MTA Doktori Értekezés

A hippocampus gátló neuronhálózatainak átalakulása temporális lebeny eredetű epilepsziában

Maglóczky Zsófia



MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Celluláris- és Hálózat-Neurobiológiai Osztály Agykéreg Kutatócsoport Budapest, 2012

<u>A fedőlap ábrája</u>: A borítón egy epilepsziás beteg temporális kérgéből műtéti úton eltávolított, majdnem szabályos gömb alakú, mintegy diónyi meszes képlet gliális fibrilláris savas protein-immunfestett metszete látható. A pontos elhelyezkedése a temporális gyrusok, T1, T2, T3 találkozásánál volt, a fehérállományban. Nem sikerült megállapítani, mi okozta a meszes golyó létrejöttét. Csak néhány metszetet tudtunk belőle vibratommal készíteni, ezeket immunfestettük neuronális (NeuN) és gliális markerrel. Neuron gyakorlatilag nem volt benne, de a GFAP-immunfestett elemek mennyisége is elenyésző, mindent a koncentrikusan lerakódott mészkristályok töltenek ki. Minden valószínűség szerint ez okozta az epilepsziás rohamokat. Gyönyörű.

Rövidítések jegyzéke

ABC: avidin-biotin-tormaperoxidáz komplex AIS: axon iniciális szegmentum BSA: szarvasmarha szérum-albumin CA: cornu Ammonis CB: calbindin CB1-R: 1. típusú cannabinoid receptor CCK: cholecystokinin CR: calretinin DAB: 3,3'-diaminobenzidin-4HCl g: glia GABA: γ-amino-vajsav GD: gyrus dentatus GFAP: gliális fibrilláris savas protein GluR2/3: glutamát receptor 2/3 alegyége h: hilus HE: humán epilepsziás HK: humán kontroll NK1: neurokinin -1 NPY: neuropeptid Y PB: foszfát puffer pm: post mortem PV: parvalbumin s.g.: stratum granulosum s.lm.: stratum lacunosum-moleculare s.m.: stratum moleculare s.o.: stratum oriens s.p.: stratum pyramidale s.r.: stratum radiatum

SOM: somatostatin

SP: substance P

SPR: substance P receptor

str.: stratum

TB: TRIS puffer

TBS: TRIS-sel pufferelt fiziológiás sóoldat

TL: temporális lebeny

TLE: temporális lebeny eredetű epilepszia

vGlut1: vezikuláris glutamát transzporter

Tartalomjegyzék

I. BEVEZETÉS	10
I/1.A temporális lebeny eredetű epilepszia	12
I./2. Az emberi hippocampus szerkezete	12
I/2.1. A nem-principálissejtek	15
I./2.2. Az interneuronok funkcionális csoportosítása	16
I./3. A hippocampális sejtpusztulás általános jellemzői t	
emporális lebeny eredetű epilepsziában	18
II. A TANULMÁNY CÉLKITŰZÉSEI:	22
III. ANYAG és MÓDSZER	23
III./1. Fixálás	24
III./2. Immuncitokémia	25
III./2.1. Egyszerű immunfestés	25
III./2.2. Kettős fluorescens immunfestés	28
III./2.3. CR-CB kettős immunfestés	29
III./3. Kvantitatív analízis	30
III./3.1. A CB-pozitív interneuronok	
méreteloszlásának meghatározása	30
III./3.2. Sejtszámolás	30
III./3.3. A szinaptikus reorganizáció vizsgálata	32
IV. EREDMÉNYEK	35

IV./1. Immerziós fixálási eljárás reszekciós és

post mortem minták esetén: új módszer kidolgozása	35
IV./1.1. Patkánykontroll alkalmazása a fixálás modellezésére	36
IV./1.2. A post mortem idő	37
IV./2. A hippocampális sejtpusztulás és rostsarjadzás	
általános jellemzésén alapuló patológiai csoportosítás	38
IV./2.1. A vizsgálatba bevont betegek patológiai típusai	41
IV./3. A funkcionálisan különböző gátlósejttípusok	
és kapcsolataik átalakulása temporális lebeny eredetű epilepsziában	
szenvedő betegek műtétileg eltávolított hippocampusában:	
a gyrus denatus interneuronjai	46
IV./3.1. A periszomatikus gátlásban résztvevő	
interneuronok a gyrus dentatusban	47
IV./3.1.1. Parvalbumin-immunreaktív sejtek	47
IV./3.1.1.2. A gyrus dentatus PV-tartalmú elemeinek	
elektronmikroszkópos elemzése	52
IV./3.1.2. A CCK-tartalmú sejtek és végződési mintázatuk	
epilepsziás gyrus dentatusban	59
IV./3.2. A dendritikus gátlásban résztvevő interneuronok	
kontroll és TL epilepsziás betegek gyrus dentátusában	63
IV./3.2.1. Calbindin-tartalmú sejtek	63
IV./3.2.1.1. A hiláris CB-immunpozitív interneuronok bemenete	67
IV./3.2.2. A P anyag receptorát kifejező sejtek	
változásai a gyrus dentatusban	73
IV./3.2.2.1. Az SPR-t expresszáló sejtek általános jellemzői	73

IV./3.2.2.2. Az SPR-immunpozitív sejtek változásai	
epilepsziás gyrus dentatusban	77
IV./3.2.2.3. Az SPR-sejtek bemenete és változásai	
epilepsziás gyrus dentatusban	
IV./3.2.2.4. Az SPR-expresszáló sejtek SP-tartalmú bemenetei	82
IV./ 3.2.3. Calretinin-tartalmú sejtek kapcsolatai és változásai	
epilepsziás gyrus dentatusban	87
IV/.3.2.3.1. A CR-sejtek eloszlása és száma az epilepsziás	
betegek gyrus dentatusaban	89
IV./4. A funkcionálisan különböző gátlósejttípusok és	
kapcsolataik átalakulása temporális lebeny eredetű	
epilepsziában szenvedő betegek műtétileg eltávolított	
hippocampusában: a CA1 régió interneuronjai	94
IV./4.1.1. A periszomatikus gátlásban részt vevő PV-tartalmú	
sejtek változásai	98
IV./4.1.1. 1. A PV-tartalmú sejtek bemenete	
kontroll és epilepsziás CA1-ben	
IV./4.1.1.1. A PV-immunfestett axonterminálisok végződési	
mintázata kontroll és epilepsziás CA1-ben	102
IV./4.1.1.2. A CA1 régió piramissejtjeinek periszomatikus	
bemenete kontroll és epilepsziás alanyokban	106
IV/4.2. A dendritkus gátlásban részt vevő gátló interneuronok	
változásai TLE betegek CA1 régiójában	110
IV./4.2.1. Calbindin-tartalmú sejtek és szinaptikus	

reorganizációjuk epilepsziában	110
IV./4.2.1.1. A CB-immunpozitív sejtek bemenetének	
és kimenetének változásai	114
IV./4.2.1.2. A CB-immunfestett terminálisok eloszlása	
és célelemei a CA1 régióban	118
IV./4.2.1.3.CB-tartalmú axo-axonikus sejt az	
emberi hippocampus CA1 régiójában	120
IV./4.2.1.4.CB-immunfestett dendritek mint a CB-immunpozitív	
axonterminálisok célelemei	122
IV./4.2.2. Az SPR-expresszáló sejtek eloszlása és	
morfológiai változásai epilepsziás betegek CA1 régiójában	124
IV./4.2.2.1. A kontroll humán CA1 régió SPR-immunfestett	
sejtjeinek morfológiai és neurokémiai jellemzői	128
IV./4.2.2.2. Az SPR-kifejező sejtek morfológiai és számbeli	
változásai epilepsziás humán hippocampus CA1 régiójában	136
IV./4.2.2.3. Az SPR-immunfestett interneuronok bemenete	
kontroll és epilepsziás CA1 régióban	
IV./4.3. A CR-tartalmú interneuronok száma, eloszlása	
és morfológiai változásai epilepsziás betegek CA1 régiójában	145
IV./4 .3.1. A CR-tartalmú sejtek funkcionális	
morfológiai vizsgálata a humán hippocampus CA1 régiójában	153
IV/4.3.2. A CR-tartalmú dendritek és terminálisok	
reorganizációja epilepsziás betegek CA1 régiójában	153

V. MEGBESZÉLÉS	157
V. 1. Az funkcionálisan különböző interneuronok	
érzékenysége és megőrződése a humán epilepsziás hippocampusban	157
V./2. Periszomatikus gátlósejtek	160
V./3. Dendritikus és interneuron szelektív gátlósejtek	162
V./4. A gátlósejtek szinaptikus reorganizációjának	
hálózati hatása epilepsziában	165
V./5. Növekedési és jelenségek az epilepsziás hippocampusban	167
V. 6. Szklerózis, sejtpusztulás, és sarjadzás	170
VI. Köszönetnyílvánítás:	173
VII. Összefoglalás	174
VIII. Idézett szakirodalom	176
IX. Az értekezés anyagát képező saját cikkek	186
X. Az értekezéshez felnem használt, az értekezés témájában a PhD óta megjelent cikkek	187

I. BEVEZETÉS

I/1.A temporális lebeny eredetű epilepszia

Az epilepszia az egyik leggyakoribb neurológiai elváltozás, mely sokféle formában és tünetegyüttessel jelenik meg, jelentős károsodásokat idéz elő a betegek életminőségében és életvitelében (Halász & Rajna, 1990; Meldrum, 1990). Minden megjelenési formájára jellemző, hogy roham alatt az agy különböző területein vagy az egész agyra kiterjedően rendellenes EEG tevékenység észlelhető (Schwartzkroin & Wheal, 1984), mely az adott terület hiperaktivitására utal, nagyszámú sejt szinkron tüzel, és bizonyos sejtcsoportok kiterjedten pusztulnak (Falconer *et al.*, 1964; Engel, 1996a). A beteg kognitív képességei – tanulás, memória – sérülhetnek (Miller *et al.*, 1993). Gyakorisága a teljes népességre nézve 1-2% körüli, gyermekkorban gyakoribb (Halász & Rajna, 1990). Az utolsó 20-30 évben megnőtt az időskori epilepsziás megbetegedések gyakorisága is (Faught, 1999; Leppik, 2007), az okokat még vizsgálják. Az időskori neurodegeneratív kórképek palettája így egy újabb betegséggel bővült, tovább növelve az időskori betegellátásra nehezedő nyomást.

Az epilepszia betegséget régebben generalizált és fokális csoportokra osztották, és megkülönböztettek genetikus, szimptómás és kriptogén epilepsziákat, eredetük szerint (League & Epilepsy, 1989)(ILAE 1989). Azonban az elektrofiziológiai vizsgálómódszerek fejlődése, a mágneses magrezonancia segítségével történő képalkotás finomodása, a rohamszemiológiai ismeretek bővülése valamint az emberi genom feltérképezése, és a genetikai eredetű epilepsziákról halmozódó ismeretek gyakorlatilag "felrobbantották" ezt az egyszerű csoportosítást (Berg *et al.*, 2010). A jelenlegi csoportosításban is megmaradt azonban a temporális lebeny eredetű epilepszia, a felnőttkori fokális epilepszia leggyakoribb formája, mely különböző szimptomás okokra vezethető vissza, ugyanis nem sikerült olyan genetikai faktorokat találni, amelyek egyértelműen összefüggésbe hozhatóak lennének a temporális lebeny eredetű epilepsziával. A legelterjedtebb vélekedés szerint "epilepsziára fogékonnyá tevő" gének húzódhatnak meg a háttérben (Salzmann *et al.*, 2008; Peternel *et al.*, 2009), melyek bizonyos körülmények között elősegíthetik epilepszia betegség kialakulását. A vélekedést az is indokolja, hogy epilepsziás betegek anamnézisében gyakran szerepel fejet ért baleset, lázgörcs, fertőző betegségek, ikerterhesség vagy egyéb perinatalis ártalom (Rocca *et*

al., 1987; Lewis, 2005). Ezek önmagukban nem váltanak ki epilepsziát, de egyes embereket – több más tényezővel együtt – fogékonnyá tehetnek a betegség kialakulására. A legvalószínűbb, hogy környezeti tényezők és a teljes genom összjátéka alakítja ki a betegséget.

Felnőtt korban a temporális lebeny eredetű epilepszia (TLE) a leggyakoribb. Noha jelenleg sokféle gyógyszer van forgalomban, a betegek 25-30%-a nem reagál a kezelésre. Gyógyszerrezisztens TLE esetén, epilepszia-sebészet alkalmazásával a betegek jelentős hányadának állapota javítható (Falconer & Taylor, 1968; Spencer & Spencer, 1994).

Epilepsziás betegek agyában a görcsöket feltehetően bizonyos pályákon érkező, abnormális serkentés, illetve serkentő rekurrens pályákon keresztüli abnormális reverberáció okozza, és ez az oka az érzékeny sejtek pusztulásának is (Olney *et al.*, 1986; Engel, 1996a).

A post mortem epilepsziás emberi agyak tanulmányozása során kiderült, a felnőttkori fokális epilepsziák jelentős része temporális lebeny eredetű (Falconer *et al.*, 1964; Green, 1991; Meldrum, 1991), és elsősorban a limbikus rendszer struktúráiban, a hippocampusban, entorhinális, temporális, perirhinális kéregben, amygdala magvakban, egyes mediális thalamus magvakban, habenulában okoz sejtpusztulást (Corsellis & Meldrum, 1976; Gumnit, 1983; Green, 1991), - mely megmagyarázza, hogy epilpesziás betegek tanulási és kognitív képességei miért szenvednek gyakran károsodást (Rodin, 1968; Miller *et al.*, 1993).

Az epilepszia gyógyszeres kezeléssel nem gyógyítható, csak tünetmentesíthető (Halász & Rajna, 1990), és a kezelés költségei jelentős terhet rónak a társadalomra. Számos állatkísérletes modellt hoztak létre az epilepszia tanulmányozására, azonban egyik modell sem tükrözi mindazon változások összességét, amelyet humán agyban leírtak. Ezért elengedhetetlen az epilepszia vizsgálatánál a humán minták minél komplexebb vizsgálata, mert csak ez teszi lehetővé a valódi betegség jelenségeinek megismerését. Ez az ismeret viszont hozzájárul pontosabb, realisztikusabb epilepszia modellek kifejlesztéséhez is, miáltal a betegség patomechanizmusa kísérletesen is tanulmányozhatóvá válik.

Csoportunk 1994. óta vesz részt az Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet (mai nevén: Országos Idegtudományi Intézet), az Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézet (2007-ben jogutód nélkül megszűntették) és a MÁV Kórház Idegsebészeti Osztálya között létrejött Epilepszia Sebészeti Programban, és folytat vizsgálatokat a terápiarezisztens temporális lebeny epilepsziás betegekből eltávolított hippocampális szövetmintákon. Jelen tanulmányban az emberi hippocampusban talált funkcionális morfológiai elváltozásokat fogom bemutatni, elsősorban a gátló neuronhálózatok átalakulását részletezve.

I./2. Az emberi hippocampus szerkezete

A hippocampus ősi kéregterület, mely többek között részt vesz a memórianyomok kialakításában, a tanulásban, a térbeli tájékozódásban, és kiterjedt külső-belső kapcsolatai révén jelentős szerepet játszik az emlősök viselkedésének és alkalmazkodásának szabályozásában (Duvernoy, 1998).

A főemlősök hippocampusa jóval fejlettebb és bonyolultabb, mint a rágcsálóké. Az emberi hippocampus három részre osztható: a fejre, vagy anterior szegmensre, amely a digitationes hippocampit tartalmazza, a hippocampus testre, vagy középső szegmensre, és a farokra, vagy posterior szegmensre (Duvernoy, 1998). Maga a hippocampus vagy hippocampális formáció két részből, a cornu Ammonisból és a gyrus dentatusból áll úgy, hogy a rétegek két, egymásba forduló C alakot képeznek (Duvernoy, 1998).

A cornu Ammonis fő tömegét a piramissejtek adják, és további 3 fő régióra osztható: CA1, CA2, CA3 (Nó, 1934; Seress, 1988; Amaral et al., 1990) melyeket a bennük elhelyezkedő principális sejtek morfológiája és kapcsolatrendszere alapján lehet elkülöníteni. A piramissejtek sejttestjei alkotják a stratum pyramidalet. Apikális dendritjeik a stratum radiatumba majd a stratum lacunosum-moleculareba futnak, bazális dendritjeik a stratum oriensben ágaznak el. A gyrus dentatus fő tömegét a kompakt szemcsesejtréteg adja, dendritfájuk a stratum molecularéban helyezkedik el. A szemcsesejtek alatt helyezkedik el a hilus, ide futnak a szemcsesejtek axonjai, a moharostok. A hilust és a cornu Ammonis CA3c régióját együtt endfoliumnak is nevezik (Sommer, 1880; Amaral et al., 1990; Duvernoy, 1998). A szakirodalomban előfordul, hogy nem a CA3c-hilus elnevezést használják, hanem ehelyett CA4-polimorf réteg felosztás szerepel (Duvernoy, 1998). A CA3c+hilus, illetve a CA4+polimorf réteg megfelel az endfoliumnak. A hilus határai szélesebbek, tartalmazzák az összes mohasejtet és számos interneuront, a CA3c-ben csak CA3 piramissejtek és interneuronok taklálhatók. A polimorf réteg keskenyebb, és csak a mohasejtek egy részét tartalmazza. Azonban, ahogy arra Seress László is felhívta a figyelmet könyvfejezetében (Seress, 2005), Amaral szerint (Amaral, 1978) a hilus

elnevezés jobban megfelel, mert jelzi, hogy ez a terület nem az Ammonszarv része. Ezért mi is ezt a nevezéktant használtuk közleményeinkben. A hilusban a mohasejtek a principális neuronok. A mohasejteken komplex, elágazó tüskék vannak, melyek a szemcsesejtek axonjaitól kapják fő bemenetüket, axonjuk a szemcsesejtek dendritjén és tüskéin végződnek a stratum moleculare belső harmadában. Érdemes megjegyezni, hogy nem azokon a szemcsesejteken végződnek, melyek axonterminálisai őket beidegzik, hanem ezektől térben eltolva, caudálisan elhelyezkedő szemcsesejteket látnak el axonjaikkal (Amaral DG, 1990). A principális sejtek serkentőek, neurotranszmitterük a glutamát.

A hippocampus principális sejtjei szoros kapcsoltban vannak egymással. A szemcsesejtek axonjai idegzik be a mohasejteket a hilusban, valami végződnek a CA3 piramisokon, a CA3c kivételével szoros köteget alkotva a stratum lucidumban. A CA3 a,b régió piramisai a CA2 és CA1 régió piramisain végződnek, ezt az axonpályát Schaffer kollaterálisoknak nevezik, valamint jól fejlett lokális axonkollaterálisaikkal beidegzik egymást is, ami szokatlan a principális sejtek esetében (Amaral & Witter, 1989; Amaral DG, 1990). A CA1 régió piramissejtjei a subiculumba vetítenek, mely az entorhinalis kéregbe küld axonokat, az entorhinalis kéreg piramissejtjei pedig visszavetítenek a gyrus dentatus szemcsesejtjeire, és a CA3-CA1 piramissejtekre (Amaral & Witter, 1989).

Az emberi hippocampus szerkezete és kapcsolatrendszerei számos vonatkozásban eltérnek a rágcsálókétól, itt most csak néhány, a dolgozat szempontjából jelentős különbségre hívom fel a figyelmet:

1. A szemcsesejtek mintegy 20%-ának vannak bazális dendritjei, melyek a hilusba nyúlnak, és bemenetet kapnak a mohaterminálisoktól (Seress & Mrzljak, 1987). Ez azért jelentős, mert ezáltal a szemcsesejtek képesek serkenteni egymást közvetlenül, nem csak más sejteken (pld. mohasejtek) vagy áttételesen axonpályákon keresztül (Seress & Mrzljak, 1987; Seress, 2005).

2. Az Ammonszarv piramissejtjei lazán, több rétegben egymás fölött helyezkednek el a CA1 régióban, vastag réteget alkotva, így a rétegbe érkező pályák sokkal heterogénebben végződnek a sejtek különböző kompartmentumain, mint sejttest és proximális dendritek, mivel a sejttestek nem alkotnak szoros, kompakt réteget (Duvernoy, 1998).

3. A CA2 régió széles és sokkal kiterjedtebb, mint a rágcsálóké. Ennek a hippocampus longitudinális szerveződésében van szerepe, ami ezáltal valószínűleg sokkal hatékonyabb, mint rágcsálókban (Duvernoy, 1998).

4. A két hippocampális félteke emberben csak minimális mértékben van direkt comissurális pályákon keresztül összekapcsolva (Amaral *et al.*, 1984; Wilson *et al.*, 1990; Gloor *et al.*, 1993). A két hippocampális félteke más-más memória funkciókban érintett (Szirmai, 2001). A domináns oldali hippocampus elsősorban a beszédértés, szavak felidézése, visszamondása, mese szüzséjének megjegyzése funkciókért felelős, mig a szubdomináns oldali hippocampális félteke a vizuális készségekben, arcfelismerés, képek térbeli forgatása, mese részleteinek felidézése, vesz részt (Szirmai, 2001). Ez a tény teszi lehetővé, hogy epilepszia műtétek esetén az egyik oldali hippocampust eltávolítsák, mivel a másik hippocampus függetlenül is tud működni, és idővel a tapasztalatok szerint – részben – képes átvenni az eltávolított hippocampális félteke funkcióit.

A hippocampus sejttípusait, alrégióit és főbb pályarendszereit az 1. ábra foglalja össze.



1. Ábra: A hippocampus főbb sejttípusai és pályarendszerei (Wittner, 2004, PhD dolgozat, a szerző szíves engedelmével) A hippocampus alrégióinak jelölését (Cornu ammonis - CA) Lorente de No szerint adtuk meg, Amaral szerint módosítva (Seress 1988). A hippocampus fő bemenetét az entorhinális kéregből kapja, mely serkentő rostokat küld elsősorban a gyrus dentátus szemcsesejtjeire, és közvetlenül a CA3 és a CA1 terület piramissejtjeire is. A gyrus dentatus szemcsesejtjeiből erednek a moharostok, melyek a CA3 rgió piramissejtjein végződnek, és serkentik azokat. A CA3 piramissejtek axonjai a CA1 piramissejtekre vetülnek, szintén serkentve azokat. A CA3 piramissejtek visszakanyarodó kollatrerálisai egyedülállóan sűrűn végződnek más CA3 piramissejteken is. A CA1 piramissejtek a subiculum principális sejtjein végződnek, a subiculum pedig visszavetít az entorhinális kéregbe, így záródik az entorhinális-hippocampális szinaptikus kör.

I/2.1. A nem-principálissejtek

A hippocampus minden régiójában találhatók nem-principális neuronok is, melyek kis hányaduk (10-16%) ellenére funkcionálisan igen jelentősek (Freund & Buzsaki, 1996). Sejttestjeik bármely rétegben elhelyezkedhetnek, axonjaik lokálisan arborizálnak, dendritjeiken többnyire nem található tüske, és az ingerületátvivő anyaguk legtöbb esetben az idegrendszer fő gátló hatású transzmittere, a gamma-aminó-vajsav (GABA). Dúsan elágazó lokális axonfájukon keresztül képesek a principális sejtek nagy csoportjainak aktivitását szabályozni (Freund & Buzsaki, 1996).

Hagyományosan a helyben elágazó sejteket interneuronoknak nevezzük, és mivel ezek többnyire GABÁ-t tartalmaznak, a szakirodalom gyakran hívatkozik a kérgi gátlósejtekre úgy, mintha azok valamennyien interneuronok lennének, illetve az interneuronokat azonosítja a GABAerg sejtekkel. Azonban kiderült, hogy a lokális axonelágazódású sejtek nem mindig GABAergek, és egyes GABA-tartalmú sejtek az agy távoli területeire vetítenek el (Seress & Ribak, 1983; Toth & Freund, 1992; Freund & Buzsaki, 1996). Csak szűkebb értelemben igaz az, a sejtek többségére, de nem mindre, hogy a lokális axonelágazódású sejtek "GABAerg interneuronok".

Jelen dolgozatban az "interneuron" elnevezést ebben a szűkebb értelemben használom, és helyi axonelágazódású gátlósejtet értek alatta.

I./2.2. Az interneuronok funkcionális csoportosítása

A patkány hippocampuson végzett komplex morfológiai és fiziológiai vizsgálatok igazolták, hogy a gátlósejtek morfológiai és neurokémiai sajátságaik alapján funkcionális csoportokba sorolhatók, melynek alapján meghatározható az adott sejt neuronhálózatban betöltött szerepe. Így vannak a periszomatikus régió gátlásáért, a dendritikus régió gátlásáért, és más interneuronok gátlásáért felelős sejtek (Freund & Buzsaki, 1996). E három csoport együttes működésének, és a régióba érkező subcortikális-corticalis pályarendszerek hatásának összegződése fogja meghatározni egy régió principális sejtjeinek aktivitását (Freund & Buzsaki, 1996). A neuronhálózati hatások még kiegészülnek az egyedi sejtek szintjén, a sejten belüli szignalizációs és enzimrendszerek módosulásával, illetve a sejten és a terminálosokon lévő receptorok regulációjával (Lloyd *et al.*, 1986; Isokawa & Mello, 1991; Mathern *et al.*, 1998a).

Az ismeretek akkumulációja és különböző technikák kombinációja ma már lehetővé teszi, hogy a sejtek egyedi és neuronhálózati működéséről összetett képet nyerjünk – patkányban. Jelentős hiányosságok mutatkoznak azonban az emberi hippocampus megváltozásának ismeretében kóros körülmények között. Számos alkalommal vizsgálták egyes neurokémiai markerek (Babb *et al.*, 1989; de Lanerolle *et al.*, 1989; Sloviter, 1989; Sundstrom *et al.*, 2001), vagy receptorok, transzmitterek szintjének és eloszlásának változását (Olney, 1978; Avoli, 1991; de Lanerolle *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 1992) (de Lanerolle *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 1992; Mathern *et al.*, 1998b; Mathern *et al.*, 1999) – de általában nem vizsgálták neuronhálózatban betöltött szerepét.

A gátló interneuronokat funkcionálisan 3 fő csoportba sorolhatjuk (Freund & Buzsaki, 1996). Két sejttípus a principális neuronokat innerválja. A periszomatikus gátlósejtek (kosársejtek és axo-axonikus sejtek) a principális sejtek sejttestjét, és proximális dendritjeit (Kosaka *et al.*, 1987) (kosársejtek) valamint axon iniciális szegmentumát (Somogyi *et al.*, 1983) (axo-axonikus sejtek, vagy ahogy Szentágothai professzor nevezte őket: chandellier sejtek) idegzik be, és a fősejtek kimenetét kontrollálják (Freund & Katona, 2007). A másik típus a dendritikus gátlósejtek csoportja, melyek a dendritikus régió különböző részeit innerválják, és valószínűleg a dendritekre beérkező serkentést és annak a sejttestig való eljutását befolyásolják (Freund & Buzsaki, 1996; Halasy *et al.*, 1996). A

harmadik típus nem principális sejteken, hanem más interneuronokon végződik, gátlósejteket gátol (interneuron-szelektív sejt) (Gulyas *et al.*, 1996). A három típus nem csak funkcionálisan, de neurokémiailag is elkülönül, GABA mellett különböző kalciumkötő fehérjék és neuropeptidek vannak bennük, így vizsgálatuk morfológiailag is lehetséges a megfelelő markerrel történő immunfestés segítségével (Freund & Buzsaki, 1996).

Az első táblázat mutatja be az egyes funkcionális interneuron típusokban jelenlévő neurokémiai markereket, kalciumkötő fehérjéket, neuropeptideket és receptorokat, melyeket felhasználtunk a sejttípusok azonosítására.

1. Táblázat. Az emberi hippocampus gátlósejtjeinek funkciói az őket jelölő marker alapján

Neurokémiai marker	Hippocampális	Forrás
	interneuron típus	
PARVALBUMIN	Kosár- és axo-axonikus	(Kosaka <i>et al.</i> , 1987)
Kalciumkötő fehérje	sejt,	(Somogyi et al., 1983)
	periszomatikus gátlás	
CALBINDIN	Dendritikus gátlás,	(Seress et al., 1991)
Kalciumkötő fehérje	+ axo-axonikus sejtben,	(Wittner <i>et al.</i> , 2002)
	részben periszomatikus	(Sloviter et al., 1991)
	gátló, az általunk talált	
	adatok alapján	
CALRETININ	Saját adatunk alapján:	(Urban <i>et al.</i> , 2002)
Kalciumkötő fehérje	Dendritikus és	(Nitsch & Leranth, 1993;
	interneuron specifikus	Nitsch & Ohm, 1995)
	gátlás,	
KOLECISZTOKININ	periszomatikus gátlás	(Lotstra &
Neuropeptid		Vanderhaeghen, 1987)
		(Katona <i>et al.</i> , 2000)
SZOMATOSZTATIN	Dendritikus gátlás	(Chan-Palay, 1987)
Neuropeptid		

NEUROPEPTID Y	Dendritikus gátlás	(Chan-Palay et al., 1986)
Neuropeptid		
P ANYAG RECEPTOR	Saját adatunk alapján:	(Toth <i>et al.</i> , 2007)
	dedritikus	
	gátlás+ismeretlen	
1. TÍPUSU	Dendritikus és	(Katona et al., 2000)
CANNABINOID	periszomatikus gátlás	
RECEPTOR		

I./3. A hippocampális sejtpusztulás általános jellemzői temporális lebeny eredetű epilepsziában

Principális sejtek érzékenysége: A humán hippocampusban epilepszia hatására kialakuló sejtpusztulási mintázatot Sommer (Sommer, 1880) írta le először: legérzékenyebbnek a hippocampus CA1 régió piramissejtjei bizonyultak, valamint az endfólium sejtejei (mohasejtek, CA3c piramissejtek és hiláris interneuronok). A limbikus struktúrákban (amygdala, entorhinális, perirhinális kérgek, habenula, középvonali thalamus magvak, temporális kérgi területek) szintén megfigyeltek neuronhálózat szintű elváltozásokat (Ben-Ari, 1987; 2001). A leggyakoribb és legszembeötlőbb epilepszia okozta elváltozás a hippocampusban a CA1 és CA3c régió piramissejtjeinek nagyarányú pusztulása, melyet egyes interneuronok pusztulása és a glia elemek mennyiségének megszaporodása (gliozis) kísér, a kórképet hippocampális sclerosisnak nevezik (Margerison & Corsellis, 1966a; Margerison & Corsellis, 1966b). (2. ábra, A, B). A scleroticus hippocampus atrófiás lesz, a CA1 régió nagyarányú sejtvesztése miatt a sejtrétegek nem különíthetők el többé, a strata pyramidale, radiatum és oriens összemosódik, csak a stratum lacunosum-moleculare különül el. A mohasejtek és CA3c piramissejtek egy része megőrződik, de jelentős részük hiánya miatt az endfolium sejtállománya megritkul.

2. Ábra. Calbindin-immunfestett metszetek illusztrálják a hippocampális szklerozist. Megfigyelhető a CA1 régió feltűnő összezsugorodása, a piramissejtek hiánya. A B ábrán nagyobb nagyítással is látható a szklerózis, a hippocampus réteghatárait szaggatott vonallal jelöltük. s.p.: str. pyramidale; s.r.: str. radiatum; s.l-m.: str. lacunosum-moleculare; s.m.: stratum moleculare; H: hilus; GD: gyrus dentatus; Subi: subiculum (Maglóczky, 2005; Magloczky, 2010)







Epilepsziás, scleroticus



A gátlósejtek érzékenysége: A gátlósejtek túlnyomó többsége megőrzödik az epilepsziás hippocampusban (Babb), azonban vannak speciális sejtcsoportok, calretinin (CR)- és somatostatin (SOM)- valamint Neuropeptid Y (NPY)-tartalmú gátlósejtek, melyek érzékenyek és epilepszia hatására elpusztulnak állatkísérletes modellben. Emberben leírták a SOM és NPY-tartalmú interneuronok axonsarjadzását is a sejtpusztulás mellett. Ezek a sejtek a hilusban vannak nagy tömegben jelen, ezért a megfigyelt hiláris interneuron pusztulás egy részét ezeknek a sejteknek az eltűnése okozza. A calbindin (CB)-tartlamú és cholecystokinin (CCK)-tartalmú sejtek rezisztenciájáról számoltak be mind állatkísérletes epilepszia modellekben, mind emberi hippocampuson végzett vizsgálatokban, míg a parvalbumin (PV)-tartalmú interneuronokat munkánk megkezdése előtt egyesek nagyon érzékenynek találták epilepsziára, míg mások megőrződéséről számoltak be. Még egy sejttípust vizsgáltunk, aminek neurokémiai sajátossága, hogy P anyag receptort fejez ki a felszínén (SPR-kifejező sejtek), ezeket nem vizsgálták emberi epilepsziában munkánk előtt.

Az emberen végzett vizsgálatok gyakori hiányossága, hogy a változásokat csak fénymikroszkópos szinten vizsgálják, és a sejtek közötti kapcsolatokat, a szinaptikus átrendeződést nem kutatják. Holott, emberi mintákon az egyes sejttípusok funkciójára csak a sejtek végződési mintázata alapján lehet következtetni, hiszen invivo vagy in vitro fiziológiai vizsgálatra vagy sejttöltésre pld. kontroll minták esetében nincsen lehetőség. A sejtek axonterminálisainak posztszinaptikus elemeiből azonban következtetni lehet, hogy periszomatikus vagy dendritikus gátlásban vesz-e részt az adott neurokémiailag azonosított sejttípus. Gyakran azért sem végeznek ilyen vizsgálatokat, mert nehéz megfelelő megőrzöttségű kontroll agyszövethez jutni, mely elektronmikroszkópos vizsgálatokra, különösen kvantitatív analízisre megfelelő lenne. Ily módon viszont csak rendkívül hiányos adatok állnak rendelkezésre az emberi szövetből, melyeket gyakran rossz megőrzöttségű kontroll mintákkal való összehasonlításokra alapoztak. Az állatkísérletes epilepszia modellekből származó adatok viszont pont az alapkérdésre nem tudnak választ adni: vajon a vizsgált jelenség megfelel-e annak, ami az epilepsziás emberek agyában történik.

Ezért célul tűztük ki az epilepsziás reorganizáció vizsgálatát temporális lebeny eredetű epilepsziában, hogy kvantitatív elektronmikroszkópos vizsgálatokkal feltárjuk a funkcionálisan különböző gátlósejtek számában, eloszlásában és kapcsoltaiban bekövetkező

változásokat, és ezek lehetséges szerepét a neuronhálózat működésének epilepsziában bekövetkező funkciózavarában.

II. A TANULMÁNY CÉLKITŰZÉSEI:

Az epilepsziás rohamokat sok sejt szinkron kisülése okozza, melyért a legvalószínűbb hipotézis szerint az elégtelen gátlás felelős. A principális sejtek aktivitását lokális gátló interneuronok szabályozzák, melyek három funkcionális csoportba sorolhatók: periszomatikus gátlósejtek, dendritikus gátlósejtek, valamint más interneuronokon végződő interneuronszelektív sejtek. A sejteket különböző neurokémiai markerek jelölik.

Ezeket a sejteket emberi hippocampusban nem vagy nem elég részletesen vizsgálták, sem kontroll alanyokban, sem temporális eredetű epilepsziás betegek műtétileg eltávolított hippocampusában, így szinaptikus reorganizációjukról és bemeneteik változásairól nem állt rendelkezésre elég adat ahhoz, hogy célzott, a neuronhálózat működését szabályozó gyógyszereket fejlesszünk.

Ezért a következő célokat tűztük ki:

1. Új immerziós fixálási módszer kidolgozása az emberi hippocampus post mortem és reszekciós mintáinak reprodukálható elektronmikroszkópos vizsgálatára

2. Az emberi hippocampus neurokémiailag azonosított gátlósejtjeinek funkcionális csoportosítása kvantitatív elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével, hogy ellenőrizzük, a patkányban már ismert funkciójú gátlósejtek ugyanazt a funkciót látják-e el emberi hippocampusban

3. Dendritikus és periszomatikus gátlásban résztvevő sejtek érzékenységének és szinaptikus reorganizációjának vizsgálata epilepsziás betegek műtétileg eltávolított hippocampusában, az epilepsziában elégtelenül működő gátlás neuronhálózati hátterének és patomechanizmusának feltárására.

4. A a gátlósejtek szinaptikus reorganizációjának összevetése az epilepsziás betegek hippocampusában található principálissejt pusztulással, annak megértésére, vajon a gátló neuronhálózatok átalakulása milyen szerepet játszik az epilepsziás sejtpusztulás kialakulásban

III. ANYAG és MÓDSZER

A PV, CB és CR-tartalmú valamint SPR-t és CB1-R-t expresszáló interneuronok morfológiai változásait vizsgáltuk 104 gyógyszerrezisztens temporális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő magyar, és 28 amerikai páciens agyából műtéti úton eltávolított és 11 kontroll humán agyból származó hippocampusban.

