer antitesteket használtunk. A metszeteket a primer antitestekkel 1 óra hosszat inkubáltuk, majd TBST-s (Tris-EDTA sóoldat 0.5% Triton 100X detergenssel, pH=7.4) mosást követően torna-peroxidázhoz kapcsolt anti-nyúl/egér szekunder antitestek kerültek a metszetekre szintén 1 órára. (Envision Kit, Dako, K-5007)

A jelölések előhívása diamino-benzidinnel (DAB) történt (Envision Kit, Dako, K-5007). A DAB a torna-peroxidáz enzim szubsztrátjaként funkcionál, a reakció hatására a DAB oxidálódik és barna csapadékot képez. A DAB-reakciót 90 másodperc után desztillált vízzel állítottuk le. Ezután haematoxylin-es magfestést alkalmaztunk (20 másodpercig), majd a metszeteket felszálló alkoholsorban (a korábban használt leszálló alkoholsor hígításai, fordított sorrendben) víztelenítettük, és DePeX fedőanyaggal fedtük le őket (Thermo Scientific). Az immunhisztokémiai kísérlet során a Sequenza System (Thermo Scientific, 72110017, 73310017) tárgylemez befogóit és tartóit használtuk. Az immunhisztokémiai festések esetében negatív kontrollt is alkalmaztunk, amelyre nem került primer antitest. A negatív kontroll metszetek esetében nem tapasztaltunk pozitív immunreakciót.

3.3 Sejtszámlálás

Ezután a metszeteket digitalizáltuk metszet szkennert (Aperio ScanScope AT Turbo, Leica Biosystems) használatával. Az immunpozitív sejteket manuálisan számoltuk le az Aperio ImageScope program (Aperio, v11.2.0.780) segítségével (3. ábra). A manuális számolás 20x-os nagyításon történt, amelynek során rögzítettük a sejtest leghosszabb átmérőjét, így információt kaptunk a sejtek irányultságáról is. Ez a módszer a sejtek nagy volumenű, objektív és visszakövethető számolását tette lehetővé.



3. ábra – A) Kortikális kolumna réteg szerinti manuális annotációja a DLPCF-ben 4x-es nagyításon az Aperio ImageScope programban. B) kortikális kolumna elhelyezkedése a vizsgált metszeten, DAB immunperoxidáz festés, GFAP.

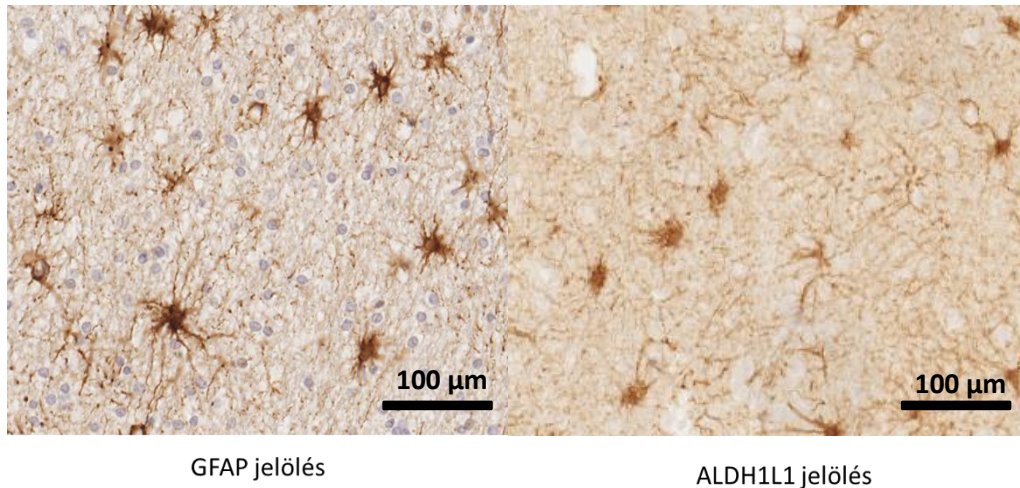
3.4 Kiértékelés, statisztikai elemzés

A vizsgált területeket topográfiaiilag elemeztük, és kiszámoltuk az asztroglia sejtek denzitását (sejtszám/terület), majd a QGIS 2.18.23 ingyenes, open source program segítségével hő térképeket készítettünk. A hő térkép készítéséhez beolvastuk az egyes jelölt sejtekhez tartozó X és Y koordinátákat, és egy metrikus koordináta rendszerben (HD72/EOV (EPSG:23700)) jelenítettük meg őket. A hő térképek létrehozásakor 70 μm -es, térkép egységekkel számoló sugarat használtunk. A hő térkép 5 kategóriára bontható színskála szerint ábrázolta a sejtek eloszlását, egy 70 μm nagyságú sugáron belül. Vagyis a szín attól függött, hogy egy adott mintavételi területen ($70^2 \times \pi = 15\,386 \mu\text{m}^2$) belül hány sejt található. A hő térkép jelmagyarázatát és a denzitásértékeket négyzetcentiméteres skálára extrapolálva, a standard deviáció feltüntetésével adtuk meg.

A dorzolaterális prefrontális kortextet rétegenként elemeztük, a nucleus caudatus-on belül pedig külön vizsgáltuk a dorzális és a ventrális régiót, hogy pontosabb képet kapjunk a magon belüli esetleges inhomogén eloszlásról. Az eredmények statisztikai értékelése az R 4.0.3 szoftverrel (ingyenes, open source) történt. A denzitásértékek és sejtátmérők normális eloszlását Kolmogorov-Smirnov próbával, és QQ-plottal ellenőriztük. A mintákat a vizsgált régió vagy a használt marker (GFAP, ALDH1L1) szerint párosítva, páros t-próbával hasonlítottuk össze. A denzitásértékek rétegenkénti összehasonlításához Tukey-próbát alkalmaztunk. Ebbe a próbába bele van építve a többszörös összehasonlításra alkalmas korrekció, ezért a p-értékeket további adjusztálására nem volt szükség (*1. melléklet*).

4. Eredmények

Vizsgálatunkban hat, neuropszichiátriai betegség nélküli (kontroll) alany agyszövet mintáját hasonlítottuk össze. Összesen 24 metszetet vizsgáltunk (12 DLPFC, 12 NC) és mintegy 105000 asztroglia sejtet számoltunk le.



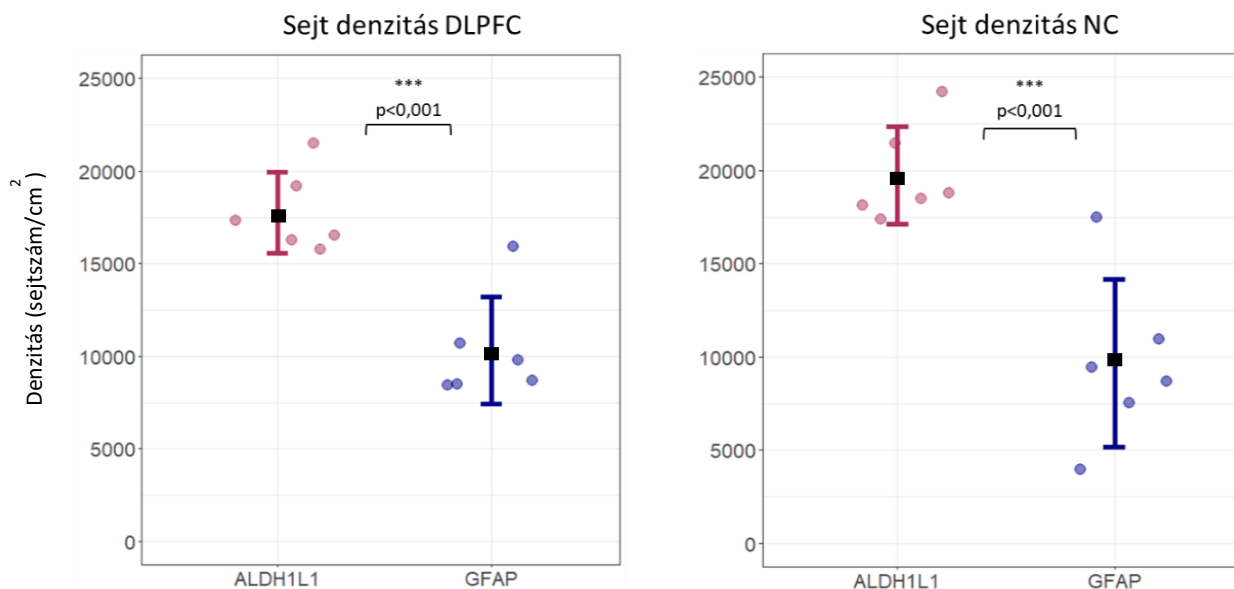
4. ábra – Asztroglia sejtek jelölése A) GFAP és B) ALDH1L1 markerrel a DLPFC-ben, 20x-os nagyításon, DAB immunperoxidáz festés

Két asztroglia specifikus markert használtunk (GFAP, ALDH1L1) és az immunpozitív sejtek topográfiai elhelyezkedését és leghosszabb átmérőjét is regisztráltuk. Ezek alapján számoltuk ki az egyes agyterületekre jellemző sejtdenzitást. A DLPFC esetén a rétegszerinti denzitást, a NC esetén a dorzális és ventrális régiók denzitását vizsgáltuk. Ezeket az értékeket statisztikailag hasonlítottuk össze az egyes agyterületeken belül, és az agyterületek között is. A sejtpopulációk topográfiai elhelyezkedéséről hő térképek készültek (17. ábra), amelyekről leolvasható az egyes populációk rétegenkénti elhelyezkedése.

4.1 A GFAP+ és ALDH1L1+ gliapopulációk denzitásának összehasonlítása a DLPFC és NC-on belül

A dorzolaterális prefrontális kortexben a GFAP immunpozitív sejtek denzitásának átlaga $8853 \pm 2881,63$ sejt/cm² volt, az ALDH1L1 pozitív sejtek denzitásának átlaga pedig $17757 \pm 2194,11$ sejt/cm². A nucleus caudatus-ban a GFAP immunpozitív sejtek denzitásának átlaga $8296 \pm 2600,01$ sejt/cm² volt, az ALDH1L1 immunpozitív sejtek denzitásának átlaga pedig $20205 \text{ sejt/cm}^2 \pm 4491,86$.

A GFAP immunpozítív és az ALDH1L1 immunpozítív sejtek denzitása a DLPFC-ben ($p < 0,001$) és a NC-ben ($p < 0,01$) is szignifikánsan különbözött (2. ábra). Az ALDH1L1 immunpozítív sejtek denzitása mind a két vizsgált területen kétszer akkora volt, mint a GFAP immunpozítív sejtek denzitása.