A felhasználásra kerülő kontroll idegszövetet a Lenhossék program bocsájtotta rendelkezésünkre, olyan elhunytakból származik, akiknek neurológiai megbetegedése nem volt. A kontroll személyek életkora 37 és 78 év között változott. A boncolást a Semmelweiss Egyetem Igazságügyi Kórbonctani Intézetében hajtották végre, az Egészségügyi Minisztérium és a Helsinki Deklaráció rendelkezéseinek megtartásával. A post mortem idő a vizsgálatba bevont kontroll idegszövet esetében 2-4 óra volt, kivéve abban az esetben, amikor a hosszú post mortem idő hatását vizsgáltuk, akkor 8-10 órás mintákat használtunk. Az epilepsziás idegszövetet terápiarezisztens temporális lebeny epilepsziában szenvedő betegek műtétileg eltávolított hippocampusa (elülső egyharmad) képezte. A vizsgálatokat a Kutatásetikai Bizottság rendelkezéseinek megtartásával (TUKEB 5-1/1996, kiterjesztve 2005) végeztük. A vizsgált epilepsziás anyag egy részét a csoportunkkal kollaborációban dolgozó Buzsáki György professzortól kaptuk, a műtéteket a New York University, School of Medicine-en végezték. A páciensek másik részét az Országos Idegsebészeti Tudományos Intézetben valamint a MÁV Kórházban műtötték. A betegek egy írásos beleegyező nyilatkozat adtak a műtét előtt, hogy tudományos célokra felhasználható az eltávolításra került szövet. A rohamok fókuszát video-EEG monitorozás, MRI SPECT és/vagy PET segítségével határozták meg, és standard anterior temporális lobectomiával (Spencer & Spencer, 1985) távolították el a temporális lebeny anterior

egyharmadát a temporomediális struktúrákkal együtt. Az összehasonlító és kvantitatív vizsgálatokhoz a hippocampus ugyanazon anterio-posterior kiterjedéséből származó régiót használtuk fel. Kihagytuk a kvantitatív vizsgálatokból a tumor-asszociált epilepsziában szenvedő betegek adatait.

III./1. Fixálás

A sebészi eltávolítás után a hippocampust 4-5 mm széles blokkokra vágtuk, és 4% paraformaldehidet, 0.05% glutáraldehidet és 0.2% pikrinsavat tartalmazó 0.1M (PB) alapú fixáló oldatba helyeztük (pH=7,2-7,4). Az agyszövetet fixáló oldatban rázógépre helyeztük, a fixálót 6 órán keresztül, minden félórában friss oldatra cseréltük, majd a blokkokat egy éjszakán keresztül ugyanabban a fixáló oldatban, de glutáraldehid nélkül utófixáltuk (Magloczky *et al.*, 1997). A 11 kontroll agyból nyolcat ugyanennek a fixálási folyamatnak vetettünk alá. A másik három kontroll agyat (HK2, HK10 és HK11) a halál beállta után két órával a koponyából kiszedve, a két-két arteria carotis internán, illetve vertebralison keresztül perfundáltuk, először fiziológiás sóoldattal (2 liter, 30 percen keresztül), majd fixáló oldattal, amely 4% paraformaldehidet és 0,2% pikrinsavat tartalmazott 0,1M PB-ben (4 liter, 1,5 órán keresztül). A hippocampust ezek után kivettük, 4-5 mm vastagságú blokkokra vágtuk, melyeket ugyanabban a fixáló oldatban, de glutáraldehid nélkül utófixáltunk egy éjszakán át, 4 C fokon. A blokkokból vibratómmal 60µm vastag metszeteket vágtunk, és egymást követő foszfát pufferes mosásokkal távolítottuk el a nem kötött fixálót, majd a metszeteket 30 % szacharóz oldatba helyeztük 1-2 napra. A krioprotektív oldatban a metszeteket 3-szor

megfagyasztottuk fólia csónakban folyékony nitrogén fölött, és vagy eppendorf csőbe helyezve eltartalékoltuk későbbi kísérletek céljára -80 °C fokon, vagy immunfestetettük.

III./2. Immuncitokémia

III./2.1. Egyszerű immunfestés

A foszfát pufferes mosások után TBS-be (TRIS-szel pufferelt fiziológiás sóoldat, pH=7.4) helyeztük át a metszeteket az inkubálás további lépéseihez, mivel a továbbiakban minden szérumot TBS-ben hígítottunk, és az egyes inkubációs lépések között TBS-sel (3X10 perc) mostuk a metszeteket. Az endogén peroxidáz blokkolására H₂O₂ 1%-os oldatát tettük a metszetekre, 10 percre. TBS-ben történő mosás után blokkoló anyagot (5%-os tejpor és 2% BSA keveréke) tettünk a metszetekre, 1 órára, a nem specifikus fehérje kötés csökkentése érdekében. Ezt követte a primer szérumokban történő inkubáció 2 napig, 4°C-on. (Kalciumkötő fehérjék: parvalbumin (PV), calbindin (CB), calretinin CR), Substance P receptor (SPR), glutamát receptor 2-3 alegysége (GluR2/3), glial fibrillal acidic protein (GFAP), CB1 cannabinoid receptor (CB1-R), kolecisztokinin (CCK), somatostatin (SOM), neeuropeptid Y (NPY), vezikuláris glutamát transzporter 1 (vGlut1), Nuclearis neurofilament N (NeuN). A pontos higításokat a 2. táblázat mutatja).

Az antitestek specificitását a forrás tesztelte. Minden antitest festési mintázatát mi is megvizsgáltuk, állati és emberi szöveten, többféle koncentrációban, hogy az optimális alkalmazási körülményeket megállapítsuk. Azokban az esetekben, ahol több antitestet is használtunk, minden esetben külön kísérletben vetettük össze az antitestek festését, hogy megbizonyosodjunk, ugyanazt festik. Egy kísérletsorozatban mindig ugyanazt az antitestet

használtuk. A táblázat azért tartalmazhat bizonyos markerekből többfélét, mert az elmúlt 18 évben az adott antitest elfogyott, és másikra tértünk át, vagy mert kettős festésekhez más állatból készült antitestre volt szükség.

2. Táblázat. A felhasznált antitestek és higításaik egyszerű immunfestés alkalmazása esetén

Primer	gazdaállat	Alkalmazott	Forrás
ellenanyag		higítás	
PV	nyúl	1:1000	(Baimbridge & Miller, 1982) Code No.
			R301
PV	egér	1:5000	Sigma, St. Louis, MO
СВ	nyúl	1:1000	(Baimbridge & Miller, 1982) Code No.
			R202
СВ	egér	1:1000	SWANT, Bellinzona, Switzerland
CR	nyúl	1:5000	(Winsky et al., 1989)
CR	nyúl	1:5000	SWANT, Bellinzona, Switzerland
SPR	nyúl	1:1000	(Shigemoto et al., 1993)
GluR2&3	nyúl	1:100	Chemicon, Temecula
NeuN	egér	1:2000	Chemicon, Temecula
NPY	nyúl	1:20000	(Csiffary et al., 1990)
SOM	patkány	1:100	Chemicon Temecula,
ССК	egér	1:3000	CURE Gastroenteric Biology Center, Los
			Angeles, CA

CCK	rabbit	1:10000	(Gulyas et al., 1990)
ССК	egér	1:1000	JN Walsh, UCLA
GFAP	egér	1:2000	Chemicon, Temecula
vGlut1	nyúl	1:10000	Synaptic System
CB1-R	nyúl	1:1000	(Tsou et al., 1998)
			(Hajos et al., 2000)

Ezután a primer szérumot felismerő biotinilált szekunder szérumot tettünk a metszetekre 2 órára (Vectastain kit, Vector; 1:250). Ezt követte az avidin-biotintormaperoxidáz komplexszel történő inkubáció (ABC, Vector 1:250) 1.5 óráig. A metszeteket kimossuk TBS-ben, majd TRIS pufferben (TB, pH=7.6) és 0.05M koncentrációjú DAB-ban (3,3'-diaminobenzidin-4HCl) előinkubáltuk 20 percig, majd a DAB kromogénhez 0.01%-os hidrogénperoxidot adva előhívtuk. Az immunpozitív sejtekben barna reakció végtermék halmozódott fel.

A metszeteket ozmifikáltuk (1% OsO₄, 40 percig), felszálló etanol sorban (1% uranil-acetátot tettünk a 70%-os alkoholba, 40 percig) és propilénoxidban dehidráltuk, majd Durcupanba (ACM; Fluka) ágyaztuk. A fénymikroszkópos vizsgálat után a részletes vizsgálatot igénylő területeket átágyaztuk, ultramikrotómmal sorozatmetszetet készítettünk belőlük és elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (Hitachi 7100). A kontroll szövetet ugyanazoknak az eljárásoknak vetettük alá.

Egyszerű fluoreszcens immunfestést alaklmaztunk a CB1-R-immunfestett rostok sűrűségének kvantifikálásához epilepsziás betegek gyrus dentatusában. A secunder szérumig a kísérlet lépései megegyeznek a fent közöltekkel. A kísérletekben két kontroll (HK3, HK4) és 10 epilepsziás, 2 foltos típusú (HE 30, 31) és 8 szklerotikus beteg (HE53,

60, 63, 72, 75, 86, 114, 115) hippocampusait használtuk fel, esetenként 2-3 metszetet. A flureszcens Cy3-kötött szamár-anti-nyúl IgG (1:200) kimosása után a metszeteket Vectashielddel fedtük, majd konfokális lézer scanning mikroszkópban vizsgáltuk és denzitometráltuk. Az adatokat Statistica programcsomaggal értékeltük ki, Mann-Whitney U-tesztet és ANOVA-t végeztünk.

III./2.2. Kettős fluorescens immunfestés

<u>A PV-CB interneuronok átfedéséhez</u>: A kettős immunfluoreszcens festéshez a poliklonális nyúl-anti-calbindin-d28k primer (1:1000) szérumot a monoklonális egér-antiparvalbumin primer antitesttel keverve használtuk (1:1000, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA). Cy3-kötött szamár-anti-nyúl IgG (1:200) illetve FITC-kötött kecske-anti- egér IgG (1:100, mindkettő Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) volt a szekunder, fluoreszcens antitest, melyet 3 órára tettünk a metszetekre, rázógépen, szobahőmérsékleten. 3 órás sötétben való inkubáció és 4x10 perc TBS mosás után a metszeteket Vectashield-del lefedtük.

<u>Az SPR-expresszáló sejtek kolokalizációs vizsgálatához:</u> Az SPR-t expresszáló interneuronok kolokalizációját más neurokémiai markerekkel fluorescens immunfestéssel ellenőriztük. A következő primer ellenanyagokat használtuk: poliklonális nyúl-anti SPR (1:1000, (Shigemoto *et al.*, 1993), monoklonális egér-anti calbindin (CB) (1:1000, SWANT, Bellinzona), monoklonális egér-anti parvalbumin (PV) (1:1000, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA), poliklonális egér-anti (CR) (1:1000, SWANT, Bellinzona, Switzerland), poliklonális egér-anti kolecisztokinin (CCK) (1:1000, JN Walsh, UCLA), monoklonális patkány-anti szomatosztatin (SOM) (1:50, CHEMICON International, Temecula, CA, USA). TBS-ben való mosás után (3x10 perc) CY3-konjugált kecske-anti-nyúl (1:200, Jackson

ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), Alexa-konjugált szamár-anti-egér (1:100, Molecular Probes, Eugene, USA), Alexa-488-konjugált kecske-anti-egér (1:100, Molecular Probes, Eugene, USA), FITC-konjugált kecske-anti patkány (1:50, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) szekunder ellenanyagokat használtunk.

3 órás sötétben való inkubáció és 4x10 perc TBS mosás után a metszeteket Vectashield-del lefedtük.

A kettős fluorescens metszeteket Zeiss Axioplan 2 mikroszkóppal vizsgáltuk.

III./2.3. CR-CB kettős immunfestés

Az eljárás hasonló volt a fentebb vázolt egyszeres immunfestéshez. Az endogén peroxidáz blokkolására H₂O₂ 1%-os oldatát tettük a metszetekre, 10 percre. TBS-ben történő mosás után 10%-os normál ló szérumot alkalmaztunk (Vector, 40 min) a nemspecifikus fehérjekötés csökkentése érdekében. Ezután először monoklonális egér-anti CR (1:5000, SWANT, Bellinzona, Switzerland) primer szérumban inkubáltuk a metszeteket 2 napig, 4 °C-on. Ezt követte a biotinilált ló-anti-egér IgG szekunder szérum (1:250, 2 óra, Vector), majd az Elite ABC (1:300, 1.5 h, Vector). Ezúttal a CR-t ammonium nikkelszulfáttal intenzifikált DAB kromogénnel hívtuk elő (DAB-Ni, fekete színű csapadék). Az első immunreakció után a metszeteket alaposan mostuk TBS-ben (4x10 min), majd a nemspecifikus fehérjekötés csökkentése érdekében 10%-os normál kecske szérumot alkalmaztunk (Vector, 20 min). Ezután poliklonális nyúl-anti CB (1:1000, Baimbridge és Miller 1982) primer szérumban inkubáltuk a metszeteket 2 napig, 4 °C-on. Ezt követte a biotinilált kecske-anti-nyúl IgG szekunder szérum (1:250, 2 óra, Vector), majd az ABC (1:250, 1.5 h, Vector). A második immunreakciót DAB kromogénnel hívtuk elő (barna

csapadék). A metszeteket felszálló etanol sorban és propilénoxidban dehidráltuk (ozmifikálás és uranil-acetát nélkül) és Durcupanba (ACM; Fluka) ágyaztuk. Az immunjelölt elemek a színkülönbség alapján megkülönböztethetőek voltak fénymikroszkópos szinten (a CR-immunfestettek feketék, a CB-immunpozitívak barnák) (Toth *et al.*, 2010).

III./3. Kvantitatív analízis

III./3.1. A CB-pozitív interneuronok méreteloszlásának meghatározása

A calbindin-tartalmú interneuronok méretének és sejtátmérőinek megállapításához a sejteket camera lucidával kirajzoltuk. A kontroll, a HE15., 16., 18., 21. és 22. számú műtétekből származó hippocampus két-két metszetének gyrus dentatusában található összes CB-tartalmú interneuron sejttestének rajzát felhasználtuk a vizsgálathoz. A rajzokat egy asztali scanner segítségével számítógépre vittük, majd az NIH Image programot (Wayne Rasband, National Institutes of Health) alkalmazva mértük meg a sejtek területét, hosszú és rövid átmérőjét (Magloczky *et al.*, 2000).

III./3.2. Sejtszámolás

<u>A PV-tartalmú sejtek területegységenkénti számának</u> megállapításához a kontrollból (HK10 és HK11), illetve egy enyhe típusú (HE40), három foltos típusú (HE15, HE16, HE31) és öt Szklerotikus (HE9, HE11, HE19, HE21, HE22) epilepsziás mintákból rajzoltunk ki camera lucida segítségével gyrus dentatus metszeteket a bennük levő összes sejttel. A

metszetek méretét az NIH Image programmal mértük meg, a sejtszámot 1 mm² területegységre állapítottuk meg külön a str. granulosum+moleculareban, illetve a hilusban (Wittner *et al.*, 2001).

<u>Az SPR-pozitív sejtek mennyiségének változását</u> a CA1 régióban vizsgáltuk. Az SPR-jelölt sejtek területegységre eső számának megállapításához a kontrollból (HK6, HK10, HK11) és az epilepsziás mintákból (nem-szklerotikus: HH24, HH28, HH81, HH9, HH33, HH34, HH96; szklerotikus: HH5, HH15, HH20, HH27, HH3, HH16) camera lucida segítségével kirajzoltuk 2-4 reprezentatív metszet CA1 régióját a benne levő összes SPRjelölt sejttel. A rajzokat lekicsinyítettük, és bepásztáztuk. A CA1 régió területét NIH Image J (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD) program segítségével határoztuk meg. A kontroll és az epilepsziás mintákból készült rajzokon megszámoltuk a sejteket és a sejtszámot területegységre vonatkoztatva adtuk meg (mm2). Az adatokat a Statistica 6.0 programmal értékeltük ki, Mann-Whitney U-tesztet és ANOVA-t alkalmaztunk (Toth *et al.*, 2007).

<u>A CR-tartalmú sejtek mennyiségét</u> a hippocampus összes régiójában meg vizsgáltuk. 3-4 reprezentatív metszetet camera lucidával kirajzoltunk különböző post mortem idejű kontroll mintákból (rövid post mortem idejű: 2-4 h: HK6, HK7, HK10 és hosszú post mortem idejű: 8-10 h: HK1, HK14, HK15) és különböző patológiai csoportba tartozó epilepsziás mintákból (nem-szklerotikus: HE47, HE67, HE72, HE79, HE109, HE134, HE138; szklerotikus: HE22, HE60, HE83, HE90, HE91). A rajzokat lekicsinyítettük, és bepásztáztuk. Az egyes régiók területét NIH Image J (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD) program segítségével határoztuk meg. A metszetekből készült rajzokon megszámoltuk a sejteket és a sejtszámot területegységre vonatkoztatva adtuk meg (mm²). Külön mértük a következő régiókat: CA1, CA3, hilus, str. granulosum + str. moleculare. A

str. granulosumot és moleculare-t összevontuk, mert egyes epilepsziás mintákban ezek határa nem állapítható meg pontosan, a szemcsesejtek szétvándorlása miatt. A CA1 régió esetében a sejtszámot a régió egységnyi hosszára (mm) is megadtuk a szklerotikus CA1 radiális zsugorodása miatt. A CA1 régió hosszát a középvonalban mértük. A str. moleculare és a fissura határán elhelyezkedő, CR-pozitív, feltételezhetően Cajal-Retzius sejtek számát külön is meghatároztuk és a str. moleculare külső határának egységnyi hosszára adtuk meg. Mivel nem találtunk szignifikáns különbséget az epilepsziás enyhe és foltos típus között, ezek adatait összevontuk, és a továbbiakban nem-szklerotikusként említjük. Az adatokat a Statistica 6.0 programmal értékeltük ki, Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk (Toth *et al.*, 2010).

SPR-pozitív interneuronok dendritelágazási pontjainak meghatározása

Az SPR-pozitív sejtek dendritelágazási pontok számának változását vizsgáltuk kontroll és epilepsziás mintákban. Ehhez a CA1 régió szegmenseiből sejteket rajzoltunk ki (a teljes dendritfájukkal együtt) camera lucida segítségével mintánként 3-4 metszetből (kontroll: HK6, HK10; epilepsziás enyhe típus: HH24, HH28; foltos típus: HH9, HH33 és szklerotikus: HH5, HH16, HH27). A rajzokon meghatároztuk az egyes sejtek dendritelágazási pontjainak a számát. Az adatokat a Statistica 6.0 programmal értékeltük ki, Mann-Whitney U-tesztet és ANOVA-t alkalmaztunk (Toth *et al.*, 2007).

III./3.3. A szinaptikus reorganizáció vizsgálata

<u>A PV- és CB-immunpozitív terminálisok</u> célelemeinek megoszlásához egymáshoz hasonló méretű blokkokat ágyaztunk át, majd sorozatmetszeteket készítettünk. Minden tizedik metszetben vizsgáltuk a terminálisok célelemeit, hogy elkerüljük ugyanannak az axonterminálisnak a kétszeri

számolását. A metszeteket szisztematikusan végignéztük és minden jelölt terminálist, amely szinaptizált, lefényképeztünk. Ezek után meghatároztuk az immunpozitív terminálisok posztszinaptikus targeteinek relatív megoszlását. A CB-immunreaktív terminálisok esetében megállapítottuk a szimmetrikus-aszimmetrikus szinapszist adó terminálisok arányát, illetve a CBpozitív posztszinaptikus targetek arányát is. A gyrus dentatusban a PV-pozitív terminálisok célelemeinek megállapításához két kontrollból (HK3 és HK5), illetve négy műtétből (HE9, 11, 21, 22, szklerotikus típus) vettünk mintát úgy, hogy a szemcsesejtréteg teljes szélességében beleesett. A CA1 régióból pedig négy kontrollból (HK2, 6, 10, 11) és négy epilepsziás szövetből (HE 40, 54, enyhe típus, és HE15, 31, foltos típus) ágyaztunk át blokkokat úgy, hogy azok a str. pyramidale teljes szélességét tartalmazták. A kvantitatív analízisekhez a 15. műtétben elkülönítettük a piramissejteket tartalmazó (15MPS+), illetve nem tartalmazó (15MPS-) foltokat, ezekből külön ágyaztunk át blokkokat. A CB-tartalmú axonok célelemeinek vizsgálatához a CA1 régióban három kontroll szövetet (HK6, HK10, HK11), két enyhe típusú (HE40, 54), és három szklerotikus típusú (HE21, 35, 37) epilepsziás hippocampust vizsgáltunk. A CA1 régió különböző rétegeiből külön blokkokat ágyaztunk át, mindegyik tartalmazta az adott réteget teljes szélességében: str. oriens, str. pyramidale+radiatum, illetve str. lacunosum-moleculare a kontroll és az enyhe típusú epilepsziás minták esetében, míg str. oriens+pyramidale+radiatum és str. lacunosum-moleculare a szklerotikus epilepsziás minták esetében (Wittner et al., 2002; Wittner et al., 2005).

<u>A CB1-R immunfestett terminálisok szinaptikus célelem megoszlását</u> két kontroll (HK11, HK14) és három szklerotikus epilepsziás alany (HE21, 60, 75) gyrus dentatusából származó mintákban végeztük. A gyrus dentatusokból egymáshoz hasonló méretű, a str. granulosum+moleculare teljes szélessét tartalmazó blokkokat ágyaztunk át, ebben minden szinaptizáló CB1-R-pozitív terminálist lefényképeztünk, és a posztszinaptikus elemeket (sejttest, dendrit, tüske) elektronmikroszkópos morfológiájuk alapján meghatároztuk (Magloczky *et al.*, 2010).

SPR-pozitív interneuronok szinaptikus borítottságának meghatározása

Az SPR-pozitív elemek szinaptikus borítottságának kvantifikálásához a str. orienst, pyramidale-t és radiatumot átágyaztuk a CA1 régióból kontroll (HK10, HK11) és epilepsziás mintákból (enyhe: HH24, HH67; foltos: HH9, HH33, HH84; szklerotikus: HH5, HH6, HH15) és lemetszettük elektronmikroszkópos vizsgálatra. A szklerotikus esetekben a str. oriens, pyramidale és radiatum nem elkülöníthető ezért egybe ágyaztuk át. A szisztematikus random mintavételezés szabályainak megfelelően minden tizedik metszetet vizsgáltuk, hogy elkerüljük ugyanannak a profilnak az ismételt előfordulását. Metszetenként az összes SPR-jelölt dendritet megkerestük, és 20000-szeres nagyítás mellett lefényképeztük (vizsgált dendritek száma: n=257 kontroll, n=168 enyhe, n=377 foltos és n=205 szklerotikus esetekben). A dendrit profilok kerületét és a szinaptikus aktív zónák hosszát NIH ImageJ program (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD) segítségével határoztuk meg. A szinaptikus borítottságot "µm szinapszishossz/100 µm dendritkerület" egységben adtuk meg. Az adatokat a Statistica 6.0 programmal értékeltük ki, Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk (Toth *et al.*, 2007).

A CR-pozitív interneuronok posztszinaptikus célelem eloszlásának meghatározása

A CR-pozitív axon terminálisok posztszinaptikus célelemeinek eloszlását vizsgáltuk 2 perfúzióval fixált kontroll mintában (10, 11) és epilepsziás szövetekben (enyhe: HE54, foltos: HE79, 38; szklerotikus: HE21, 71, 75). A str. orienst, pyramidale-t, radiatumot és lacunosummoleculare-t átágyaztuk a CA1 régióból, és lemetszettük elektronmikroszkópiára. A szklerotikus esetekben a str. oriens, pyramidale és radiatum nem elkülöníthető ezért egybe ágyaztuk át. A szisztematikus random mintavételezés szabályainak megfelelően minden tizedik metszetet vizsgáltuk, hogy elkerüljük ugyanannak a profilnak az ismételt előfordulását. A metszeteket alaposan átnéztük és minden CR-pozitív terminálist lefényképeztünk 20000-es vagy 30000-es nagyítás mellett, és meghatároztuk a CR-pozitív terminálisok posztszinaptikus célelemeit. Mivel nem találtunk szignifikáns különbséget az epilepsziás enyhe és foltos típus között, ezek adatait összevontuk, és a továbbiakban nem-szklerotikusként említjük (Urban *et al.*, 2002; Toth *et al.*, 2010)

IV. EREDMÉNYEK

IV./1. Immerziós fixálási eljárás reszekciós és post mortem minták esetén: új módszer kidolgozása

Az emberi agyszövetet, akár műtéti kivételből, akár post mortem kontroll agyakból származnak, immerziós fixálásnak vetik alá a leggyakrabban. Ebben az esetben a szövetblokkot fixáló oldatba merítik egy bizonyos időre, majd kiveszik belőle és metszik/kísérletbe vonják. Munkám kezdetén feltűnt, hogy rendkívül variál, ki, milyen hosszú időre, mekkora agydarabot és milyen fixálóba tesz. Sok esetben a cikkekben sem tértek ki ennek részletezésére, kivéve a fixáló oldat megadását. Én viszont azt tapasztaltam, hogy jelentős eltéréseket okoz a fixálás időtartama és a blokk mérete.

A körülmények tisztázására és standardizálására kísérletekbe kezdtem, mivel esetünkben alapvető jelentőségű volt, hogy olyan fixálási protokollt használjunk, amely reprodukálható, azonos körülmények között azonos eredményre vezet, és lehetővé teszi nem csak a minták immuncitokémiai vizsgálatát, hanem elektronmikroszkópos kvantitatív összehasonlítások elvégzését is.

Hamar kiderült, hogy a fő probléma a fixáló oldat penetrációjának elégtelensége, ami Zamboni-fixáló alkalmazása mellett a blokkok felszíni és belseje közötti sárga szín intenzitásának változásában azonnal látható volt. Kezdetben csak akkor sikerült elérni a blokkok belsejének fixálódását, ha a blokkokat legalább egy hétig fixáló oldatban hagytam, ezután viszont sokat romlott a szövet antigenecitása, ráadásul az immunfestés minősége metszetről-metszetre változott.

Ezért változtatni kezdtem a blokk méretét, a fixálás idejét, és bevezettem a blokkot tartalmazó edény rázógépre való helyezését, valamint a fixáló oldat rendszeres időközönkénti lecserélését friss oldatra. A metszeteket mind fénymikroszkópban, mind elektronmikroszkópban megvizsgáltam immuncitokémiai eljárások után, kontroll és epilepsziás betegekből származó mintákban.

Azt találtam, hogy a rázógépen való immerziós fixálás lényegesen javítja a blokkok megőrzöttségét, a penetráció megnövekszik, azonos mértékben és gyorsan befixálódik a blokkok belseje és külseje is, vigyázni kell azonban a fixálás idejére, mert így könnyű túlfixálni a blokkokat, ami már az immunreakció rovására megy. Jelentős tényező a blokkok mérete és a blokkok vastagsága is.

Azok az "ideális" körülmények, amik között én reprodukáható és immuncitokémiai vizsgálatokra fény- és elektronmikroszkópos szinten is megfelelő fixálódást kaptam, a következőek:

- 4-5 mm vastag, maximum 1-1,5cm X 1-1,5 cm blokknagyság

- A kivágott blokkok lehetőség szerint azonnali fixáló oldatba helyezése

 A fixálós edényke rázógépen való mozgatása, úgy, hogy az oldat éppen ellepi a blokkot, így az mozog és folyamatosan új oldattal találkozik.

 A fixálóoldat frissre cserélése 20-30 percenként, legalább 6, de nem több mint 8 órán keresztül, szobahőn

- A fixált blokk glutármentes utófixálása 4 C fokon, rázás nélkül, egy éjszakán át

- Ezután a blokkot ki kell venni a fixálóból, és pufferben kimosni, a túlfixálás elkerülésére.

Ez a módszer lehetővé tette, hogy az egy blokkból való metszetek fixáltsága, a rajtuk végzett immunfestés, és a belőlük készült elektronmikroszkópos minta azonos minőségű legyen, és különböző agyakból származó, azonos módszerrel fixált minták is összehasonlíthatóak legyenek egymással (Magloczky *et al.*, 1997).

IV./1.1. Patkánykontroll alkalmazása a fixálás modellezésére

Hogy biztosak legyünk az eredményben, patkányon is megismételtük a fentebb vázolt fixálási módszert. Túlaltattam két patkányt, majd cervicalis dislocatioval megöltem őket. Az egyiket azonnal lefejeztem, az agyat kiemeltem a koponyából, a humán
hippocampusból származóhoz hasonló méretű blokkot készítettem belőle, és ugyanúgy fixáltam, ahogy az emberi hippocampus blokkokat. A másik patkány esetében vártam 2 órát, majd ugyanezt az eljárást követtem. Másnap a blokkokat lemetszettem, és immunfestettem CB, PV és CR antitestekkel. A CB immunfestésben nem mutatkozott különbség az azonnali és a 2 óra post mortem immerziósan fixált minták között. A PV immunfestés is nagyon hasonló volt, a CA3-ban és a hilusban megfigyeltem néhány torz, gyöngyözött dendritet. A CR immunfestés is nagyon hasonló volt a sejtek számát és eloszlását tekintve, de a 2 óra post mortem késéssel fixált mintákban minden régióban lehetett látni néhány gyöngyözött dendritű sejtet, noha a sejtek túlnyomó többsége síma dendritű és normális morfológiájú volt.

Így megállapítottuk, hogy az alkalmazott immerziós fixálási eljárás rövid post mortem idejű minták esetében kielégítő, kvantitatív összehasonlító vizsgálatokat is lehetővé tevő megőrzöttséget eredményez (Wittner *et al.*, 2001).

IV./1.2. A post mortem idő

A post mortem idő a következő kulcstényezője a kontroll agyak megőrzöttségének. A halál utáni oxigén- és energia-szegény állapotban gyorsan megindul a sejtek bomlása, mitokondriumok, membránfehérjék, a citoszkeleton, DNS szétesése. Azt tapasztaltuk, hogy bizonyos marker-tartalmú sejtek (pld. PV, SPR, CB1-R) alig érzékenyek a 8 órán belüli post mortem időben történő fixálásra, míg mások (pld. CR) különösen sérülékenyek, és 4 óránál későbbi post mortem idő esetén szignifikánsan romlik az elemek megőrzöttsége és az immunfestés minősége.

Az elektronmikroszkópos megőrzöttség minősége fordítottan aránylott a post mortem idő hosszához, mennyiségi elektronmikroszkópos elemzéseket mindig csak a legrövidebb, 2-4 órás post mortem idejű mintákon végeztünk.

A kontroll személyek életkora is befolyásolhatja az immunfestés minőségét, valószínűleg az időekbb alanyokban gyakrabban előforduló arteriosclerosis miatt, ezért azokat a betegeket, akiknél a patológiai vizsgálat arteriosclerosist talált, kizártuk, és kvantitatív analízist csak 70 évnél fiatalabb kontrollokon végeztünk.

IV./2. A hippocampális sejtpusztulás és rostsarjadzás általános jellemzésén alapuló patológiai csoportosítás

Többféle neurokémiai markerrel festettük a műtéti mintákból származó hippocampusokat annak feltárására, hogy milyen általános sejtpusztulási mintázatok fordulnak elő, és az egyes markerek által feltárt változások hogyan kombinálódnak egymással, felfedezhető-e egyfajta általános mintázat. A principálissejteket NeuN-nel és GluR2/3-mal tettük láthatóvá, a serkentő rostokat vGlut1-gyel, a gátlósejteket pedig neuropeptidek, kalciumkötő fehérjék és sejtfelszíni receptorok elleni immunfestéssel tettük láthatóvá (1. táblázat).

A betegek műtétileg eltávolított hippocampusaiban különböző elváltozásokat találtunk. A principális sejtek pusztulásának mértéke alapján négy típust állítottunk fel (Wittner *et al.*, 2005). A vizsgált interneuronális változások szorosan korrelláltak a principális sejtek pusztulásával, az érzékeny idegsejtek száma, a neurokémiai változások, a morfológiai torzulások gyakorisága és az axonsarjadzás mennyisége együtt változott a principális sejtek pusztulásával (3. ábra). Az osztályozásnál fokozozott figyelmet fordítottunk a CA1 régió piramissejtjeinek meglétére, mivel ezek képezik a hippocampus fő kimenetét a subiculum felé, és így kulcsszerepet játszanak a hippocampális-entorhinális szinaptikus kör záródásában (Wittner *et al.*, 2001; Maglóczky, 2005; Wittner *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2007; Magloczky, 2010; Toth *et al.*, 2010).

A patológiai típusok:

1. "**Enyhe**" típus, a principális sejtek száma, eloszlása alig különbözik a kontrolltól. A gyrus dentatus szemcsesejtjei, és a CA1 régió piramissejtjeiben

megfogyatkozik a CB mennyisége. Az érzékeny, CR-tartalmú idegsejtek száma elsősorban a hilus területén lecsökken.

2. "Foltos" típus, a CA1 régió piramissejtjei foltokban pusztulnak, de az anatómiai határok és rétegek megtartottak. A CB mennyisége lecsökken a principális sejtekben, a szemcsesejtréteg esetenként megduplázódik, de szemcsesejt diszperzió nagyon ritkán figyelhető meg. Az érzékeny interneuronok morfológiai elváltozásokat mutatnak, egyesek száma csökken. A moharostok sarjadzása fénymikroszkóposan is megfigyelhető a stratum moleculareban. Az első két típust összevonva mint nem-szklerotikus eseteket is említjük a változások leírása folyamán.

3. "**Szklerotikus**" típus, a CA1 régió piramissejtjeinek több, mint 90%-a hiányzik, a szemcsesejtréteg majdnem minden esetben diszpergált, szétvándorolt, CB tartalmuk részben vagy egészen hiányzik, szembeötlő a mohasejtek és CA3c piramissejtek részleges pusztulása, az érzékeny gátlósejtek drámai számcsökkenése. A rostsarjadzás feltűnő, különösen a gyrus dentatusban, de a sclerotikus CA1 régió fő tömegét is axonterminálisok alkotják a gliális elemek mellett.

4. "**Gliotikus**" típus, amelyben a szklerotikus mintákban megfigyelt érzékeny sejtek mellett a "rezisztens", más betegek hippocampusában túlélő idegsejtek is nagy számban pusztulnak, úm. a szemcsesejtek vagy a CB-tartalmú interneuronok. Ritkán fordult elő.

39

3. Ábra. A patológiai típusok

A típusokba sorolt egy-egy beteg hippocampusát a principálissejtek rétegével (kék) camera lucidával kirajzoltam. A nyilak a CA1 régió vastagságát mutatják, a szklerotikus és gliotikus esetekben a piramissejtek pusztulása miatt ez nagyon vékony. A foltos típusban a CA1 régióban foltokban hiányzó piramissejteket feketével satírozott területek jelzik. (Maglóczky, 2005)



A sejtpusztulási mintázat alapján hasonlóan csoportosították az epilepsziás betegeket de Lanerolle és munkatársai is (de Lanerolle *et al.*, 2003), de ők 5 csoportot hoztak létre, és nem találtak moharost sarjadzást a nem-szklerotikus típusokban, míg az általunk vizsgált betegekben ez minden típusban megfigyelhető volt (Magloczky *et al.*, 1997).

IV./2.1. A vizsgálatba bevont betegek patológiai típusai

Észrevettük, hogy a gyerekekből és serdülőkből származó hippocampus minták jellegzetességei eltérnek a felnőttek mintáitól. A minták messze túlnyomó többségét a felnőttekből származó hippocampusok adták, az eltérések vizsgálatához nem volt elég fiatal alany. A 18 évnél fiatalabb betegeket ezért kizártuk a vizsgálatokból (Magloczky, 2010).

A betegek egy részének epilepszia megbetegedésen kívül agytumora is volt. A vizsgálatból kizártuk azokat a betegeket, akiknél tumoros beszűrődés volt megfigyelhető a hippocampus állományában. A beszűrődésektől mentes hippocampusú tumoros betegekben ugyanazokat a patlógiai elváltozásokat találtuk, mint a nem-tumoros betegek hippocampusában, de időnként előfordultak olyan elváltozások is, amelyek a többi betegekben sokkal ritkábbak voltak, pld. a szemcsesejt réteg megduplázódása. Hogy elkerüljük az esetleg egyéb megbetegedéshez köthető elváltozások vizsgálatát, a tumoros betegek összességét kizártuk az elektronmikroszkópos kvantifikációs vizsgálatokból.

Nem vizsgáltuk a gliotikus csoportba eső betegeket sem, az alacsony mintaszám miatt.