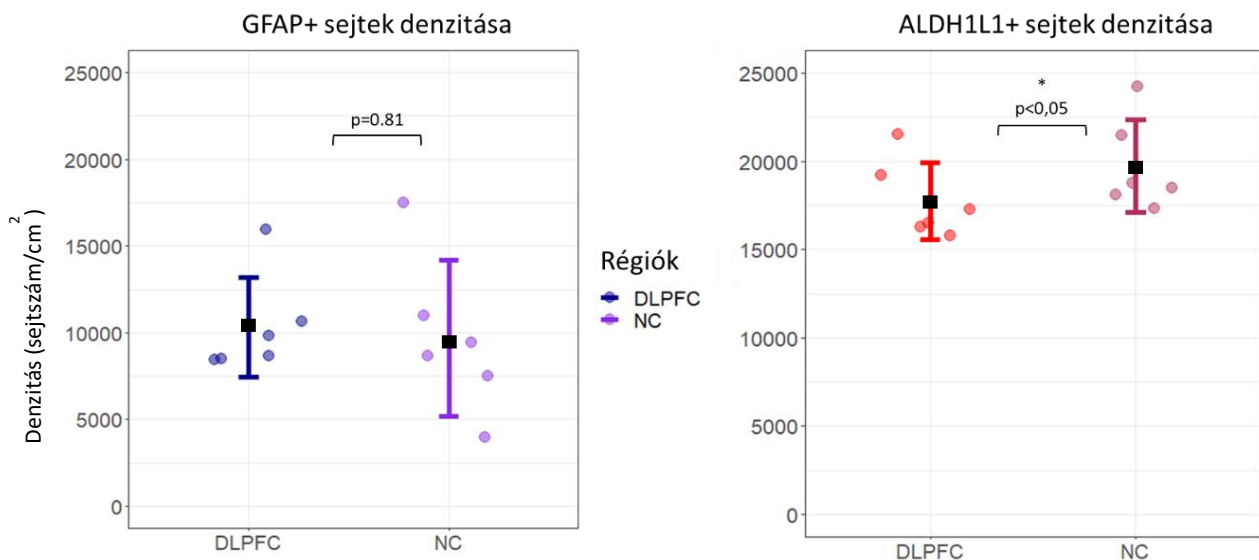


5. ábra – A GFAP+ és ALDH1L1+ sejtek denzitásának összehasonlítása a DLPFC-ben és a NC-ben.

Az adatok átlagát fekete négyzettel, az SD-t vertikális vonallal jelöltük. Az immunpozítív sejtek denzitása mind a két területen statisztikailag szignifikánsan különbözött ($p < 0,001$).

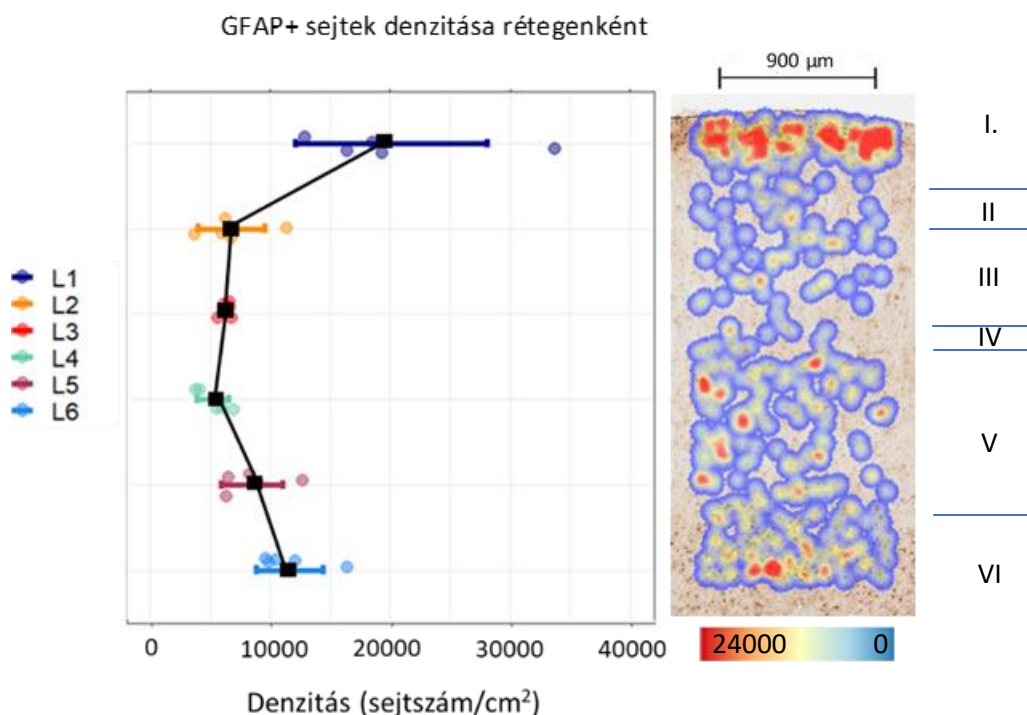
4.2 A GFAP és ALDH1L1 immunpozítív gliapopulációk denzitásának összehasonlítása a DLPFC és NC között

Arra is szerettünk volna választ kapni, hogy van-e statisztikailag szignifikáns különbség az azonos markerrel jelölt sejtek denzitása tekintetében a két agyterület között. A GFAP immunpozítív populáció denzitása esetében nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a DLPFC és a NC között ($p > 0,5$). Az ALDH1L1 immunpozítív populáció esetében a mért denzitás szignifikánsan különbözött a DLPFC és a NC között ($p < 0,05$) (6. ábra).



6. ábra – A GFAP+ asztroglia denzitásának (bal), és az ALDH1L1+ asztroglia denzitásának összehasonlítása a DLPFC és a NC között (jobb). Az ALDH1L1+ asztroglia denzitása szignifikánsan magasabb volt az NC-ben. Az adatok átlagát fekete négyzettel, az SD-t vertikális vonallal jelöltük.

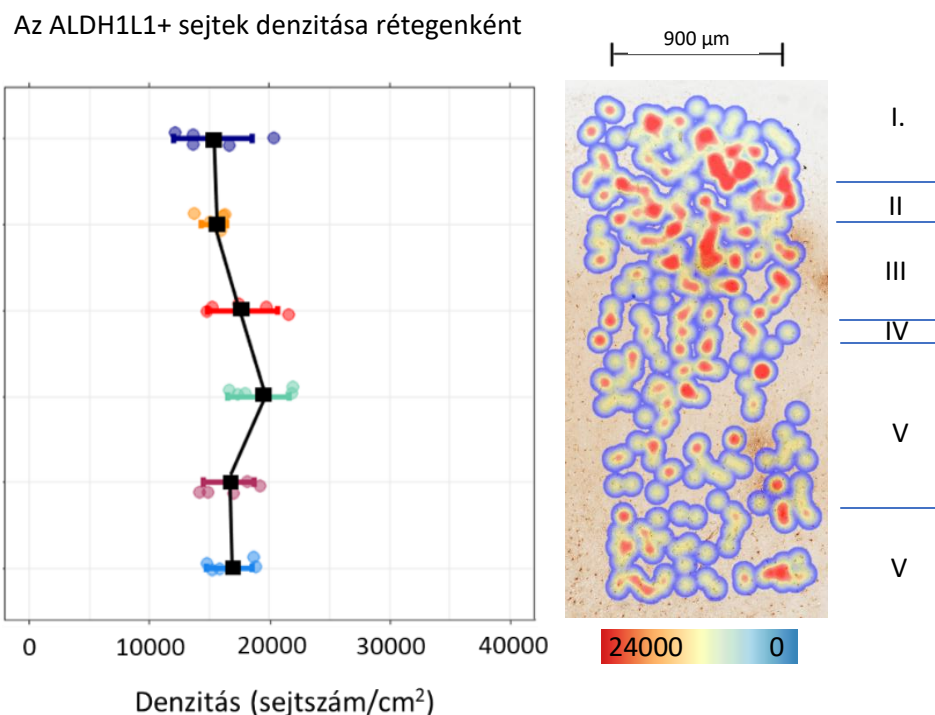
4.3 Az asztroglia populációk rétegenkénti eloszlása a DLPFC-ben



7. ábra – A GFAP+ asztroglia denzitása a DLPFC rétegeiben (bal). GFAP+ asztroglia populációk réteg szerinti eloszlása lokális hő térképen (jobb), 4x-es nagyításon. Az adatok átlagát fekete négyzettel, az SD-t vertikális vonallal jelöltük.

A DLPFC hat kortikális rétege szerint is vizsgáltuk a GFAP és ALDH1L1 immunpozitív sejtek denzitását. A GFAP+ populáció denzitásának maximuma az első (piális felszín alatti) rétegben volt (1.táblázat, 7.ábra), amelyet az L2-5 rétegek alacsonyabb denzitása követett.

A hatodik, fehérállománnyal szomszédos rétegben szintén magasabb GFAP+ denzitást detektáltunk. Az első réteg denzitása statisztikailag szignifikánsan magasabb volt, mint az L2-L6 rétegek denzitása ($p < 0,05$). Vizsgálatunk során fluoreszcens felvétel készült a DLPFC rétegeiről, amelyen látható, hogy az L1 réteg sejtjeiből az L2-L4 rétegen keresztül lenyúló asztroglia nyúlványok indulnak ki (9. ábra).

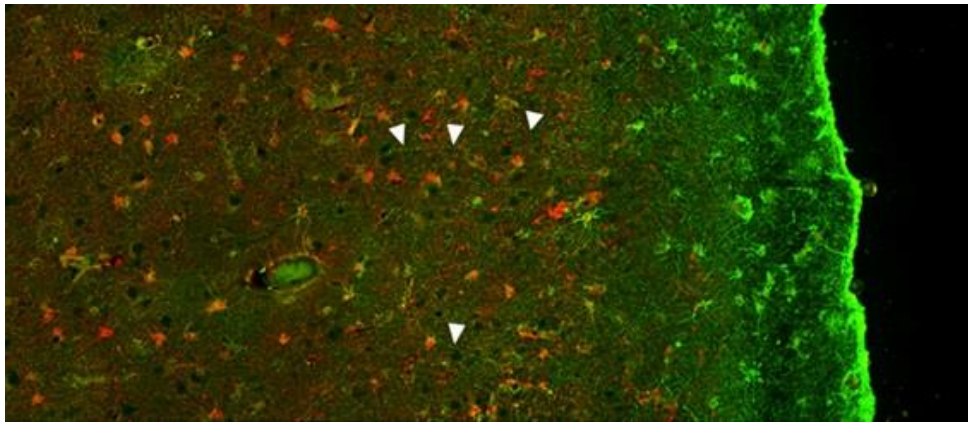


8. ábra – Az ALDH1L1+ asztroglia denzitása a DLPFC rétegeiben (bal). GFAP+ asztroglia populációk réteg szerinti eloszlása lokális hő térképen (jobb), 4x-es nagyításon. Az adatok átlagát fekete négyzettel, az SD-t vertikális vonallal jelöltük

Az ALDH1L1+ sejtek denzitásának maximuma a negyedik rétegben volt (1. táblázat). Ugyanakkor az ALDH1L1+ sejtek denzitásában nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a rétegek között ($p > 0,05$). A GFAP és ALDH1L1 markerrel jelölt sejtek denzitásának rétegenkénti összehasonlításakor azt találtuk, hogy az L2-L5 rétegekben az ALDH1L1+ asztroglia sejtek denzitása statisztikailag szignifikánsan magasabb volt ($p < 0,001$). (1. táblázat, 8. ábra)

Rétegek	1	2	3	4	5	6	Összdenzitás
GFAP	22386	6161	6105	4988	7433	10610	8853
ALDH1L1	17597	16309	17864	18861	16613	16681	17757

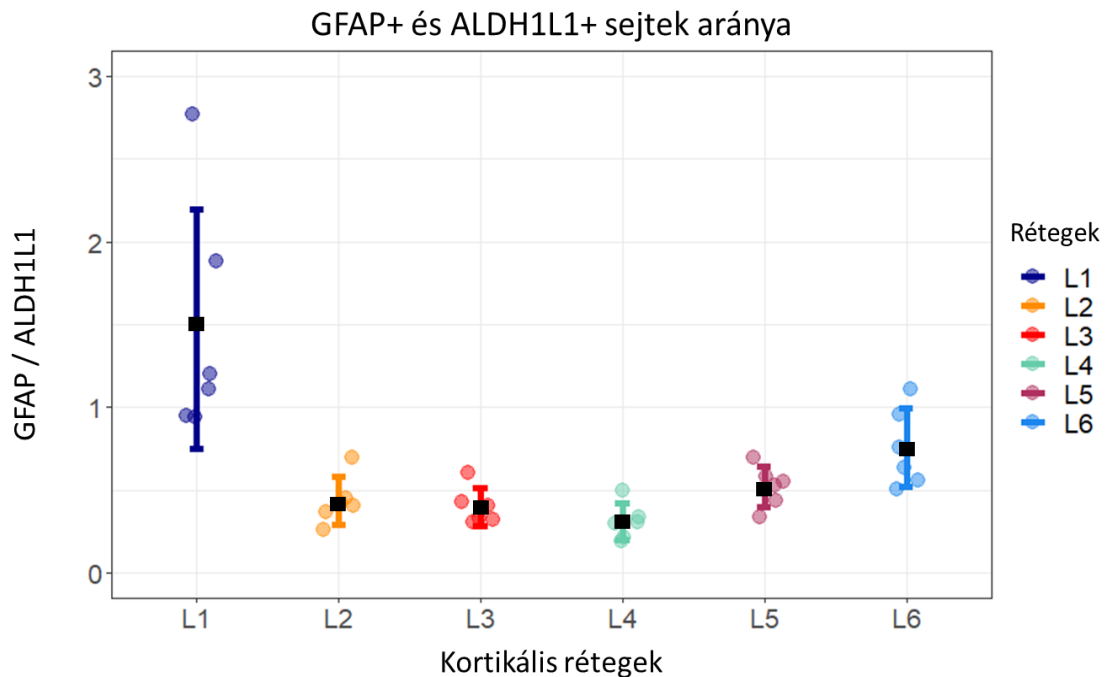
1. táblázat – A GFAP+ és ALDH1L1+ sejtek denzitásának átlaga rétegek szerint (sejtszám/cm²)



9. ábra – GFAP+ (zöld) sejtek fluoreszcens jelölése a DLFC-ben (S12/059 számú alany), 20x-os nagyításon. Jól láthatóak az L1 rétegben elhelyezkedő GFAP+ asztroglia sejtek. Az L2 rétegben az L1 GFAP+ asztrogliaiból kiinduló hosszú nyúlványok láthatóak (fehér háromszöggel jelölve).

4.3 A GFAP és ALDH1L1 immunpozitív sejtek denzitásának aránya a DLPFC rétegeiben

A denzitás rétegenkénti vizsgálata során kiszámoltuk a GFAP+ és az ALDH1L1 + sejtek arányát, a teljes DLPFC-re és az egyes kortikális rétegekre vonatkozóan is. A DLPFC-ben a GFAP/ALDH1L1 arány az összes rétegre vonatkoztatva $0,4986 \pm 0,12$ volt, vagyis a GFAP+ sejtek denzitása csak fele akkora volt, mint az ALDH1L1+ sejtek denzitása.

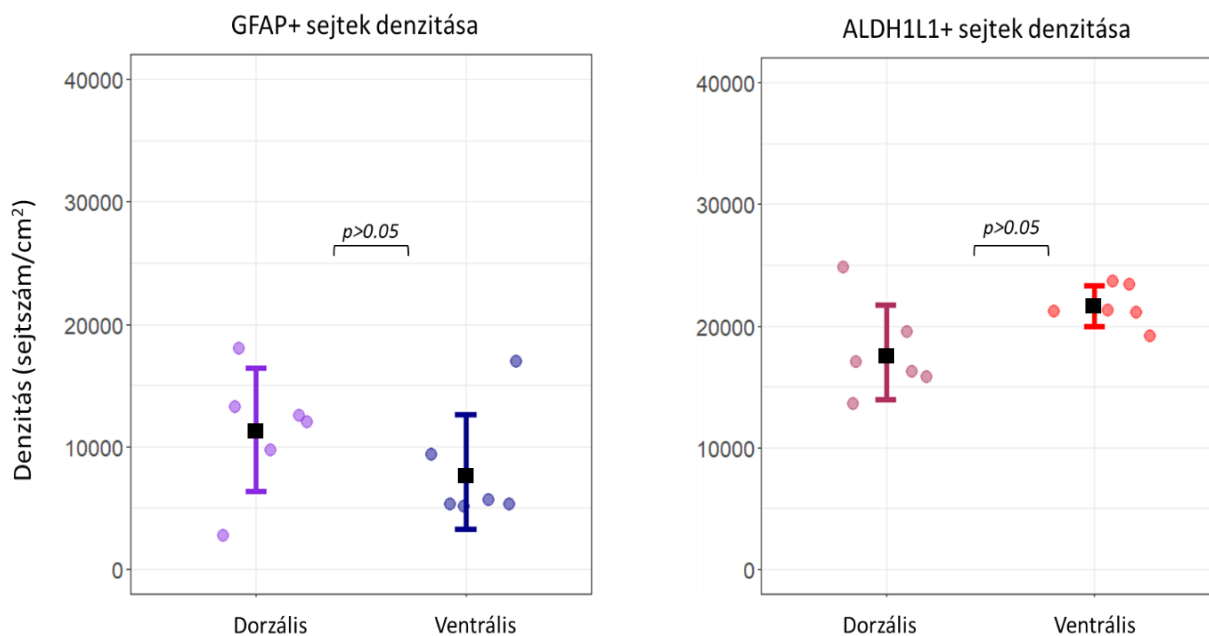


10. ábra – A GFAP/ALDH1L1 immunpozitív sejtek aránya a DLPFC rétegeiben. Az adatok átlagát fekete négyzettel, az SD-t vertikális vonallal jelöltük

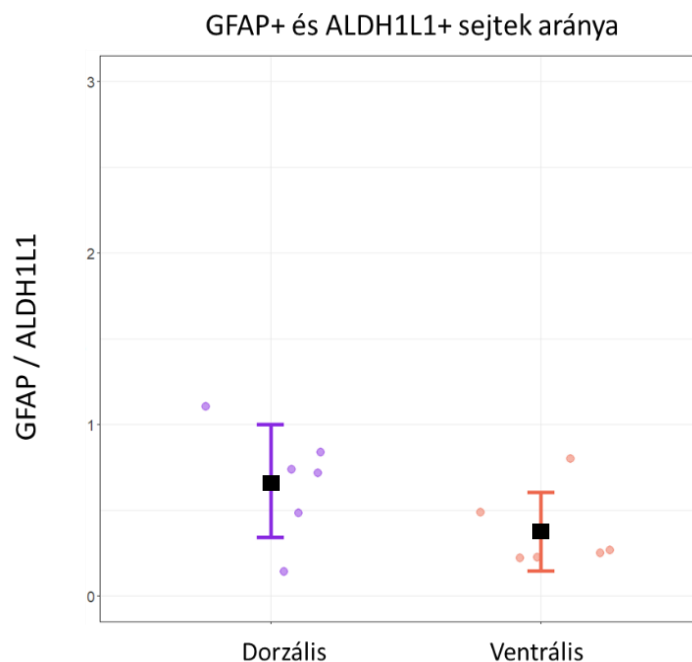
Az arányok rétegenkénti vizsgálatából azonban kiderült, hogy az első rétegben (L1) a GFAP+ sejtek denzitása meghaladta az ALDH1L1 populáció denzitását $1,2722 \pm 0,65$, viszont az L2-L6 rétegekben az ALDH1L1+ sejtek denzitása volt magasabb (10. ábra).

4.4 Az eltérő asztroglia populációk denzitásainak összehasonlítása a NC dorzális és ventrális régiói között

Vizsgálatunk során leszámoltuk a nucleus caudatus dorzális és ventrális régiójában található GFAP-val és ALDH1L1-val jelölt sejteket. Ezt követően összehasonlítottuk a populációk régiókénti denzitását (11. ábra), és a DLPFC-hez hasonlóan kiszámoltuk a GFAP és ALDH1L1 immunpozitív sejtek arányát. A GFAP/ALDH1L1 összdenzitás aránya $0,4106 \pm 0,15$ volt, vagyis a nucleus caudatusban szintén mintegy 2-szer magasabb az ALDH1L1+ sejtek denzitása, mint a GFAP+ sejteké (12. ábra). A dorzális régióban a GFAP/ALDH1L1 denzitás aránya $0,6705 \pm 0,21$ volt, a ventrális régióban pedig $0,3756 \pm 0,27$. A dorzális és ventrális régiók között azonban sem a GFAP+ sejtek, sem az ALDH1L1+ sejtek denzitása esetében nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget ($p > 0,05$).



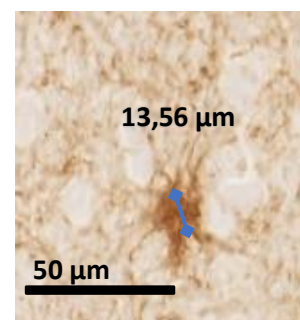
11. ábra – A GFAP+ (bal), és ALDH1L1+ (jobb) sejtek denzitásának összehasonlítása a NC dorzális és ventrális régiója között, az immunpozitív sejtek denzitása között nem volt statisztikailag szignifikáns különbség ($p < 0,05$). Az adatok átlagát fekete négyzettel, az SD-t vertikális vonallal jelöltük.