3. Táblázat. A 18 évnél idősebb TLE betegek megoszlása a különböző patológai

csoportokban

A patológiai csoportosítást a principális sejtek számának csökkenése, a serkentő pályák sarjadzása és egyes interneuron típusok számának csökkenése alapján alakítottuk ki. **1**. "Enyhe" típus, a principális sejtek száma, eloszlása alig különbözik a kontrolltól. **2**. "Foltos" típus, a CA1 régió piramissejtjei foltokban pusztulnak, de az anatómiai határok és rétegek megtartottak. **3**. "Szklerotikus" vagy sarjadzó típus, a CA1 régió piramissejtjeinek több, mint 90%-a hiányzik, a szemcsesejtréteg majdnem minden esetben diszpergált. A rostsarjadzás feltűnő.

4. "Gliotikus" típus, amelyben a scleroticus mintákban megfigyelt érzékeny sejtek mellett a "rezisztens", más betegek hippocampusában túlélő idegsejtek is nagy számban pusztulnak, úm. a szemcsesejtek vagy a calbindin-tartalmú interneuronok (Magloczky, 2010).

A TLE betegek	Százalékos	Átlagos életkor (év)	Az epilepsziabetegség
csoportosítása	gyakoriság az		fennállásának átlagos hossza
sejtpusztulás és	összes	Minimum/maximum	(év)
rostsarjadzás	betegre	életkor a csoporton	
alapján	vonatkoztatva	belül(év)	Minimum/maximum
	(N=104)		fennállási hossz a csoporton
			belül (év)
1. Típus	18,3%	34,2	14,3
ENYHE	N=19		
		18/56	0,5/39
2. Típus	25%	35,9	19,4
FOLTOS	N=26		
		18/63	0,2/40
3. Típus	49%	38,2	18,55
SZKLERO-	N=51		
TIKUS		20/68	0,2/48
4. Típus	7,7%	35,6	14,4
GLIOTIKUS	N=8		
		18/52	2/37

Megfigyelhető, hogy a legtöbb beteg szklerotikus volt, a legkevesebb beteget a gliotikus csoportban találhatjuk. Feltűnő az is, hogy a betegek átlagos életkora illetve az epilepszia betegség fennállásának átlagos hossza nem korrelál a sejtpusztulás súlyosságával, noha a minimum/maximum fennállási időtartam is nagyon hasonló a csoportok között.

4. Táblázat. A morfológiai vizsgálatokban felhasznált magyar betegek csoportosítása a fennáló hippocampális elváltozások alapján

Patológiai	Beteg	Nem	Kor	Kor (év) az	Az epilepszia
csoport	Kód-		(év)	epilepszia	fennállásának
	száma			kezdetén.	időtartama (év)
	(HE)				
ENYHE	6	F	34	20	14
	40	F	20	6	14
(1. típus)	54	N	22	15	7
	58	Ν	23	12	11
	67	N	23	17	6
	79	F	47	8	39
	134	Ν	39	25	14
	138	Ν	50	19	31
FOLTOS	15	F	25	8	17
(2. típus)	16	F	33	26	7
	25	F	R	19	24
	26	F	52	15	37
	30	N	40	1	39
	31	Ν	23	2	21
	41	F	16	2	14
	42	N	43	13	30
	46	N	37	37	2 hónap
	47	Ν	30	15	15
	49	F	63	59	4
	54	N	22	15	7
	59	F	32	7	25
	61	F	41	16	25
	68	F	44	20	24
	72	F	31	29	2
	73	N	27	10	17
	109	F	32	11 hónap	32
	3	Ν	22	8 hónap	21

44

SZKLE-	4	F	31	24	7
ROTIKUS	7	F	38	24	14
	9	F	39	23	16
(3. típus)	10	F	20	12	8
	11	F	36	30	6
	18	F	32	20	12
	19	F	56	24	32
	21	F	30	21	9
	22	N	27	22	5
	29	N	29	5	24
	32	N	41	19	22
	35	F	25	12	13
	36	N	45	31	14
	37	F	41	2	39
	39	N	17	5	12
	53	F	26	17	9
	60	F	30	6	24
	62	N	45	25	20
	75	F	24	0.3	24
	83	N	29	6	23
	86	F	41	10	31
	90	N	46	11	35
	91	N	35	20	15
	92	N	35	5	30

5. Táblázat. A morfológiai vizsgálatokban felhasznált amerikai betegek csoportosítása a fennáló hippocampális elváltozások alapján

Patológiai	Beteg	Nem	Kor (év)	Kor (év)	Az epilepszia
csoport	kódszám			az	fennállásának
	a			epilepszia	időtartama
				kezdetén	(év)
	HH 17	F	27	17	10
	HH 24	F	41	3	38
ENYHE	HH 28	N	46	22	24
(1 típus)	HH 31	F	42	25	17
	HH 67	F	45	16	29
	HH 81	N	22	17	5
	HH 9	Ν	32	1	31
FOLTOS	HH 33	F	38	28	10
FOLIOS	HH 34	N	34	5	29
(2 tinus)	HH 43	N	44	4	40
(2 tipus)	HH 84	Ν	42	29	13
	HH 96	Ν	26	7	19
SZKLEROTI-	HH 3	N	22	8 hónap	21
KUS	HH 4	F	31	24	7
(3. típus)	HH 5	F	48	16	32
	HH 6	F	21	18	3
	HH 15	F	42	Nincs adat	
	HH 16	N	34	Nincs adat	
	HH 20	Ν	35	12	23
	HH 21	F	35	2	33
	HH 26	F	41	1	40
	HH 27	N	36	3	33

HH 49	Ν	48	13	35
HH 60	Nincs	Nincs	Nincs adat	
	adat	adat		
HH 63	N	38	0	38
HH 70	N	66	20	46
HH 77	F	37	28	9
HH 82	F	37	14	23

IV./3. A funkcionálisan különböző gátlósejttípusok és kapcsolataik átalakulása temporális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő betegek műtétileg eltávolított hippocampusában: a gyrus denatus interneuronjai

Általánosságban megállapítható, hogy a gátlósejtek összességében kevésbé érzékenyek TL epilepsziában, mint a principálissejtek (Babb *et al.*, 1989). Ha GAD-dal jelölt sejteket szamoltak epilepsziás emberek hippocampusában, azt találták, hogy a GABAerg sejtek kisebb hányada hiányzik, mint a principálissejtekből (Babb *et al.*, 1992), hiszen a CA1 és CA3c régió piramissejtjei tömegesen pusztulnak. Azonban, ha külön-külön vizsgáljuk meg az egyes funkcionálisan és neurokémiailag elkülönülő gátló sejtcsoportokat, jelentős eltéréseket találunk a sejtek változásaiban és érzékenységében.

Jelen dolgozatban a kontroll, illetve a sebészileg eltávolított epilepsziás hippocampus két régióját vizsgáltuk meg: a gyrus dentatust, mely szerepet játszik az epileptogenezisben, de jelentős mértékű principálissejt pusztulás nincsen benne, valamint a CA1 régiót, ahol viszont a legnagyobb tömegű a principálissejt pusztulás hippocampális szklerózisban, és amely a hippocampus legjelentősebb kimenetét adja a subiculum felé. Vizsgálataink egyik legfontosabb szempontja volt, hogy nem csak a szklerotikus betegek hippocampusát analizáltuk, hanem azokat is, amelyekben a piramissejtek többnyire megőrződtek, az enyhe és

foltos típust is, így lehetőségünk van összehasonlítani a különböző mértékű principálissejt pusztuláshoz köthető gátlósejt változásokat.

Ezekben a régiókban a PV- és CCK-tartalmú periszomatikus gátlósejtek, a CB- és SPR-tartalmú dendritikus gátlósejtek, valamint a CR-tartalmú, dendritikus és interneuronszelektív gátlásban résztvevő neuronok eloszlását, számát, morfológiai jellemzőit, valamint kiés bemeneti tulajdonságait vizsgáltuk meg.

IV./3.1. A periszomatikus gátlásban résztvevő interneuronok a gyrus dentatusban

IV./3.1.1. Parvalbumin-immunreaktív sejtek

A parvalbumin a hippocampusban kizárólag gátló interneuronokban van jelen, melyek mindig tartalmaznak GABA-t is (Kosaka *et al.*, 1987; Freund & Buzsaki, 1996). A parvalbumin-tartalmú sejtek közé tartoznak többek között a hippocampus leghatékonyabb gátlósejtjei, az axo-axonikus sejtek, melyek principálissejtek axon iniciális szegmentumán végződnek, és a kosársejtek is, melyek sejttesteket és proximális dendriteket innerválnak minden eddig vizsgált emlősfajban (Celio, 1986; Kosaka *et al.*, 1987; Katsumaru *et al.*, 1988b; Freund & Buzsaki, 1996). A parvalbumin-pozitív sejttestek nagy számban találhatók a hippocampus minden szubrégiójában, axonjaik sűrű fonatot képeznek a piramissejtek és a gyrus dentatus szemcsesejtjei körül. Főemlősökben a sejtek összáma kevesebb, mint patkányban (Seress *et al.*, 1993a; Freund & Buzsaki, 1996).

4. Ábra: PV-immunfestett sejtek eloszlása kontroll (A) és szklerotikus epilepsziás (B) gyrus dentatusban. A kontroll hilusban számos sejt található, az epilepsziás mintában a hilus üres, nagyméretű, dús dendritfájú sejt helyezkedik el a str. moleculareban. A rétegek határát szaggatott vonal jelzi, h: hilus, s.g.: stratum granulosum, s.m. stratum moleculare. Mérce: 50 μm (Wittner *et al.*, 2001)



Kontroll gyrus dentatusban a PV-immunpozitív sejtek többsége a hilusban helyezkedik el a str. moleculareban alig találni sejteket (4. A ábra). Ezek a sejtek, a két periszomatikus gátló neurontípushoz, az axo-axonikus és kosársejtek típusához tartoznak. Minden epilepsziás mintában a sejtek számának csökkenését találtuk, a csökkenés korrelált a patológiai típussal. Az enyhe, vagy foltos sejtpusztulást mutató mintákban a sejtek száma inkább a kontrollhoz hasonlított, míg a szklerotikus esetek egy részében egyáltalán nem volt PV-pozitív sejt a metszetben (Wittner *et al.*, 2001). Legtöbbször néhány multipoláris sejtet találtunk a str. moleculareban, a hilus többnyire üres volt (4.B, 5. A ábrák). A megmaradó sejtek dendritje gyakran gyöngyözött volt (Wittner *et al.*, 2001).

5. Ábra. PV-immunfestett sejt camera lucida rajza szklerotikus epilepsziás emberi gyrus dentatusból (A), ugyanaz ami a 4. ábra B részén látható kisnagyítású képen. Megfigyelhető a sűrű axonhálózat a gyrus dentatusban és a gyöngyözött, hosszú dendritek. A B képen az axonfonadék fénymikroszkópos fényképe látható, nyilhegyek hívják fel a figyelmet a függőleges orientációjú, axo-axonikus sejtek axonhálózatára emlékeztető rostkötegekre. Mérce: A: 100 μm, B: 50 μm (Wittner *et al.*, 2001)



Sejtszámlálással igazoltuk a PV-pozitív interneuronok számának csökkenését (6. táblázat) két kontroll (HK10, HK11), és kilenc, mindhárom típusból származó epilepsziás mintában (Enyhe típus: HE40, Foltos típus: HE16, HE31, HE40; szklerotikus típus: HE9, HE11, HE19, HE21, HE22). A PV-immunfestett sejtek számát egységnyi területre határoztuk meg a str. granulosum+moleculareban, illetve a hilusban. A PV-pozitív sejtek száma a szklerotikus sejtpusztulás mértékének növekedésével párhuzamosan csökkent (6. táblázat).

6. Táblázat. A PV-immunpozitív sejtek száma egységnyi területre (mm²) számítva a gyrus dentatus rétegeiben, kontroll és epilepsziás emberi hippocampusban. Az epilepsziás szklerotikus esetek értékei szignifikánsan kisebbek, mint a kontroll (Wittner *et al.*, 2001).

A beteg	A minta	PV-tartalmú sejtek	PV-tartalmú sejtek
kódszáma	patológiai	száma /mm ² a strata	száma /mm² a
	típusa	granulosum	hilusban
		+moleculare-ban	
Kontroll (10)	Nincs	1.073	4.545
Kontroll (11)	Nincs	1.058	5.465
15	Enyhe	0.942	2.268
31	Enyhe	0.557	1.901
40	Enyhe	0.826	3.279
16	Foltos	0.358	0.934
19	Foltos	0.322	0.278
22	Szklerotikus	0.251	0.718

9	Szklerotikus	0.077	0.000
11	Szklerotikus	0.392	<mark>0.058</mark>
21	Szklerotikus	0.080	0.035

Rostfestés tekintetében eltérés figyelhető meg az epilepsziás és kontroll minták között. A kontrollban a PV-pozitív terminálisok eloszlása a szemcsesejtrétegben homogén, az epilepsziás mintákban viszont váltakoztak a sűrű PV-immunpozitív terminális-felhők illetve a kevés festett terminálist tartalmazó foltok. Olyan metszetekben is voltak a sűrű terminálisfelhők, amelyben nem voltak immunfestett sejtek, egyes esetekben pedig az egész metszetben alig voltak PV-immunpozitív rostok. Rendszerint axo-axonikus sejtekre jellemző vertikálisan elhelyezkedő axonkötegeket láttunk (5. ábra).

IV./3.1.1.2. A gyrus dentatus PV-tartalmú elemeinek elektronmikroszkópos elemzése

Három hilaris és két a str. moleculareban elhelyezkedő PV-tartalmú interneuront vizsgáltunk meg kontroll gyrus dentatusban. Kevés (4-6) szinapszist – szimmetrikust és aszimmetrikust egyaránt – találtunk a sejttesteken. A PV-immunpozitív hilaris dendritek főleg aszimmetrikus szinapszisokat kaptak moha terminálisokra emlékeztető axonvégződésektől, szimmetrikus szinapszist csak ritkán kaptak. A str. moleculareban lévő dendriteken kis méretű, leggyakrabban aszimmetrikus szinapszist adó terminálisok végződtek.

Epilepsziás mintában három PV-pozitív sejtet vizsgáltunk meg. Az egyik a hilus-str. granulosum határán helyezkedett el (HE15, foltos típus), a másik kettő a str. moleculareban (HE21, HE37, szklerotikus) elhelyezkedő, dús dendritfájú sejt volt. A szklerotikus minták PV-

52

immunpozitív sejttestjein több szinapszis fordult elő, mint a kontrollban. Aszimmetrikus szinapszist adó, mohaterminálisok morfológiai jegyeit mutató axonvégződések, alighanem sarjadzó szemcsesejt axonok végződtek a sejteken. Mohaterminálisok a hilusban és a str. moleculareban gyakran végződtek a PV-tartalmú dendriteken. Szimmetrikus szinapszisok a kontrollhoz hasonlóan ritkán fordultak elő a dendriteken.

A PV-immunfestett axonterminálisok mind kontroll, mind epilepsziás gyrus dentatusban kizárólag szimmetrikus szinapszist alkottak, sejttesten, szemcsesejtek és interneuronok dendritjén és tüskéken (6, 7. ábra). Részletesen vizsgáltuk a dús rosthálózatokat a str. granulosum-moleculareban, és elemeztük a szinaptikus célelemek relatív gyakoriságát. A dendriteket elektronmikroszkópos karakterisztikájuk alapján különítettük el szemcsesejt és interneuron dendritekre, ez utóbbiak irányultsága, mitokondriumaik mennyisége és formája, a dendritek tüskétlensége alapján. A szemcsesejtek dendritjei és sejttestjei voltak a leggyakoribb célelemek mind kontroll, mind epilepsziás mintákban (6, 7. ábra). Az axon iniciális szegmentumok gyakorisága megnőtt az epilepsziás gyrus dentatusokban (7. táblázat). A tüskék gyakorisága nem mutatott semmilyen tendenciát, de ennek az is oka lehet, hogy axon iniciális szegmentumon is találtunk tüskét (7. A ábra), nem csak dendriten, viszont nem mindig tudtuk a talált tüskékről megállapítani, honnan erednek.

53

7. Táblázat. PV-immunpozitív axonterminálisok posztszinaptikus célelemeinek relatív gyakorisága (Wittner *et al.*, 2001)

A beteg kódszáma	Sejttest	Dendrit	Axon iniciális	Tüske
			szegmentum	
Kontroll 3 (n=49)	34.7%	40.8%	12.2%	12.2%
Kontroll 5 (n=46)	30.4%	47.8%	19.6%	2.2%
Epilepsziás szklerotikus	4.3%	40.6%	44.9%	10.2%
(HE21) (n=69)				
Epilepsziás szklerotikus	25%	39%	31.5%	4.5%
(HE9) (n=41)				
Epilepsziás szklerotikus	10.4%	58.3%	27.1%	4.2%
(HE11) (n=48)				
Epilepsziás szklerotikus	18.2%	43.6%	21.8%	16.4%
(HE22) (n=55)				

6. Ábra. PV-immunpozitív terminálisok célelemei humán kontroll gyrus dentatusban.
Szimmetrikus szinapszist alkotnak szemcsesetek (A) és interneuronok (B) dendritjén, tüskén (C, nyílhegy jelzi a tüskeapparátust), sejttesten (D) és axon iniciális szegmentumon (E).
Nyilak jelzik a szinapszist. Mérce: 0.5 μm (Wittner *et al.*, 2001)



dc_349_11

7. Ábra. PV-immunfestett axonterminálisok szimmetrikus szinapszist alkotnak epilepsziás gyrus dentatusban szemcsesejtek axon iniciális szegmentumán (A), sejttestjén (B), dendritjén (C) és ritkán interneuronk dendritjén is (D). Az A képen kis nyíl jelzi a tüskét az axon iniciális szegmentumon, amely szinapszist kap ugyanattól a terminálistól, amitől az iniciális szegmentum. Mérce: 1 μm (Wittner *et al.*, 2001)



Epilepszia modellben (Magloczky & Freund, 1995), és isémiában is leírták, hogy a PV-immunfestés eltűnhet a a sejtekből (Johansen *et al.*, 1990), még akkor is, ha a sejtek maguk túlélnek és jelen vannak. A mi emberi mintáinkban pedig gyakori volt a rostfestés foltossága, hiánya, illetve jelenléte olyan metszetekben is, ahol PV-immunfestett sejtek nem voltak megfigyelhetőek. A jelenség alapján nem volt egyértelműen eldönthető, hogy a sejtek és rostok degenerálódtak-e, vagy csak a PV-immunfestés nem mutatja őket. Ezért a szemcsesejtek sejttest és iniciális szegmentum bemenetét megvizsgáltuk a PV-immunfestéstől függetlenül is (Wittner *et al.*, 2001). A szemcsesejtréteg sok és kevés PV-immunpozitív terminálist tartalmazó foltjaiból ágyaztunk át blokkokat a további elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz.

8. Táblázat. Szemcsesejtek axon iniciális szegmentumának (AIS) szinaptikus borítottsága dús és gyér PV-immunfestett axonhálózatú foltokban a szemcsesejt rétegben. Az epilepsziás értékek szignifikánsan különböznek a kontrolltól, p<0.01 (Wittner *et al.*, 2001)

A beteg kódszáma	Az axon iniciális szegmentum	Szinapszisok száma/
(n: a vizsgált iniciális	átlagos szinaptikus borítottsága	100 µm of AIS
szegmentumok száma)	(μm synapse/100 μm of AIS	kerület
	kerület)	
Kontroll 5 (n=95)	0,49	2,80
Kontroll 10 (n=88)	0,55	2,98
Epilepsziás (HE9) (n=45)	2.64	9.64
(szklerotikus)		
Sűrű PV terminalis festés		
Epilepsziás (HE21) (n=68)	2.96	12.79
(szklerotikus)		
Gyér PV terminalis festés		
Epilepsziás (HE21) (n=31)	2.59	9.59
(szklerotikus)		
Sűrű PV terminalis festés		
Epilepsziás (HE22) (n=58)	1.11	6.75
(foltos)		
Sűrű PV terminalis festés		
Epilepsziás (HE15) (n=74)	1.22	5.09
(enyhe)		
Gyér PV terminalis festés		

Látható (8. táblázat), hogy mind a dús, mind a gyér PV-immunpozitív foltokban megnőtt a szimmetrikus szinapszisok borítottsága a szemcsesejtek axon iniciális szegmentumán. Azonban még a dús foltokban sem volt az összes szimmetrikus szinapszist adó terminális PV-immunpozitív.

Mivel tudni akartuk, hogy a szemcsesejtek axon iniciális szegmentumán talált nem PV-festett szinapszisok milyen forrásból származhatnak, immunfestést végeztünk szomatosztatin, neuropeptid Y és kolecisztokinin neuropeptidek ellen, mert lehetőség volt arra, hogy a szinapszisok egy részét más túlélő és epilepsziában sarjadzó (de Lanerolle *et al.*, 1989) gátlósejtek adják. Azt találtuk, hogy mindhárom neuropeptid szinapszisainak gyakorisága megnőtt a kontrollhoz képest epilepsziás betegek gyrus dentatusaban, de egyik sem alkotott szinapszist axon iniciális szegmentumon, sem kontrollban, sem epilepsziás betegekben, hanem főleg szemcsesejt dendriteken és tüskéken szinaptizáltak, mind kontroll mind epilepsziás mintákban. Ez a kísérlet igazolta De Lanerolle megfigyeléseit is, aki fénymikroszkóposan bemutatta a SOM és NPY rostok sarjadzását, de sohasem igazolta, hogy ezek valóban szinapszist alkotnak az epilepsziás hippocampusban, és az eredeti célelemekkel (Wittner *et al.*, 2001).

9. Táblázat. A szemcsesejtek sejttestének szinaptikus bemenete kontroll és epilepsziás mintákban. Statisztikailag szignifikáns különbség nem volt a kontroll és epilepsziás értékek között. (Wittner *et al.*, 2001)

A beteg kódszáma	A szimmetrikus szinapszisok átlagos
n: a vizsgált sejttestek száma	száma/sejttest
Kontroll 5 (n=50)	1,1
Kontroll 10 (n=50)	1,3
Kontrollok együtt (n=100)	1,2
Epilepsziás (HE21) (n=50)	1,74
szklerotikus	
	1,52

Epilepsziás (HE9) (n=50)	
szklerotikus	
Epilepsziás (HE22) (n=50)	1,5
foltos	
Epilepsziás (HE15) (n=50)	1,48
enyhe	

A sejttestek szimmetrikus szinapszisoktól származó bemenete nem változott szignifikánsan epilepsziás mintákban (9. táblázat), noha a sejttestek relatív gyakorisága csökkent a szinaptikus célelemek között (7. táblázat). Szklerotikus mintákban előfordult a szemcsesejteken nagy valószínűséggel mohaterminálisoktól származó aszimmetrikus szinapszis is, ezeket nem vontuk bele a számításokba.

A rendelkezésre álló adatok azt bizonyítják, hogy a szemcsesejtek axon iniciális szegmentumán megnő a szimmetrikus szinapszisok bemenete, és ennek egyik forrását a PV-immunfestett, axo-axonikus sejtekből eredő terminálisok adják. A sejttestek gátló bemenete nem változik (Wittner *et al.*, 2001).

IV./3.1.2. A CCK-tartalmú sejtek és végződési mintázatuk epilepsziás gyrus dentatusban

A CCK a periszomatikus sejtek második ismert neurokémiai markere (Freund & Buzsaki, 1996). Eltérően a PV-tartalmú sejtektől, melyek elsősorban a pontosan időzített GABAhatásért felelősek, és részt vesznek a gamma- és theta oszcilláció kialakításában, a CCKtartalmú kosársejtek inkább a bemenet modulációjáért felelősek (Freund & Katona, 2007). A CCK-tartalmú sejtek nagyrészt megőrződnek epilepsziás állatokban, és ezt találtuk emberben

is(Wyeth *et al.*, ; Schwarzer *et al.*, 1996; Katona *et al.*, 2000; Magloczky *et al.*, 2010). A CCK-tartalmú sejtek a hippocampus minden régiójában és rétegében előfordultak, mind a kontroll mind az epilepsziás hippocampusban (Freund & Buzsaki, 1996). Nem-szklerotikus hippocampusban és szklerotikus hippocampus gyrus dentatusában az eloszlásuk és morfológiai tulajdonságaik nem különböztek lényeges a kontrolltól (Magloczky *et al.*, 2010), a szklerotikus CA1 régióban is jelen voltak, de általában multipoláris dendritfájuk horizontális dendritűvé torzult az atrófiás CA1-ben.

Nagyon szerettük volna tudni, mi történik ezzel a gátlástípussal epilepsziás hippocampusban. Csakhogy az általunk hozzáférhető CCK antitestek – noha stabil sejttest festést adtak – csak részben, és megbízhatatlanul jelenítték meg az axonokat, bár több antitestet is kipróbáltunk. Laboratóriumunkban többen is foglalkoztak az endokannabinoid rendszer vizsgálatával, és Katona István és munkatársai bizonyították, úgy patkányban mint emberben, hogy a 1. típusú cannabis receptort (CB1-R) legnagyobb mennyiségben az interneuronok közül a CCK sejtek termelik és azok axonján van jelen a hippocampusban (Katona *et al.*, 2000)[~] (~90% kontrollban).

Jelen dolgozat témáját meghaladja az endocannabinoid rendszer és annak változásai epilepsziában, ezért azzal itt nem foglalkozom. De kihasználva, hogy vizsgáltuk a CB1-R eloszlását kontroll és epilepsziás humán hippocampusban (34 TLE beteg), bemutatom, milyen változást mutattak a CB1-R-immunpozitív, szimmetrikus szinapszist adó, tehát zömmel CCKtartalmú sejtekhez tartozó axonterminálisok.

A kísérletekhez a Prof. Ken Mackie által kifejlesztett CB1-R antitestet használtuk fel, mely kizárólag a gátlósejtekben és gátló terminálisokon jelen lévő CB1-R-okat teszi láthatóvá (Katona *et al.*, 2000). Ezzel az antitesttel festettünk meg öt kontroll kontroll és 34 epilepsziás betegből származó hippocampusokat, és azt találtuk, hogy a sejttesteken kívül dús rosthálózat

vált láthatóvá, mely legerősebb a principálissejtek rétegében és a gyrus dentatusban, a stratum moleculareban volt. A stratum moleculare és stratum granulosum rétegében elhelyezkedő sűrű rostköteget tanulmányoztuk nagyobb részletességgel (Magloczky *et al.*, 2010).

Terminálisok posztszinaptikus célelemeit 2 kontroll és 3 szklerotikus alany gyrus dentatusában vizsgáltuk. Valamennyi immunfestett terminális szimmetrikus szinapszist adott. Legnagyobb mennyiségben dendritek fordultak elő a célelemek között, de a sejttestek és tüskék is gyakoriak voltak. (10. táblázat). A posztszinaptikus célelemek gyakorisága nem mutatott szignifikáns változást, noha a terminálisok sűrűsége megnőtt.

10. Táblázat. CB1-R-immunfestett terminálisok szinaptikus célelemei kontroll és szklerotikus epilepsziás betegek gyrus dentatusában. A szinaptikus célelemek eloszlása nem változik epilepsziás betegekben (Magloczky *et al.*, 2010).

	Dendrit	Tüske	Sejttest
Kontroll	75 %	13,2%	11,8%
(N= 105 terminális)			
Epilepsziás,	72,5%	15%	13%
szklerotikus (N=175			
terminális)			

A rostsűrűséget a gyrus dentatus molekuláris rétegében mértük meg, fluoreszcens immunfestett metszeteken, denzitometriával, 3 kontroll és 10 szklerotikus beteg gyrus dentatusában, konfokális lézer scanning mikroszkóp segítségével. Az immunfestett rostok sűrűsége signifikánsan nagyobb volt az epilepsziás betegekben (8. ábra), ami a CCK-tartalmú

sejtek axonsarjadzására és/vagy a CB1-R mennyiségének megnövekedésére az egyes terminálisokban utal.

8. Ábra. CB1-R immunfestés kontroll (A) és szklerotikus epilepsziás beteg (B) stratum molecularejában. Megfigyelhető a sűrű CB1-R-immunpozitív rosthálózat, mely epilepsziás betegekben megerősödik. A szemcsesejtek mindig negatívak. C: A rosthálózat denzitometriai adatai, 3 kontroll és 10 epilepsziás betegből mérve. Az epilepsziás, szklerotikus betegekben a rosthálózat szignifikánsan erősebb immunfstést mutatott. D: Egy CB1-R-immunarany jelölt terminális szimmetrikus szinapszist ad dendritre egy epilepsziás beteg stratum molecularejában. s.g.: str. granulosum. Mérce: A,B: 50 μm; C: 0.5 μm (Magloczky *et al.*, 2010)



Ugyanezt a mintázatot kaptuk epilepsziás egerekben is, pilocarpine-indukálta epilepszia hatására, 1-2 hónapos túlélés után. Az állatkísérlet eredményei bizonyították, hogy a CB1-R-immunfestett szimmetrikus szinapszist képező terminálisok sarjadzása nem csak az emberi epilepsziás betegek sajátossága, hanem a krónikus epilepsziás állapoté (Magloczky *et al.*, 2010; Karlocai *et al.*, 2011). Az epilepsziás egerekben is látható volt a különbség a szklerotikus és nem-szklerotikus állatok között, a szklerotikus állatokban sokkal erősebb volt a rostok sürüsége, ahogyan az emberekben is (Magloczky *et al.*, 2010; Karlocai *et al.*, 2011).

IV./3.2. A dendritikus gátlásban résztvevő interneuronok kontroll és TL epilepsziás betegek gyrus dentátusában

IV./3.2.1. Calbindin-tartalmú sejtek

Calbindint tartalmaznak a gyrus dentatus szemcsesejtjei és azok axonjai, a moharostok, a CA1-CA2 régiók piramissejtjei valamint interneuronok a hippocampus minden áreájában és rétegében (Baimbridge & Miller, 1982; Celio, 1990; Gulyas *et al.*, 1991; Seress *et al.*, 1993a). A moharostok és a szemcsesejt dendritek erős immunfestése miatt mondtunk le arról, hogy megszámoljuk a CB-tartalmú interneuronokat, mivel a CB-tartalmú sejtek alig látszanak a kontroll gyrus dentatusban az erős szemcsesejt-immunpozitivitás miatt.

Az epilepsziás betegek gyrus dentatusában a szemcsesejtek egy része elveszti CB tartalmát (Magloczky *et al.*, 1997), a szemcsesejtek pedig szétvándorolnak, és kompakt réteg helyett laza, széles, rétegben, leggyakrabban a stratum moleculareval összemosódva helyezkednek el (9. ábra). A CB-tartalmú interneuronok rendkívüli rezisztenciát mutattak állatkísérletes modellekben (Sloviter, 1989; Magloczky & Freund, 1995) és epilepsziás betegekben is a sejtek megőrződéséről számoltak be (Sloviter *et al.*, 1991). Azonban nem csak

megmaradnak a CB-immunpozitív interneuronok, hanem jelentős morfológiai változásokat mutatnak. A kontrollban megfigyelhető sejteknek rövid, síma dendritjeik vannak, míg epilepsziás betegekben a sejtek hosszú dendritekkel festődnek. A jelenség különösen feltűnő szklerotikus betegekben, ahol a dendriteken, sőt a sejttesteken is számos tüske figyelhető meg (Magloczky *et al.*, 2000).

9. Ábra. Kis nagyítású fénymikroszkópos felvétel kontroll és szklerotikus beteg CBimmunfestett gyrus dentatusából. Megfigyelhető a szemcsesejtek, dendritjeik és axonjaik erős immunpozitivitása (A), mely az epilepsziás mintában részben eltűnik (B). Az interneuronok alig látszanak a kontrollban, kicsi, rövid, síma dendritű sejtek (fehér nyilak, A). Az epilepsziás mintában számos nagyméretű, megnyúlt dendritű sejt látható a hilusban (fekete nyilak, B), amelyek dendritjeiken és sejttestükön gyakran tüskéket (nyitott nyíl, B), akár elágazó tüskéket viselnek (kis nyílhegyek, C, ezt a sejtet jelölte a nyitott nyíl a B képen). A D képen egy hosszú, megnyúlt dendritű hilaris CB-tartalmú interneuron látható, amelyen kevés, egyszerű tüske van. Mérce. A-B: 70 μm; C-D: 50 μm (Magloczky *et al.*, 2000)



Ráadásul a sejtek sejttestje is nagyobb lesz, számos óriás méretű neuron figyelhető meg a hilusban (9. B ábra). Megmértük a kontrollban található, és az epilepsziás hilus CBimmunpozitív sejttestjeit. Betegenként és kontrollonként 2-2 metszetből camera lucidával kirajzoltuk a hiláris interneuronokat. A sejteket méretskálával együtt számítógépbe vittük, és a

sejtek területét, hosszú és rövid átmérőjét NIH Image programmal meghatároztuk. A vizsgált metszetből kirajzoltunk 50 szemcsesejtet is, és azokat is ugyanígy megmértük. Az eredmények bizonyítják, hogy az epilepsziás esetekben megnő a nagyméretű sejtek előfordulási gyakorisága (10. ábra). A szemcsesejtek mérete nem különbözött szignifikánsan (Magloczky *et al.*, 2000).

10. Ábra. A fekete színnel jelölt kontrollhoz képest a kék árnyalatokkal jelölt epilepsziás betegekben gykrabban fordulnak elő nagyméretű sejttesttel bíró hiláris interneuronok, köztük olyan nagyméretű sejtekkel is, melyek kontrollban nem voltak megfigyelhetőek. (Magloczky *et al.*, 2000)



IV./3.2.1.1. A hiláris CB-immunpozitív interneuronok bemenete

Több CB-immunfestett interneuront megvizsgáltunk a gyrus dentatusból elektronmikroszkópban, hogy megismerjük bemeneti tulajdonságaikat. A kontrollból összesen 8-at. A sejtek rövid dendrittel festődtek, a citoplazmában közepes számú mitokondriummal (11. A, B ábrák). A sejttesten több terminális alkotott szimmmetrikus vagy szimmetrikus szinapszist (11. C, D, E ábrák), köztük mohaterminálisokkal (11. E ábra). Mohaterminálisként azokat a CB-immunpozitív vagy –negatív terminásokat azonosítottuk, amelyekben vezikula akkumulációt, és sűrű magvú vezikulát figyeltünk meg. Ezek mindig aszimmetrikus szinapszist alkottak, gyakran punctum adherens is jelen volt rajtuk.

11. Ábra. Kontroll hilusból származó CB-immunfestett interneuron sejttestje, rövid dendritjei és az azokat borító szinapszisok (C,D,E nyilak). A bekeretezett részek láthatóak nagyobb nagyítással a B-D képeken. Mohaterminálisok által alkotott szinapszis figyelhető meg az E ábrán, nyilak. Mérce: A: 5 μm; B:4 μm; C-D: 0.5 μm; E: 1 μm (Magloczky *et al.*, 2000)



Epilepsziás mintákból (HE21, HE18 szklerotikus) összesen 8 sejtet ágyaztunk át. Ezek alapján a hiláris CB-pozitív interneuronok három csoportját különböztettük meg: óriási méretű hipertróf sejtek (2 vizsgált sejt, hosszú átmérő: 30-60 µm, rövid átmérő: 20-40 µm), gliarostokkal körülvett normális méretű sejtek (4 vizsgált sejt, hosszú átmérő: 15-35 µm, rövid átmérő: 10-25 µm, ilyen méretű sejtek találhatók a kontroll szövetben), és szomatikus tüskéket viselő sejtek (2 vizsgált sejt) (Magloczky *et al.*, 2000).

Az óriás méretű sejtek nem mutatták degenerálódás jeleit, nagy mennyiségű citoplazma, endoplazmás retikulum és mitokondrium volt bennük, sejtmagjuk jelentősen invaginálódott, és számos szinapszis, köztük mohaterminálisok is, végződtek rajtuk (12. ábra) (Magloczky *et al.*, 2000).

12. Ábra. Óriás méretű CB-immunfestett sejt elektronmikroszkópos képe epilepsziás
hippocampus hilusából (A), a sejt dús citoplazmája és mitokondriumai nagyobb nagyítással a
B képen láthatóak. A mitokondriumok egy részének belső struktúrája felbomlott. A sejten több
szinapszist is találtunk (C, D), a D képen CB-immunpozitív mohaterminális látható. Mérce: A
10 μm; B-D: 2 μm (Magloczky *et al.*, 2000)



A hiláris CB-immunfestett interneuronok második típusát képezték a normál méretű, ám gliarostokkal sűrűn borított sejtek. Ezeken alig lehetett szinapszist találni, mert mindent

befedtek a gliarostok. Sejtmagjuk invaginálódott, citoplazmájuk dús volt, nem mutatták degenerálódás jeleit (13. A ábra) (Magloczky *et al.*, 2000).

A harmadik csoportba a sejttesttüskével rendelkező interneuronokat soroltuk. Ezeket nem borította glia, és számos, főleg aszimmetrikus szinapszis végződött rajtuk, köztük CBimmunpozitív vagy negatív mohaterminálisokkal (13. B ábra). A sejttestüskék is gyakran kaptak szinaptikus bemenetet (13. B ábra) (Magloczky *et al.*, 2000).