12. ábra – A GFAP/ALDH1L1 sejtek aránya a NC dorzális és ventrális régiójában. Az ALDH1L1+ sejtek aránya, mind a két régióban magasabb volt. Az adatok átlagát fekete négyzettel, az SD-t vertikális vonallal jelöltük

A GFAP+ és ALDH1L1+ asztroglia sejtek átmérőinek vizsgálata a DLPFC-ben

Az asztroglia sejtek számolásakor mindig rögzítettük a sejtest leghosszabb átmérőjét, majd az értékek átlagát összehasonlítottuk a két vizsgált marker szerint (8. ábra). A GFAP markerrel jelölt asztroglia sejtek átmérőinek átlaga $8,59 \pm 0,81 \mu\text{m}$ volt, az ALDH1L1+ asztroglia sejtek átmérőinek átlaga pedig $8,41 \pm 0,69 \mu\text{m}$ volt. (2. táblázat) A különböző markerrel jelölt sejtek átmérőinek átlaga között a DLPFC-ben nem volt statisztikailag szignifikáns eltérés ($p\text{-érték} > 0,05$) (14. ábra).

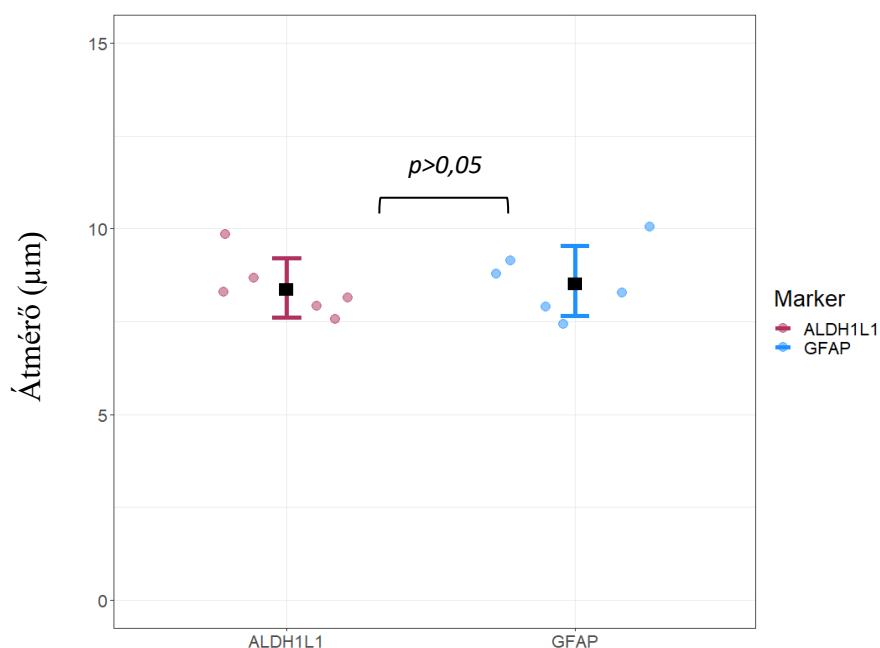


13. ábra – ALDH1L1+ sejt a DLPFC-ben, rögzített leghosszabb átmérővel

Rétegek	1	2	3	4	5	6
GFAP	7,68	9,04	9,18	7,39	7,35	8,18
ALDH1L1	8,65	9,07	8,35	7,72	7,18	8,62

2. táblázat – A különböző alanyokból származó GFAP+ és ALDH1L1+ asztroglia sejtestek átmérőinek átlaga alanyonként (μm)

A GFAP+ és ALDH1L1+ asztroglia átmérőinek
átlaga a DLPFC-ben

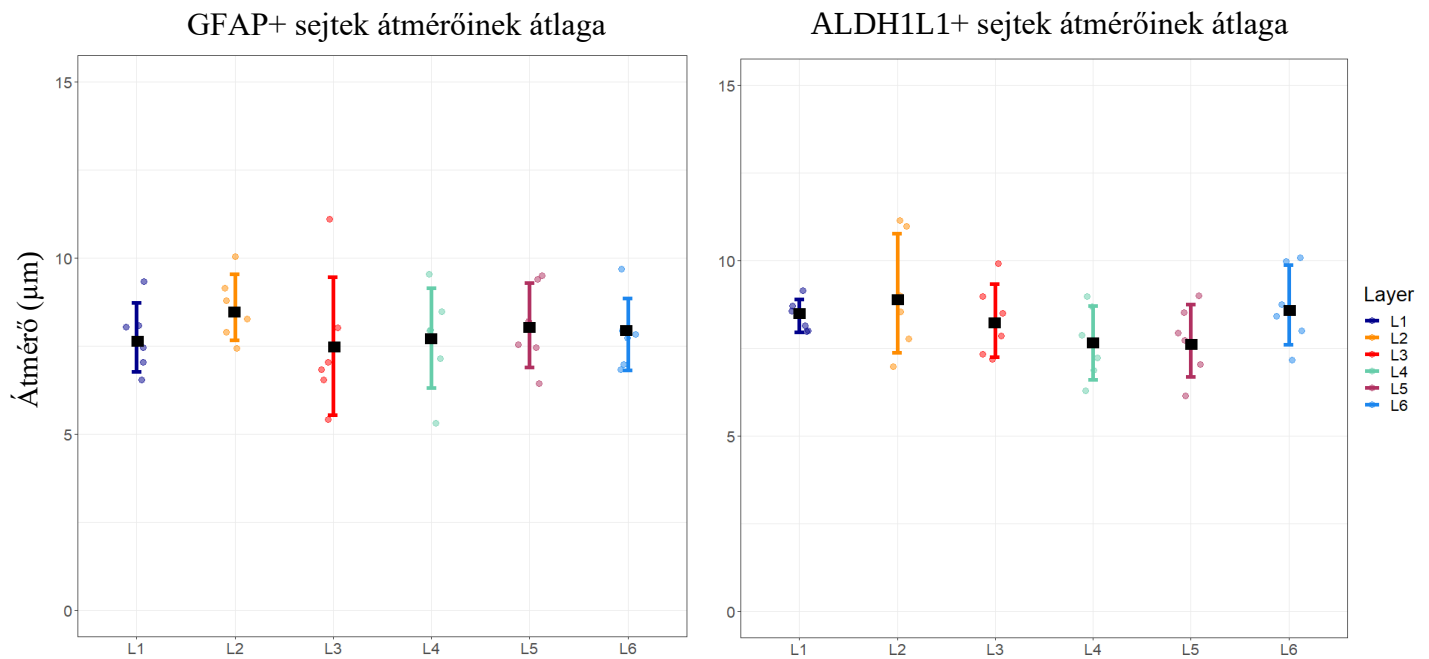


14.ábra – GFAP+ és ALDH1L1+ sejtek átmérőinek átlaga a DLPFC-ben, az átmérők átlaga között nem volt statisztikailag szignifikáns különbség. Az adatok átlagát fekete négyzettel, az SD-t vertikális vonallal jelöltük

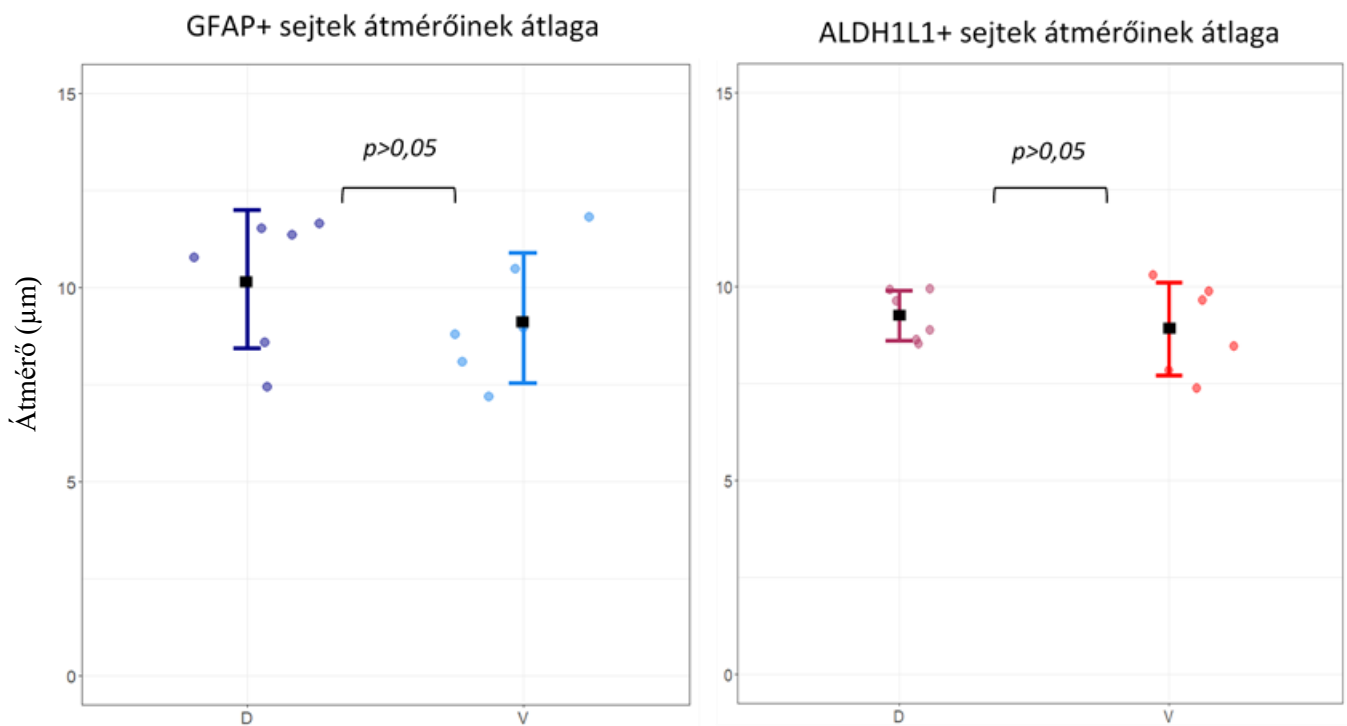
A sejtek átmérőinek átlagát összehasonlítottuk a DLPFC rétegei szerint, az értékeket a 3. táblázat foglalja össze, az átlagok ábrázolása a 9. ábrán látható. Az átmérők rétegszerinti átlagai között nem volt statisztikailag szignifikáns különbség (p -érték $> 0,05$). Ezután összehasonlítottuk a sejtek átmérőjét a NC dorzális és ventrális régiójában (16. ábra). Sem a GFAP+, sem az ALDH1L1+ sejtek méretében nem volt szignifikáns különbség a régiók között.

ID	S12/059	S12/002	S12/071	S10/196	S11/096	S11/081	Átlag
GFAP	10,05	8,79	7,44	9,15	8,27	7,89	8,59
ALDH1L1	9,86	7,93	7,57	8,68	8,29	8,14	8,41

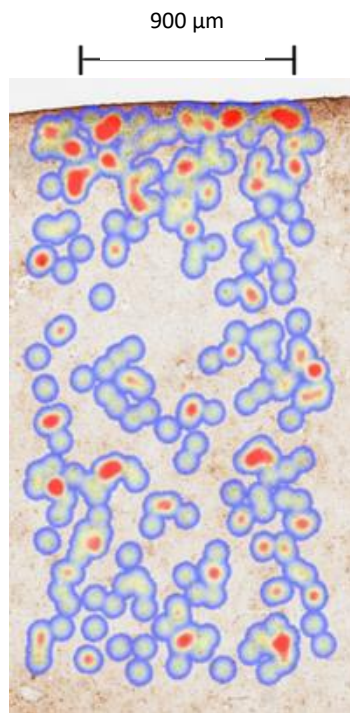
3. táblázat – Az asztroglia sejtek átmérőinek átlaga a DLPFC rétegei szerint (μm)



15. ábra – A GFAP+ és ALDH1L1+ sejtek átmérőinek átlaga a DLPFC rétegeiben. Az adatok átlagát fekete négyzettel, az SD-t vertikális vonallal jelöltük

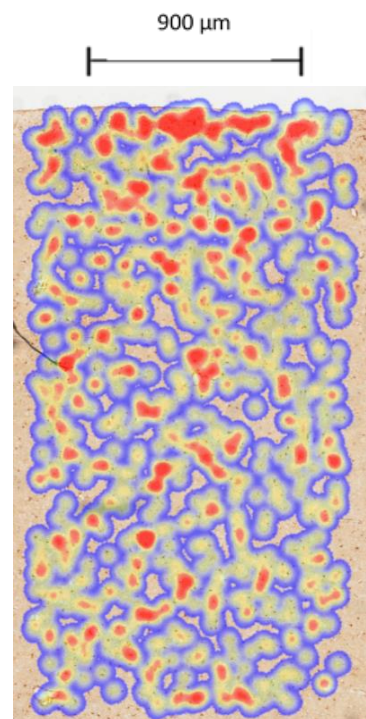


16. ábra – A GFAP+ és ALDH1L1+ sejtek átmérőinek átlaga a NC dorzális és ventrális régiójában. A sejtek mérete nem különbözött szignifikánsan a vizsgált régiókban. Az adatok átlagát fekete négyzettel, az SD-t vertikális vonallal jelöltük.

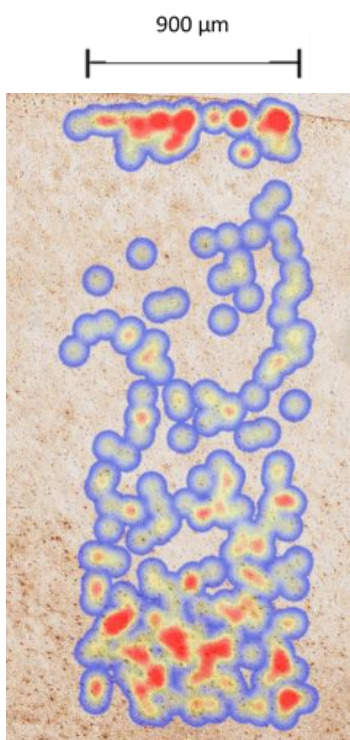


S11/096 (GFAP)

- I.
- II.
- III.
- IV.
- V.
- VI.

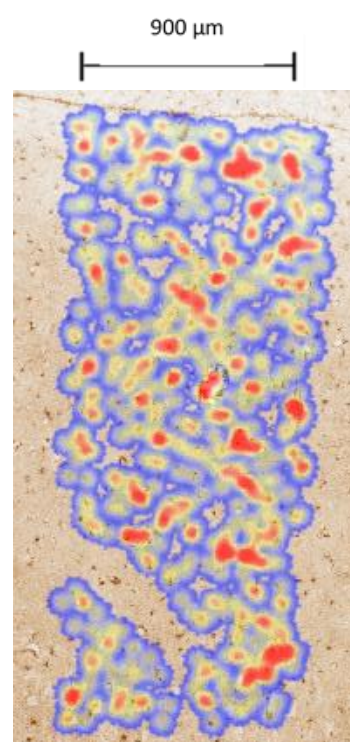


S11/096 (ALDH1L1)

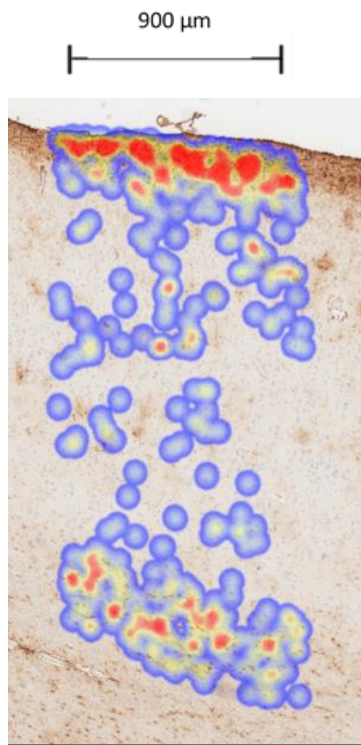


S10/196 (GFAP)

- I.
- II.
- III.
- IV.
- V.
- VI.

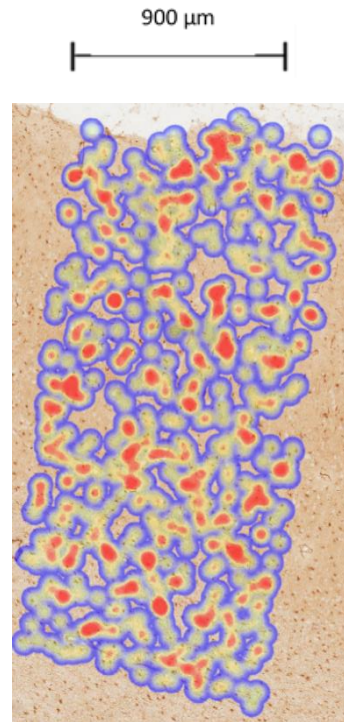


S10/196 (ALDH1L1)

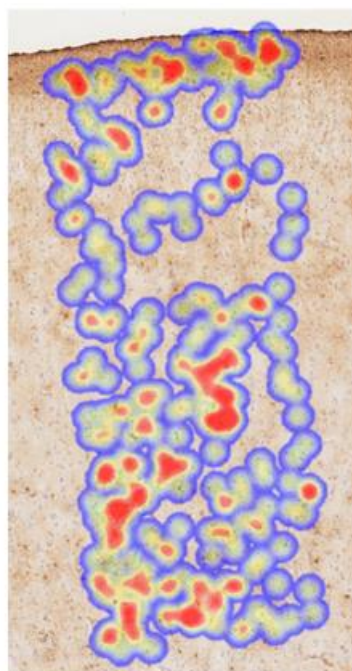


S12/059 (GFAP)

- I.
- II.
- III.
- IV.
- V.
- VI.

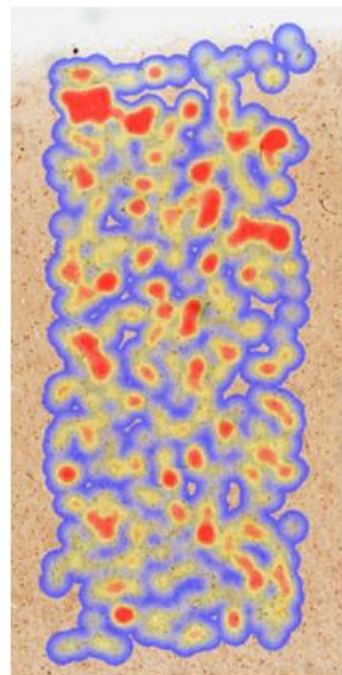


S12/059 (ALDH1L1)

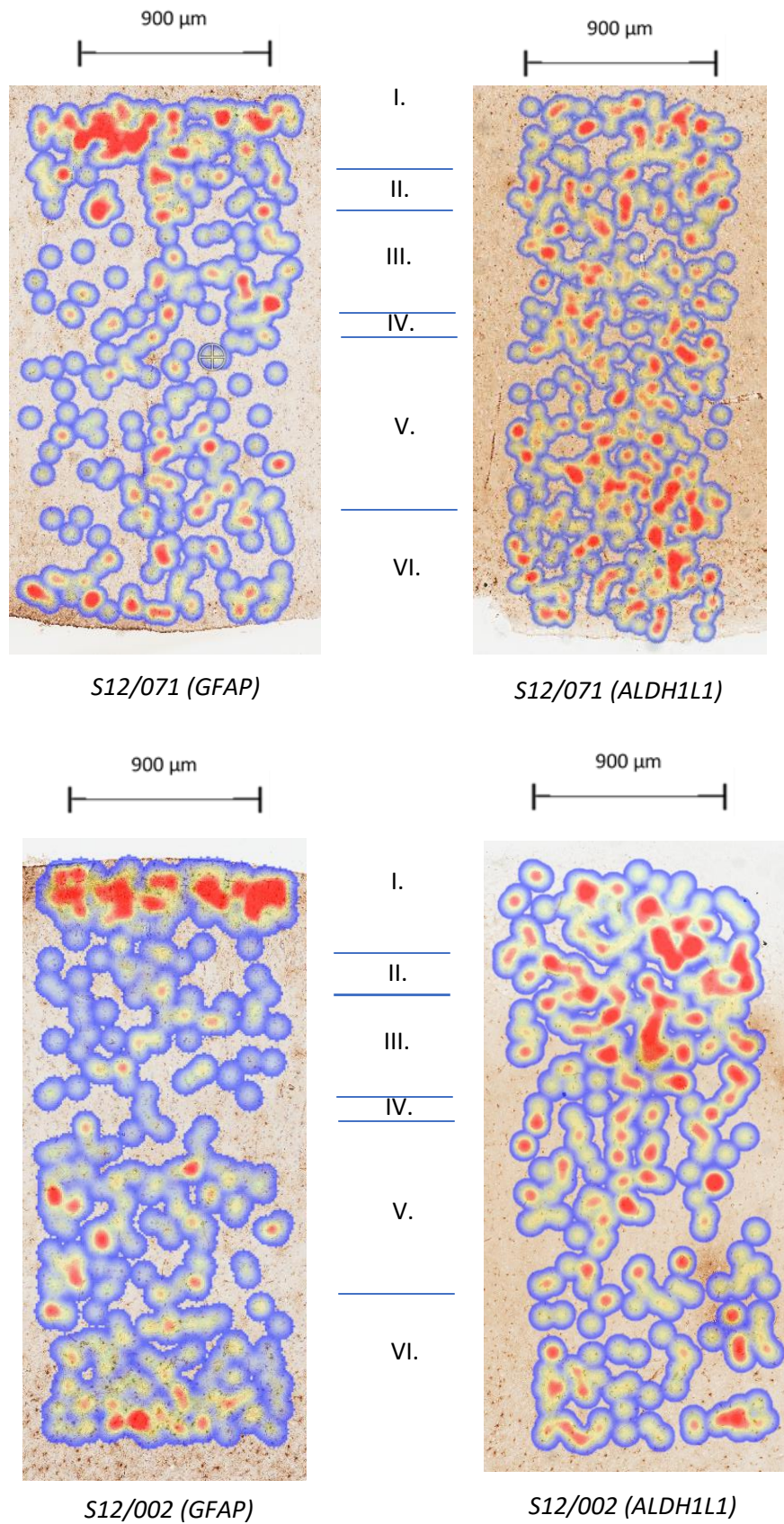


S11/081 (GFAP)

- I.
- II.
- III.
- IV.
- V.
- VI.