A hilusban előforduló tüskés és síma dendritek közepes mennyiségű szinaptikus bemenetet kaptak, gyakran mohaterminálisoktól (13. D ábra). A dendritek között zonula adherentiát is találtunk (13. C ábra).

13. Ábra. Glianyúlványokkal borított (A) és szomatikus tüskét viselő (B) CB-immunfestett interneuron elektronmikroszkópos képe. A sejtek nem mutatják degeneráció jeleit, citoplazmájuk dús. Az A képen lévő sejttestet borító glianyúlványt nyílhegyek jelölik. A B képen aszimmetrikus szinapszisokkal borított szomatikus tüske látható. A C és D képen hiláris dendritek vannak. A tüskés dendrit a C képen (d1) és egy másik dendrit (d2) zonula adherenssel kapcsolódik (nyílak). Mindkét dendrit kap aszimmetrikus szinapszisokat (nagy nyilak). A hiláris dendrit a D képen CB-immunpozitív és negatív mohaterminálisoktól kap bemenetet (nyilak), részben gliarostok borítják. Mérce: A: 5μm; B-D: 2 μm (Magloczky *et al.*, 2000)



Megvizsgáltuk az epilepsziás betegek stratum molecularéban látható, sűrű CB-pozitív axonköteget is (14. ábra), amely sarjadzó mohaterminálisok tömegének bizonyult, és gyakran szinaptizált szemcsesejteken (Magloczky *et al.*, 1997).

14. Ábra. Epilepsziás betegek stratum molecularejából származó mohaterminálisok képe. Az A ábrán egy CB-negatív mohaterminális szinaptizál dendriteken, a b ábrán egy CBimmunpozitív mohaterminális alkot aszimmetrikus szinapszisokat dendrittüskékkel (nyilak). A mohaterminálisokat könnyen fel lehet ismerni a jellegzetes vezikula-akkumulációról, a belsejükben jelen lévő sötét magvú vezikulákról, és relatíve rövid szinaptikus aktív zónájukról (Magloczky *et al.*, 1997).


IV./3.2.2. A P anyag receptorát kifejező sejtek változásai a gyrus dentatusban

IV./3.2.2.1. Az SPR-t expresszáló sejtek általános jellemzői

A Substance P (SP) a tachikinin neuropeptid szupercsalád tagja, melyeket neurokininenknek is neveznek (Severini *et al.*, 2002). A P anyagot kódoló génből egy preprotachikinin nevű peptid képződik, melyből többféle biológiailag aktív neuropeptid képződik poszttranszlációs hasítással, melyek aminósav összetételükben hasonlóságot mutatnak. Ezek egyike a SP, melyet neurokinin1-nek is neveznek (Severini *et al.*, 2002). Számos idegélettani folyamatban vesz részt, és szerepel a stressz, fájdalom, szorongás, neurogén gyulladás kialakításában (Maubach *et al.*, 1998; Palma & Maggi, 2000; Caberlotto *et al.*, 2003; Smith & Dawson, 2008). Az agyban neurotranszmitterként és modulátorként is funkcionál, töbnyire glutamáttal együtt fordul elő, és serkenit az idegsejteket . Receptora a substance P receptor (SPR) vagy neurokinin 1 (NK1) receptor. A SPR egy nagyaffinitású G-fehérje kapcsolt receptor (Nakaya *et al.*, 1994; Mantyh *et al.*, 1995). A többi neurokinin peptidnek is megvan a saját, nagyaffinitású receptora, meg kell azonban jegyezni, hogy valamennyi neurokinin képes bizonyos hatásfokkal kötődni az összes neurokinin receptorhoz, és aktiválni azokat (Severini *et al.*, 2002).

A SPR-immunfestés nem teszi láthatóvá az axont, csak a sejttesteket és dendriteket, de (Shigemoto *et al.*, 1993; Nakaya *et al.*, 1994; Acsady *et al.*, 1997). Így a sejtek funkciójának meghatározásához kolokalizációs vizsgálatokat kellett végezni, annak megállapítására, hogy milyen ismert funkciójú interneuront jelölő neurokémiai marker található bennük. Patkányban az SPR-t expresszáló sejtek a hippocampusban mind interneuronok voltak, és GABA-t tartlmaztak. Funkcionálisan heterogéneknek bizonyultak a kolokalizáló neurokémiai markerek

alapján, PV-t, CCK-t, SOM-t, NPY-t találtak bennük, így egy részük periszomatikus, más részük dendritikus gátlósejtnek bizonyult (Acsady *et al.*, 1997).

Emberi hippocampusban munkánk előtt az SPR-t kifejező sejteket nem vizsgálták. Azt találtuk, hogy az SPR-t expresszáló sejtek a humán hippocampus minden régiójában és rétegében előfordulnak, legkevesebb a CA2 régióban van belőlük, legtöbb a CA1-ben (15. ábra) (Toth *et al.*, 2007). A sejtek multipolárisak voltak vagy "kétcsokros" bitufted morfológiát mutatnak. Ritkán nagyon gracilis, bipoláris alakjuk is látható, ahol a dendritek a principálissejt rétegre merőlegesen futnak, a CA1 str. oriensben pedig horizontális elhelyezkedésűek. Egyes metszetekben, a hilusban vagy a CA3-ban óriási méretű SPR-kifejező sejtet is találtunk, ez azonban csak néhány esetben fordult elő (15. ábra) (Toth *et al.*, 2007).

15. Ábra. Az SPR-expresszáló sejtek eloszlása za emberi hippocampus különböző régióiban.Camera lucida rajz.

dc_349_11



IV./3.2.2.2. Az SPR-immunpozitív sejtek változásai epilepsziás gyrus dentatusban

Kontroll gyrus dentatusban a sejtek többsége a hilusban helyezkedik el. A sejtek egy része multipoláris sejt, mely dendritjeit a hilusban tartja, más részük hosszú dendriteket nyújt a str. moleculareba. A str. moleculareban csak kevés sejt van, melyek alkalomszerűen láthatók, nem minden metszetben. A sejtek többségének 3-6 fődendritje van, néhány bipoláris sejtet találtunk csak, ezek többnyire a str. moleculareban helyezkedtek el, dendritjeik irányultsága

75

merőleges a szemcsesejt rétgre. A dendritek többsége síma, de előfordulnak ritkán tüskések is. (16-17 ábra, A)

Epilepsziás betegek gyrus dentatusában a SPR-expresszáló sejtek eloszlása drasztikusan megváltozott, de csak a szklerotikus mintákban, nem-szklerotikus esetekben a sejtek eloszlása és morfológiája haonlít a kontrollhoz (16. B, C ábra), egyes dendritek gyöngyözöttek (Magloczky *et al.*, 2000). A szklerotikus minták hilusa kiüresedett, néhány sejt maradt csak ott, erősen gyöngyözött dendritekkel. A sejtek többsége a stratum moleculareban helyezkedik el, szinte mindnek gyöngyözöttek a dendritjei, a dendritfa gubancos, és sokkal több dendritelágazódási pont jelenik meg rajta (16. C, 17. ábra) (Magloczky *et al.*, 2000). A denditmorfológia jobb láthatósága kedvéért a gyrus dentatus egy-egy szegmensét kontrollból és epilepsziás szklerotikus betegből camera lucidával kirajzoltuk (17. ábra).

16. Ábra: SPR-immunreaktív sejtek eloszlását mutató fénymikroszkópos kép kontroll (**A**) és epilepsziás (**B**, nem-szklerotikus, **C:**szklerotikus) humán gyrus dentatusban. A kontrollban az SPR-sejtek heterogén morfológiájú, síma dendritű vagy ritkán tüskés nem-principálissejtek, a többségük a hilusban helyezkedik el. Az epilepsziás gyrus dentatusban a sejtek dendritje gyöngyözötté válik, a szklerotikus esetekben az eloszlás megváltozik, a sejtek többsége a str. moleculareban található, és csak néhány a hilusban, a dendritek száma nő, és gyöngyözötté, varikózzá válnak. Mérce: A-C: 70 μm (Magloczky *et al.*, 2000; Maglóczky, 2005)



17. Ábra. Camera lucida rajz kontroll (A) és szklerotikus (B) gyrus dentatusból, SPRimmunfestett metszetekből. A rajzon megfigyelhető, hogy epilepsziás esetekben a sejtek eloszlása és dendritmorfológiája megváltozik, dendritjeik gyöngyözöttek, több elágazódás van rajtuk, a sejtek többsége a str. moleculareban helyezkedik el. Mérce: 50 μm (Maglóczky, 2007)



IV./3.2.2.3. Az SPR-sejtek bemenete és változásai epilepsziás gyrus dentatusban

Az SPR-t kifejező sejttesteket és dendriteket megvizsgáltuk elektronmikroszkópban kontroll alanyok gyrus dentatusában. A hiláris sejttestek az interneuronok karakterisztikus

képét mutatták, invaginálódott sejtmaggal és dús citoplazmával. A sejttestek szinaptikus bemenete ritka volt. Síma és tüskés SPR-immunfestett dendriteket találtunk a hilusban, melyek hihetetlenül sűrűn voltak borítva szinapszisokkal (18. ábra). A stratum molecularéban elhelyezkedő dendritek is nagy mennyiségű szinapszist kaptak. A szinapszisok messze túlnyomó többsége aszimmetrikus volt, a hilusban nagyszámú mohaterminális végződött az SPR-immunpozitív dendriteken, a str. moleculareban talált, SPR-immunfestett dendriteken végződő terminálisok többsége a morfológiai jegyek alapján valószínűleg az entorhinális kéregből eredt (18. C, D ábra).

18. Ábra. SPR-immunpozitív dendritek elektronmikroszkópos képe kontroll gyrus dentatusból, A-B hilus, C-D str. moleculare. A dendriteken nagy mennyiségű aszimmetrikus szinapszis található (nyilak). A hilusban tüskés dendritek is előfordulnak, a tüskéken is gyakran van szinapszis (nyílhegyek). A hiláris szinapszisok nagy része a mohaterminálisok morfológiai jegyeit mutatja, a str. moleculareban látott aszimmetrikus szinapszist adó terminálisok többnyire kicsik és egy részük az entorhinális terminálisokra emlékeztet. Mérce: A: 1,5 μm B-D: 1 μm (Magloczky *et al.*, 2000)



Epilepsziás szklerotikus mintában 1 hiláris és 2 stratum moleculare-ban elhelyezkedő sejttestet vizsgáltunk meg. A hiláris SPR-festett sejt nagyon hasonlított a kontrollhoz. A str. moleculareban elhelyezkedő sejttestek épek voltak, nagy mennyiségű citoplazmával, invaginálódott sejtmaggal, felszínüket részben gliarost borítota. A hiláris dendritek is hasonlóak voltak a kontrollhoz, hasonlóan erőteljes szinaptikus bemenettel. Azonban a str. moleculare dendritjei különböztek a kontrolltól. Felszínükön a kontrollban talált kisméretű terminálisok helyett nagy mennyiségű moharost-szerű terminális szinaptizált (19. ábra). A gyöngyözött dendritek varikozitásainak egy részében széteső mitokondriumokat láttunk (19. B ábra) (Magloczky *et al.*, 2000).

19. Ábra: SPR-immunfestett elemek szklerotikus epilepsziás beteg gyrus dentatusából. A: SPR-immunpozitív sejttest a str. moleculareban. Megfigyelhető, hogy a immunprecipitatum a sejttest membránhoz és a Golgi készülékekhez kötődik (kis nyílhegyek). A sejttest gazdag citoplazmájú, a sejtmag felszíne betűrődött, a sejtmagban intranucleáris pálca van. A sejttest részben gliarostokkal borított (nagy nyílhegyek). A B és C képen gyöngyözött denritek láthatók a str. moleculáréból, felszínükön számos aszimmetrikus szinapszissal (nyilak), a terminálisok nagyrésze mohaterminálisokra hasonlít. A varikozitások egy részében széteső mitokondriumokat látni (C). Mérce: A: 4 μm; B: 1 μm; C: 0.5 μm. (Magloczky *et al.*, 2000)

dc_349_11



IV./3.2.2.4. Az SPR-expresszáló sejtek SP-tartalmú bemenetei

Az SPR a P anyagra a legérzékenyebb, így az ember arra számítana, hogy a receptort kifejező sejtek fő bemenetüket SP-tartalmú rostoktól kapják. Az emberi hippocampus legfőbb SP forrásai a hippocampusban jelen lévő SP-tartalmú interneuronok, de ezek nagyon kevesen vannak. Másik fő forrás a supramammilláris pálya, mely patkányban kevesebb SP-tartalmaz, mint majomban majomban (Borhegyi & Leranth, 1997a).

Ez a pálya patkányban is, majomban is hasonló végződési mintázatot mutat: a rostok sűrű hálózatot alkotnak a gyrus dentatus szemcseejtrétege fölött, a stratum moleculare belső harmadában, valamint a CA3a-b és CA2 régióban, a piramissejtrétegben, az oriensben és kismértékben a radiatumban is (Vertes, 1992; Magloczky *et al.*, 1994; Borhegyi & Leranth, 1997a; Borhegyi & Leranth, 1997b). A cornu Ammonisban lazább hálózatot formálnak, mint a gyrus dentatusban . Különös módon, a stratum moleculare és a CA2 régió az, ahol a legkevesebb SPR-immunfestett sejtet találjuk (15. ábra). A CA1 régió, ahol talán a legtöbb SPR-immunpozitív sejt van, egyáltalán nem kap supramammillaris bemenetet. Ezt a jelenséget hívjuk receptor nem-illeszkedésnek, mivel láthatóan a receptort expresszáló sejtek olyan területen helyezkednek el, ahol a receptor (ismert) ligandumát tartalmazó rostok nem vagy alig kapcsolódnak az adott receptort kifejező elemekhez (Mantyh *et al.*, 1984; Liu *et al.*, 1994).

Emberi hippocampusban a sejtek bemenetét nem lehet pályajelölő anyaggal megjelölni, a hozzáférhető SP antitestek pedig nem adtak értékelhető immunfestést mintáinkban. Azonban a supramammillaris pálya SP-n kivül számos más markert, többek között calretinint is tartalmaz (Nitsch & Leranth, 1993; Borhegyi & Leranth, 1997a). Mivel

részletesen vizsgáltuk a CR-tartalmú sejteket és terminálisokat (l. következő fejezet), ezt a pályát is tanulmányoztuk az emberi hippocampusban.

A gyrus dentatus CR-immunfestett metszetén megfigyelhető a supramammilláris pálya végződése kontroll gyrus dentatusban a szemcsesejtréteg fölött, sűrű kompakt axonhálózat formájában (Magloczky *et al.*, 2000). Ez a kompakt axonfonadék epilepsziás betegek gyrus dentatusában nem figyelhető meg, helyette az egész str. molecularét egyenletesen ellepték a CR-immunfestett terminálisok (20. ábra). A jelenség szklerotikus és nem-szklerotikus betegek gyrus dentatusában is megfigyelhető volt (Magloczky *et al.*, 2000).

20. Ábra. CR-immunfestett metszetek fénymikroszkópos képe a gyrus dentatusból. A képen megfigyelhető a supramammillaris, CR-tartalmú pálya végződése a szemcsesejtréteg (A, s.g.) fölött, nyílhegyek. Az epilepsziás szklerotikus beteg gyrus dentatusaban a CR-tartalmú rostok nem kompakt réteget, hanem homogén, gubancos hálózatot képeznek (B, nyilak). A szemcsesejt réteg széthúzódott. Mérce: 50 μm



Elektronmikroszkópban viszgáltuk meg a CR-tartalmú rosthálózatot a gyrus dentatusban, hogy következtetni tudjunk a supramammilláris bemenet sorsára. Két kontroll alany, és két epilepsziás (egy szklerotikus és egy nem szklerotikus) beteg gyrus dentatusának stratum granulosum+moleculare rétegét átágyaztuk, és elektronmikroszkópban viszgáltuk a CR-immunpozitív szinapszisokat adó terminálisokat. Azért választottunk a szklerotikus mellé egy nem-szklerotikus beteget is, mert a szklerotikus gyrus dentatusban gyakran szetvándorolnak a szemcsesejtek, így a supramammillaris rosthálózat kiterjedését okozhatta volna akár az is, hogy a szemcsesejtréteg kiszélesedett. A nem- szklerotikus hippocampusban viszont nem kellett számolnunk ezzel a jelenséggel. A gyrus dentatusokból készült blokkokban a strata moleculare és granulosum teljes szélessége benne volt. A helyi interneuronok szimmetrikus szinapszist adtak, míg a supramammillaris pálya terminálisai jellegzetes, vastag posztszinaptikus denzitású, aszimmetrikus szinapszisokat alkottak a szemcsesejtek dendritjein és tüskéin, ahogy patkányban (Magloczky *et al.*, 2000). A terminálisok több mint 90%-a aszimmetrikus szinapszist adott a stratum moleculareban, a szinaptikus célelem eloszlást a CR-tartalmú elemek változásainál mutatom be.

21. Ábra. A supramammillaris pálya CR-immunpozitív terminálisai által alkotott jellegzetes, vastag posztszinaptikus denzitású aszimmetrikus szinapszisok a strata moleculare belső (A,D) középső (B,E) és külső (C,F) harmadában, kontroll (A-C) és epilepsziás (D-E) betegben. A szinapszisok többsége dendriten (A-F, nyilak) és tüskén (B,E nyilak) végződik, nem ritka, hogy egy terminális több szinapszist ad ugyanazon (C) vagy különböző célelemeken (B,E). Mérce: 1 μm (Magloczky *et al.*, 2000)

84



Az elektronmikroszkópos viszgálat során három részre osztottuk a strata granulosum+moleculare kiterjedését, belső, középső és külső harmadra, és külön-külön megvizsgáltuk bennük az aszimmetrikus szinapszisok részarányát a str. moleculare egészében végződő, szinaptizáló CR-immunpozitív terminálisokhoz viszonyítva. 21. Ábra. A strata granulosum+moleculare belső, középső és külső harmadában talált, CRimmunpozitív terminálisok részaránya. A terminálisok száma: Kontroll 1: 92; Kontroll 2: 103; Szklerotikus epilepsziás HE9: 129; Nem-szklerotikus epilepsziás HE15: 117 szinaptizáló terminális (Magloczky et al., 2000)



CR-pozitív szinapszisok részaránya a str. moleculare

Megfigyelhető, hogy a CR-immunpozitív, aszimmetrikus szinapszist adó terminálisok eloszlása megváltozik epilepsziás betegekben, és míg kontrollban jelentős részük a szemcsesejtréteghez közel helyezkedik el, epilepsziás betegekben elfoglalják a str. moleculare teljes szélességét, szklerotikus és nem-szklerotikus betegekben egyaránt, tehát nem a szétvándorló szemcsesejtek okozzák a pálya kiterjedését (Magloczky et al., 2000).

IV./ 3.3. Calretinin-tartalmú sejtek kapcsolatai és változásai epilepsziás gyrus dentatusban

Calretinin kizárólag nem-principálissejtekben van jelen, melyek a hippocampus minden régiójában és rétegében előfordulnak (Gulyas *et al.*, 1992; Gulyas *et al.*, 1996). A legtöbb calretinin-immunpozitív sejtet és rostot patkányban a hilusban és a CA3 régió stratum lucidumában találták (Gulyas et al.1992). Két csoportját különböztethetjük meg a calretininpozitív interneuronoknak: a sűrűn tüskés dendritű neuronok csak a hilusban és a CA3 stratum lucidumban fordulnak elő, a stratum lucidumban dendritjeik párhuzamosan futnak a stratum pyramidaleval, és nem hagyják el a réteget. A síma dendrítű típus sejtjei a hippocampus minden régiójában megtalálhatók (Gulyas *et al.*, 1992). Kolokalizációs vizsgálatok szerint a síma dendritű sejtek minden esetben tartalmaznak GABA-t (Miettinen *et al.*, 1992), axonjuk nem hagyja el a hippocampust, hanem helyben arborizál, és a CA1-ben elsősorban más gátló neuronokon végződik, interneuron-szelektív sejt (Gulyas *et al.*, 1996).

Emberben a CR-tartalmú sejtek eloszlása és morfológiája különbözött a patkányétól. A legtöbb sejt a CA1 régióban található, itt helyezkednek el a patkány CA1-ben találthoz hasonló síma dendritű sejtek, valamint egy multipoláris sejteket tartalmazó sűrű réteg a strata radiatum és lacunosum-moleculare határán, ami patkányban nincs jelen (Nitsch & Leranth, 1993; Nitsch & Ohm, 1995; Urban *et al.*, 2002). A CA3-ból hiányoznak a jellegzetes tüskés sejtek a str. lucidumból (22. ábra).

22. Ábra: A humán hippocampus CR-tartalmú rostjainak eloszlása, camera lucida rajz,HK10 (Urban *et al.*, 2002)

dc_349_11



A gyrus dentatus kevesebb sejtet tartalmaz, mint a CA1, ezek méreteloszlása rendkívül változatos. Találhatóak a hilusban 5-10 µm ármérőjű sejtek 1, maximum két kiinduló dendrittel, multipoláris sejtek rendkívül kiterjedt dendritfával, melynek egy részét a stratum moleculareba nyújtják, nagyméretű, trianguláris sejtek hosszú dendritekkel, valamint jellegzetesek a str. moleculare tetején elhelyezkedő horizontális dendritű sejtek (23. A ábra),

melyek egy része Cajal-Retzius sejtnek bizonyult reelin-tartalmuk alapján (Abraham & Meyer, 2003).

A CR-pozitív sejtek nyúlványai gyakran alkotnak dendritikus összefekvéseket (Urban *et al.*, 2002) (23. C ábra) ahogyan patkányban is (Gulyas *et al.*, 1992).

IV/.3.3.1. A CR-sejtek eloszlása és száma az epilepsziás betegek gyrus dentatusaban

A sejtek száma epilepsziás esetekben lecsökken, mely a legkifejezettebben szklerotikus esetekben figyelhető meg (23. ábra, B) (Magloczky *et al.*, 2000). A jelenséget epilepszia modellben is leírták (Magloczky & Freund, 1993; 1995), azonban emberben a CR-sejtek megőrződését, sőt, megemelkedett számát írták le epilepsziás betegek hippocampusában (Blumcke *et al.*, 1996; Blumcke *et al.*, 1999). Hogy tisztázzuk ezt az ellentmondást, részletes mennyiségi viszgálatot végeztünk, és megszámoltuk a CR-tartalmú sejteket a hippocampus minden régiójában. Az analízist az adatok egyben tartása és jobb áttekinthetősége miatt a CA1 fejezetben mutatom be.

23. Ábra: CR-immunfestett sejtek fénymikroszkópos eloszlása kontroll (A) és epilepsziás (B), szklerotikus gyrus dentatusban. Nyilak mutatnak a sejtekre. A C ábra a CR-immunpozitív dendritek összefekvését mutatja egy kontroll gyrus dentatus szemcsesejt rétegében (nyílhegyek). Mérce: A,B: 100 μm; C: 15 μm



calretinin-immunreaktív sejtek a gyrus dentatusban



Megvizsgáltuk a CR-immunpozitív axonterminálisokat a stratum moleculareban. Kétféle terminálist találtunk, az egyik vastag posztszinaptikus denzitású aszimmetrikus szinapszist adott, és a hozzáférhető adatok alapján a supramammillaris magból eredő pályához tartozott (Nitsch & Leranth, 1993; Magloczky *et al.*, 1994; Borhegyi & Leranth, 1997a), a másik szimmetrikus szinapszisokatt képezett, és minden valószínűség szerint helyi interneuronokból eredt (Urban *et al.*, 2002). Az előző fejezetben már beszámoltam a supramammillaris pálya elhelyezkedéséről és annak kiterjedéséről epilepsziás betegek gyrus dentatusában (Magloczky *et al.*, 2000). Itt megmutatom a CR-immunpozitív terminálisok szinaptikus célelem megoszlását.

91

dc_349_11

11. Táblázat. CR-immunfestett, aszimmetrikus szinapszist adó terminálisok célelemei a str. granulosum+moleculareban, kontroll és epilepsziás betegekben (két kontroll és két szkleotikus epilepsziás alany adatai összevonva).

	CR-immunpozitív aszimmetrikus							
	szinapszisok							
	dendrit tüske sejttest							
Kontroll	73%	19%	3%					
Epilepsziás	83%	16%	1%					

A szimmetrikus szinapszist adó terminálisok az összes talált CR-immunpozitív szinapszis 2%-át tették ki kontrollban, és nagytöbbségük a str. moleculare külső harmadában helyezkedett el. Epilepsziás betegekben kicsit megnőtt a szimmetrikus szinapszisok részaránya, 7% volt a szklerotikus, és 9% a nem-szklerotikus beteg esetében. A szimmetrikus szinapszist adó szinapszisok dendriteken végződtek (24. ábra), kontrollban és epilepsziás betegekben is, sejttesten nem találtunk CR-festett szimmetrikus szinapszist.

24. Ábra: Aszimmetrikus és szimmetrikus szinapszist adó terminálisok epilepsziás beteg str. molecularejaban. A supramammillaris pálya rostjai aszimmetrikus szinapszist adnak főleg dendriten és tüskén (A, C nyilak) a lokális interneuronok kizárólag szimmetrikus szinapszist adnak főleg szemcsesejtek dendritjeire (B, D, vékony nyilak). Mérce: 1 μm



Megállapíthatjuk, hogy a sejtek számának csökkenése ellenére a szimmetrikus szinapszist adó terminálisok, noha eredetileg is kevesen voltak (2%) nem tűntek el teljesen, hanem kismértékben megemelkedett relatív arányuk, de szinaptikus célelemeik nem változtak.

IV./4. A funkcionálisan különböző gátlósejttípusok és kapcsolataik átalakulása temporális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő betegek műtétileg eltávolított hippocampusában: a CA1 régió interneuronjai

IV./4. 1. A periszomatikus gátlásban résztvevő sejetk

IV./4.1. 1. A periszomatikus gátlásban részt vevő PV-tartalmú sejtek változásai

A PV-tartalmú sejtek zöme a patkányhoz és majomhoz hasonlóan (Kosaka *et al.*, 1987; Katsumaru *et al.*, 1988b; Nitsch *et al.*, 1990; Seress *et al.*, 1991; Ribak *et al.*, 1993) a strata pyramidale és radiatum rétegekben helyezkedik el a CA1-ben (Braak *et al.*, 1991; Seress *et al.*, 1993a). Ezek nagyméretű, hosszú, síma dendritű sejtek, dendritjeik a piramissejtek apikális dendritjével párhuzamosan futnak, axonjaik a piramissejtek periszomatikus régiójában végződtek. A str. oriensben is találhatóak PV-immunpozitív sejtek, ezek dendritjei horizontálisan helyezkednek el (25., 26. A ábra). A sejtek összsűrűsége messze elmarad a rágcsálókban találtnál, de a sejtek robusztusabbak. Gyakoriak a hoszan egymás mellett futó, összefekvő dendritek (27. Ábra), ezeket a sejtek közötti elektromos szinapszisokkal, gap junction-okkal hozzák összefüggésbe (Kosaka & Hama, 1985; Katsumaru *et al.*, 1988a; Seress *et al.*, 1993a; Fukuda & Kosaka, 2000), melyek lehetővé teszik a sejtek gyors kapcsolatát és a közreműködésüket gamma oszcilláció kialakításában (Penttonen *et al.*, 1998; Galarreta & Hestrin, 1999; Gibson *et al.*, 1999; Tamas *et al.*, 2000).

Sűrű PV-pozitív terminálisfelhő található a str. pyramidaleban, melyet főleg az axoaxonikus és kosársejtek axonjai képeznek (27. D ábra).

Az enyhe és foltos típusba tartozó nem-szklerotikus hippocampusban a PV-tartalmú sejtek eloszlása és az axonfelhő elhelyezkedése nem változik szignifikánsan (25. B, 26. B, C ábra). A sejtek dendritfái valamivel kurtábbak (25. ábra), de továbbra is előfordultak köztük dendritikus összefekvések. Szklerotikus esetekben viszont, ahol piramissejtek nem vagy alig láthatók, a PV-immunpozitív sejtek száma drasztikusan

lecsökkent, alig néhány metszetben lehetett egyáltalán immunfestett sejttestet vagy akár dendritet látni, festett terminálisok nem fordultak elő. Ezért a kvantitatív elektronmikroszkópos vizsgálatoknál a szklerotikus hippocampusokat nem elemeztük.

25. Ábra: A CA1 régióban található PV-immunfestett interneuronok camera lucida rajza, kontroll (A) és nem-szklerotikus (B) valamint szklerotikus (C) betegből. A legtöbb sejt a str. pyramidale-radiatumban van. Megfigyelhető, hogy a sejtek száma és eloszlása nem különbözik lényegesen a nem-szklerotikus esetekben a kontrolltól. Szklerotikus CA1-ben viszont a sejtek száma drasztikusan lecsökken, az esetek messze túlnyomó többségében nincs is immunfestett sejt a metszetekben. Nagyon ritkán lehet találni egy-egy eltorzult dendritfájú interneuront, de nem a strata pyramidale-radiatumban, hanem a lacunosum-moleculareban. Mérce: 100 μm



26. Ábra: CA1 areában található PV-immunfestett sejtek morfológiája és eloszlása kontroll (A) és nem szklerotikus, enyhe (B) és foltos (C) típusba tartozó, valamint szklerotikus (D) esetekben (3. típus). Az enyhe és foltos típusban (1-2 típus) a sejtek eloszlása és morfológiája hasonlít a kontrollhoz. A C ábrán megfigyelhető a foltos sejtpusztulás, egymás mellett látható egy piramissejt gazdag- és szegény régió, amit a PV festés enyhe háttere tesz láthatóvá. A sejtek radiális dendritjeit nyílhegyek jelzik, a sejteket nyilak. A szklerotikus hippocampus zsugorodott, a rétegeket nem lehet elkülöníteni, sem PV-immunfestett sejtek, sem piramissejtek nem láthatók, terminálisok nincsenek, csak egy dendrit festődik az egész régióban (nyílhegyek). Mérce: 50 μm



27. Ábra: A nagy nagyítású fénymikroszkópos képeken megfigyelhetőek a kontroll szövet (A, B) PV-immunfestett nagyméretű, multipoláris sejtjei hosszú, radiálisan futó dendritekkel és a dendritek között gyakori összefekvésekkel (B). Sűrű terminálisfelhő figyelhető meg a nem-szklerotikus esetekben a piramissejtek körül, melyek gyakran alkotnak kosarakat (C, D nyílhegyek). A szklerotikus esetekben (E) nincs terminális

festés, a CA1 összezsugorodott, sejttestek nem láthatóak, a metszetben csak egy PVfestett dendrit van. A CA1 rétegeit jelöltük: s.p.: str. pyramidale, s. l.m.: str. lacunosummoleculare; s. o,p,r: a szklerotikus CA1 egymástól megkülönböztethetelen rétegei, strata pyramidale, oriens, radiatum. Mérce: A,C-E: 10 µm; B: 20 µm



A sejteket megszámoltuk a kontrollban, valamint az enyhe, foltos és szklerotikus típusú epilepsziás betegek CA1 régiójában. A sejtek száma szignifikánsan csökkent a szklerotikus és foltos típusú epilepsziás betegek CA1 régiójában. Az enyhe típusban a 97

sejtek száma nem különbözött lényegesen a kontrolltól. Meg kell azonban jegyezni, hogy a terminális festés a sejtcsökkenés ellenére is megmaradt a foltos típusban, még a piramissejteket és PV-immunfestett sejteket nem tartalmazó régiókban is megfigyeltük a PV-axonfestést a str. pyramidaleban.

Az alanyok kódszámar		Sejtek száma a CA1-ben/ mm ²
Kontroll	HK10	3.85
	HK11	6.81
	HK6	4.97
	átlag	5.21
Epilepsziás	P40	3.06
(enyhe)	P79	4.97
	átlag	4.02
Epilepsziás	P16	1.01
(foltos)	P31	0.89
	átlag	0.95
Epilepsziás	P75	1.10
(szklerotiku	P22	1.15
s)	átlag	1.12

12. Táblázat. A PV-immunfestett sejtek sűrűsége kontroll és foltos típusú, valamint szklerotikus epilepsziás betegek CA1 régiójában.

IV./4.1.1. 2. A PV-tartalmú sejtek bemenete kontroll és epilepsziás CA1-ben

Három kontrollból (HK2,6,11) 5 PV-immunfestett sejtet vizsgáltunk meg a piramissejt rétegben. A sejttesteken és a dendriteken nagyszámú aszimmetrikus, és kevés szimmetrikus szinapszist adó terminális végződött (28. B, C ábra), a sejttesteken PV-immunpozitív szimmetrikus szinapszis is előfordult. A PV-pozitív sejttestekre érkező aszimmetrikus szinapszisok száma lényegesen magasabb volt a CA1 régióban, mint a gyrus dentatusban, 10-13 szinapszis (közülük 1-2 szimmetrikus, a többi aszimmetrikus) (28. A ábra). A PVimmunreaktív dendritek között gyakori volt a zonula adhaerentia is (Seress *et al.*, 1993a) (28. C ábra).

28. Ábra. A PV-immunfestett sejtek bemenete kontroll CA1 régióban. Az A ábrán lévő sejt számos szinapszist kap (nyílhegyek) melyek nagyobb nagyítással az A1-A6 ábrákon láthatóak.

A szinapszisok nagy része aszimmetrikus (nyilak), az A3 ábrán egy szimmetrikus szinapszist adó terminális figyelhető meg (nyílhegy). A dendritek bemenete is rendkívül sűrű, főleg aszimmetrikus szinapszisokat kapnak (B, nyilak). Gyakran találtunk zonula adherentiat az egymás mellett fekvő PV-immunfestett dendritek között (C, d1-d2 dendritek, d2 ké szinapszist kap, vékony nyilak, a zonula adherentiát nyílhegyek jelölik). Mérce: A: 2 μm; A1-A6, B, C: 1 μm



Epilepsziás szövetből származó mintákban négy sejtet vizsgáltunk meg (HE15, 40, 54, 79), ezek foltos és enyhe típusú epilepsziás mintákból származtak, a szklerotikus metszetekben nem voltak PV-immunpozitív sejtek. Sem a sejttestek, sem a dendritek bemenetében nem volt jelentős változás (29. ábra), nagy mennyiségű aszimmetrikus, és kevés szimmetrikus szinapszist kaptak, ahogyan kontrollban (28. ábra). A zonula adherentia itt is gyakori volt a dendritek között (29. D ábra) sőt, PV-immunpozitív és PV-immunnegatív dendritek között is találtunk ilyen struktúrát (29. D ábra). Megvizsgáltuk a szklerotikus szövetben ritkán előforduló PV-festett dendriteket. Ezeket gyakran részben gliarostok borították, de hasonló szinaptikus bemenetet kaptak, sok aszimmetrikus, kevés szimmetrikus szinapszissal, mint a kontroll vagy a nem-szklerotikus esetekben.

29. Ábra. A PV-immunfestett sejtek bemenete epilepsziás CA1 régióban. Az A ábrán lévő sejt számos szinapszist kap (nyílhegyek) melyek nagyobb nagyítással az A1-A6 ábrákon láthatóak. A szinapszisok nagy része aszimmetrikus (nyilak), az A3 és A6 ábrán egy szimmetrikus szinapszist adó terminális figyelhető meg (nyílhegy). A dendritek bemenete is rendkívül sűrű, főleg aszimmetrikus szinapszisokat kapnak (B-D nyilak). Gyakran találtunk zonula adherentiat az egymás mellett fekvő PV-immunfestett dendritek között (B), de PV-immunpozitív és nem immunpozitív dendrit között is (C). B: d1-d2 dendritek, d1 és d2 is szinapszist kap, vékony nyilak, a zonula adherentiát nyílhegyek jelölik, C: d1-d2 dendritek, d2 is szinapszist kap, vékony nyíl, a zonula adherentiát nyílhegyek jelölik. A C és D ábrán láthatóak a dendriteket részben borító gliarostok is. Mérce: A: 2 μm; A1-A6, B, C, D: 1 μm



101

IV./4.1.1.1. A PV-immunfestett axonterminálisok végződési mintázata kontroll és epilepsziás CA1-ben

Négy kontroll és négy epilepsziás beteg CA1 régiójában (enyhe és foltos típus) vizsgáltuk meg a PV-pozitív axonterminálisok célelemeit. A 15. műtét anyagában megkülönböztettük a piramissejteket tartalmazó (15 PS+) illetve nem tartalmazó (15 PS-) foltokat, ezekből külön blokkokat ágyaztunk át, és a feldolgozás során is szétválasztottuk. Azonban a két mintavételi helyről nagyon hasonló eredményeket kaptunk, így ezeket az adatokat végül összevontuk. A PV-immunreaktív terminálisok nagy része piramissejteken végződik: axon iniciális szegmentumon, sejttesten, proximális, és disztalis dendriteken, tüskéken (Seress *et al.*, 1993a) (30., 31. ábra, 13. táblázat). Kis részük interneuron dendritekre adott szimmetrikus szinapszist, ezek között előfordulnak PV-immunpozitív dendritek is. Elkülönítettük az azonosíthatatlan kis átmérőjű dendriteket is (13. táblázat). A kontroll és az epilepsziás mintákban nem találtunk jelentős különbséget a célelemek százalékos eloszlásában, de az egyes esetekből származó különböző mintavételi helyek között nagy eltéréseket találtunk mind a kontroll, mind az epilepsziás csoportban (13. táblázat). A HE31., az 54. és a 15.betegek CA1 régiójában a célelemek egy jelentős része degenerálódó profil volt (31. H ábra, 13. táblázat).