S11/081 (ALDH1L1)



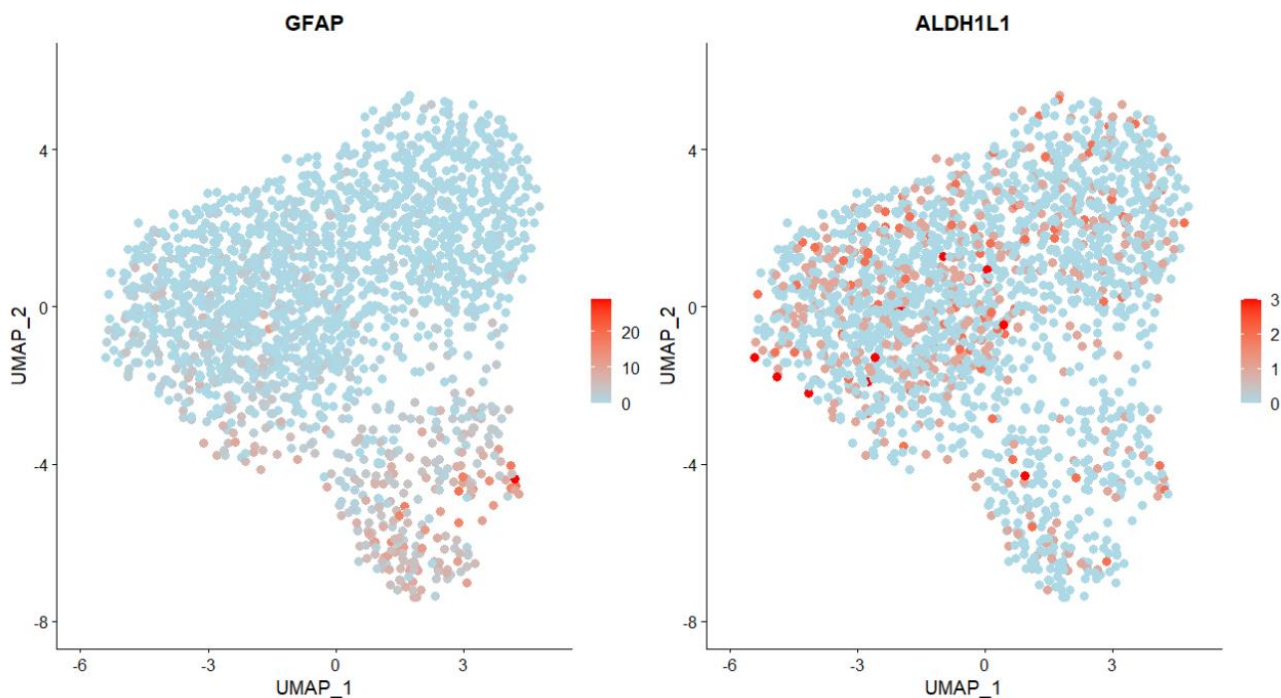
17. ábra – A GFAP+ (bal oldali oszlop) és ALDH1L1+ asztroglia (jobb oldali oszlop) eloszlása hő térképen ábrázolva, 2x-es nagyításon

5. Diszkusszió

A legújabb szakirodalmi adatok szerint a rágcslók agykérgében található protoplazmás asztroglia populációk regionálisan nagyfokú funkcionális heterogenitást mutatnak (*Khakh és Deneen 2019, Lanjakospirian és mtsai, 2018, Zeisel és mtsai, 2015*). Az ismert, hogy molekuláris és morfológiai különbségek vannak a rágcslók agykérgének különböző rétegeiben előforduló asztroglia populációk között (*Lanjakospirian és mtsai, 2018*).

Az ALDH1L1+ asztroglia humán kortikális rétegek közötti összehasonlításáról még nincs irodalmi adat, azonban egy 2017-es kutatásban az egerek különböző agyterületeit vizsgálva (agykéreg, thalamus, kisagy) az ALDH1L1+ asztroglia transzkriptomikus profilja (RNS-szekvenálás) alapján öt szubpopulációt különítettek el (*Lin és mtsai, 2017*). A funkcionálisan hasonló neuronok az agykéregben rétegek szerint rendeződnek. Ennek megfelelően kutatásunk során arra kerestünk választ, hogy az egyes asztroglia szubpopulációk topográfiai eloszlása mutat-e (akár a neuronokéhoz hasonló) rétegződést a humán agykéregben.

Szakirodalmi adatok alapján ismertek a protoplazmás asztroglia humán agykéregben található szubpopulációi (úm. GFAP+ és ALDH1L1+ populációk) (*Oberheim és mtsai, 2009, Waller és mtsai, 2016*). Mindezek ellenére pontos topográfiai, denzitometriai elemzés még nem készült a szubpopulációk elhelyezkedéséről. Eredményeink alapján feltártuk, hogy a két populáció réteg szerint átfedő módon helyezkedett el, viszont sejtszinten csak az asztroglia kis része (mintegy egytizede) fejezte ki mind a két markert.



18. ábra - A GFAP és az ALDH1L1 gének magi expressziója a humán agykéreg asztroglia populációjában. A két gén expressziója szemmel láthatóan részben átfedő, de jelentősen elkülönülő mintázatot mutat. A transzkriptomikus adatok ábrázolása a Li és mtsai, 2018-as tanulmány online hozzáférhető, egysejt szintű RNS szekvenálós adatmátrixának újraelemzésével történt (<http://development.psychencode.org/>). A skála az expresszió mértékét jelzi logaritmizált értékekkel, a nullától (kék) az adott gén maximumáig (piros). Az UMAP egy gyakori dimenzióredukciós vizualizálási módszer.

Vizsgálatunk során a DLPFC-ben és a NC-ben két asztroglia szubpopulációt különítettünk el. A GFAP és az ALDH1L1 markerek topográfiailag átfedő, de sejtszinten elkülönülő asztroglia populációkban fordultak elő. Ezt megerősítik az Allen Brain Institute egysejt szintű transzkriptomikus adatbázisában elérhető (<https://celltypes.brain-map.org/rnaseq/human/mtg>) és már publikált eredmények is (Hodge és mtsai, 2019) (17.ábra). Annak ellenére, hogy a GFAP 1971-es felfedezése óta (Eng és mtsai, 1971) a leggyakrabban használt asztroglia specifikus marker (Eng és mtsai, 1994, Zhang és mtsai, 2019, Preston és mtsai, 2019), eredményeink szerint az asztroglia sejteknek mintegy felét az egészséges humán agyban nem jelöli (Sofroniew és Vinters, 2010).

Az általunk az L1-ben elemzett GFAP+ asztroglia populáció valószínűleg megegyezik a marginális és interlamináris asztroglia néven leírt populációkkal (hivatkozás), amelynek sejttestjei közvetlenül a piális felszín alatt helyezkednek el. A mélyebb kortikális rétegekben (L5, L6) talált GFAP+ asztroglia pedig megfelelt a polarizált asztroglia populációnak (Oberheim és mtsai, 2009).

Több publikációban is leírták, hogy a transzkriptomikus eredmények alapján a kortexben (Waller és mtsai, 2016) és a striatumban (Khakh és mtsai, 2020) magasabb volt az ALDH1L1+ asztroglia aránya, mint a GFAP+ asztrogliaé, azonban nem közöltek pontos denzitás adatokat. Ezzel szemben a GFAP+ sejtek aránya jóval magasabb volt a hippocampusban. Feltételezzük, hogy az inter-regionális heterogenitás hátterében funkcióbeli különbségek állnak. Eredményeink alátámasztják, hogy a neuropatológiai vizsgálatok során a GFAP marker alkalmazása nem tájékoztat teljeskörűen a glia érintettségéről. Ugyanakkor az is valószínűsíthető, hogy kutatásunk során bizonyos asztroglia sejteket nem tudtunk azonosítani, melyek potenciálisan GFAP és ALDH1L1 immunnegatívak.

Kutatásunk következő fontos lépése a neuropszichiátriai betegséggel nem diagnosztizált alanyok mintáinak összevetése skizofrén és autizmus spektrum zavarral rendelkező alanyok agyszövet mintáival.

6. Összefoglalás

Az asztroglia és a neuronok közel azonos arányban fordulnak elő a humán agy szürkeállományában, azonban a neuron populációkkal szemben az asztroglia heterogenitásáról relatíve kevés információval rendelkezünk. Az már széleskörűen elfogadott tény, hogy számos különböző funkciót betöltő neuronpopuláció alkotja az agykérget, viszont a lehetséges asztroglia szubpopulációknak a humán agy szürkeállományában való előfordulása szinte teljesen ismeretlen.

Tanulmányunk során célunk volt a világon elsőként, kvantitatív módon megvizsgálni az emberi dorzolaterális prefrontális kéregre és nucleus caudatus asztroglia populációit. Ezeknek a területnek a neuropszichiátriai betegségekben való érintettsége már bizonyított.

Az agyszövetet a Holland Agy Bank biztosította a vizsgálatokhoz. Az immunhisztokémiai feldolgozás formalinnal-fixált paraffinba ágyazott metszeteken történt. Két specifikus asztroglia markert, a GFAP-t és az ALDH1L1-t alkalmaztuk. A metszeteket metszetszkennel digitalizáltuk. Az egyes asztroglia populációk morфомetriai és topográfiai elemzését az ImageScope programmal hajtottuk végre.