30. Ábra. A PV-immunfestett terminálisok szinaptikus célelemei kontroll CA1 régióban. A terminálisok kizárólag szimmmetrikus szinapszist adtak piramisok sejttestjén (A, a bekeretezett rész nagyobb nagyítással a bevágott ábrán látható, a szinapszist nyilak jelölik), axon iniciális szegmentumon (B, nyíl), disztális (C, nyíl) és proximális (D, nyíl) dendriteken, és ritkán tüskén (E, nyílhegy). Mérce: A: 2 μm; B-E: 0.5 μm



31. Ábra. A PV-immunfestett terminálisok szinaptikus célelemei epilepsziás betegek CA1 régiójában. Csak a nem-szklerotikus (enyhe és foltos típusú) betgek CA1 régiójában voltak immunfestett terminálisok. A PV-immunpozitív terminálisok szimmetrikus szinapszisokat adtak életbenmaradt (A, B) és degenerálódó piramissejtek sejttestjén (H) (a B ábrán az A ábra bekeretezett terminálisa látszik nagyobb nagyítással, a szinapszist nyíl jelöli), proximális dendritjein (C, nagyobb nagyítással D, a szinapszist nyilak mutatják), disztális dendriteken (G), axon iniciális szegmentumon (AIS, F, nyíl) és néha tüskén (E). Degenerálódó elemeken is találtunk szinapszist (G, H nyilak). A G és E képen a profil aszimmetrikus szinapszist is kap nem jelölt terminálistól (nyílhegy). Mérce: A,C: 1 μm; B, D-H: 0.5 μm



105

13. Táblázat. PV-pozitív axon terminalisok szinaptikus célelem eloszlása a CA1 regióban n= a vizsgált terminálisok száma

PS: piramis sejt; 15PS+: A HE15 beteg azon mintája, amely fénymikroszkópos szinten látható piramissejteket tartalmaz; 15PS-: A HE15 beteg azon mintája, amely fénymikroszkópos szinten látható piramissejteket nem tartalmaz, elektronmikroszkópos szinten ezekben a mintákban nagy mennyiségű degenerálódó elemet találtunk.

-			-					-	
		AIS	PS	PS	PS	Inter	Nem	Tüske	A degenerá-
			szoma	proxi-	dend-	ne-	azono-		lódó elemek
				malis	rit	uron	sí-		aránya a
				dendrit		dend-	tott		célelemek
						rit	kis		között
							dendrit		
	10 (n=53)	9.4%	17.0%	26.4%	17.0%	1.9%	15.1%	13.2%	0%
	11 (n=55)	16.4%	9.1%	3.6%	18.2%	3.6%	20.0%	29.1%	0%
Kontrol	2 (n=55)	7.3%	23.6%	29.1%	5.5%	0%	18.2%	16.4%	0%
1	6 (n=52)	25.0%	9.6%	13.5%	5.8%	3.8%	30.8%	11.5%	0%
HK		14.5%	14.8%	18.2%	11.6%	2.3%	21.0%	17.6%	
	Összesen								
	kontroll								
	40 (n=60,	28.3%	6.7%	25.0%	6.7%	0%	21.7%	11.7%	0%
	enyhe)								
Epilep-	54 (n=56,	21.4%	16.1%	26.8%	5.4%	0%	23.2%	7.1%	60.7%
sziás	enyhe)								
HE	31 (n=52,	6.2%	7.7%	24.6%	1.5%	0%	40.0%	20.0%	81.5%
	foltos)								
	15	13.1%	14.0%	15.9%	12.1%	7.5%	32.7%	4.7%	15: 54.2%
	(n=107,								15PS+:
	foltos)								11.7%
									15PS-:
	1			1	1	1	1		
									92.9%

ä	17.3%	11.1%	23.1%	6.4%	1.9%	29.4%	10.9%	
Osszesen								
epilepsziás								

IV./4.1.1.3. A CA1 régió piramissejtjeinek periszomatikus bemenete kontroll és epilepsziás alanyokban

A periszomatikus gátló bemenetek vizsgálatához piramissejtek sejttestjeinek és axon iniciális szegmentumainak szinaptikus borítottságát elemeztük.

A CA1 piramissejtek szomatikus bemenetét három kontroll, és öt epilepsziás (3 enyhe és 2 foltos típus) mintában vizsgáltuk. Minden kontroll és epilepsziás esetben két-két hasonló méretű blokkból vettünk mintát, és meghatároztuk a szinaptikus borítottságot, illetve a 100 μm szóma kerületre eső szinapszisszámot. Minden sejttestre érkező szimmetrikus szinapszist figyelembe vettünk, PV-tartalmától függetlenül. Aszimmetrikus szinapszis csak ritkán fordult elő sejttesten, ezeket nem vettük figyelembe és nem mértük. A kontroll szövetben a piramissejtek sejttestjének kerületére eső szinaptizáló terminálisok 16-29%-a volt PV-pozitív, ez egyes epilepsziás esetekben megnőtt, másokban nem változott (14. táblázat)

A HE15 beteggel azért foglalkoztunk különösen részletesen, mert CA1 régiójában fénymikroszkóppal jól elkülöníthetőek voltak a piramissejteket tartalmazó, illetve nem tartalmazó foltok. Az elektronmikroszkópos vizsgálat viszont feltárta, hogy ott is vannak piramissejtek, ahol fénymikroszkópban nem látszottak, de ezek degenerálódó sejtek. A PVimmunfestett terminálisok célelem-eloszlása, és a piramisok sejttestjeinek és iniciális szegmentumainak szinaptikus borítottsága viszont nem különbözött szignifikánsan a sejttesteket tartalmazó, és nem tartalmazó foltokban, sőt, a degenerálódó sejttestek szinaptikus bemenete is hasonló volt a nem degenerálódó sejttestek bemenetéhez, ezért az adatokat összevontuk.

A HE54 beteget a fénymikroszkópos vizsgálat alapján az enyhe típusba soroltuk, elektronmikroszkópban viszont itt is foltos sejtpusztulást találtunk: az egyik mintavételi helyen a sejtek 68%-a a degenerálódott, a másik mintában a piramissejtek mindegyike ép sejt volt. A 31. műtétben pedig, amelyet a foltos típusba soroltunk, mind a piramissejtekben szegény, mind a piramissejtekben gazdag mintavételi helyen nagyjából azonos arányú degenerálódó sejt volt (81%, illetve 84%).

Ebből következik, hogy fénymikroszkópos vizsgálatból nem lehet pontosan megbecsülni, milyen arányban és milyen mintázatban pusztultak el a piramissejtek egy epilepsziás beteg CA1 régiójában. A betegek patológiai csoportokba való tartozását nem változtattuk meg, mert azt a fénymikroszkópos vizsgálatok alapján állítottuk fel, és lehetetlen minden beteg teljes CA1 régióját ilyen részletességgel megvizsgálni.

Mind a kontroll esetekben, mind az epilepsziásokban, az azonos metszetből, de különböző helyről vett minták közt rendszerint nagy eltéréseket tapasztaltunk a szinapszisszámban és a szinaptikus borítottságban is. Az esetek mintavételi helyeit összevonva azonban egy csoporton belül (kontroll, epilepsziás enyhe, foltos típus) nagyon hasonló eredményeket kaptunk. Ez felhívja a figyelmet a mintavétel módszerének körültekintő megválasztására. Megbízható eredmény eléréséhez nem csak a vizsgálatba bevont alanyok száma, de az egyes alanyokból vett minták száma is meghatározó lehet.

Az enyhe típusú epilepsziás esetekben a piramissejtek sejttestjének szinaptikus bemenete a kontrollhoz hasonló volt (14. táblázat). A foltos típusba tartozó epilepsziás esetekben pedig szignifikánsan kisebb, mint a kontroll, vagy az enyhe típusba sorolt esetekben (14. táblázat). Így tehát, a mintavételi helyek szórása ellenére, és a degenerálódó elemek bizonytalan fénymikroszkópos azonosíthatósága ellenére, az enyhe és a foltos típus mégis elkülönül egymástól a piramissejtek sejttestjének szinaptikus borítottságában.

14. Táblázat. A CA1	piramissejtek sejttes	stjének szinaptikus	bemenete, csak
szimmetrikus szinaps	zisok		

n= a vizsgált piramissejtek száma, a csillaggal jelöltek szignifikánsan különböztek a kontrolltól, p<0.05

		A piramissejt	Szinapszisok	A PV-pozitív	A szinaptikus
		sejttestek	(terminalisok)	terminálisok	aktív zóna
		szinaptikus	száma/ 100 μm	aránya (%)	átlagos hossza
		borítottsága (µm	szoma kerületr		(µm)
		szinapszis/ 100 µm			
		szoma kerület,			
		átlag±S.E.M.)			
	2 (n=40)	0.676 ± 0.086	3.36	29.07	0.168
Kontroll	10 (n=40)	0.633±0.074	3.44	15.85	0.167
НК	6 (n=40)	0.604 ± 0.070	3.59	24.42	0.160
	Átlag össz	0.637	3.462	23.11	0.165
	kontroll				
Epilep-	40 (n=40)	0.730±0.097	3.95	26.67	0.168

107

108

sziás	54 (n=39)	0.583±0.079	3.13	26.92	0.172
	79 (n=40)	0.613±0.075	3.63	46.07	0.159
HE	Enyhe	0.642	3.572	33.22	0.166
	típus				
	Átlag				
	15 (n=39)	0.444±0.076 *	2.06	45.10	0.198
	31 (n=40)	0.404±0.075 *	2.18	48.00	0.170
	Foltos típus	0.424 *	2.117	46.55	0.184
	Átlag				
	Átlag össz	0.554	2.990	38.55	0.173
	epilepsziás				

A piramissejtek axon iniciális szegmentumának szinaptikus borítottságát három kontroll (HK2, 6, 10) és öt epilepsziás (HE 40, 54, 79, enyhe típus, és HE15, 16, foltos típus) esetben vizsgáltuk. Megmértük az AIS-ok szinaptikus borítottságát (μm szinapszishossz/ 100 μm axon iniciális szegmentum kerület), és a 100 μm axon iniciális szegmentumr kerületre eső szinapszisszámot. Minden axon iniciális szegmentumon szinaptizáló terminálist megmértünk, azok PV-tartalmától függetlenül. A terminálisok közel fele tartalmazott parvalbumint a kontroll CA1 régióban, ez az epilepsziás esetekben is hasonló arány volt (15. táblázat).

Az axon iniciális szegmentumok szinaptikus borítottsága nagyon hasonlított a kontrollhoz, egyik epilepsziás esetben sem változott szignifikánsan (p<0.05, Kruskal Wallis ANOVA, Mann-Whitney U teszt) (15. táblázat).

A HE15 beteg fénymikroszkóposan sejtszegénynek és sejtdúsnak látszó régióit ebben a vizsgálatban is elkülönítettük. A degenerálódó piramissejteket tartalmazó foltból vett mintában az axon iniciális szegmentumok egy része is degenerálódó volt, de nem az összes. A degenerálódó axon iniciális szegmentumok szinaptikus borítottsága lényegesen kisebb volt, mint a megőrződött axon iniciális szegmentumok borítottsága.

A szinaptikus aktív zónák összehasonlításából kiderült, hogy az aktív zónák hossza megnőtt az axon iniciális szegmentumokon (15. táblázat). Hasonló növekedést epilepsziás szövetben mások is találtak állatkísérletes modellben (Nusser *et al.*, 1998), és mi magunk is más vizsgált emberi epilepsziás mintákban (CB-tartalmú terminálisok, SPR-sejtek dendritikus bemenete, l. következő fejezetek).
15. Táblázat. A CA1 piramissejtek axon iniciális szegmentumának (AIS) szinaptikus bemenete kontroll és epilepsziás esetekben n= a vizsgált AISok száma

		AIS	AIS szinaptikus	A szinapszi-	A PV-	A szinaptikus
		teljes	borítottság	sok	immunpozitív	aktív zónák
		hossz	átlaga (µm	(termináli-	terminálisok	átlagos hossza
		(µm)	szinapszis/ 100	sok) száma/	aránya (%)	(µm)
			µm AIS kerület,	100 µm AIS		
			mean±S.E.M.)	kerületr		
Kontroll	10 (n=76)	678.93	2.57±0.32	12.23	45.88	0.172
нк	2 (n=60)	450.47	2.28±0.33	10.21	45.65	0.163
	6 (n=40)	466.52	2.01±0.34	10.07	44.68	0.151
	Össz kontroll átlag		2.28	10.84	45.41	0.162
Epilepsziás	40 (n=76)	921.61	3.03±0.45	13.67	35.71	0.181
HE	54 (n=41)	407.58	3.75±0.66	13.49	41.82	0.208
	79 (n=40)	440.09	2.75±0.37	16.81	50.00	0.156
	Enyhe típus átlag		3.17	14.66	42.51	0.181
	16 (n=39)	532.08	1.53±0.37	7.14	40.98	0.187
	15 (n=63)	577.24	3.24±0.51	10.57	36.84	0.264
	Foltos típus átlag		2.39	8.85	38.91	0.225

110

Össz	2.86	12.34	41.07	0.199
epilepszi-				
ás átlag				

A CA1 régió piramissejtjeinek periszomatikus bemenetéről tehát megállapítottuk, hogy az axon iniciális szegmentumon megőrződik, de nem növekszik meg, mint a gyrus dentatusban, a sejttesten az enyhe típusban kontrollszerű, míg a foltos típusban szignifikánsan csökken.

IV/4.2. A dendritikus gátlásban részt vevő gátló interneuronok változásai TLE betegek CA1 régiójában

IV./4.2.1. Calbindin-tartalmú sejtek és szinaptikus reorganizációjuk epilepsziában

Calbindin mind a piramissejtekben, mind interneuronokban előfordul a CA1 régióban (Sloviter *et al.*, 1991; Seress *et al.*, 1992; Seress *et al.*, 1993a). Az interneuronok a CA1 régió minden rétegében előfordulnak, símadendritűek vagy ritkán tüskések, változatos sejtméretűek és dendritfájúak, a str. oriensben általában horizontálisan futnak a denditek, a radiátumban a piramissejtek apikális dendritjével párhuzamosan, de multipoláris sejtek is előfordulnak különböző irányultságú dendritekkel. Előzetes adatok alapján a dendritikus gátlásban vesznek részt (Seress *et al.*, 1993a). Megszámolásukra nem vállalkoztunk a piramissejtek CB-immunpozitivitása miatt, noha a piramissejtek CB-immunfestése általában halványabb, mint az interneuronoké (Seress *et al.*, 1991), ez nem minden esetben van így, ezért csak pontatlan és bizonytalan eredményt kaphattunk volna.

Epilepsziás betegek CA1 régiójában a piramissejtek nagyrésze elveszti CB-pozitivitását, ahogyan a gyrus dentatusban a szemcsesejtek. Másik hasonlóság, hogy a szklerotikus régióban is megnőnek a sejttestek és tüskéssé válnak, a denritek is sokkal hosszabban kifestődnek, és síma

dendritű sejtet alig találni. A 32. ábrán a gyrus dentatust és a CA1-t együtt mutatjuk be, hogy a hasonló fénymikroszkópos szintű változások jobban szembeötöljenek (32. ábra).

32. Ábra. Calbindin-immunfestett metszetek kontroll, nem-szkleotikus és szklerotikus epilepsziás beteg CA1 és gyrus dentatus régiójából. Megfigyelhető, hogy már az enyhe típusú epilepsziás betegben eltűnik a calbindin a piramissejtek és szemcsesejtek egy részéből. A szklerotikus betegben a CA1 régió atrofizálódik, a piramissejtek elpusztulnak, a rétegeket nem lehet elkülöníteni, az interneuronok sejttestje megnő, dendritjeik megnyúlnak. A gyrus dentatusban pedig szétvándorolnak a részben CB-negatív szemcsesejt-testek, az interneuronok sejttestje megnő, dendritjeik megnyúlnak.



A CA1 régió nagyobb nagyítású képén (33. ábra) jobban megfigyelhető a CBimmunfestett interneuronok morfológiai változása.

33. Ábra: A fénymikroszkópos kép a CB-immunpozitív sejtek eloszlását mutatja kontroll (**A**) és epilepsziás (**B**) CA1 régióban. A rétegeket szaggatott vonallal jelöltük. A régiók rövidítései: s.o.: stratum oriens, s. p.: str. pyramidale, s.r.: str. radiatum.

A) Kontrollban a piramissejtek és nem-principális sejtek egyaránt mutatnak calbindinimmunpozitivitást (nyilak).

B) Szklerotikus epilepsziás CA1-ben a piramissejtek eltűnnek, a rétegek összetömörödnek. Az interneuronok nagy számban maradnak életben, de morfológiailag megváltoznak, sejttestjük megnő, dendritjeik eltorzulnak (nyilak). A kontrollban síma dendritű sejteken tüskék jelennek meg, dendritjeiken (C, nyílhegyek) és egyes sejtek szómáján is (D, nyílhegyek). Mérce: **A-B**: 70 μ m, **C-D**: 50 μ m

Eredetileg megjelent: Neuroscience 115. 961-978, 963. oldal, Wittner et al., 2002.



calbindin-immunreaktív sejtek a CA1 régióban

34. Ábra. Camera lucida rajz kontroll és epilepsziás szklerotikus beteg CA1 régiójából, a CB-immunfestett sejtek eloszlását és morfológiai torzulásait mutatja. A sejttestek egy része megnő, a dendritfák eltorzulnak, gubancossá válnak. Mérce: 100 μm



IV./4.2.1.1. A CB-immunpozitív sejtek bemenetének és kimenetének változásai

Két humán kontroll CA1 régió különböző rétegeiből származó, összesen nyolc CBimmunpozitív sejtet vizsgáltunk meg elektronmikroszkópban. Ezek a sejttestek kevés számú bemenetet kaptak, mind szimmetrikus, mind aszimmetrikus szinapszist adó, kisméretű terminálisok végződtek rajtuk (35. ábra). A CB-tartalmú interneuron dendritek főleg aszimmetrikus szinapszisokat kapnak, szimmetrikus szinapszist csak ritkán figyeltünk meg a dendriteken (35. B, C ábra).

35. Ábra: Kontroll CA1 régióból zármazó interneuron sejttest (A) és dendritek szinaptikus bemenetei láthatók a képen (B, C). A sejttest kevés szinapszist kapott, egyet találtunk ezen a sejttesten (bekeretezve), az aszimmetrikus szinapszist adó (nyíl) terminális nagyobb nagyítással a bevágott kisképen látható. Az interneuron dendriteken legtöbbször kisméretű aszimmetrikus szinapszist adó terminálisok végződtek (B, C nyilak). Mérce: 1 μm, a kisképen: 0.1 μm



Epilepsziás betegek CA1 régiójában öt CB-immunreaktív sejtet vizsgáltunk meg (2 szklerotikus és két enyhe esetből). A sejttestekre érkező szinapszisok típusa és száma nem

mutatott jelentős változást . Az szklerotikus CA1-ben a sejttesteket részben gliarostok fedték (36. A ábra). Az epilepsziás szövetben több szimmetrikus szinapszist adó terminális végződött a CB-pozitív dendriteken, és a terminálisok szinaptikus aktív zónájának és méretének megnövekedését is tapasztaltuk (36. B, C, D ábrák). A szklerotikus CA1 régióban a CBimmunpozitív interneuronok dendritjein megnőtt a CB-immunfestett terminálisok aránya (mind szimmetrikus, mind aszimmetrikus szinapszist adók, (36. B, C ábra). Szinaptikus kapcsolat CB-festett elemek között sokkal ritkább volt a kontroll és a nem-szklerotikus epilepsziás CA1 régióban (17. táblázat).

36. Ábra. Szklerotikus beteg CA1 régiójából származó CB1-immunpozitív sejttest (A) és dendritek szinaptikus bemenete (B-D). A profilokat részben gliarostok borítják (kis nyilak, G, g). A dendritken több szimmetrikus szinapszis végződik (B, D nyitott nyilak) és feltűnően több lesz a CB-immunfestett terminálisok aránya. Az aszimmetrikus szinapszisokat teli nyíl jelöli. A terminálisok nagyobbak, mint a kontrollban. Mérce: 1 μm



A CB-immunfestett interneuronok dendritjeinek kerületét és a rajtuk levő szinapszisok hosszát megmértük, majd kiszámoltuk a szinaptikus borítottságot (µm szinapszishossz/ 100µm dendrit) valamint a szimmetrikus és aszimmetrikus szinapszishosszok arányát a teljes szinapszishosszra vonatkoztatva (µm szimmetrikus, és aszimmetrikus szinapszishossz/ µm teljes szinapszishossz, százalékban kifejezve).

A teljes szinaptikus borítottság (beleszámítva a szimmetrikus és aszimmetrikus szinapszisokat is) nem változott jelentősen az epilepsziás szövetben (16. táblázat) de rétegekenként nagy eltérést mutatott. a teljes szinaptikus borítottság sokkal nagyobb volt a str. pyramidale+radiatumban és oriensben, mint a str. lacunosum-moleculareban (16. táblázat). Az eredmények hasonlóak voltak a str. oriensben és pyramidale+radiatumban, így ezeket összevontuk. Noha a CB-immunfestett interneuronok teljes szinaptikus borítottsága nem változott, de minden epilepsziás mintában (a megőrződött rétegzettségű CA1 régióval rendelkező enyhe és foltos típus típusú betegekben is) megnőtt a szimmetrikus szinapszishosszok aránya a teljes szinapszishosszra vonatkoztatva (36. ábra, 16. táblázat).

16. Táblázat. A CB-pozitív interneuron dendritek szinaptikus borítottsága a CA1 regióban, rétegek szerint. A strata pyramidale, oriens és lacunosum moleculare az összehasonlíthatóság miatt van összevonva, mert ezeket a rétegeket szklerotikus betegekben nem lehet elkülöníteni.

Patológiai cso	oport	A vizsgált CB- immunpozitív dendritek teljes kerülete (μm)	Teljes szinaptikus borítás (µm szinapszis/ 100 µm dendrit kerület)	Az aszimmetrikus szinaptikus hossz aránya a teljes szinaptikus borítottsághoz	A szimmetrikus szinaptikus hossz aránya a teljes szinaptikus borítottsághoz
Kontroll (HK 10, 11)	str. or.+pyr.+rad	489.2	8.63	92.8%	7.2%
	str. lac-mol.	182.3	2.39	86.9%	13.1%
Epilepszi- ás (enyhe) (HE40, 54)	str. or.+pyr.+rad	534.7	6.83	75.7%	24.3%
	str. lac-mol.	221.3	2.69	73.2%	<mark>26.8%</mark>
Epilepsziás (szkleroti- kus)	str. or.+pyr.+rad	648.7	10.72	69.4%	30.6%
(HE21, 29, 35, 37)	str. lac-mol.	357.7	4.22	67.0%	33.0%

IV./4.2.1.2. A CB-immunfestett terminálisok eloszlása és célelemei a CA1 régióban

A CB-immunpozitív axonterminálisok targetelemeit a CA1 régió minden rétegében megvizsgáltuk (Wittner *et al.*, 2002). A kontroll CA1-ben az aszimmetrikus szinapszisokat adó terminálisok egy része a CA1 piramissejtektől ered, a lokális interneuronok szimmetrikus

szinapszisokat alkotnak (Seress *et al.*, 1993a). Az aszimmetrikus szinapsziok fő céleleme a piramissejtek tüskéje, valamint piramissejtek és CB-negatív interneuronok dendritje, míg a szimmetrikusoké a piramissejt dendrit volt, csak kisrészük, mintegy 0-10% végződött interneuronon (37. ábra, 17. táblázat).

Jelentős mennyiségű CB-immunfestett terminális adott szimmetrikus szinapszist a CA1 régió piramissejt rétegében (37. A ábra, 17. táblázat), amiről korábban emberi hippocampust vizsgáló munkákban nem tettek említést.

37. Ábra. CB-immunpozitív terminálisok szinaptikus célelemei a kontroll CA1 régióban. A str. pyramidale-ban jelentős mennyiségű, szimmetrikus szinapszist adó terminális végződött piramissejtek axon inicialis szegmentumán (A, B, üres nyilak). A legtöbb aszimmetrikus (C, nyíl)) vagy szimmetrikus (D, üres nyíl)szinapszist adó terminális piramissejtek dendritjén vagy tüskéjén szinaptizált. Mérce: 1 μm



17. Táblázat. A CB-immunpozitív terminálisok (szimmetrikus és aszimmetrikus) célelemei a
CA1 régió különböző rétegeiben, kontroll és epilepsziás (enyhe és szklerotikus) betegekben.
n= a vizsgált szinaptizáló terminálisok száma.

Patológiai cso	port			szim	metrikus			aszimmet	rikus
			n	piramis	Piramis	AIS	n	piramis	Piramis
				sejt,	sejt			sejt,	sejt
				interne-	tüske			interne-	tüske
				uron				uron	
				dendrit				dendrit	
Kontroll HK	str. or		59	69.5%	28.8%	1.7%	40	67.5%	37.5%
6, 10	str. py	/r.+rad.	55	54.5%	25.5%	20.0%	62	24.2%	75.8%
	str. la	c-mol.	35	62.9%	37.1%	-	28	57.1%	42.9%
Epilepsziás	str. or		32	75.0%	21.9%	3.1%	55	32.7%	67.3%
enyhe	str. py	/r.+rad.	41	61.0%	19.5%	19.5%	82	12.2%	87.8%
(HE 40, 54)	str. la	c-mol.	15	73.3%	26.7%	-	84	28.6%	71.4%
			n	Interne-	Inter-	AIS	n	Interne-	Interne-
				uron	neuron			uron	uron
				dendrit	tüske			dendrit	tüske
Epilepsziás		str.	90	72.2%	26.7%	1.1%	67	64.2%	35.8%
szklerotikus		or.+							
(HE21, 35, 37)	pyr.+r							
		ad.							
		str.	53	73.6%	26.4%	-	43	62.8%	37.2%
		lac-							
		mol.							

IV./4.2.1.3.. CB-tartalmú axo-axonikus sejt az emberi hippocampus CA1 régiójában

A piramissejt rétegben axon inicialis szegmentumon végződő CB-immunpozitív terminális arány – 20% - túl magas volt ahhoz, hogy dendritikus gátlósejtek véletlenszerű szinapszisai magyarázhatták volna. Feltételeztük, hogy egy axo-axonikus sejttől erednek, amely CB-immunpozitív. Azonban lehetséges volt, hogy ez nem önnálló sejttípus, hanem a PV-tartalmú axo-axonikus sejtek egy olyan alcsoportja, mely CB-t is tartalmaz. Ezért kettős fluoreszcens immunfestést végeztünk annak vizsgálatára, hogy a CA1 régióban a PVimmunfestett sejtek között vannak-e CB-immunpozitívak is.

38. Ábra. CB-PV fluroszcens kettősfestés human kontroll CA1 régióban, A-B: strata oriens+pyramidale, C-D: str. Oriens, rétegek jelölve. Az A-B és C-D képeken ugyanaz a régió látható, a nyilak jelzik az egyiken vagy a másikon az immunfestett sejteket. Nincs kolokalizáció. Mérce: 50 μm



Semmilyen kolokalizációt nem találtunk a két marker között, ráadásul a sejtek morfológiája is erősen eltér, a PV-tartalmú sejtek sokkal nagyobbak és robusztusabbak a dendritjeik. Ezért feltételezzük, hogy a CB-immunfestett terminálisok a piramissejtek axon iniciális szegmentumán egy olyan CB-tartalmú axo-axonikus gátlósejttől erednek, amit eddig még nem írtak le.

IV./4.2.1.4.CB-immunfestett dendritek mint a CB-immunpozitív axonterminálisok célelemei

A CB-immunpozitív dendritek CB-festett terminálisok általi beidegzését külön megvizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a CB-immunpozitív interneuron dendritek mennyisége szignifikánsan megnövekszik a célelemek között a szklerotikus hippocampusban (18. táblázat).

18. Táblázat. A CB-immunpozitív dendritek megoszlása a CB-immunpozitív terminálisok (szimmetrikus és aszimmetrikus) célelemei között a CA1 régió különböző rétegeiben, kontroll és epilepsziás (enyhe és szklerotikus) betegekben. n= a vizsgált szinaptizáló terminálisok száma.

Patológiai csop	ort		szimmetriku	IS		aszmmetrikus	5
		n	Pyramissejt	CB-pozitív	n	Pyramissejt	CB-
			CB-negatív	interneuron		CB-negatív	pozitív
			interneuron			interneuron	inter-
							neuron
Kontroll	str. or.	79	90.0%	10.0%	67	92.3%	7.7%
(HK6, 10, 11)	str. pyr.+rad.	76	93.1%	6.9%	129	93.9%	6.1%
	str. lac-mol.	53	90.0%	10.0%	42	100%	0%
Epilepsziás	str. or.	32	90.1%	9.9%	55	89.3%	10.7%
(enyhe)	str. pyr.+rad.	41	98.1%	1.9%	82	96.2%	3.8%
(HE40, 54)	str. lac-mol.	15	100%	0%	84	98.1%	1.9%
		n	CB-negatív	CB-pozitív	n	CB-negatív	CB-
			interneuron	interneuron		interneuron	pozitív
							inter-
							neuron
Epilepsziás	str.	90	57.3%	<mark>42.7%</mark>	67	40.0%	60.0%
(szkleroti-	or.+pyr.+rad						
kus)							
(HE21, 35,	str. lac-mol.	53	38.7%	<mark>62.3%</mark>	43	36.5%	73.5%
37)							

A CB-immunreaktív terminálisok mérete, és a szinaptikus aktív zónák hossza megnövekedett az epilepsziás CA1 régióban. Ráadásul feltűntek olyan terminálisok, különösen a str. lacunosum-moleculareban, amelyek mohaterminálisokra hasonlítottak (Mathern *et al.*, 1997a; Mathern *et al.*, 1997b) (39. ábra).

39. Ábra. Szimmetrikus (A) és aszimmetrikus szinapszist adó (B, C) CB-immunpozitív terminálisok célelemei az epilepsziás hippocampus CA1 régiójában. Az elemek kis része, főleg a szklerotikus CA1-ben, degenerálódó dendrit (A, üres nyíl, szimmetrikus szinapszis). Az aszimmetrikus szinapszisok nagy részét mohaterminális-jellegű végződések adták (C, D nyíl). A terminálisok mérete és a szinaptius aktív zónák hossza megnő. Mérce: 1 μm

calbindin-immunreaktív terminálisok szinaptikus célelelemei az epilepsziás CA1-ben



IV./4.2.2. Az SPR-expresszáló sejtek eloszlása és morfológiai változásai epilepsziás betegek CA1 régiójában

IV./4.2.2.1. A kontroll humán CA1 régió SPR-immunfestett sejtjeinek morfológiai és neurokémiai jellemzői

Ahogyan az a 15. ábrán látható, a CA1 régió tartalmazza a legtöbb SPRimmunpozitív sejtet a humán hippocampusban (Toth *et al.*, 2007). A sejtek többsége síma dendritű, multipoláris vagy "bitufted" neuron (40. B,C ábra). A str. oriensben a sejtek dendritjei horizontális elrendeződésűek (40. A ábra). Olykor nagyméretű, hosszú, régió határokon túlnyúló dendritű sejteket is találtunk (40. D ábra)

40. Ábra. SPR-expresszáló sejtek morfológiai megjelenése a CA1 régióban. A: horizontális neuron a str. oriensben. B-D: multipoláris sejtek a cornu Ammonisban. D: óriás méretű neuron, ezt a sejtet a CA3 régióban találtuk, de jellegzetességei megegyeznek az egyéb régiókban ritkán megjelenő nagyméretű sejtekével. Mérce: 50 μm



Mivel az SPR-immunfestés nem adott axonfestést, nem tudtunk következtetni a sejtek funkciójára posztszinaptikus célelemeik alapján. Ezért fluoreszcens kettősfestést végeztünk SPR és olyan markerek között, amelyek ismert funkciójú interneuron típusokat jelenítenek meg. PV és CCK: periszomatikus gátlósejtek (Lotstra & Vanderhaeghen, 1987; Braak *et al.*, 1991; Seress *et al.*, 1993a; Katona *et al.*, 2000); CB és SOM: dendritikus gátlósejtek (Chan-Palay, 1987; Sloviter *et al.*, 1991; Seress *et al.*, 1993a); CR: dendritikus és interneuronszelektív sejtek (Urban *et al.*, 2002). Három kontroll hippocampus metszeteit kettősfestettük ezekkel a markerekkel és SPR-rel, és a kolokalizációt fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk 19. táblázat, 41. ábra).

<u>19. Táblázat</u>: Az SPR és különböző funkciójú interneuronokat jelölő neurokémiai markerek kolokalizációja a kontroll humán hippocampus CA1 régiójában.

	CB	PV	CR	SOM	CCK
A vizsgált SPR-	325	524	335	566	217
immunpozitív sejtek					
száma					
A más markereket is	8.7 %	4 %	2.6 %	3.4 %	0 %
tartalmazó SPR-					
immunpozitív sejtek					
aránya					

Az SPR-immunpozitív sejtek arányában

A különböző markereket tartalmazó sejtek arányában

	СВ	PV	CR	SOM	CCK
A vizsgált különböző	190	281	280	188	103

marker tartalmú sejtek					
száma					
Az SPR-t is tartalmazó	20,8 %	7.3 %	2.6 %	7.8 %	0 %
marker-immunpozitív sejtek aránya					

41. Ábra. Fluorescens kettős festés a kontroll hippocampus CA1 régiójában, az SPR és kalcium-kötő fehérjék, valamint neuropeptidek kolokalizációját vizsgáltuk. Az autofluoreszcens lipofuszcin szemcsék a sejtekben könnyen elkülöníthetőek a homogén specifikus jelöléstől. A-B: SPR-CB kolokalizáció (kettősnyíl). C-D: az SPR-pozitív interneuron (nagy nyíl) nem tartalmaz CR-t (kis nyíl). E-F: az SPR-pozitív sejtek nem tartalmaznak PV-t (nagy nyíl) és a PV-tartalmú sejtek nem SPR-pozitívak (kis nyíl). G-H: az SPR-pozitív sejt nem tartalmaz CCK-t (nagy nyíl), és a CCK-tartalmú sejt nem tartalmaz SPR-t (kis nyíl). I-J: a kettős nyíl az SPR és a SOM kolokalizációját mutatja egy interneuronban. Mérce: 20 μm



Azt találtuk, hogy az SPR alig fordul elő a vizsgált markerekkel együtt. Az SPRkifejező sejtek csak kis hányada tartalmazza bármelyik markert, legnagyobb, 8,7%-a CB-t,

127

míg a marker-tartalmú sejtek közül a SOM-, CCK-, CR-, PV-tartalmú sejtek nem vagy alig, a CB-tartalmú sejteknek csak 20%-a exprsszál SPR-t. Az eredmény várható volt az SPRimmunpozitív sejtek morfológiája alapján: ilyen méretű és dendritprofilú sejtek nincsenek például a PV-t vagy CR-t tartalmazó sejtek között. Az eredmények rendkívül különböztek a patkányban megfigyeltektől, ahol jelentős kolokalizációt mutattak ki ezekkel a markerekkel (Acsady *et al.*, 1997; Sloviter *et al.*, 2001).

Megállapíthatjuk, hogy az SPR-immunpozitív sejtek között biztosan nincsenek ismert periszomatikus markert (PV, CCK) tartalmazó kosár- vagy axo-axonikus sejtek, sem interneuron-szelektív (CR) sejtek. Noha a dendritkius sejtek markereivel sem mutattak nagyarányú kolokalizációt, csak CB fordul elő bennük említésre méltó arányban, és az is kevés, kizárásos alapon feltételezhetjük, hogy az SPR sejtek egy része nagy valószínűséggel a dendritikus gátlásban vesz részt. Valamint, mivel az SPR ismert periszomatikus markerrel említésre méltó kolokalizációt nem adott, vagy nem vesz részt a periszomatikus gátlásban egyáltalán, vagy egy olyan egyéb markert tartalmazó periszomatikus gátlósejt típusba tartozhat a sejtek egy része, amit még egytelen fajban sem írtak le.

IV./4.2.2.2. Az SPR-kifejező sejtek morfológiai, neurokémiai és számbeli változásai epilepsziás humán hippocampus CA1 régiójában

Epilepsziás hippocampusban a sejtek számának és morfológiai tulajdonságainak megváltozását tapasztaltuk, a változások mértéke összefüggött a sejtpusztulás és reorganizáció mértékével (42-44. ábra) (Toth *et al.*, 2007)

42. Ábra. A kisnagyítású fénymikroszkópos kép az SPR-immunfestett sejtek (nyilak) eloszlásáról kontroll, epilepsziás nem-szklerotikus és szklerotikus hippocampus CA1 régiójában. Az SPR-immunpozitív interneuronok hasonló mennyiségben vannak jelen a nem-

szklerotikus mintában mint kontrollban, míg számuk jelentősen lecsökken a szklerotikus esetekben. A szklerotikus CA1 erősen atrofizált. Mérce: 100 μm



43. ábra. SPR-immunpozitív sejtek kontroll (A, B, C) és epilepsziás (D,E,F, G) hippocampusok CA1 régiójából. A: Az SPR-immunpozitív sejtek többsége a cornu Ammonisban multipoláris sejt, több vékony elsődleges dendrittel. B: Horizontális dendritű orsó alakú sejtek találhatóak a str. oriensben a CA1 és CA3 régiókban. C: A csepp alakú sejtek a str. radiatumra jellemzőek. Egyetlen fő dendritjük a sejttesthez közel kettéágazik és a str. lacunosum-moleculare felé fut. D-E: A nem-szklerotikus epilepsziás CA1-ben a dendritmorfológia drasztikusan eltér a kontrolltól. A legtöbb dendrit gyöngyözötté válik, a

130

kevés sejtet látunk, azok dendritjei az esetek többségében ritkán tüskézettek. Két fő típusuk a kevés dendrittel rendelkező horizontális sejtek (F) és a torz, varikóz, szegmentált dendritekkel rendelkező sejtek (G). Mérce: 50 μm.



44. Ábra. SPR-immunfestett sejtek camera lucida rajz a CA1 régióból, kontroll és különböző patológiai típusba tartozó epilepsziás betegekből. Megfigyelhető, hogy a sejtek száma és eloszlása a nem-szklerotikus esetekben (enyhe és foltos típus) kontrollhoz hasonló. A dendritfa azonban több elágazást mutat, különösen a foltos típusban, és a dendritek gyöngyözötté válnak. A str. oriensre jellemző orsó alakú sejtek eltűnnek. Szklerotikus esetben a sejtek mennyisége lecsökken, és többségük csupán néhány torz dendrittel bír. Jellegzetes a sejtek össznyomott, horizontális elhelyezkedése. Mérce: 0.1 mm



Megszámoltuk a sejteket a kontroll és különböző patológiai típusba tartozó epilepsziás betegek CA1 régiójában. A nem szklerotikus minták nem különböztek jelentősen a kontrolltól. A szklerotikus mintákban viszont szignifikánsan lecsökkent a sejtek száma kevesebb mint a kontrollban talált felére (45. ábra).

45. ábra. Meghatároztuk az SPR-pozitív sejtek területegységre eső számát kontroll és epilepsziás CA1 régióban. Az SPR-pozitív sejtek mennyisége hasonló volt a kontrollhoz a nem-szklerotikus hippocampusokban (kontroll: 12.5 ± 2.14 , Enyhe típus: 11.53 ± 1.01 , Foltos típus: 12.68 ± 1.84). Azonban a szklerotikus mintákban szignifikánsan lecsökken az SPR-immunfestett sejtek száma (4.97 ± 1.25). (Csillag jelzi a szignifikáns különbséget, p<0.05).



Kvantifikáltuk a dendritmorfológiában megfigyelhető eltéréseket is, camera lucidával kirajzoltuk az SPR-immunfestett sejteket két kontroll, 2 enyhe, 2 foltos és 3 szklerotikus beteg CA1 régiójának egy-egy szegmenséből, minden esetben 2-3 metszetből a kiválasztott szegmens összes sejtjét. A rajzokon meghatároztuk a dendritelágazódási pontokat (46. ábra, 20. táblázat).

46. ábra. Kvantifikáltuk az SPR-pozitív sejtek dendritelágazási pontjait kontroll és epilepsziás hippocampusok CA1 régiójában. Camera lucida rajzot készítettünk a sejtekről, és az elágazási pontokat megszámoltuk. A dendritelágazási pontok száma szignifikánsan megnőtt a nemszklerotikus foltos típusban. A szklerotikus CA1-ben az elágazási pontok száma lecsökkent, a dendritfa leegyszerűsödött és eltorzult. Mérce: 0.1 mm.



134

	Dendritelágazási pontok száma/sejt (átlag±szórás)				
Vizsgált sejtek száma	str. oriens	str. pyramidale + radiatum			
Kontroll (n=33)	4.25 ± 1.04	10.52 ± 3.28			
Enyhe típus (n=30)	6.63 ± 2.88	11.59 ± 4.62			
Foltos típus (n=28)	* 7.25 ± 1.91	* 21.15 ± 4.68			
Szklerotikus típus (n=18)	str. oriens + pyramidale + radiatum				
	3.22 ± 1.26				

<u>20. táblázat</u>: Az SPR-pozitív interneuronok dendritelágazási pontjainak száma kontroll és epilepsziás mintákban. A szignifikáns eltérést csillag jelöli (p < 0.05).

Megvizsgáltuk az SPR-immunfestett sejtek kolokalizációját CB-vel epilepsziás mintákban, hogy megállapítsuk, történt-e változás. Azért nem vizsgáltuk a többi markert, mert egyik sem mutatott morfológiai hasonlóságot az SPR-immunfestett sejtekkel, amelyek nagyon jellegzetes gyöngyözöttséget és dendritszám-szaporulatot mutattak. Nem-szklerotikus hippocampusokban sem PV-, sem SOM-, CCK-, vagy CR-sejteken ilyesmit nem lehetett megfigyelni, a CB-tartalmú sejtek viszont nagy számban megőrződtek, és dendritfájuk megváltozott epilepsziás esetekben (33-34. ábra) (Wittner *et al.*, 2002).

<u>21. Táblázat</u>: Az SPR és a CB kolokalizációja az epilepsziás humán hippocampusban.

Az SPR-pozitív sejtek arányában

	Kontroll	Epilepsziás	Epilepsziás	Epilepsziás
		Enyhe típus	Foltos típus	Szklerotikus
				típus
A vizsgált SPR-	860	642	896	245
pozitív sejtek				
száma				
A CB-t is	8.7 %	9.6 %	14,5 %	16.9 %
tartalmazó SPR-				
pozitív sejtek				
aránya				

A CB-tartalmú sejtek arányában

	Kontroll	Epilepsziás	Epilepsziás	Epilepsziás
		Enyhe típus	Foltos típus	Szklerotikus
				típus
A vizsgált CB-	424	162	426	173
tartalmú sejtek				
száma				
Az SPR-t is	20,8 %	38.2 %	23,7 %	32.2 %
expresszáló CB-				

pozitív sejtek		
aránya		
aranya		

Az eredmények azt mutatják, hogy epilepsziás esetekben nő a kolokalizáció, és megemelkedik az SPR-t és CB-t egyaránt tartalmazó sejtek száma.

IV./4.2.2.3. Az SPR-immunfestett interneuronok bemenete kontroll és epilepsziás CA1 régióban

Az SPR-immunpozitív sejtek szinaptikus bemenetét, és ezek változását 2 kontroll és 7 epilepsziás (2 enyhe, 2 foltos és 3 scleroticus) mintában vizsgáltuk. Minden betegből külön vettünk mintát a str. oriensből és a str. pyramidale-radiatum területből. A szklerotikus esetekben a strata oriens, pyramidale és radiatum rétegek már nem különíthetik el, itt csak egy mintát vettünk.

Az általunk vizsgált mintákban nem volt SPR-immunpozitív axon, vagy axonterminális. Az SPR-immunfestés többnyire a dendritek és sejttestek membránján adott jelölést, de a DAB-reakció szolubilitása miatt idinként elifordult, hogy a végtermék a teljes dendritet kitöltötte.

Szinaptikus bemenetet csak a dendritek kaptak, a sejttesteken egyetlen esetben sem volt szinapszis. A szimmetrikus és aszimmetrikus szinapszisokat a posztszinaptikus denzitás alapján különböztettük meg. A dendritek az esetek 90%-ában aszimmetrikus szinapszist kaptak, de epilepsziás és kontroll mintákban is találtunk kis számú szimmetrikus szinapszist is (47. ábra). Szklerotikus mintákban a dendritek gyakran tüskéssé váltak (48. ábra), a tüskéken is gyakran aszimmetrikus szinapszisok végződtek.

47. ábra. Az SPR-immunreaktív dendritekre sok bemenet érkezik, többségükben aszimmetrikusak mind kontrollban (A, nyíl) mind epilepsziás esetekben (B, D ábrák, nyilak). Ritkán figyelhető meg szimmetrikus szinapszis a dendriteken (C, d2 dendrit, kis nyíl). d1 és d2 dendrit között zonula adherens van (C, nyílhegyek). Az epilepsziás mintákban perforált szinapszisokat is találtunk (D). Mérce: 1 μm



137

48. ábra. A szklerotikus CA1 régióból készült elektronmikroszkópos képeken megfigyelhető a szinaptikus aktív zónák hosszának növekedése (A, B, D, nyilak). Dendritek közötti kontaktusok, puncta adherentiák (A, nyílhegyek), és glianyúlványokkal részben körülvett SPR-immunpozitív elemek (B, C, D) gyakran feltűnnek. Mérce: 1 μm



Megvizsgáltuk, hogy a dendritek szinaptikus borítottsága hogyan változik epilepsziás esetekben. A szinaptikus borítottságot úgy számítottuk, hogy minden patológiai típusból átágyaztunk blokkokat a CA1 régióból, abban az összes dendritet lefényképeztük, megmértük az aszimmetrikus, valamint a szimmetrikus szinapszisok aktív zónájának hosszát, és ezeket viszonyítottuk a dendritprofil kerületéhez, és kiszámítottuk a µm szinapszishossz/100µm dendritkerületet (49. ábra).

49. ábra. A szimmetrikus és az aszimmetrikus szinaptikus borítottság átlagos értékeit mutatja a grafikon. Az aszimmetrikus borítottságban nem mutatható ki szignifikáns eltérés a kontrolltól. A szimmetrikus borítottság azonban a szklerotikus esetekben szignifikánsan nagyobb (a szignifikáns különbségeket csillag jelzi). P<0,05;

n=vizsgált dendritátmetszetek száma.



Azt találtuk, hogy az aszimmetrikus szinapszisok borítottsága nem változik lényegesen, de a szimmetrikus szinapszisok borításának aránya megemelkedik az szklerotikus epilepsziás CA1-ben.

IV./4. 3. A CR-tartalmú interneuronok száma, eloszlása és morfológiai változásai epilepsziás betegek CA1 régiójában

CR a humán hippocampus CA1 régiójában is kizárólag nem-principálissejtekben van jelen (Nitsch & Ohm, 1995). Ahogy erre a IV. 3.3. fejezetben már utaltam, a CA1 régióban helyezkednek el azok a síma dendritű, gracilis, bipoláris sejtek, amelyek hasonlítanak a patkányban megvizsgált interneuron-szelektív sejtcsoporthoz (Gulyas *et al.*, 1996). Fénymikroszkóposan már leírták a humán hippocampus CR-tartalmú sejtjeit (Nitsch & Ohm, 1995; Urban *et al.*, 2002), és elemezték axonterminálisaikat is , amelyek dendriteken végződtek. De célzottan nem elemezték posztszinaptikus targetjeiket, így nyitott maradt a kérdés: vajon a CR-tartalmú sejtek részt vesznek-e az interneuron-szelektív gátlásban a humán hippocampusban.

IV./4. 3.1. A CR-tartalmú sejtek funkcionális morfológiai vizsgálata a humán kontroll hippocampus CA1 régiójában

Hat kontroll humán hippocampusban vizsgáltuk meg a CR-tartalmú sejtek eloszlását, morfológiáját és posztszinaptikus célelemeit (Urban *et al.*, 2002). A sejtek általános eloszlását és leírását a IV./2.3.1. fejezetben már megadtam. Újra felhívom a figyelmet a sejtek piramissejt dendritekkel párhuzamosan futó, síma dendritjeire, és a köztük nagyon gyakori dendritikus összefekvésekre, ami a CA1 régióban még gyakoribb, mint a gyrus dentatusban. Szintén figyelmet érdemel, hogy a CR-immunpozitív dendriteken gyakran találtunk CR-immunfestett terminálisokat (50. ábra).

50. Ábra. CR-imunfestett dendritek a humán hippocampus CA1 régiójából. A: a dendritek között gyakoriak voltak az összefekvések (nyílhegyek). A CR-immunpozitív dendriteket sokszor innerválták CR-immunfestett terminálisok (B, kis nyilak). Mérce: 15 μm



Az ultrastruktúrális vizsgálatokhoz két post mortem perfundált humán agyat használtunk fel, a legjobb elektronmikroszkópos megőrzöttség miatt.

A CR-immunfestett sejttestek szerkezete hasonlított a majomban leírt CRimmunfestett sejtekéhez (Seress *et al.*, 1993b), kis sejttest, vékony citoplazmával, mely az interneuronokra jellemzően számos mitokondriumot tartalmazott. A dendriteken gyakran láttuk a fénymikroszkópban már megfigyelt CR-immunfestett terminálisokat, melyek szimmetrikus szinapszist adtak az interneuron dendritekre (50., 51. a, b ábra). A dendritikus összefekvéseket is megvizsgáltuk, és a dendritek között zona adherentiat találtunk (51. d ábra).

Megvizsgáltuk a CR-immunpozitív axonterminálisokat és végződési mintázatukat a kontroll CA1-ben. Kétféle, szimmetrikus és aszimmetrikus szinapszist adó CRimmunfestett axonterminálist találtunk a CA1 régióban, az aszimmetrikus szinapszist adó a str. radiatum alján és a str. lacunosum-moleculareban fordult elő, és főleg piramissejtek dendritjein szinaptizált, ritkán tüskén (Urban *et al.*, 2002). Ezek a rostok korábbi tanulmányok alapján a nucleus Reuniens Thalamiban erednek (Amaral &

Cowan, 1980; Bokor *et al.*, 2002). A szimmetrikus szinapszisok minden eddigi adat szerint a lokális interneuronoktól eredtek (Freund & Buzsaki, 1996), és ezek gyakran végződtek interneuronok és piramissejtek dendritjein is (51. a, b, c ábra). A dendritek közötti összefekvések gyakran bizonyultak zonula adherentiának (51. d ábra).

51. Ábra. A CA1 régióban található, CR-immunpozitív szimmetrikus szinapszist adó terminálisok gyakran végződtek CR-immunfestett dendriteken (a, d1-d2 között zonula adherentia látható, fehér nyílhegy), jelöletlen interneuron dendriteken, melyeket a dús szinaptikus bemenet és a nagyméretű, sok mitokondrium alapján azonosítottunk (b) valamint piramissejt dendriteken (c), a bekeretezett rész látható a bevágott kisképen nagyobb nagyítással. A szinapszisokat nyilak jelzik. A d képen két (d1-d2) CR-immunpozitív interneuron dendrit közötti zonula adherentia látható (fehér nyílhegyek). A harmadik dendrit (d3) is szorosan összesimul d2-vel, de köztük nincs dendrodendritikus kapcsolat, legalábbis ebben a metszetben. Mérce: 0.5 μm



Megvizsgáltuk a szimmetrikus szinapszist adó CR-immunfestett terminálisok posztszinaptikus elemeinek eloszlását is (Urban *et al.*, 2002). A posztszinaptikus elemeket elektronmikroszkópos morfológiai jellegeik alapján különítettük el, a piramissejtek dendritjei kevés mitokondriumot tartalmaznak, és az esetek messze túlnyomó többségében nincs rajtuk aszimmetrikus szinapszis (Megias *et al.*, 2001), az

interneuronok dendritjei több mitokondriumot tartalmaznak és több szinapszist kapnak (51. ábra). Megkülönböztettük az azonosítatlan dendritek kategóriáját is.

22. Táblázat. A CR-immunfestett, szimmetrikus szinapszist adó terminálisok célelemeinek megoszlása a CA1 régióban. Zárójelben a vizsgált szinaptizáló terminálisok száma látható.

Posztszinap-	CR-	Pramis-	CR-	CR-negatív	Piramis	Azonosítat-
tikus target	pozitív	sejt test	pozitív	interneuron	dendrit	lan
	szóma		dendrit	dendrit		dendrit
Humán						
kontroll	1.05%	5.26%	30.52%	11.57%	27.36%	24.21%
HK10						
(N=95)						
Humán						
kontroll	2.19%	6.59%	23.10%	13.19%	23.10%	31.87%
HK11						
(N=91)						

Az eredmények azt mutatják, hogy a CR-immunfestett dendritek többnyire dendriteken végződnek, méghozzá nagyobb gyakorisággal (42-46%) végződnek CR-immunfestett és jelöletlen interneuronok dendritjén, mint piramissejt dendriteken, de azokra is adnak 25-28%-ban szinapszist. Ez azt jelenti, hogy a sejtek funkcionálisan heterogének, bizonyosan van köztük interneuron-szelektív sejt, amit a közel 50%-os posztszinaptikus interneuron dendrit target valószínűsít, de van köztük dendritikus gátlósejt is, mert a szinapszisok közel 30%-a piramissejt dendrit volt. A periszomatikus gátlásban nem vesznek részt, mert csak ritkán végződtek sejttesten, és axon iniciális szegmentumon soha (Urban *et al.*, 2002).

Patkányban a CR-tartalmú, szimmetrikus szinapszist adó terminálisok gyakran végződnek CB-pozitív interneuronok dendritjén, ezek a sejtek a dendritikus gátlásban vesznek részt (Gulyas *et al.*, 1996), és a CR-tartalmú interneuron-szelektív sejtek szinkronizálják a működésüket a megfelelő hatékonyságú dendritikus gátlás eléréséhez (Gulyas *et al.*, 1996; Miles *et al.*, 1996). Kíváncsiak voltunk, emberben is végződnek-e a CR-

tartalmú interneuronok CB-immunfestett interneuronokon, melyek saját eredményeink alapján emberben is nagytöbbségben dendritikus gátlósejtek (fejezet). Ezért CR-CB DAB-DAB-Ni kettősfestést végeztünk humán kontroll és nem-szklerotikus hippocampusban, és analizáltuk a CR-tartalmú terminálisok (DAB-Ni, fekete reakció végtermék) végződését a CB-tartalmú (DAB, barna csapadék) sejteken (52. ábra) (Toth *et al.*, 2010).

52. ábra. CB-CR kettős immunfestés humán kontroll hippocampus CA1 régiójában DAB-DAB-Ni módszerrel. A CB-tartalmú nem-principálissejtek dendritjein (barna csapadék) nagy számban találhatók CR-immunfestett (DAB-Ni, fekete csapadék) terminálisok (nyilak) mind kontroll (A) mind nem-szklerotikus epilepsziás (B) mintákban. A vizsgált CB-pozitív dendritszakaszok a str. oriensben és radiátumban (közel a str. pyramidalehoz) helyezkedtek el, így a velük közeli kapcsolatban lévő CR-pozitív terminálisok interneuronoktól származtak, mert az elektronmikroszkópos célelem eloszlás vizsgálatok szerint ezek a területek mentesek az aszimmetrikus szinapszist adó CR-pozitív terminálisoktól. Mérce: 10 μm


IV./4. 3.2. A CR-tartalmú sejtek eloszlása, morfológiája epilepsziás betegek CA1 régiójában.

Hasonlóan a gyrus dentatushoz, és előzetes állatkísérletes epilepszia modellekben talált változásokhoz, azt találtuk, hogy epilepsziás betegek CA1 régiójában csökken a CR-tartalmú sejtek száma, és megváltozik a sejtek morfológiája (Magloczky & Freund, 1993; 1995; Magloczky *et al.*, 2000; Andre *et al.*, 2001; Slezia *et al.*, 2004; van Vliet *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2006). Azonban más kutatók a CR-tartalmú sejtek megőrződését figyelték meg, sőt, több CR-immunpozitív sejtet találtak epilepsziás emberi hippocampusban, mint kontrollban (Blumcke *et al.*, 1996). Feltűnt azonban, hogy ezek a kutatók cikkeikben nagyon hosszú post mortem idejű (akár 48 óra) kontroll agyakat használtak összehasonlításra, holott nekünk a különböző post mortem idejű kontroll agyak vizsgálatakor (IV.1.2. fejezet) az derült ki, hogy éppen a CR-immunpozitív sejtek a legérzékenyebbek a post mortem idő megnövekedésére. Ezért újra számoltuk a CRimmunfestett sejteket a hippocampus összes régiójában, úgy, hogy rövid (2-4) és hosszú (8-10 h) post mortem idejű kontrollt is bevettünk a mintába, valamint szklerotikus és nem szklerotikus epilepsziás betegeket (53.-57. ábra) (Toth *et al.*, 2010).

53. ábra. A CR-pozitív sejtek eloszlása a kontroll és epilepsziás gyrus dentatusban. A: kontroll, post mortem 2 óra. Jellegzetesek a hilusban található nagy sejtek, a str. moleculareban található horizontális sejtek, valamint a kisebb méretű CR-pozitív sejtek, melyek a GD minden rétegében láthatók. A hosszú post mortem idejű kontrollban (B, post mortem 8 óra) alig néhány CR-immunpozitív sejt látható a GD-ban. Az epilepsziás foltos típusban (C) a sejtek eloszlása és mennyisége hasonlít a rövid post mortem idejű kontrollhoz, egyes dendritek gyöngyözötté válnak. Az epilepsziás szklerotikus típusban kevés a sejt, de még így is több, mint a hosszú post mortem idejű kontrollban. A dendritek gyöngyözöttek. A sejteket nyilak jelölik. Mérce: 100 μm p.m.: post mortem

Gyrus dentatus



54. Ábra. A: Kontroll CA1 régió, post mortem 2 óra. Számos immunoreaktív sejt látható az összes rétegben, hosszú sima dendritekkel. A radiálisan futó denritekkel rendelkező, gracilis sejtek láthatók leggyakrabban a str.pyramidaleban és a str. radiatumban. B: CA1 régió, post mortem 8 óra. Alig néhány CR-immunfestett sejt van jelen ezekben a mintákban, azoknak is szegregálódik a dendritfája. A foltos típusú epilepsziás CA1-ben valamivel kevesebb a sejt, mint a kontrollban, de eloszlásuk hasonló. A szklerotikus CA1 összezsugorodik a piramissejtek halála miatt, a CR-tartalmú sejtek száma erősen lecsökken. Mérce: A-D: 100 μm p.m.: post mortem

CA1 region

Control (10) post mortem 2h



Epileptic "patchy" type

C



Epileptic sclerotic type



55. Ábra. A nagy nagyítású fénymikroszkópos képeken a CR-pozitív sejtek dendritjeinek morfológiai változásai láthatóak. A rövid post mortem idejű kontroll CA1 régióban a hosszú, síma dendritek jellemzőek, melyek gyakran egymás mellett párhuzamosan fekszenek hosszabb-rövidebb szakaszokon (A, nyílhegy). A hosszú post mortem idejű kontroll mintákban azonban a dendritek degenerálódnak, gyöngyözötté válnak (B). A nemszklerotikus foltos típusú mintákban (C) az immunfestett dendritek gyöngyözöttek, szegmentáltak (nyilak). A dendritek közötti kapcsolatok ritkábban figyelhetőek meg, mint a kontroll mintákban (nyílhegyek). A szklerotikus CA1-ben (D) szegmentálódott, gyöngyözött dendritek láthatók, ép dendrit alig (nyilak). Mérce: 20 μm

HK 10 p.m. 2 h

R Epilepsziás foltos szklerotikus

hippocampus egyes alrégióiban. A: kontroll, post mortem 2 óra; B: kontroll, post mortem 8 óra; C: epilepsziás, nem-szklerotikus (foltos típus); D: epilepsziás, szklerotikus. A CR-tartalmú sejtek a hippocampus valamennyi alrégiójában előfordulnak (A). Mennyiségük drasztikusan lecsökken a hosszú post mortem idejű kontrollban (B) és az erősen atrófiás, szklerotikus epilepsziás mintákban (D). A nem-szklerotikus mintákban mennyiségük hasonló a rövid post mortem idejű kontroll mintákhoz (C). Mérce: 1mm

56. Ábra. Camera lucida rajzok foglalják össze a CR-immunpozitív sejtek eloszlását a humán

HK 15 p.m. 8 h



 Kontroll post mortem 2 óra
 Kontroll post mortem 8 óra

 A
 B

 Imm
 B

 A
 Imm

A sejteket megszámoltuk a hippocampus minden régiójában 3 rövid post mortem idejű (2-4 h) és 3 hosszú post mortem idejű (8-10 h) kontrollban, valamint 7 nem-szklerotikus (foltos és enyhe) és 5 szklerotikus epilepsziás betegben, minden mintából 2-4 metszetben. A sejtek számát területegységre határoztuk meg. A kvantitatív adatok igazolták a sejtek számának csökkenését jósló előzetes megfigyeléseket (57. ábra).

57. Ábra. A CR-pozitív sejtek denzitását kvantitatív módszerekkel meghatároztuk rövid (2-4 óra) és hosszú (8-10 óra) post mortem idejű kontroll mintákban, valamint nem-szklerotikus és szklerotikus epilepsziás esetekben. A GD-t (A, B), a CA3 régiót (C), a CA1 régiót (D, E) és a str. moleculare-fissura határán fekvő, horizontális dendritű, feltehetően Cajal-Retzius sejtek sűrűségét (F) külön vizsgáltuk. Szignifikánsan kevesebb CR-pozitív sejt található a hippocampus összes régiójában a hosszú post mortem idejű szövetekben (A-E). A nemszklerotikus esetekben a hilusban (B) és a CA3-ban (C) találtunk szignifikáns sejtszám csökkenést. A többi régióban a CR-immunoreaktív sejtek mennyisége és eloszlása hasonlít a rövid post mortem idejű kontrollhoz. A szklerotikus mintákban a CA1 régió kivételével

mindenhol szignifikáns csökkenés látható (A, B, C) a rövid post mortem idejű kontrollhoz viszonyítva. A CA1 régió térfogata jelentősen lecsökken a szklerotikus hippocampusban, ezért nem találtunk szignifikáns különbséget egységnyi területre vonatkoztatva (D). A CA1 régió egységnyi hosszára vonatkoztatva a CA1-ben is szignifikáns sejtszám csökkenés mutatható ki (E). A str. moleculare-fissura határán található, CR-pozitív, feltételezhetően Cajal-Retzius sejtek száma lecsökkent az epilepsziás mintákban és a hosszú post mortem idejű kontroll mintákban is (F). A szignifikáns különbséget csillag jelzi. p<0.05 (Mann-Wittney U teszt) K: kontroll;n epi: epilepsziás; p.m.: post mortem









dc_349_11





A grafikonok mutatják, hogy hosszú post mortem idejű kontrollok nem alkalmasak a CRimmunfestett sejtek vizsgálatára, mert a CR-tartalmú sejtek nagyon érzékenyek energia- és oxigénszegény állapotokra, és eltűnnek a mintából. Ugyanezt tapasztaltuk isémián átesett patkányokban is (Freund & Magloczky, 1993). Epilepsziában is redukálódik a sejtek száma, de különösen nem szklerotikus epilepsziás betegekben jóval több marad életben, mint hosszú post mortem idejű kontrollokban. A CA3 régió és a hilus különösen érzékenyek epilepsziás kitettségre, még a nem-szklerotikus esetekben is csökken a sejtek száma. Meglepő volt viszont,

hogy a szklerotikus CA1-ben a piramissejtek pusztulása miatti zsugorodás maszkolta a sejtszámcsökkenést, és így a sejtsűrűség nem különbözött szignifikánsan a rövid post mortem idejű kontrolltól, csak amikor CA1 egységnyi hoszra számítottuk ki a sejtek mennyiségét. Ez mutatja, hogy a szklerotikus zsugorodás mennyire nehézzé teszi a mennyiségi számításokat a megváltozott térfogatú régiókban és milyen pontatlanságokat eredményezhet. A str. moleculare- fissura határon elhelyezkedő horizontális, feltehetően Cajal-Retzius sejtek (Abraham & Meyer, 2003) száma is szignifikánsan csökkent epilepsziás mintákban.

IV.4.3.3. .A CR-tartalmú dendritek és terminálisok reorganizációja epilepsziás betegek CA1 régiójában

Részletes elektronmikroszkópos vizsgálatot végeztünk a CR-tartalmú dendriteken, és analizáltuk, hogyan változik a bemenetük és a dendritek közötti kapcsolatrendszer. Azt találtuk, hogy a kontrollban megfigyelhető egyenes dendritek helyett itt a varikóz dendritek gyöngyei gyakran elszakadnak egymástól (58. B ábra). Noha megfigyelhetőek a kontrollhoz hasonló (58. A ábra) zonula adherentiák a dendritek között, de ezek sokkal ritkábbak. A gyöngyözött dendriteken továbbra is végződnek CR-immunpozitív terminálisok (58. B ábra) de ezek is sokkal ritkábbak. A varikóz dendritek felfújt gyöngyeiben gyakran látni pusztuló, széteső struktúrát (58. B ábra).

58. Ábra. Kontroll (A) és epilepsziás (B) CA1 régióban a CR-immunpozitív dendritek morfológiája különböző. A B ábrán egy gyöngyözött dendrit kiszélesedő szakasza degenerálódó citoplazmatikus organellumokat tartalmaz, de még végződik rajta egy szimmetrikus CR-pozitív szinapszis (nagy fehét nyílhegy) és két aszimmetrikus szinapszis jelöletlen terminálisoktól (kis fekete nyílhegyek). A CR-pozitív interneuronok terminálisai szimmetrikus szinaptikus kapcsolatot létesítenek (A, B, D, vastag nyílhegyek) CR-pozitív dendriteken (A, d1) vagy nem jelölt dendriteken (D). A str. lacunosum-moleculare határán a CR-tartalmú terminálisok egy része aszimmetrikus szinaptikus kapcsolatot létesít többnyire piramisszerű nem jelölt dendritekkel, jól felismerhető vastag postszinaptikus denzitással (C, kis nyílhegyek). Mérce: A, C, D: 0.5 μm; B: 10 μm



A terminálisok végződési mintázatát tanulmányozva azt láttuk, hogy a CRimmunpozitív posztszinaptikus célelemei megváltoznak epilepsziás CA1 régióban (Toth *et al.*, 2010). Ritkább lesz a CR-tartalmú terminálisok szinapszisa a CR-immunfestett dendriken (59., 60. ábra), sőt, általában ritkábban lehet CR-immunfestett terminálist találni. Az aszimmetrikus szinapszist adó terminálisok gyakorisága viszont megnő (59. E, F ábra).

59. ábra. CR-pozitív interneuron terminálisokat, melyek CR-tartalmú dendriteket idegeznek be, ritkábban látni az epilepsziás mintákban (A, nem-szklerotikus). Főleg nem jelölt

interneuron dendriteken végződnek mind nem-szklerotikus (B, nyílhegy), mind szklerotikus esetekben (D, nyílhegy). Szklerotikus CA1-ből származó, degenerálódó, nem jelölt interneuron dendrit látható a B ábrán, mely számos , mely számos szimmetrikus szinapszist kap, egyet egy CR-pozitív- és hármat nem jelölt interneuronoktól. Az aszimmetrikus szinapszist adó CR-pozitív terminálisok továbbra is jelen vannak (C) a str. lacunosum-moleculareban, mely egy nem jelölt dendrittel és egy tüskével szinaptizál. Szklerotikus mintákban a CR-pozitív terminálisok célelemei nem jelölt interneuron dendritek (D). Az E és az F ábrán szklerotikus CA1-ben gyakoribbá váló, aszimmetrikus szinapszist adó CR-pozitív terminálisok célelemei nem jelölt interneuron dendritek (E), és egy nem jelölt interneuron dendriten, egy tüskén (E), és egy nem jelölt interneuron dendriten végződnek (F). Mérce: 0.5 μm.



60. ábra. A CR-pozitív interneuronok posztszinaptikus célelem eloszlása megváltozik az epilepsziás CA1 régióban. A kontroll mintákban a CR-tartalmú szimmetrikus szinapszist adó terminálisok főleg interneuron dendriteken (CR-pozitív és nem-jelölt egyaránt) és principálissejt dendriteken végződnek. A CR-tartalmú dendritek aránya a posztszinaptikus célelemek között lecsökken mind a nem-szklerotikus, mind a szklerotikus CA1-ben. A nem jelölt interneuron dendritek aránya megnő minden epilepsziás esetben. A piramissejt dendritek

aránya lecsökken a nem-szklerotikus esetekben, a szklerotikus mintákban pedig egyáltalán nem szerepeltek a célelemek között.

CR d: CR-pozitív dendrit; IN d: interneuron dendrit; P d: piramis sejt dendrit; A d:

azonosítatlan dendrit; n: alanyok száma; N: a megvizsgált CR-immunpozitív axonterminálisok száma.



Megállapíthatjuk, hogy epilepsziás betegek CA1 régiójában a CR-immunfestett terminálisok gyakrabban végződnek interneuronokon, de ezek többnyire nem CRimmunfestett dendritek, mint a kontrollban. A CR-immunpozitív dendritek viszont a felszegmentálódás, szétesés jeleit mutatják, ami arra utal, hogy a dendritikus kapcsoltság és a gyors szinkronizáció lehetősége a CR-tartalmú sejtek között sérül.

V. MEGBESZÉLÉS

V. 1. Az funkcionálisan különböző interneuronok érzékenysége és megőrződése a humán epilepsziás hippocampusban

A gyrus dentatusban életben marad a szemcsesejtek túlnyomó többsége (Engel, 1996b), noha CB-tartalmát elveszti (Mody *et al.*, 1990; Magloczky *et al.*, 1997) sőt, a mohasejtek jelentős része is (Ludanyi *et al.*, 2008; Seress *et al.*, 2009). Így a principálissejtek megőrződésével a rajtuk végződő interneuronok is nagyobb eséllyel maradnak életben az epilepsziás szövetben. A CA1 régió szklerózisa viszont más helyzetet teremt, hiszen a régió principálissejtjei eltűnnek. Ezért vizsgáltuk meg az interneuronokat és kapcsolataikat mind szklerotikus, mind nem-szklerotikus betegekben.

Ha összegezzük az eredményeket, kitűnik, hogy jelentős különbség van a gyrus dentatus és a CA1 régió interneuronjainak megőrződésében, ugyanakkor vannak bizonyos interneuronok, melyek mindkét régióban megmaradnak, pld. a CB-tartalmú (9., 33., 34., ábra) (Magloczky *et al.*, 2000) (Wittner *et al.*, 2002) és CCK-tartalmú sejtek (Magloczky *et al.*, 2010). A PV-tartalmú (26. ábra) és SPR-kifejező (42. ábra) sejtek csak a szklerotikus CA1 régióban pusztulnak el (Wittner *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2007), a CR-tartalmú sejtek viszont minden régióban érzékenyek, a nem-szklerotikus és a szklerotikus hippocampusban is (60. ábra) (Toth *et al.*, 2010). Tehát önmagában a CA1 régió megőrzöttsége vagy pusztulása alapján nem tudjuk megjósolni a gátlósejtek érzékenységét, noha a szklerotikus hippocampusban a gyrus dentatus változásai is markánsabbak (Magloczky *et al.*, 2000; Wittner *et al.*, 2001). A gátlósejtek megőrződésében és eloszlásában talált változásokat összegzi a következő két sematikus ábra (61., 62. ábra).

61. Ábra. Összefoglaló ábra a dendritikus gátlásban résztvevő (CB-, CR- és SPR-pozitív) vizsgált interneuronok eloszlásáról. Minden sejttípus néhány igen jellegzetes sejtjét camera lucida segítségével kirajzoltuk és számítógépre vittük. Az epilepsziás mintákban az interneuron-hálózat jelentősen megváltozott, a rezisztensnek mondott sejtek is különböznek a kontrollban találhatóktól. Óriás méretű hipertróf CB-tartalmú sejtek jelennek meg a hilusban, dendritjeik is hosszabban festődnek (piros). A CR-pozitív sejtek száma erősen csökken (zöld), míg a CR-tartalmú

supramammillaris nucleusból származó rosthálózat kiterjed a stratum moleculare teljes szélességére (zöld felhő). Az SPR-immunreaktív sejtek eloszlása is változik: többségük a hilusban látható kontroll szövetben, míg epilepsziásban a stratum moleculareban. Ezen felül a dendritmorfológiájuk is megváltozik, torz dendritfájú, varikóz, gyöngyözött dendritű sejtek találhatók az epilepsziás gyrus dentatusban (kék). A szemcsesejtek (szürke) szétvándorolnak epilepsziás szklerotikus esetekben, és nagy többségük elveszti CB-tartalmát (üres kör). Neuroscience 96. 7-25, 22. oldal, Maglóczky et al., 2000.