A GFAP+ és ALDH1L1+ asztroglia populációk egymással átfedő módon fordulnak elő a dorzolaterális prefrontális kéregben, azonban a kortikális rétegek szerinti arányuk különbözött. A GFAP+ asztroglia denzitása az L1-es rétegben szignifikánsan magasabb volt, mint az L2-L6 rétegekben, az ALDH1L1+ asztroglia rétegenkénti denzitásában viszont nem volt szignifikáns különbség. A GFAP és ALDH1L1 markerrel jelölt sejtek denzitásának rétegenkénti összehasonlításakor azt találtuk, hogy az L2-L5 rétegekben szignifikánsan magasabb volt az ALDH1L1+ asztroglia denzitása. Mind az agykéregben, mind a nucleus caudatus területén mintegy kétszer annyi volt ALDH1L1+ asztroglia összdenzitása, mint GFAP+ asztrogliaé. Az asztroglia sejtek átmérőjében egyik vizsgált területen sem találtunk szignifikáns különbséget.

Eredményeink azt támasztják alá, hogy a GFAP asztroglia markerként való alkalmazása patológiai folyamatok vizsgálatakor nem informál teljeskörűen az asztroglia állapotáról, csak egy részpopulációról tájékoztat. Az asztroglia típusok regionális eloszlásáról kvantitatív módszerekkel térképeket készítettünk, amelyek később olyan betegségcsoportok közötti összehasonlítást tesznek majd lehetővé, mint az autizmus spektrum zavar és a skizofrénia.

7. Summary

Astroglia és neurons populate the human cerebral gray matter in a 1:1 ratio. While there is much information available on the diversity of neuronal populations, relatively little is known about that of the astroglia. We aimed to quantitatively investigate different astroglial populations present in the human cortex és caudate nucleus with morphometric és topographic analyses. We focussed on the dorsolateral prefrontal cortex whose involvement in neuropsychiatric disorders is already demonstrated. Human brain tissue was provided by the Netherlands Brain Bank és Oxford Brain Bank.

Our results showed that GFAP+ és ALDH1L1+ astroglial populations were distributed in an overlapping pattern in the dorsolateral prefrontal cortex. The GFAP+ population was preferentially located in L1, whereas the ALDH1L1+ population was predominantly found in L2-L5. Furthermore, two times more ALDH1L1+ than GFAP+ astroglia was found in both the cerebral cortex és caudate nucleus.

Our results suggest that the use of GFAP in routine pathological investigations only informs about approximately one-third of the cortical astroglia. Regional distribution of diverse astroglial populations was mapped quantitatively in the human grey matter which will allow future investigations of potential astroglial alterations in conditions such as autism spectrum disorder és schizophrenia.

8.Hivatkozáslista

1. Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*. 2009 Feb 5;457(7230):675-7.
2. Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol*. 2009 Apr 10;513(5):532-41.
3. Bazargani N, Attwell D. Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat Neurosci*. 2016 Feb;19(2):182-9.
4. Bernstein HG, Meyer-Lotz G, Dobrowolny H, Bannier J, Steiner J, Walter M, Bogerts B. Reduced density of glutamine synthetase immunoreactive astrocytes in different cortical areas in major depression but not in bipolar I disorder. *Front Cell Neurosci*. 2015 Aug 10;9:273.
5. Bignami, A. and Dahl, D. 1977. Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia. *J. histochem. Cytochem.* 25:466–469.
6. Brodmann, K, 1909. Vergleichende Lokalisationlehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. Leipzig, Johann Ambrosius Barth
7. Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*. 2002 Jan 1;22(1):183-92.
8. Cahoy John D, Ben Emery, Amit Kaushal, Lynette C. Foo, Jennifer L. Zamanian, Karen S. Christopherson, Yi Xing, Jane L. Lubischer, Paul A. Krieg, Sergey A. Krupenko, Wesley J. Thompson, Ben A. Barres, A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function, *Journal of Neuroscience* 2 January 2008, 28 (1) 264-278
9. Choi KH, Elashoff M, Higgs BW, Song J, Kim S, Sabunciyan S, Diglisic S, Yolken RH, Knable MB, Torrey EF, Webster MJ. Putative psychosis genes in the prefrontal cortex: combined analysis of gene expression microarrays. *BMC Psychiatry*. 2008 Nov 7;8:87.
10. Clarke LE, Barres BA. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci*. 2013 May;14(5):311-21. doi: 10.1038/nrn3484. Epub 2013 Apr 18. Erratum in: *Nat Rev Neurosci*. 2013 Jun;14(6):451.

11. Colombo, J.A., Yáñez, A., Puissant, V. and Lipina, S. (1995), Long, interlaminar astroglial cell processes in the cortex of adult monkeys. *J. Neurosci. Res.*, 40: 551-556.
12. De Bock M, Leybaert L, Giaume C. Connexin Channels at the Glio-Vascular Interface: Gatekeepers of the Brain. *Neurochem Res.* 2017 Sep;42(9):2519-2536.
13. Eng and R. S. Ghirnikar, “GFAP and astrogliosis,” *Brain Pathol.*, 4, No. 3, 229-237 (1994).
14. Eng, J. J. Vanderhaeghen, A. Bignami, and B. Gerstl, “An acidic protein isolated from fibrous astrocytes,” *Brain Res.*, 28, No. 2, 351-354 (1971).
15. Falkowska A, Gutowska I, Goschorska M, Nowacki P, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences.* 2015; 16:25939.
16. Farhy-Tselnicker, I., Allen, N.J. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Dev* 13, 7 (2018).
17. Florio M, Huttner WB. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development.* 2014 Jun;141(11):2182-94.
18. Freeman MR. Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science.* 2010 Nov 5;330(6005):774-8.
19. Fujii E, Mori K, Miyazaki M, Hashimoto T, Harada M, Kagami S. Function of the frontal lobe in autistic individuals: a proton magnetic resonance spectroscopic study. *J Med Invest.* 2010 Feb;57(1-2):35-44.
20. Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte *J Neurosci.* 2007 Jun 13; 27(24):6473-7
21. Hamilton, N.B. and Attwell, D. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 227–238 (2010).
22. Hashemi Ezzat, Jeanelle Ariza, Haille Rogers, Stephen C. Noctor, Verónica Martínez-Cerdeño, The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Prefrontal Cortex in Autism, *Cerebral Cortex*, Volume 27, Issue 3, March 2017, Pages 1931–1943.
23. Hirao K, Miyata J, Fujiwara H, Yamada M, Namiki C, Shimizu M, Sawamoto N, Fukuyama H, Hayashi T, Murai T. Theory of mind and frontal lobe pathology in schizophrenia: a voxel-based morphometry study. *Schizophr Res.* 2008 Oct;105(1-3):165-74.

24. Hodge RD, Bakken TE, Miller JA, Smith KA, Barkan ER, Graybuck LT, Close JL, Long B, Johansen N, Penn O, Yao Z, Eggermont J, Höllt T, Levi BP, Shehata SI, Aevermann B, Beller A, Bertagnolli D, Brouner K, Casper T, Cobbs C, Dalley R, Dee N, Ding SL, Ellenbogen RG, Fong O, Garren E, Goldy J, Gwinn RP, Hirschstein D, Keene CD, Keshk M, Ko AL, Lathia K, Mahfouz A, Maltzer Z, McGraw M, Nguyen TN, Nyhus J, Ojemann JG, Oldre A, Parry S, Reynolds S, Rimorin C, Shapovalova NV, Somasundaram S, Szafer A, Thomsen ER, Tieu M, Quon G, Scheuermann RH, Yuste R, Sunkin SM, Lelieveldt B, Feng D, Ng L, Bernard A, Hawrylycz M, Phillips JW, Tasic B, Zeng H, Jones AR, Koch C, Lein ES. Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature*. (2019) John Lin CC, Yu K, Hatcher A, Huang TW, Lee HK, Carlson J, Weston MC, Chen F, Zhang Y, Zhu W, Mohila CA, Ahmed N, Patel AJ, Arenkiel BR, Noebels JL, Creighton CJ, Deneen B. Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nat Neurosci*. 2017 Mar;20(3):396-405.
25. Kettenmann H, Ransom BR, editors. Oxford University Press Oxford: 2013. *Neuroglia*. p. 35, 197, 347
26. Khakh BS, Deneen B. The Emerging Nature of Astrocyte Diversity. *Annu Rev Neurosci*. 2019 Jul 8;42:187-207.
27. Khakh BS, Yu X, Nagai J, Improved tools to study astrocytes. *Nat Rev Neurosci*. 2020 Mar;21(3):121-138.
28. Lanjakornsiripan D, Pior BJ, Kawaguchi D, Furutachi S, Tahara T, Katsuyama Y, Suzuki Y, Fukazawa Y, Gotoh Y. Layer-specific morphological and molecular differences in neocortical astrocytes and their dependence on neuronal layers. *Nat Commun*. 2018 Apr 24;9(1):1623. doi: 10.1038/s41467-018-03940-3.
29. Li M, Santpere G, Imamura Kawasawa Y, Evgrafov OV, Gulden FO, Pochareddy S, Sunkin SM, Li Z, Shin Y, Zhu Y, Sousa AMM, Werling DM, Kitchen RR, Kang HJ, Pletikos M, Choi J, Muchnik S, Xu X, Wang D, Lorente-Galdos B, Liu S, Giusti-Rodríguez P, Won H, de Leeuw CA, Pardiñas AF; BrainSpan Consortium; PsychENCODE Consortium; PsychENCODE Developmental Subgroup, Hu M, Jin F, Li Y, Owen MJ, O'Donovan MC, Walters JTR, Posthuma D, Reimers MA, Levitt P, Weinberger DR, Hyde TM, Kleinman JE, Geschwind DH, Hawrylycz MJ, State MW, Sanders SJ, Sullivan PF, Gerstein MB, Lein ES, Knowles JA, Sestan N. Integrative functional genomic analysis of human brain development and neuropsychiatric risks. *Science*. 2018 Dec 14;362(6420): eaat7615.