62. ábra. A gátlósejtek eloszlásának és mennyiségének változásai sematikus rajzon szklerotikus és nem-szklerotikus epilepsziás hippocampusban. Minden sejttípus néhány jellegzetes sejtjét camera lucida segítségével kirajzoltuk és számítógépre vittük. A CRtartalmú (zöld) sejtek száma mindkét epilepsziás esetben csökken, a megváltozott morfológiájú SPR-immunpozitív sejtek (kék) csak a szklerotikus CA1-ből tűnnek el, csakúgy, mint a PV-tartalmú sejtek (sárga). A CB-tartalmú sejtek a szklerotikus CA1-ben is megőrződnek, méretük nagyobb, dendritjeik tüskések lesznek (piros). Feltűnő a str. oriens kiürülése már a nem-szkleotikus CA1 régióban is. alig különbözik a kontrolltól.



V.2. Periszomatikus gátlás

Részletesen elemezve, azt találjuk, hogy a periszomatikus, PV- és CCK-tartalmú gátlósejtek jól megtartottak, a nem-szklerotikus hippocampusban eloszlásuk és morfológiájuk alig különbözik a kontrolltól (Wittner *et al.*, 2001; Wittner *et al.*, 2005; Magloczky *et al.*, 2010).

A szklerotikus gyrus dentatusban azonban a PV-immunfestés nem mutatható ki a sejtekben és a dendritekben, a sejtszám lecsökken, noha a terminálisok jelentős részében megmarad (Wittner et al., 2001). Hasonló jelenséget írtak már le epilepsziás betegek agykérgében is, ahol elektronmikroszkópos vizsgálatot nem végeztek, és ezért úgy gondolták, a PV-immunpozitív sejtek eltűnése a pusztulásukat jelenti és ez az oka az epilepsziának (DeFelipe et al., 1993; Marco et al., 1997; DeFelipe, 1999). Valamint modellekben is leírták a PV-immunreakció gyengülését, epilepsziában (Magloczky & Freund, 1995) és isémiában is (Kamphuis et al., 1989; Johansen et al., 1990; Best et al., 1993). Azonban a modellekben jól látszik, hogy a sejtek maguk nem tűnnek el, pld. az általunk használt káinsavas modellben 1 nappal a káinsav-által kiváltott rohamok után alig lehetett PV-tartalmú sejtet látni a hippocampusban, a 3 nap túlélésű állatokban viszont újra ki lehetett mutatni a PV-tartalmú sejteket immunreakcióval (Magloczky & Freund, 1995). A jelenséget azzal hozzák összefüggésbe, hogy jelentős kalcium-beáramlás hatására – mint amilyen pld. epilepsziás roham hatására létrejön – a PV túltöltődik kalciummal, és konformáció változáson esik át, ezért nem ismeri fel az antitest (Johansen et al., 1990). Az epilepsziás gyrus dentatusban a sejtek eltűnése mellett az axonok jelentős részének megőrződését, a sejttestek gátló bemenetének megmaradását, és a gátló bemenet megnövekedését találtuk szemcsesejtek axon

iniciális szegmentumán, tehát a PV-tartalmú sejtek egy része megőrződik (Wittner *et al.*, 2001) csak nem lehet PV-immunfestéssel kimutatni.

A CA1 régióban azonban nem járnak ilyen jól a PV-tartalmú sejtek. A nemszklerotikus régióban ugyan megőrződik a piramisok sejttestének bemenete, csak a foltos típusban csökken kis mértékben (14. táblázat), de axonsarjadzás az iniciális szegmentumon nincs, és a szklerotikus CA1 régióból teljesen eltűnnek a PV-immunfestett elemek, se sejt, se dendrit, se terminális (Wittner *et al.*, 2005). Pedig a terminálisok jelentős része megőrzi PVimmunraktivitását mind epilepsziás állatban (Magloczky & Freund, 1995), mind epilepsziás betegek gyrus dentatusában (Wittner *et al.*, 2001), hiányuk tehát a sejtek pusztulását jelzi. Mivel eredeti posztszinaptikus célelemük a piramissejtek voltak, és a szklerotikus CA1-ben ezek sincsenek jelen többé, megállapíthatjuk, hogy célelemeik pusztulásával a PV-tartalmú sejtek maguk is eltűnnek (Wittner *et al.*, 2005).

A CCK-tartalmú periszomatikus gátlósejtek mind a nem-szklerotikus, mind szklerotikus hippocampusban jelen vannak, jól megtartottak, dendritmorfológiájuk is csak annyiban változik, hogy a zsugorodott CA1 régióban horizontális dendritű sejteket látunk. A szklerotikus betegek gyrus dentatusában a CCK-tartalmú sejtek axonsarjadzását találtuk, melyet CB1-R elleni immunfestéssel tettünk láthatóvá (8. ábra). A CB1-R-immunfestett terminálisok megtartották eredeti végződési mintázatukat, de sokkal intenzívebb immunreakciót mutattak (Magloczky *et al.*, 2010).

A denzitometriai eredmények azonban nem adtak választ arra, hogy az erősebb immunfestést az egyes terminálisokban előforduló több receptor, vagy nagyobb mennyiségű, sarjadzó terminális okozza-e. A fénymikroszkópos képeken több rost látszott, de nem lehetett kizárni a receptorok mennyiségének megemelkedését sem. Végül erre a kérdésre a pilocarpine-indukálta epilepszia modellünkben kaptuk meg a választ, a szklerotikus állatok

gyrus dentatusában megnőtt a terminálisok száma, és az egyes terminálisokban is több lett a receptor (Karlocai *et al.*, 2011). Az eredmények arra utalnak, hogy a CCK-tartalmú periszomatikus gátlósejtek is sarjadzanak epilepsziában.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a periszomatikus gátlósejtek sarjadzása miatt a gyrus dentatusban a szemcsesejteken több a gátló bemenet, mint a kontrollban. Az axon iniciális szegmentumon a PV-tartalmú bemenet már a nem szklerotikus betegekben is megerősödik (Wittner *et al.*, 2001), a szklerotikus betegekben pedig a kontroll többszöröse lesz, így a szemcsesejtek szinkronizációja sokkal valószínűbb esemény egy epilepsziás betegben, mint kontrollban. Annál is inkább, mert a mohaterminálisok sarjadzását is megfigyelték epilepsziás betegekben (Houser *et al.*, 1990; Babb *et al.*, 1991; Franck *et al.*, 1995), mi is találtuk ezt saját mintáinkban, szklerózistól függetlenül, így a szemcsesejtek dendritjei egy megerősödött serkentő bemenetet kapnak, nem csak kevés és ritka bazális denritjeikre a hilusban, hanem kiterjedt, str. moleculareban elhelyezkedő dendritfáikra is, így az aktivitást közvetlenül át tudják adni egymásnak. Elképzelhető, hogy a gátló terminálisok nagyobb száma a szemcsesejteken egy kompenzációs jelenség, melyet éppen a megnövekedett serkentő bemenet vállott ki.

V. 3. Dendritikus és interneuron szelektív gátlósejtek

A CB-immunpozitív sejtek rezisztenciája már ismert volt állatkísérletes modellben (Sloviter, 1989; Houser, 1991; Freund *et al.*, 1992; Magloczky & Freund, 1993) és emberi epilepsziás szövetben is (Sloviter *et al.*, 1991; Suckling *et al.*, 2000). A CB-tartalmú sejtek száma valóban nem változott jelentősen az általunk vizsgált epilepsziás szövetben sem, különösen a nem-szklerotikus esetekben (Magloczky *et al.*, 2000; Wittner *et al.*, 2002). De a

szklerotikus CA1-ben és gyrus dentatusban rendkívüli morfológiai változáson estek át. Megnőttek a sejttestek, meghosszabbodtak a dendritek, tüskék képződtek a dendriteken és sejttesteken, amik szinapszisokat kaptak. A sejtek épek voltak még a szklerotikus hippocampusban is, és rendkívül aktív anyagcsere jeleit mutatták (12. ábra) (Magloczky *et al.*, 2000; Wittner *et al.*, 2002). Nem pusztultak el annak ellenére sem, hogy a szklerotikus CA1 régióban elvesztették eredeti targetjeiket, a piramissejteket. Axonjaik új posztszinaptikus célelemeket találtak maguknak, és nagyobb arányban végződtek interneuronokon, mint kontrollban (Wittner *et al.*, 2002).

Különösen fontos, hogy ez a targetváltás nem korlátozódott kizárólag a szklerotikus CA1-re, hanem már a nem szklerotikus betegekben is megfigyelhető volt, tehát a CB-tartalmú interneuronok az epilepsziás esetekben a principálissejtek pusztulásától függetlenül nagyobb arányban végződnek CB-pozitív dendriteken, mint kontrollban. Ennek legvalószínűbb oka, hogy az epilepsziás hippocampusban a CR-tartalmú sejtek száma erősen lecsökken (Toth et al., 2010), dendrithálózatuk pedig, melyeken keresztül össze vannak kapcsolva, éppúgy, mint a PV-tartalmú sejtek, szétesik és felszegmentálódik (Wittner et al., 2005; Toth et al., 2010). Ugyanis kimutattuk, hogy a CR-tartalmú interneuronok sok végződést adnak CB-immunfestett interneuronok dendritjeire (Toth et al., 2010), feltehetően azért, hogy a patkányban megfigyeltekhez hasonlóan (Gulyas et al., 1996) az emberi hippocampusban a CRimmunpozitív interneuron-szelektív sejtek képesek legyenek összehangolni a dendritikus gátlósejtek – melyek jelentős része CB-tartalmú – működését. De, ha a CR-tartalmú sejtek száma lecsökken, és dendritjeik károsodnak, képtelenek erre, és a CB-immunreaktív sejtek működése sem lesz hatékony. Elképzelhető, hogy a CB-tartalmú sejtek azért végződnek nagyobb arányban egymáson, hogy pótolni tudják a kieső CR-tartalmú terminálisokat, és kompenzációként szinaptizálnak többet interneuronokon. Azonban kétséges, hogy egy ilyen

neuronhálózat "véletlenszerűen" összekapcsolódó gátlósejtekkel képes lehet-e egy olyan, szinte tökéletesen hangolt szinkron működés létrhozására, mint a kontrollban.

63. Ábra. Összefoglaló sematikus diagram a CR-pozitív interneuronokat és dendritikus gátlósejteket hálózatának zinaptikus reorganizációjáról a nem-szklerotikus epilepsziás CA1 régióban. Kontroll: a humán hippocampusban a CR-tartalmú sejtek egy része interneuron-szelektív gátlósejt, melyek dendritikus gátlósejteken (sötétkék) és más CR-immunpozitív interneuronokon (zöld) végződnek. Az elektromos szinapszisokkal összekapcsolt CR-tartalmú sejtek hatékonyan szinkronizálják a dendritikus gátlósejtek bemenetének hatását a piramissejt dendriteken (narancssárga). Epilepsziás, nem-szklerotikus: a CR-tartalmú sejtek egy része degenerálódik, és sérül a dendritjeik közti elektromos kapcsolat. Ez felborítja a dendritikus gátlósejtek szinkronizációját (különböző világoskék árnyalatok), ami egy kevésbé hatékony dendritikus gátlást eredményez a piramissejt dendriteken, és így felerősödhet a serkentő bemenetek hatása (sötétnarancs) amik egyébként is többen vannak, a serkentő pályák sarjadzása miatt epilepsziában.



V.4. A gátlósejtek szinaptikus reorganizációjának hálózati hatása epilepsziában

A hálózati összhatás tehát a periszomatikus gátlás megerősödése, különösen a gyrus dentatusban (Wittner et al., 2001), miközben a dendritikus gátlás meggyengül, elsősorban nem is a dendritikus gátlósejtek pusztulása, hanem a CR-tartalmú sejtek dendritikus hálózatának és degenerálódásának eredményeképpen (Toth et al., 2010). A dendritkus gátlósejtekből vizsonylag sok életben marad epilepsziás hippocampusban. A CB-tartalmú sejtek megőrződnek, mind állatkísérletes modellben (Sloviter, 1989; Houser, 1991; Freund et al., 1992; Magloczky & Freund, 1993), mind emberben (Sloviter et al., 1991; Magloczky et al., 2000; Suckling et al., 2000; Wittner et al., 2002), a SOM- és NPY-tartalmú sejtek ugyan részben elpusztulnak (de Lanerolle et al., 1988; Sundstrom et al., 2001), de valamilyen mennyiségük mindig megmarad (Sundstrom et al., 2001), és kompenzációs sarjadzással (de Lanerolle et al., 1988) igyekszik pótolni a kieséseket. De a dendritikus gátlás sokkal kevésbé hatékony, mint a periszomatikus, és több sejt együttműködését igényli (Miles et al., 1996), így a CR-tartalmú sejtek szinkronizáló hatása és ép hálózata nélkül nincs esély hatékony dendritikus gátlásra. Ki is mutatták állatkísérletes modellekben, hogy nem a gátlás általános gyengülése áll az epilepszia patomechanizmusának hátterében, hanem a dendritkus gátlás gyengül meg (Cossart et al., 2001), ráadásul több serkentő pálya sarjadzik, moharostok (Sutula et al., 1989), supramammiláris pálya (Magloczky et al., 2000) és a septális és entorhinális bemenet (Lehmann et al., 2001), amit a meggyengült dendritikus gátlás már nem tud szabályozni. Így a periszomatikus gátlás szinte átveszi az irányítást, és növeli a principális sejtek szinkron tüzelésének valószínűségét.

.....és ha a GABA serkentő?

Több eredmény is alátámasztja azt, hogy a GABA bizonyos sejtekben, bizonyos körülmények között nem hiperpolarizáló hanem depolarizáló hatású, többen is megfigyelték ezt a jelenséget epilepsziás szeletben (Cohen *et al.*, 2002; Haug *et al.*, 2003; Khalilov *et al.*, 2003).

Meglepő talán, de a hálózati összhatáson keveset változtatna az, ha a GABA nem hiperpolarizáló, hanem depolarizáló hatású lenne. A dendritekre és sejttesteke érkező "kosársejt serkentés" ugyan nem fogja ugyanolyan hatásfokkal növelni a szinkronitást, mint a gátlás, de az axon iniciális szegmentumok serkentése ugyanúgy fokozhatja a principálissejtek tüzelési készségét, mint a gátlás (Szabadics *et al.*, 2006). A dendritikus sejtek csak akkor hatékonyak, ha több együtt, egyszerre működik (Miles *et al.*, 1996), ha a GABA serkentő, ez még inkább így van. Az interneuron-szelektív sejtek pedig akkor sem képesek őket szinkron működésre bírni, ha serkentenek. Tehát a dendritkus sejtek szinkronizációja ebből a hálózatból is hiányozni fog.

Mindazonáltal, a megnövekedett serkentés a sekentő axonpályákkal együtt növelheti a principálissejtek tüzelési valószínűségét, mivel a PV- és CCK-tartalmú periszomatikus (Wittner *et al.*, 2001; Magloczky, 2010; Magloczky *et al.*, 2010), és a CB-tartalmú dendritikus sejtek is sarjadzanak (Wittner *et al.*, 2002).

Azt is figyelembe kell venni, hogy a GABA depolarizáló hatását nem homogénen az egész hippocampusban mérték, hanem egy-egy sejten, vagy egyes sejtek szűk környezetében (Cohen *et al.*, 2002; Huberfeld *et al.*, 2007). Az ilyen foltok kialakulása valószínűleg az epilepsziás rohamok által megnövelt magas kálium szint következménye (Fisher *et al.*, 1976), amely szintén nem egyöntetűen mindenhol, hanem sporiadikusan, bizonyos területeken alakul ki. Itt a kalium-klorid kotranszporter működése megváltozik, és a sejt belseje irányában

haladnak rajta keresztül a klorid ionok, ezért a GABA-A receptorban lévő klorid csatornán már csak kifelé tudnak menni, és a GABA depolarizálni fog (Katchman *et al.*, 1994; Van Den Pol *et al.*, 1996; Vale & Sanes, 2000; Rivera *et al.*, 2002). Ez a depolarizáló hatás azonban időben és térben heterogén lesz, és nem egyöntetű, így még az epilepsziás hippocampusban is lehet a GABA hálózati összhatása gátló, attól függően, mennyi és mekkora ilyen folt van.

V.5. Növekedési és jelenségek az epilepsziás hippocampusban

A gátlósejtek axonsarjadzásán kívül még számos serkentőpálya is sarjadzik, melyek már régebben is ismertek voltak, mint a moharostok sarjadzás (Sutula *et al.*, 1989) vagy aseptális és entorhinális bemenet sarjadzása (Lehmann *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2006). Mi pedig a supramammilláris pálya kiterjedését találtuk epilepsziás esetekben, mind nemszklerotikus, mind szklerotikus betegekben (Magloczky *et al.*, 2000). Ráadásul a szinaptikus terminálisok mérete, a szinaptikus aktív zónák hossza megnő, és gyakoribbá válnak a zonula adherentiák olyan interneurontípusok dendritjei között is, melyek ezt a tulajdonságot nem mutatták kontrollban (Wittner *et al.*, 2002; Wittner *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2007). Leírták a gap junction-ok mennyiségének növekedését epilepsziás patkányban (Szente *et al.*, 2002), és valószínű, hogy epilepsziás emberi hippocampusban is ez a jelenség áll a gyakoribb dendritikus kapcsolatok megjelenésének hátterében.

A sejtek növekedését, dendritsarjadzást és axonsarjadzást valószínűleg a hippocampus egyes sejtjeiben termelődő, és epilepsziában megnövekedő mennyiségű neurotrofinok okozzák. Neurotrofinokat (NT3, NT5) termelnek a szemcsesejtek (Mathern *et al.*, 1997b; Jankowsky & Patterson, 2001), és ennek megemelkedett szintje okozza valószínűleg a moharostok sarjadzását (Mathern *et al.*, 1997b). De idegnövekedési faktort (NGF) találtak a

supramammilláris pályában is , mely szintén hathat a mohaterminálisok sarjadzására (Lee *et al.*, 1997; Hughes *et al.*, 1999). Az is feltűnő, hogy a suprammillaris pálya végződési területe : gyrus dentatus, CA3 a,b, CA2, megegyezik azokkal a területekkel, melyekben legjobban megőrződnek a principálissejtek epilepsziás szövetben (Magloczky *et al.*, 1994; Borhegyi & Leranth, 1997a). Valamint a pálya által ellátott gyrus dentatusban az SPR-expresszáló sejtek nem csak dendritkus sarjadzást mutatnak, hanem a kontrolltól eltérő elhelyezkedést is, mintha felvándoroltak volna a str. molecularéba, ahol a supramammilláris pálya rostjai szétterjedtek (Magloczky *et al.*, 2000). Az is lehetséges persze, hogy ez nem ugyanaz a sejtpopuláció, mint kontrollban, hanem más sejtek expresszálják az SPR-t. De a hilusból viszont eltűnnek ugyanazok a morfológiailag hasonló, csak több dendrittel rendelkező sejtek, ezért a felvándorlást mi valószínűbbnek tartjuk (Magloczky *et al.*, 2000). Lehetséges, hogy a magas SP-tartalmú supramammillaris pálya megerősödése és térfoglalása áll a jelenségek hátterében.

A CA1-ben viszont, ahol nincs supramammillaris vegződés, valószínűleg a principállissejtek által epilepsziás rohamok hatására termelődő SP (Liu *et al.*, 1999) lehet felelős a morfológiai változásokért és dendritsarjadzásért. Kimutatták, hogy az SP nem csak fokozza a sejtek aktivitását, de dendritjeiket is gyöngyözötté teszi (Mantyh *et al.*, 1995), így a felgyöngyözött dendritfa az SPR-expresszáló sejteken a nagyobb aktivitás jele lehet (Liu *et al.*, 1999). Talán a CA1 piramisok SP termelése egy kompenzációs jelenség lehet epilepsziában, hogy így fokozzák a részben bizonyosan dendritikus gátló SPR-expresszáló sejtek működését.

23. Táblázat. A szklerotikus és nem-szklerotikus iterneuronális változások öszesítése TLE betegek hippocampusának különböző régióiban.

Interneuron	Nem-	Szklerotikus	Nem-	Szklerotikus
típusok	szklerotikus	CA1	szklerotikus	GD
neurokémiai	CA1		GD	
markerek alapján				
Parvalbumin/	A sejtek	PV-tartalmú	A legtöbb sejt	Ismeretlen
Periszomatikus	többsége túlél,	sejtek	túlél, Axon	mennyiségű sejt
GABAerg sejtek	Nincs axon	érzékenyek,	sarjadzás a	túlél, PV-
	sarjadzás a	Alig néhány sejt	szemcsesejtek	immunreakció
(kosár és axo-	periszomatikus	látható	axon iniciális	részben eltűnik a
axonikus)	régióban		szegmentu-	sejtekből, axon
			mán	sarjadzás az
				iniciális
				szegmentumon
Calbindin/	A sejtek	A sejtek egy	A sejtek	A sejtek többsége
Dendritikus	jelentős része	része túlél,	többsége túlél	túlél,
GABAerg sejtek	túlél,	tüskeképződés,		tüskeképződés,
	Axonjaik	sejt- és dendrit-		sejt- és dendrit-
	sarjadzanak,	növekedés, CB-		növekedés
	CB-pozitiv	pozitiv		
	interneuron	interneuron		
	dendritek CB-	dendritek CB-		

	bemenete nő	bemenete nő axonsarjadzás		
Substance P	A sejtek	A sejtek	A sejtek	A sejtek többsége
receptort kifejező	többsége túlél,	pusztulnak,	nagyrésze	túlél, normálistól
dendritikus	Dendrit	A sejtek száma	Tlél, eloszlás	különböző
GABAerg sejtek	sarjadzás	és a dendritfa	és morfológia	eloszlás,
		kiterjedése	kontrollszerű.	dendritsarjadzás,
		csökken		

V. 6. Szklerózis, sejtpusztulás, és sarjadzás

Az epilepszia hatására túlserkentett sejtcsoportok pusztulásának két fő mechanizmusa ismert az excitotoxicitási hipotézis szerint (Olney, 1990; Meldrum, 1991; Choi, 1992). Az első egy akut ödéma, melyet a serkentő aminósavak által kinyitott ioncsatornákon keresztül az idegsejtbe jutó abnormális mennyiségű ionok és víz okoznak. Ez nem szelektív, minden sejtet érint melyek excitotoxin hatásának lettek kitéve (Olney, 1990; Meldrum, 1991) a sejtek jelentős része azonban képes ezt a nagy mennyiségű iont és vizet kipumpálni magából és túlélni az ödémás károsodást. Az érzékeny interneuronok, melyek epilepszia modellekben a rohamindukciót követően néhány órával eltűnnek, valószínűleg az akut ödémás mechanizmussal halnak meg. A második mechanizmus egy késleltetett, kalcium által közvetített folyamat (Olney, 1978; Choi, 1992), ahol feszültségfüggő NMDA-típusú glutamát receptorok által megnyitott csatornákon keresztül kalcium ion jut a sejtbe, amely a belső raktárakból nagy mennyiségű további kalciumot szabadít fel, és különböző biokémiai mechanizmusokat, lebontó enzimeket aktivál(Rasmussen, 1986). Ezek károsítják a citoszkeletont, a mitokondriumokat, ezzel a sejt energetikai rendszerét, valamint az axonális transzportot és a DNS-t. Ez a sejt degenerációjához vezethet. A magas kalcium ion szint aktiválhat egy speciális sejtpusztítási mechanizmust is, ahol a megfelelő enzimkészlet jelen van, amelyet programozott sejthalálnak vagy apoptózisnak nevezünk (Gavrieli et al., 1992; Bonfoco et al., 1995). Ez a sejt DNS-ének

feldarabolódásához vezet, azonos típusú sejtekben azonos idő alatt. Epilepszia modellekben bizonyították, hogy ez a mechanizmus felelős a CA1 régió piramissejtjeinek pusztulásáért (Pollard *et al.*, 1994).

Felmerül a kérdés, hogy a sejtpusztulás és rostsarjadzás különböző mértéke szklerotikus- nemszklerotikus a betegség különböző fázisait jelöli-e, és vajon az enyhébb sejtpusztulást mutató típusok idővel átalakulnak-e a súlyosabb sejtpusztulást mutató patológiás formákká. Mivel a betegeket egy adott időpontban oprálták meg, csak ezt az egy állapotukat ismerjük. Megvizsgáltuk, hogy a sejtpusztulás mértéke korrelál-e az epilepszia fennálásának időtartamával, és azt találtuk, hogy nincs egyértelmű összefüggés (3. táblázat). A temporális lebeny eredetű epilepsziának számos modellje van, melyekben különböző sejtpusztulási mintázat alakul ki. A hippocampális sclerosist legjobban a káinsav-kiváltotta epilepszia, vagy a pilocarpinos modell reprezentálja (Hablitz et al., 1992; Ben-Ari & Cossart, 2000). Azonban a gerjesztéses (kindling) modell is a TLE modellje, és ebben nem alakul ki sclerosis (McNamara, 1984; Represa et al., 1989). Modellkísérletek adatai alapján a principális sejtek a scleroticussá váló állatokban apoptótikusan pusztulnak, mely a programozott sejthalál egyik megfelelője, és bizonyos mennyiségű sejtbe belépő kalcium ion váltja ki az érzékeny - megfelelő enzimkészlettel rendelkező – sejtekben (Olney, 1990). Az axonsarjadzás, és az érzékeny interneuronok pusztulása viszont megfigyelhető azokban az epilepszia modellekben is, ahol sclerosis nem alakul ki. A principális sejtek pusztulása tehát egy meghatározott mennyiségű túlserkentés hatására bekövetkező kalciumszint emelkedés függvényének tűnik. Ez megtörténhet az epilepsziás rohamok során bármikor, az első roham idején épp úgy, mint húsz év múlva. Nem törvényszerű, hogy az enyhébb sejtpusztulást mutató típusok idővel súlyosabbá váljanak, de bármikor előfordulhat. Az epilepsziás reorganizáció egyéb jelenségei viszont – axonsarjadzás vagy transzmitter szintek, receptorok változásai – valószínűleg az elektromos aktivitás megnövekedése következtében jönnek létre, és minden pathológiai típusban megfigyelhetők (Maglóczky, 2005; Magloczky, 2010).

Igy kijelenthetjük, hogy az axonsarjadzás a az epilepsziás reorganizáció sokkal általánosabb jelensége, mint a sejtpusztulás. Az axonsarjadzás és a sejtek kapcsolatainak átrendeződése önmagában is képes lehet rohamokat generálni, ha a sejtek nem pusztulnak el.

Ráadásul, a piramissejtek pusztulását tapasztaltuk elektronmikroszkópos mintáinkban olyan betegekben, akiknél ez fénymikroszkóppal nem látszott (Wittner *et al.*, 2005). A nem-szklerotikus betegek hippocampusa sem "ép", jelentős szinaptikus reorganizáció és nem elhanyagolható

172

sejtpusztulás játszódott le benne, és mivel még vannak ép vetítő kapcsolatai más agyterületek felé felé az életben maradt sejtektől, még könnyebben terjesztheti, és még több területre az epilepsziás aktivitást.

Figyelembe véve a reorganizációs eredményeket, érdemes olyan neuronhálózati elemeket választani terápiás célpontnak, mely kulcsszerepet játszik a neuronhálózat szabályozásában. Az eredmények azt sugallják, hogy a CR-tartalmú sejtek megóvása az epilepszia korai fázisában megakadályozná a dendritikus gátlás összeomlását, és megóvhatná a hálózatot a kóros szinkronizációtól.

VI. Köszönetnyílvánítás:

Köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akik munkájukkal hozzájárultak az eredmények létrejöttéhez. Elsősorban Freund Tamás professzornak, aki egyetemi hallgató korom óta tanítómesterem, és aki mindenben támogatott munkám végzése során. Az értekezésben foglalt munkát több tanítványommal együtt végeztük. Köszönöm Wittner Lucának,

Tóth Kingának és Karlócai Ritának a közös munkát, lelkesedésüket, kitartásukat, a téma iránti elkötelezettségüket, és hogy mindig öröm volt dolgozni velük

Köszönettel tartozom számos kollégának akikkel kollaborációban dolgoztam: Borhegyi Zsoltnak, Buzsáki Györgynek, Fabó Dánielnek, Halász Péternek, Juhász Gábornak, Katona Istvánnak, Ludányi Anikónak, Ulbert Istvánnak akikkel csodálatos élménnyé vált a tudományos munka. Rengeteget segítettek munkámban a KOKI munkatársai is, elsősorban Barthó Péter, Mátyás Ferenc, Kovács Krisztina, Madarász Emília, Varga Viktor, Hájos Norbert, Hrabovszki Erik, Rancz Ede, Slézia Andrea, akikhez mindig fordulhattam, ha egy problémát nem tudtam megoldani.

Köszönetet szeretnék mondani Palkovits Miklós és Sótonyi Péter professzoroknak a kontroll humán hippocampus minták biztosításáért.

A projectben dolgozó számos orvosnak is köszönöm, hogy együtt dolgoztak velem: elsősorban Altmann Annának, Juhos Verának, Jerney Juditnak, Erőss Lorándnak, Rásonyi Györgynek, Czirják Sándornak, Vajda Jánosnak, Szabó Zeréndnek, de a következő intézmények mindazon orvosainak és dolgozóinak is, akik elősegítették a projectben végzett munkát: Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézet Epilepszia Centrum, Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet, MRE Bethesda Gyermekkórház, Neurológiai Osztály, Heim Pál Kórház, Járóbeteg Epilepszia Centrum, Szent István Kórház, Neurológia Osztály, MÁV Kórház, Budapest, Ideggyógyászati és Idegsebészeti Osztály.

A gyakorlati kivitelezés lehetetlen lett volna a kiváló technikai segítség nélkül. Iványi Katalin, Lengyel Katalin, Széles Csilla, Szépné Simon Emőke, Goda Győző, Bucsánszki Miklós és Wolf György segítőkészségét köszönöm.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönetet mondok szüleimnek, öcsémnek és családjának, valamint férjemnek, mert mindig mindenben mellettem álltak, bíztak bennem és szerettek. Köszönöm.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

Az epilepsziás rohamokat sok sejt szinkron kisülése okozza, melyért a legvalószínűbb hipotézis szerint az elégtelen gátlás felelős. A principális sejtek aktivitását lokális gátló interneuronok szabályozzák, melyek három funkcionális csoportba sorolhatók. 1. periszomatikus gátlósejtek, melyek a principálissejtek sejttestén és proximális szegmentumán (kosársejtek,) vagy axon iniciális szegmentumán (axo-axonikus sejtek) végződnek, ezek a hippocampusban parvalbumint (PV) vagy kolecisztokinint (CCK) tartalmaznak. 2. Dendritikus gátlósejtek, melyek a dendriteken végződnek, és számos neuropeptidet és calbindint (CB) tartalmaznak, substance P receptort (SPR) expresszálnak. 3. Valamint más interneuronokon végződő interneuron-szelektív sejtek, melyek patkányban calretinint (CR) tartalmaznak.

Ezeket a sejteket emberi hippocampusban nem vagy nem elég részletesen vizsgálták, sem kontrollban, sem epilepsziás betegek hippocampusában, így szinaptikus reorganizációjukról és bemeneteik változásairól nem állt rendelkezésre elég adat ahhoz, hogy a principálissejtekre érkező gátlás és annak változásait megismerjük és megértsük. E nélkül viszont az epilepszia patomechanizmusa nem tárható fel, és nem lehet célzott, a neuronhálózat működését szabályozó gyógyszereket fejleszteni.

Ezért kifejlesztettünk egy olyan módszert, ami reprodukálhatóan jó minőségű immerziós fixálást tesz lehetővé kontroll és temporális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő terápiarezisztens betegek műtétileg eltávolított hippocampusán, és így elektronmikroszkópos kvantitatív vizsgálatokat tesz lehetővé a szinaptikus reorganizáció feltárására.

Ezzel a módszerrel hasonlítottuk össze a kontroll post mortem alanyok és szklerotikus és nem-szklerotikus hippocampális patológiával rendelkező epilepszia betegek agyában a funkcionálisan különböző típusú gátlósejteket, úgy, hogy immunfestést végeztünk az azokat jelölő neurokémiai markerek ellen.

A neuronhálózat jelentős átalakulását találtuk, úgy szklerotikus mint nem-szklerotikus betegekben. A PV-tartalmú gátló bemenet megerősödik a szemcsesejtek axon iniciális szegmentumán, de sejttestjén nem, a CCK-tartalmú sejtek axonja sarjadzik a gyrus dentátusban, az SPR-kifejező sejtek dendritikus sarjadzást mutatnak a szklerotikus gyrus dentatusban és a nem-szklerotikus CA1-ben, a CR-tartalmú sejtek pedig, melyekről

bizonyítottuk, hogy az emberi hippocampusban részt vesznek a dendritkikus és interneuronszelektív gátlásban, elpusztulnak és dendrtikus hálózatuk összeomlik. A CB-tartalmú sejtek axonja is sarjadzik, és nagyobb arányban végződik életben maradó interneuronokon epilepsziás hippocampusban, mint kontrollban, növelve ezzel a gátlósejtek gátlását.

Mindez a dendritikus gátlás meggyengüléséhez és a periszomatikus gátlás megerősödéséhez vezet, mely növeli a hálózat szinkron működésének valószínűségét, különösen mivel több serkentő pálya is sarjadzik, és nő a principálissejtek serkentő bemenete is. Vizsgálataink rámutatnak, hogy a sarjadzás sokkal általánosabb jelensége az epilepsziás reorganizációnak, mint asejtpusztulás, és már a nem-szklerotikus hippocampusokban is jelen van, és elősegíti az epilepsziás rohamokat.

Eredményeink azt sugallják, hogy az általunk vizsgált temporális epilepsziás betegekben a gátló neuronhálózatok olyan mértékben átalakultak és a dendritikus és periszomatikus gátlás egyensúlya annyira eltolódott, hogy általános GABAerg rendszereket segítő terápia már nem biztos, hogy gátolja a sejtek szinkron kisülését. A gátló neuronhálózatok, és különösen a periszomatikus gátlás megerősödése egyik oka lehet annak, hogy ezek a betegek terápirezisztensek voltak, és olyan terápiát igényelnének, mely célzottan a dendritkus gátlást erősíti.

VIII. Idézett irodalom

- Abraham, H. & Meyer, G. (2003) Reelin-expressing neurons in the postnatal and adult human hippocampal formation. *Hippocampus*, **13**, 715-727.
- Acsady, L., Katona, I., Gulyas, A.I., Shigemoto, R. & Freund, T.F. (1997) Immunostaining for substance P receptor labels GABAergic cells with distinct termination patterns in the hippocampus. J Comp Neurol, 378, 320-336.
- Amaral, D.G. (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, **182**, 851-914.
- Amaral, D.G. & Cowan, W.M. (1980) Subcortical afferents to the hippocampal formation in the monkey. J.Comp.Neurol., 189, 573-591.
- Amaral, D.G., Insausti, R. & Cowan, W.M. (1984) The commissural connections of the monkey hippocampal formation. *The Journal of comparative neurology*, **224**, 307-336.
- Amaral DG, I.R. (1990) Hippocampal formation. In G., P. (ed.) *The Human Nervous System*,. Academic Press, San Diego, CA, pp. 711-755.
- Amaral, D.G., Ishizuka, N. & Claiborne, B. (1990) Neurons, Numbers and the Hippocampal Network. *Understanding.the.Brain Through.the.Hippocampus.*, **83**, 1-11.
- Amaral, D.G. & Witter, M.P. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, **31**, 571-591.
- Andre, V., Marescaux, C., Nehlig, A. & Fritschy, J.M. (2001) Alterations of hippocampal GAbaergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithiumpilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, **11**, 452-468.
- Avoli, M. (1991) Excitatory amino acid receptors in the human epileptogenic neocortex. *Epilepsy research*, **10**, 33-40.
- Babb, T.L., Kupfer, W.R., Pretorius, J.K., Crandall, P.H. & Levesque, M.F. (1991) Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience*, **42**, 351-364.
- Babb, T.L., Pretorius, J.K., Kupfer, W.R. & Crandall, P.H. (1989) Glutamate decarboxylaseimmunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J Neurosci*, 9, 2562-2574.
- Babb, T.L., Pretorius, J.K., Mello, L.E., Mathern, G.W. & Levesque, M.F. (1992) Synaptic reorganizations in epileptic human and rat kainate hippocampus may contribute to feedback and feedforward excitation. *Epilepsy Res Suppl*, 9, 193-202.
- Baimbridge, K.G. & Miller, J.J. (1982) Immunohistochemical localization of calcium-binding protein in the cerebellum, hippocampal formation and olfactory bulb of the rat. *Brain Res.*, **245**, 223-229.
- Ben-Ari, Y. (1987) Brain damage caused by seizure activity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*, **39**, 209-211.
- Ben-Ari, Y. (2001) Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia*, 42, 5-7.
- Ben-Ari, Y. & Cossart, R. (2000) Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci*, 23, 580-587.
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J.,
 French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., Moshe, S.L., Nordli, D., Plouin, P. & Scheffer, I.E.
 (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51, 676-685.
- Best, N., Mitchell, J., Baimbridge, K.G. & Wheal, H.V. (1993) Changes in parvalbuminimmunoreactive neurons in the rat hippocampus following a kainic acid lesion. *Neurosci.Lett.*, 155, 1-6.