30. M Kálmán, Glial reaction and reactive glia, *Advances in Molecular and Cell Biology*,
31. Magi S, Piccirillo S, Amoroso S, Lariccia V. Excitatory Amino Acid Transporters (EAATs): Glutamate Transport and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 13;20(22):5674.
32. Matias I, Morgado J, Gomes FCA. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Front Aging Neurosci*. 2019 Mar 19; 11:59.
33. McCall MA, Gregg RG, Behringer RR, Brenner M, Delaney CL, Galbreath EJ, Zhang CL, Pearce RA, Chiu SY, Messing A. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 25;93(13):6361-6.
34. Morgan JT, Barger N, Amaral DG, Schumann CM (2014) Stereological Study of Amygdala Glial Populations in Adolescents and Adults with Autism Spectrum Disorder. *PLOS ONE* 9(10)
35. Mucke L, Oldstone MB, Morris JC, Nerenberg MI. Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *New Biol*. 1991 May;3(5):465-74. PMID: 1883812.
36. Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JH, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci*. 2009 Mar 11;29(10):3276-87.
37. O'Leary, L. A., Davoli, M. A., Belliveau, C., Tanti, A., Ma, J. C., Farmer, W. T., Turecki, G., Murai, K. K., and Mechawar, N. 2020, Characterization of Vimentin-Immunoreactive Astrocytes in the Human Brain. *Frontiers in neuroanatomy*, 14, 31.
38. O'Leary, Maureen, Bloch, Jonathan and Flynn, John and Gaudin, Timothy and Giallombardo, Andres and Giannini, Norberto and Goldberg, Suzann and Kraatz, Brian and Luo, Zhe-Xi and Meng, Jin and Ni, Xijun and Novacek, Michael and Perini, Fernando and Randall, Zachary and Rougier, Guillermo and Sargis, Eric and Silcox, Mary, Simmons, Nancy, Spaulding, Michelle, Cirranello, Andrea. 2013, *The Placental Mammal Ancestor and the Post-K-Pg Radiation of Placentals*. Science (New York, N.Y.). 339. 662-7.
39. Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia*. 2007 Sep;55(12):1251-62.
40. Potkin SG, Turner JA, Brown GG, McCarthy G, Greve DN, Glover GH, Manoach DS, Belger A, Diaz M, Wible CG, Ford JM, Mathalon DH, Gollub R, Lauriello J, O'Leary

- D, van Erp TG, Toga AW, Preda A, Lim KO; FBIRN. Working memory and DLPFC inefficiency in schizophrenia: the FBIRN study. *Schizophr Bull.* 2009 Jan;35(1):19-31.
41. Preston AN, Cervasio DA, Laughlin ST. Visualizing the brain's astrocytes. *Methods Enzymol.* 2019; 622:129-151
 42. Réthelyi, J., Szentágothai, J. 2014. *Funkcionális anatómia.* Budapest, Medicina Tankönyvkiadó Zrt.
 43. Shibuki K, Gomi H, Chen L, Bao S, Kim JJ, Wakatsuki H, Fujisaki T, Fujimoto K, Katoh A, Ikeda T, Chen C, Thompson RF, Itohara S. Deficient cerebellar long-term depression, impaired eye blink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice. *Neuron.* 1996; 16:587–599.
 44. Slifstein M, van de Giessen E, Van Snellenberg J, Thompson JL, Narendran R, Gil R, Hackett E, Girgis R, Ojeil N, Moore H, D'Souza D, Malison RT, Huang Y, Lim K, Nabulsi N, Carson RE, Lieberman JA, Abi-Dargham A. Deficits in prefrontal cortical and extrastriatal dopamine release in schizophrenia: a positron emission tomographic functional magnetic resonance imaging study. *JAMA Psychiatry.* 2015 Apr;72(4):316-24.
 45. Sofroniew and Vinters, “Astrocytes: biology and pathology,” *Acta Neuropathol.*, 2010 119, No. 1, 7-35.
 46. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 2009 Dec;32(12):638-47
 47. Srinivasan K, Friedman BA, Larson JL, Lauffer BE, Goldstein LD, Appling LL, Borneo J, Poon C, Ho T, Cai F, Steiner P, van der Brug MP, Modrusan Z, Kaminker JS, Hansen DV. Untangling the brain's neuroinflammatory and neurodegenerative transcriptional responses. *Nat Commun.* 2016 Apr 21; 7:11295
 48. Tasic B, Menon V, Nguyen TN, Kim TK, Jarsky T, Yao Z, Levi B, Gray LT, Sorensen SA, Dolbeare T, Bertagnolli D, Goldy J, Shapovalova N, Parry S, Lee C, Smith K, Bernard A, Madisen L, Sunkin SM, Hawrylycz M, Koch C, Zeng H. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat Neurosci* 19: 335–346, 2016. doi:10.1038/nn.4216
 49. Tsuchida A, Fellows LK. Lesion evidence that two distinct regions within prefrontal cortex are critical for n-back performance in humans. *J Cogn Neurosci.* 2009 Dec;21(12):2263-75.
 50. Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev.* 2018 Jan 1;98(1):239-389.

51. Volterra, A. and Meldolesi, J. (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 626-640.
52. Waller, R., Woodroffe, M. N., Wharton, S. B., Ince, P. G., Francese, S., Heath, P. R., and mtsai, (2016). Gene expression profiling of the astrocyte transcriptome in multiple sclerosis normal appearing white matter reveals a neuroprotective role. *J. Neuroimmunol.* 299, 139–146. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.09.010
53. Williams, An introduction to the caudate in schizophrenia. 2016, *The CNS Journal*, 2:(1).
54. Yang, Y. and mtsai, Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15194–15199 (2003)
55. Zeisel A, Muñoz-Manchado AB, Codeluppi S, Lönnerberg P, La Manno G, Juréus A, Marques S, Munguba H, He L, Betsholtz C, Rolny C, Castelo-Branco G, Hjerling-Leffler J, Linnarsson S. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science*. 2015 Mar 6;347(6226):1138-42. doi: 10.1126/science.aaa1934. Epub 2015 Feb 19. PMID: 25700174.
56. Zhang L, Verwer RWH, Lucassen PJ, Huitinga I, Swaab DF. Prefrontal cortex alterations in glia gene expression in schizophrenia with and without suicide. *J Psychiatr Res.* 2020 Feb; 121:31-38

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek folyamatos rendelkezésre állását, és a sok segítséget, amivel szakmai fejlődésemhez hozzájárult. Köszönöm laborasszisztensünk, Pácz Erzsébet a rengeteg segítséget. Köszönöm a konzultációt és a tanácsokat és belső konzulensemnek, Puska Ginának. Köszönöm a csoporttársaimnak is a folyamatos visszajelzést, tanácsot és támogatást, főleg Tyler Teadorának, aki nagyon sokat segített ennek a szakdolgozatnak a létrejöttében. Végül szeretném megköszönni a szüleimnek a rengeteg bátorítást és segítséget.

Témavezetői ellenjegyzés

AlulírottDr.Adorján István..... Igazolom,
hogyHoppa Paulina..... (a hallgató
neve) Az asztroglia heterogenitásának vizsgálata a humán agykéregben és nucleus
caudatusban.....diplomamunkát ismerem, azt
beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2021.04.30.....

.....Dr. Adorján István.....

a témavezető neve és aláírása

Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet,

Semmelweis Egyetem

4. melléklet

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott PUSKA GINA Igazolom, hogy
..... HOPPA PAULINA (a hallgató neve)
AZ ASTROGLIA HETEROGENITÁSÁNAK VIZSGÁLATA A HUMÁN című
AGYKÉRÉGBEN ÉS NUCLEUS CAUDATUSBAN
diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védezésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2021. APRILIS 29.

.....
PUSKA GINA
belső konzulens neve és aláírása

.....
ÖKOLÓGIAI
.....
tanszék

HuVetA - SZIA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név:Hoppa Paulina.....

Elérhetőség (e-mail

cím):.....hoppa.paulina@gmail.com.....

...

A feltöltendő mű címe:..... Az asztroglia heterogenitásának vizsgálata a humán agykéregben és nucleus caudatusban

A mű megjelenési adatai: SZAKDOLGOZAT

Az átadott fájlok száma:1.....

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA és a SZIA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA és a SZIA egynél több (csak a HuVetA és a SZIA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy a átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- ☐ engedélyezi, hogy a HuVetA-ban/SZIA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- ☐ a Szent István Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- ☒ a SZIE Állatorvos-tudományi Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- ☐ csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

* Jelen nyilatkozat az 5/2011. számú, *A Szent István Egyetemen folytatott tudományos publikációs tevékenységgel kapcsolatos adatbázis kialakításáról és alkalmazásáról* című rektori utasításhoz kapcsolódik, illetve annak alapján készült.

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**

☒ Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA/SZIA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban/SZIA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2021 . év04.....hó ...30.....nap

Hoppa Paulina

aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;
- a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;
- az Állatorvos-tudományi Kar és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;
- a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,
- a nyílt hozzáférés támogatása.

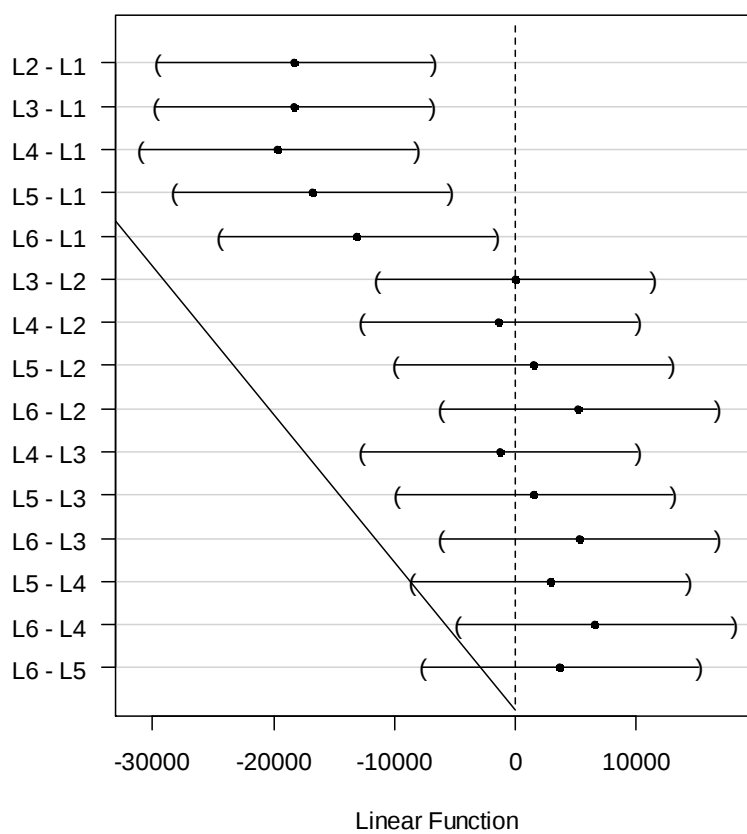
A SZIA Szent István Archívum a Szent István Egyetemen keletkezett tudományos dolgozatok tára.

9. Melléklet

GFAP rétegenkénti összehasonlítás

L2 - L1	< 0.001 ***
L3 - L1	< 0.001 ***
L4 - L1	< 0.001 ***
L5 - L1	0.00134 **
L6 - L1	0.01744 *

95% family-wise confidence level



ALDH1L1 rétegenkénti összehasonlítás

L2 - L1	0.992
L3 - L1	1.000
L4 - L1	0.960
L5 - L1	0.998
L6 - L1	0.999
L3 - L2	0.955
L4 - L2	0.726
L5 - L2	1.000
L6 - L2	1.000
L4 - L3	0.994
L5 - L3	0.982
L6 - L3	0.986
L5 - L4	0.817
L6 - L4	0.835
L6 - L5	1.000