- 177
- Blumcke, I., Beck, H., Nitsch, R., Eickhoff, C., Scheffler, B., Celio, M.R., Schramm, J., Elger, C.E., Wolf, H.K. & Wiestler, O.D. (1996) Preservation of calretinin-immunoreactive neurons in the hippocampus of epilepsy patients with Ammon's horn sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55, 329-341.
- Blumcke, I., Beck, H., Suter, B., Hoffmann, D., Fodisch, H.J., Wolf, H.K., Schramm, J., Elger, C.E. & Wiestler, O.D. (1999) An increase of hippocampal calretinin-immunoreactive neurons correlates with early febrile seizures in temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol (Berl)*, **97**, 31-39.
- Bokor, H., Csaki, A., Kocsis, K. & Kiss, J. (2002) Cellular architecture of the nucleus reuniens thalami and its putative aspartatergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat. *The European journal of neuroscience*, **16**, 1227-1239.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P. & Lipton, S.A. (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-Daspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 92, 7162-7166.
- Borhegyi, Z. & Leranth, C. (1997a) Distinct substance P- and calretinin-containing projections from the supramammillary area to the hippocampus in rats; a species difference between rats and monkeys. *Exp.Brain Res.*, **115**, 369-374.
- Borhegyi, Z. & Leranth, C. (1997b) Substance P innervation of the rat hippocampal formation. *The Journal of comparative neurology*, **384**, 41-58.
- Braak, E., Strotkamp, B. & Braak, H. (1991) Parvalbumin-immunoreactive structures in the hippocampus of the human adult. *Cell Tissue Res.*, **264**, 33-48.
- Caberlotto, L., Hurd, Y.L., Murdock, P., Wahlin, J.P., Melotto, S., Corsi, M. & Carletti, R. (2003) Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain. *Eur J Neurosci*, **17**, 1736-1746.
- Celio, M.R. (1986) Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science*, **231**, 995-997.
- Celio, M.R. (1990) Calbindin-D-28K and Parvalbumin in the Rat Nervous System. *Neuroscience*, **35**, 375-475.
- Chan-Palay, V. (1987) Somatostatin immunoreactive neurons in the human hippocampus and cortex shown by immunogold/silver intensification on vibratome sections: coexistence with neuropeptide Y neurons, and effects in Alzheimer-type dementia. *J Comp Neurol*, **260**, 201-223.
- Chan-Palay, V., Kohler, C., Haesler, U., Lang, W. & Yasargil, G. (1986) Distribution of neurons and axons immunoreactive with antisera against neuropeptide Y in the normal human hippocampus. J Comp Neurol, 248, 360-375.
- Choi, D.W. (1992) Excitotoxic cell death. J Neurobiol, 23, 1261-1276.
- Cohen, I., Navarro, V., Clemenceau, S., Baulac, M. & Miles, R. (2002) On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science*, **298**, 1418-1421.
- Corsellis, J.A.N. & Meldrum, B.S. (1976) Epilepsy. In Blackwood, W., Corsellis, J.A.N. (eds.) *Greenfield's Neuropathology*. Arnold, London, pp. 771-795.
- Cossart, R., Dinocourt, C., Hirsch, J.C., Merchan-Perez, A., De Felipe, J., Ben-Ari, Y., Esclapez, M. & Bernard, C. (2001) Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci*, **4**, 52-62.
- Csiffary, A., Gorcs, T.J. & Palkovits, M. (1990) Neuropeptide Y innervation of ACTH immunoreactive neurons in the arcuate nucleus of rats: a correlated light and electron microscopic double immunolabelling study. *Brain Res.*, **506**, 215-222.
- de Lanerolle, N.C., Brines, M., Williamson, A., Kim, J.H. & Spencer, D.D. (1992) Neurotransmitters and their receptors in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Suppl*, **7**, 235-250.
- de Lanerolle, N.C., Kim, J.H., Robbins, R.J. & Spencer, D.D. (1989) Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res*, **495**, 387-395.

- de Lanerolle, N.C., Kim, J.H., Williamson, A., Spencer, S.S., Zaveri, H.P., Eid, T. & Spencer, D.D. (2003) A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories. *Epilepsia*, **44**, 677-687.
- de Lanerolle, N.C., Sloviter, R.S., Kim, J.H., Robbins, R.J. & Spencer, D.D. (1988) Evidence for hippocampal interneuron loss in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, **29**, 674.
- DeFelipe, J. (1999) Chandelier cells and epilepsy. Brain, 122, 1807-1822.
- DeFelipe, J., Garcia Sola, R., Marco, P., del Rio, M.R., Pulido, P. & Ramon y Cajal, S. (1993) Selective changes in the microorganization of the human epileptogenic neocortex revealed by parvalbumin immunoreactivity. *Cereb Cortex*, **3**, 39-48.
- Duvernoy, H.M. (1998) The human hippocampus. Springer-Verlag, Berlin.
- Engel, J., Jr. (1996a) Excitation and inhibition in epilepsy. Can J Neurol Sci, 23, 167-174.
- Engel, J., Jr. (1996b) Introduction to temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res, 26, 141-150.
- Falconer, M., Serafetinides, E. & Corsellis, J.A.N. (1964) Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Arch.Neurol.*, **10**, 233-248.
- Falconer, M.A. & Taylor, D.C. (1968) Surgical treatment of drug-resistant epilepsy due to mesial temporal sclerosis. Etiology and significance. *Arch Neurol*, **19**, 353-361.
- Faught, E. (1999) Epidemiology and drug treatment of epilepsy in elderly people. *Drugs Aging*, **15**, 255-269.
- Fisher, R.S., Pedley, T.A., Moody, W.J., Jr. & Prince, D.A. (1976) The role of extracellular potassium in hippocampal epilepsy. *Arch Neurol*, **33**, 76-83.
- Franck, J.E., Pokornny, J., Kunkel, D.D. & Schwartzkroin, P.A. (1995) Physiologic and morphologic characteristics of granule cell circuitry in human epileptic hippocampus. *Epilepsia*, **36**, 543-558.
- Freund, T.F. & Buzsaki, G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6, 347-470.
- Freund, T.F. & Katona, I. (2007) Perisomatic inhibition. Neuron, 56, 33-42.
- Freund, T.F. & Magloczky, Z. (1993) Early degeneration of calretinin-containing neurons in the rat hippocampus after ischemia. *Neuroscience*, **56**, 581-596.
- Freund, T.F., Ylinen, A., Miettinen, R., Pitkanen, A., Lahtinen, H., Baimbridge, K.G. & Riekkinen, P.J. (1992) Pattern of neuronal death in the rat hippocampus after status epilepticus.
 Relationship to calcium binding protein content and ischemic vulnerability. *Brain Res Bull*, 28, 27-38.
- Fukuda, T. & Kosaka, T. (2000) Gap junctions linking the dendritic network of GABAergic interneurons in the hippocampus. *J Neurosci*, **20**, 1519-1528.
- Galarreta, M. & Hestrin, S. (1999) A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature*, **402**, 72-75.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J.Cell Biol.*, **119**, 493-501.
- Gibson, J.R., Beierlein, M. & Connors, B.W. (1999) Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature*, **402**, 75-79.
- Gloor, P., Salanova, V., Olivier, A. & Quesney, L.F. (1993) The human dorsal hippocampal commissure. An anatomically identifiable and functional pathway. *Brain*, **116** (**Pt 5**), 1249-1273.
- Green, R.C. (1991) Neuropathology and behavior in epilepsy *Epilepsy and Behavior*. Wiley-Liss, Inc., pp. 345-359.
- Gulyas, A.I., Gorcs, T.J. & Freund, T.F. (1990) Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by GABAergic septal afferents. *Neuroscience*, **37**, 31-44.
- Gulyas, A.I., Hajos, N. & Freund, T.F. (1996) Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci*, **16**, 3397-3411.
- Gulyas, A.I., Miettinen, R., Jacobowitz, D.M. & Freund, T.F. (1992) Calretinin is present in nonpyramidal cells of the rat hippocampus--I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fibre system. *Neuroscience*, **48**, 1-27.

- Gulyas, A.I., Toth, K., Danos, P. & Freund, T.F. (1991) Subpopulations of GABAergic neurons containing parvalbumin, calbindin D28k, and cholecystokinin in the rat hippocampus. *J Comp Neurol*, **312**, 371-378.
- Gumnit, R.J. (1983) *The epilepsy handbook. The practical mangement of seizures*. Raven Press, New York.
- Hablitz, J.J., Ben-Ari, Y., Gutnick, Mody, I., Snead, O.C., Cherubini, E., Pumain, R., Prince, D.A., Engel, J., Jasper, H.H., Fariello, R.G., Marescaux, C., Avanzini & Gale (1992) Chronic models and human epilepsy - general discussion. *Epilepsy Res.*, 393-395.
- Hajos, N., Katona, I., Naiem, S.S., MacKie, K., Ledent, C., Mody, I. & Freund, T.F. (2000) Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci*, **12**, 3239-3249.
- Halasy, K., Buhl, E.H., Lorinczi, Z., Tamas, G. & Somogyi, P. (1996) Synaptic target selectivity and input of GABAergic basket and bistratified interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus*, **6**, 306-329.
- Halász, P. & Rajna, P. (1990) Epilepszia. Innomark, Budapest.
- Haug, K., Warnstedt, M., Alekov, A.K., Sander, T., Ramirez, A., Poser, B., Maljevic, S., Hebeisen, S., Kubisch, C., Rebstock, J., Horvath, S., Hallmann, K., Dullinger, J.S., Rau, B., Haverkamp, F., Beyenburg, S., Schulz, H., Janz, D., Giese, B., Muller-Newen, G., Propping, P., Elger, C.E., Fahlke, C., Lerche, H. & Heils, A. (2003) Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nature genetics*, 33, 527-532.
- Houser, C.R. (1991) GABA neurons in seizure disorders: a review of immunocytochemical studies. *Neurochem Res*, **16**, 295-308.
- Houser, C.R., Miyashiro, J.E., Swartz, B.E., Walsh, G.O., Rich, J.R. & Delgado-Escueta, A.V. (1990) Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J Neurosci*, **10**, 267-282.
- Huberfeld, G., Wittner, L., Clemenceau, S., Baulac, M., Kaila, K., Miles, R. & Rivera, C. (2007) Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *The Journal of neuroscience*, 27, 9866-9873.
- Hughes, P.E., Alexi, T., Walton, M., Williams, C.E., Dragunow, M., Clark, R.G. & Gluckman, P.D. (1999) Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Prog Neurobiol*, 57, 421-450.
- Isokawa, M. & Mello, L.E. (1991) NMDA receptor-mediated excitability in dendritically deformed dentate granule cells in pilocarpine-treated rats. *Neurosci Lett*, **129**, 69-73.
- Jankowsky, J.L. & Patterson, P.H. (2001) The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol*, **63**, 125-149.
- Johansen, F.F., Tonder, N., Zimmer, J., Baimbridge, K.G. & Diemer, N.H. (1990) Short-term changes of parvalbumin and calbindin immunoreactivity in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, **120**, 171-174.
- Kamphuis, W., Huisman, E., Wadman, W.J., Heizmann, C.W. & daSilva, H.L. (1989) Kindling induced changes in parvalbumin immunoreactivity in rat hippocampus and its relation to longterm decrease in GABA-immunoreactivity. *Brain Res.*, 479, 23-34.
- Karlocai, M.R., Toth, K., Watanabe, M., Ledent, C., Juhasz, G., Freund, T.F. & Magloczky, Z. (2011) Redistribution of CB1 Cannabinoid Receptors in the Acute and Chronic Phases of Pilocarpine-Induced Epilepsy. *PLoS One*, 6, e27196.
- Katchman, A.N., Vicini, S. & Hershkowitz, N. (1994) Mechanism of early anoxia-induced suppression of the GABAA-mediated inhibitory postsynaptic current. *Journal of neurophysiology*, **71**, 1128-1138.

- Katona, I., Sperlagh, B., Magloczky, Z., Santha, E., Kofalvi, A., Czirjak, S., Mackie, K., Vizi, E.S. & Freund, T.F. (2000) GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience*, **100**, 797-804.
- Katsumaru, H., Kosaka, T., Heizmann, C.W. & Hama, K. (1988a) Gap junctions on GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus (CA1 region). *Exp Brain Res*, **72**, 363-370.
- Katsumaru, H., Kosaka, T., Heizmann, C.W. & Hama, K. (1988b) Immunocytochemical study of GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus. *Exp Brain Res*, **72**, 347-362.
- Khalilov, I., Holmes, G.L. & Ben-Ari, Y. (2003) In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. *Nature neuroscience*, **6**, 1079-1085.
- Kosaka, T. & Hama, K. (1985) Gap junctions between non-pyramidal cell dendrites in the rat hippocampus (CA1 and CA3 regions): a combined Golgi-electron microscopy study. *The Journal of comparative neurology*, **231**, 150-161.
- Kosaka, T., Katsumaru, H., Hama, K., Wu, J.Y. & Heizmann, C.W. (1987) GABAergic neurons containing the Ca2+-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res*, **419**, 119-130.
- League, C.o.C.a.T.o.t.I. & Epilepsy, A. (1989) Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*, **30**, 389-399.
- Lee, S., Williamson, J., Lothman, E.W., Szele, F.G., Chesselet, M.F., Von Hagen, S., Sapolsky, R.M., Mattson, M.P. & Christakos, S. (1997) Early induction of mRNA for calbindin-D28k and BDNF but not NT-3 in rat hippocampus after kainic acid treatment. *Brain research*, 47, 183-194.
- Lehmann, T.N., Gabriel, S., Eilers, A., Njunting, M., Kovacs, R., Schulze, K., Lanksch, W.R. & Heinemann, U. (2001) Fluorescent tracer in pilocarpine-treated rats shows widespread aberrant hippocampal neuronal connectivity. *Eur J Neurosci*, 14, 83-95.
- Lehmann, T.N., Gabriel, S., Kovacs, R., Eilers, A., Kivi, A., Schulze, K., Lanksch, W.R., Meencke, H.J. & Heinemann, U. (2000) Alterations of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsia*, **41**, S190-194.
- Leppik, I.E. (2007) Epilepsy in the elderly: scope of the problem. *International review of neurobiology*, **81**, 1-14.
- Lewis, D.V. (2005) Losing neurons: selective vulnerability and mesial temporal sclerosis. *Epilepsia*, **46 Suppl 7**, 39-44.
- Liu, H., Brown, J.L., Jasmin, L., Maggio, J.E., Vigna, S.R., Mantyh, P.W. & Basbaum, A.I. (1994) Synaptic relationship between substance P and the substance P receptor: light and electron microscopic characterization of the mismatch between neuropeptides and their receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1009-1013.
- Liu, H., Mazarati, A.M., Katsumori, H., Sankar, R. & Wasterlain, C.G. (1999) Substance P is expressed in hippocampal principal neurons during status epilepticus and plays a critical role in the maintenance of status epilepticus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5286-5291.
- Lloyd, K.G., Bossi, L., Morselli, P.L., Munari, C., Rougier, M. & Loiseau, H. (1986) Alterations of GABA-mediated synaptic transmission in human epilepsy. *Adv Neurol*, **44**, 1033-1044.
- Lotstra, F. & Vanderhaeghen, J.J. (1987) Distribution of immunoreactive cholecystokinin in the human hippocampus. *Peptides*, **8**, 911-920.
- Ludanyi, A., Eross, L., Czirjak, S., Vajda, J., Halasz, P., Watanabe, M., Palkovits, M., Magloczky, Z., Freund, T.F. & Katona, I. (2008) Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 28, 2976-2990.
- Magloczky, Z. (2010) Sprouting in human temporal lobe epilepsy: excitatory pathways and axons of interneurons. *Epilepsy research*, **89**, 52-59.
- Maglóczky, Z. (2005) A hippocampális neuronhálózatok átalakulása krónikus temporális lebeny epilepsziában. In Halász, P. (ed.) *Hippocampus, mint neuropszichiátriai betegségek közös nevezője*. Melinda Kiadó, Budapest, pp. 61-101.
- Maglóczky, Z. (2007) Epilepszia és agykutatás. In Halász, P. (ed.) *Epilepszia: Ablak az agyra*. Garbo Kiadó, Budapest, pp. 85-93.
- Magloczky, Z., Acsady, L. & Freund, T.F. (1994) Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. *Hippocampus*, **4**, 322-334.
- Magloczky, Z. & Freund, T.F. (1993) Selective neuronal death in the contralateral hippocampus following unilateral kainate injections into the CA3 subfield. *Neuroscience*, **56**, 317-335.
- Magloczky, Z. & Freund, T.F. (1995) Delayed cell death in the contralateral hippocampus following kainate injection into the CA3 subfield. *Neuroscience*, **66**, 847-860.
- Magloczky, Z., Halasz, P., Vajda, J., Czirjak, S. & Freund, T.F. (1997) Loss of Calbindin-D28K immunoreactivity from dentate granule cells in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 76, 377-385.
- Magloczky, Z., Toth, K., Karlocai, R., Nagy, S., Eross, L., Czirjak, S., Vajda, J., Rasonyi, G., Kelemen, A., Juhos, V., Halasz, P., Mackie, K. & Freund, T.F. (2010) Dynamic changes of CB1-receptor expression in hippocampi of epileptic mice and humans. *Epilepsia*, **51 Suppl 3**, 115-120.
- Magloczky, Z., Wittner, L., Borhegyi, Z., Halasz, P., Vajda, J., Czirjak, S. & Freund, T.F. (2000) Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience*, **96**, 7-25.
- Mantyh, P.W., Allen, C.J., Ghilardi, J.R., Rogers, S.D., Mantyh, C.R., Liu, H., Basbaum, A.I., Vigna, S.R. & Maggio, J.E. (1995) Rapid endocytosis of a G protein-coupled receptor: substance Pevoked internalization of its receptor in the rat striatum in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 92, 2622-2626.
- Mantyh, P.W., Pinnock, R.D., Downes, C.P., Goedert, M. & Hunt, S.P. (1984) Correlation between inositol phospholipid hydrolysis and substance P receptors in rat CNS. *Nature*, **309**, 795-797.
- Marco, P., Sola, R.G., Cayal, S.R.Y. & DeFelipe, J. (1997) Loss of inhibitory synapses on the soma and axon initial segment of pyramidal cells in human epileptic peritumoral neocortex: implications for epilepsy. *Brain Res.Bull.*, **44**, 47-66.
- Margerison, J.H. & Corsellis, J.A. (1966a) Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain*, **89**, 499-530.
- Margerison, J.H. & Corsellis, J.A.N. (1966b) Epilepsy and the temporal lobe. Brain, 89, 499-530.
- Mathern, G.W., Babb, T.L. & Armstrong, D.L. (1997a) Hippocampal Sclerosis. In Engel, J.J., Pedley, T.A. (eds.) *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Lipincott-Raven, Philadelphia, pp. 133-155.
- Mathern, G.W., Babb, T.L., Micevych, P.E., Blanco, C.E. & Pretorius, J.K. (1997b) Granule cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus. *Mol.Chem.Neuropathol.*, **30**, 53-76.
- Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Leite, J.P., Kornblum, H.I., Mendoza, D., Lozada, A. & Bertram, E.H., 3rd (1998a) Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. *Epilepsy Res*, **32**, 154-171.
- Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Mendoza, D., Leite, J.P., Chimelli, L., Born, D.E., Fried, I., Assirati, J.A., Ojemann, G.A., Adelson, P.D., Cahan, L.D. & Kornblum, H.I. (1999) Hippocampal Nmethyl-D-aspartate receptor subunit mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. Ann Neurol, 46, 343-358.

- Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Mendoza, D., Lozada, A., Leite, J.P., Chimelli, L., Fried, I., Sakamoto, A.C., Assirati, J.A. & Adelson, P.D. (1998b) Increased hippocampal AMPA and NMDA receptor subunit immunoreactivity in temporal lobe epilepsy patients. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57, 615-634.
- Maubach, K.A., Cody, C. & Jones, R.S. (1998) Tachykinins may modify spontaneous epileptiform activity in the rat entorhinal cortex in vitro by activating GABAergic inhibition. *Neuroscience*, 83, 1047-1062.
- McNamara, J.O. (1984) Kindling: an animal model of complex partial epilepsy. *Ann Neurol*, **16**, S72-76.
- Megias, M., Emri, Z., Freund, T.F. & Gulyas, A.I. (2001) Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*, **102**, 527-540.
- Meldrum, B. (1991) Excitotoxicity and epileptic brain damage. Epilepsy Res, 10, 55-61.
- Meldrum, B.S. (1990) Anatomy, physiology, and pathology of epilepsy. Lancet, 336, 231-234.
- Miettinen, R., Gulyas, A.I., Baimbridge, K.G., Jacobowitz, D.M. & Freund, T.F. (1992) Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus--II. Co-existence with other calcium binding proteins and GABA. *Neuroscience*, **48**, 29-43.
- Miles, R., Toth, K., Gulyas, A.I., Hajos, N. & Freund, T.F. (1996) Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron*, **16**, 815-823.
- Miller, L.A., Munoz, D.G. & Finmore, M. (1993) Hippocampal sclerosis and human memory. *Arch Neurol*, **50**, 391-394.
- Mody, I., Reynolds, J.N., Salter, M.W., Carlen, P.L. & MacDonald, J.F. (1990) Kindling-induced epilepsy alters calcium currents in granule cells of rat hippocampal slices. *Brain Res.*, **531**, 88-94.
- Nakaya, Y.T., Kaneko, R., Shigemoto, R., Nakanishi, S. & Mizuno, N. (1994) Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. *J.Comp.Neurol.*, 347, 249-274.
- Nitsch, R. & Leranth, C. (1993) Calretinin immunoreactivity in the monkey hippocampal formation. II: Intrinsic GABAergic and hypothalamic nonGABAergic systems. An experimental tracing and coexistence study. *Neuroscience*, **55**, 797-812.
- Nitsch, R. & Ohm, T.G. (1995) Calretinin immunoreactive structures in the human hippocampal formation. *J.Comp.Neurol.*, **360**, 475-487.
- Nitsch, R., Soriano, E. & Frotscher, M. (1990) The Parvalbumin-Containing Nonpyramidal Neurons in the Rat Hippocampus. *Anat.Embryol.*, **181**, 413-425.
- Nó, L.d. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the Ammonic system. *J. für Psychologie und Neurologie*, **46**.
- Nusser, Z., Hajos, N., Somogyi, P. & Mody, I. (1998) Increased number of synaptic GABA(A) receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature*, **395**, 172-177.
- Olney, J.W. (1978) Neurotoxicity of excitatory amino acids. In McGeer, E., Olney, J.W., McGeer, P. (eds.) *Kainic acid as a tool in neurobiology*. Raven Press, New York, pp. 95-121.
- Olney, J.W. (1990) Excitotoxicity: an overview. *Can Dis Wkly Rep*, **16 Suppl 1E**, 47-57; discussion 57-48.
- Olney, J.W., Collins, R.C. & Sloviter, R.S. (1986) Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. In Delgado-Escueta, A., Ward, A., Woodbury, D., Porter, R. (eds.) Basic mechanisms of the epilepsies: Molecular and cellular approaches. Raven Press, New York, pp. 857-877.
- Olsen, R.W., Bureau, M., Houser, C.R., Delgado-Escueta, A.V., Richards, J.G. & Mohler, H. (1992) GABA/benzodiazepine receptors in human focal epilepsy. *Epilepsy Res Suppl*, **8**, 383-391.
- Palma, C. & Maggi, C.A. (2000) The role of tachykinins via NK1 receptors in progression of human gliomas. *Life Sci*, **67**, 985-1001.
- Penttonen, M., Kamondi, A., Acsady, L. & Buzsaki, G. (1998) Gamma frequency oscillation in the hippocampus of the rat: intracellular analysis in vivo. *Eur J Neurosci*, **10**, 718-728.

- Peternel, S., Pilipovic, K. & Zupan, G. (2009) Seizure susceptibility and the brain regional sensitivity to oxidative stress in male and female rats in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **33**, 456-462.
- Pollard, H., Cantagrel, S., Charriaut-Marlangue, C., Moreau, J. & Ben Ari, Y. (1994) Apoptosis associated DNA fragmentation in epileptic brain damage. *Neuroreport*, **5**, 1053-1055.
- Rasmussen, H. (1986) The calcium messenger system. N.Engl.J.Med., **314**, 1094-1101.
- Represa, A., Le Gall La Salle, G. & Ben-Ari, Y. (1989) Hippocampal plasticity in the kindling model of epilepsy in rats. *Neurosci Lett*, **99**, 345-350.
- Ribak, C.E., Seress, L. & Leranth, C. (1993) Electron microscopic immunocytochemical study of the distribution of parvalbumin-containing neurons and axon terminals in the primate dentate gyrus and Ammon's horn. *J Comp Neurol*, **327**, 298-321.
- Rivera, C., Li, H., Thomas-Crusells, J., Lahtinen, H., Viitanen, T., Nanobashvili, A., Kokaia, Z., Airaksinen, M.S., Voipio, J., Kaila, K. & Saarma, M. (2002) BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K+-Cl- cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl- extrusion. *The Journal of cell biology*, **159**, 747-752.
- Rocca, W.A., Sharbrough, F.W., Hauser, W.A., Annegers, J.F. & Schoenberg, B.S. (1987) Risk factors for complex partial seizures: a population-based case-control study. *Annals of Neurology*, 21, 22-31.
- Rodin, E.A. (1968) The prognosis of patient with epilepsy. CC Thomas, Springfield, Illionis.
- Salzmann, A., Perroud, N., Crespel, A., Lambercy, C. & Malafosse, A. (2008) Candidate genes for temporal lobe epilepsy: a replication study. *Neurol Sci*, **29**, 397-403.
- Schwartzkroin, P.A. & Wheal, H.V. (1984) *Electrophisyology of epilepsy*. Academic Press, London.
- Schwarzer, C., Sperk, G., Samanin, R., Rizzi, M., Gariboldi, M. & Vezzani, A. (1996) Neuropeptidesimmunoreactivity and their mRNA expression in kindling: functional implications for limbic epileptogenesis. *Brain Res Brain Res Rev*, 22, 27-50.
- Seress, L. (1988) Interspecies comparison of the hippocampal formation shows increased emphasis on the regio superior in the Ammon's horn of the human brain. *J Hirnforsch*, **29**, 335-340.
- Seress, L. (2005) Az emberi hippocampus makroszkópos anatómiája, szövettani szerkezete, külső és belső kapcsolatai és fejlődése. In P., H. (ed.) *Hippocampus mint neuropszichiátriai betegségek közös nevezője*. Melinda kiadó, Budapest.
- Seress, L., Abraham, H., Horvath, Z., Doczi, T., Janszky, J., Klemm, J., Byrne, R. & Bakay, R.A.E. (2009) Survival of mossy cells of the hippocampal dentate gyrus in humans with mesial temporal lobe epilepsy Clinical article. J. Neurosurg., 111, 1237-1247.
- Seress, L., Gulyas, A.I., Ferrer, I., Tunon, T., Soriano, E. & Freund, T.F. (1993a) Distribution, morphological features, and synaptic connections of parvalbumin- and calbindin D28kimmunoreactive neurons in the human hippocampal formation. *J Comp Neurol*, **337**, 208-230.
- Seress, L., Gulyas, A.I. & Freund, T.F. (1991) Parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of the macaque monkey. *J Comp Neurol*, **313**, 162-177.
- Seress, L., Gulyas, A.I. & Freund, T.F. (1992) Pyramidal neurons are immunoreactive for calbindin D28k in the CA1 subfield of the human hippocampus. *Neurosci Lett*, **138**, 257-260.
- Seress, L. & Mrzljak, L. (1987) Basal dendrites of granule cells are normal features of the fetal and adult dentate gyrus of both monkey and human hippocampal formations. *Brain Res*, 405, 169-174.
- Seress, L., Nitsch, R. & Leranth, C. (1993b) Calretinin immunoreactivity in the monkey hippocampal formation--I. Light and electron microscopic characteristics and co-localization with other calcium-binding proteins. *Neuroscience*, 55, 775-796.
- Seress, L. & Ribak, C.E. (1983) GABAergic cells in the dentate gyrus appear to be local circuit and projection neurons. *Exp Brain Res*, **50**, 173-182.
- Severini, C., Improta, G., Falconieri-Erspamer, G., Salvadori, S. & Erspamer, V. (2002) The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev*, **54**, 285-322.

- Shigemoto, R., Nakaya, Y.T., Nomura, S., Ogawa-Meguro, R., Ohishi, H., Kaneko, T., Nakanishi, S. & Mizuno, N. (1993) Immunocytochemical localization of rat substance P receptor in striatum. *Neurosci.Lett.*, **153**, 157-160.
- Slezia, A., Kekesi, A.K., Szikra, T., Papp, A.M., Nagy, K., Szente, M., Magloczky, Z., Freund, T.F. & Juhasz, G. (2004) Uridine release during aminopyridine-induced epilepsy. *Neurobiol Dis*, 16, 490-499.
- Sloviter, R.S. (1989) Calcium-binding protein (Calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J.Comp.Neurol.*, 280, 183-196.
- Sloviter, R.S., Ali-Akbarian, L., Horvath, K.D. & Menkens, K.A. (2001) Substance P receptor expression by inhibitory interneurons of the rat hippocampus: enhanced detection using improved immunocytochemical methods for the preservation and colocalization of GABA and other neuronal markers. *J Comp Neurol*, **430**, 283-305.
- Sloviter, R.S., Sollas, A.L., Barbaro, N.M. & Laxer, K.D. (1991) Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. J Comp Neurol, 308, 381-396.
- Smith, P.W. & Dawson, L.A. (2008) Neurokinin 3 (NK3) receptor modulators for the treatment of psychiatric disorders. *Recent Pat CNS Drug Discov*, **3**, 1-15.
- Sommer, W. (1880) Erkrankung des Ammonshornes als Aetiologisches Moment der Epilepsie. *Arch.Psychiat.NervKrankh*, **10**, 631-675.
- Somogyi, P., Nunzi, M.G., Gorio, A. & Smith, A.D. (1983) A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Res.*, 259, 137-142.
- Spencer, D.D. & Spencer, S.S. (1985) Surgery for epilepsy. Neurol Clin, 3, 313-330.
- Spencer, D.D. & Spencer, S.S. (1994) Hippocampal resections and the use of human tissue in defining temporal lobe epilepsy syndromes. *Hippocampus*, **4**, 243-249.
- Suckling, J., Roberts, H., Walker, M., Highley, J.R., Fenwick, P., Oxbury, J. & Esiri, M.M. (2000) Temporal lobe epilepsy with and without psychosis: exploration of hippocampal pathology including that in subpopulations of neurons defined by their content of immunoreactive calcium-binding proteins. *Acta Neuropathol (Berl)*, **99**, 547-554.
- Sundstrom, L.E., Brana, C., Gatherer, M., Mepham, J. & Rougier, A. (2001) Somatostatin- and neuropeptide Y-synthesizing neurones in the fascia dentata of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain*, **124**, 688-697.
- Sutula, T.P., Cascino, G., Cavazos, J.E. & Ramirez, L. (1989) Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann.Neurol.*, **26**, 321-330.
- Szabadics, J., Varga, C., Molnar, G., Olah, S., Barzo, P. & Tamas, G. (2006) Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science*, **311**, 233-235.
- Szente, M., Gajda, Z., Said Ali, K. & Hermesz, E. (2002) Involvement of electrical coupling in the in vivo ictal epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the neocortex. *Neuroscience*, 115, 1067-1078.
- Szirmai, I. (2001) Neurológia. Medicina, Budapest.
- Tamas, G., Buhl, E.H., Lorincz, A. & Somogyi, P. (2000) Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nature neuroscience*, **3**, 366-371.
- Tang, F.R., Chia, S.C., Jiang, F.L., Ma, D.L., Chen, P.M. & Tang, Y.C. (2006) Calcium binding protein containing neurons in the gliotic mouse hippocampus with special reference to their afferents from the medial septum and the entorhinal cortex. *Neuroscience*, **140**, 1467-1479.
- Toth, K., Eross, L., Vajda, J., Halasz, P., Freund, T.F. & Magloczky, Z. (2010) Loss and reorganization of calretinin-containing interneurons in the epileptic human hippocampus. *Brain*, **133**, 2763-2777.

- Toth, K. & Freund, T.F. (1992) Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience*, **49**, 793-805.
- Toth, K., Wittner, L., Urban, Z., Doyle, W.K., Buzsaki, G., Shigemoto, R., Freund, T.F. & Magloczky, Z. (2007) Morphology and synaptic input of substance P receptor-immunoreactive interneurons in control and epileptic human hippocampus. *Neuroscience*, **144**, 495-508.
- Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M.C., Mackie, K. & Walker, J.M. (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83, 393-411.
- Urban, Z., Magloczky, Z. & Freund, T.F. (2002) Calretinin-containing interneurons innervate both principal cells and interneurons in the CA1 region of the human hippocampus. *Acta Biol Hung*, 53, 205-220.
- Vale, C. & Sanes, D.H. (2000) Afferent regulation of inhibitory synaptic transmission in the developing auditory midbrain. *The Journal of neuroscience*, **20**, 1912-1921.
- Van Den Pol, A.N., Obrietan, K. & Chen, G. (1996) Excitatory actions of GABA after neuronal trauma. *The Journal of neuroscience*, **16**, 4283-4292.
- van Vliet, E.A., Aronica, E., Tolner, E.A., Lopes da Silva, F.H. & Gorter, J.A. (2004) Progression of temporal lobe epilepsy in the rat is associated with immunocytochemical changes in inhibitory interneurons in specific regions of the hippocampal formation. *Exp Neurol*, **187**, 367-379.
- Vertes, R.P. (1992) PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J.Comp.Neurol.*, **326**, 595-622.
- Wilson, C.L., Isokawa, M., Babb, T.L. & Crandall, P.H. (1990) Functional connections in the human temporal lobe. I. Analysis of limbic system pathways using neuronal responses evoked by electrical stimulation. *Exp Brain Res*, 82, 279-292.
- Winsky, L., Nakata, H., Martin, B.M. & Jacobowitz, D.M. (1989) Isolation, partial amino acid sequence, and immunohistochemical localization of brain-specific calcium-binding protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 86, 10139-10143.
- Wittner, L., Eross, L., Czirjak, S., Halasz, P., Freund, T.F. & Magloczky, Z. (2005) Surviving CA1 pyramidal cells receive intact perisomatic inhibitory input in the human epileptic hippocampus. *Brain*, **128**, 138-152.
- Wittner, L., Eross, L., Szabo, Z., Toth, S., Czirjak, S., Halasz, P., Freund, T.F. & Magloczky, Z.S. (2002) Synaptic reorganization of calbindin-positive neurons in the human hippocampal CA1 region in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, **115**, 961-978.
- Wittner, L., Magloczky, Z., Borhegyi, Z., Halasz, P., Toth, S., Eross, L., Szabo, Z. & Freund, T.F. (2001) Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience*, **108**, 587-600.
- Wyeth, M.S., Zhang, N. & Houser, C.R. Increased cholecystokinin labeling in the hippocampus of a mouse model of epilepsy maps to spines and glutamatergic terminals. *Neuroscience*, **202**, 371-383.

IX. A doktori pályaműhöz felhasznált saját közlemények (Maglóczky Zsófia)

Zs. Maglóczky, P. Halász, J. Vajda, S. Czirják, and T.F. Freund (1997): Loss of Calbindin-D28k immunoreactivity from dentate granule cells in human temporal lobe epilepsy. Neuroscience, 76:377-386

Maglóczky, Zs. Wittner, L., Borhegyi, Zs., Halász, P., Vajda, J., Czirják, S. and Freund, T.F. (2000): Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. Neuroscience, 96: 7-25

Wittner L, <u>Maglóczky Zs</u>, Borhegyi Zs, Halász P, Tóth Sz, Erőss L, Szabó Z, Freund TF (2001) Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *NEUROSCIENCE* 108: pp. 587-600.

Urbán Z., Maglóczky Zs. and Freund T. F. (2002) Calretinin-containing interneurons innervate both principal cells and interneurons in the CA1 region of the human hippocampus. Acta Biologica Hungarica 53: 205-220.

L. Wittner, L. Erőss, Z. Szabó, Sz. Tóth, S. Czirják, P. Halász, T.F. Freund and Zs. Maglóczky (2002) Synaptic reorganization of calbindin-positive neruons in the human hippocampal CA1 region in temporal lobe epilepsy. Neuroscience 115 (3):961-978.

Lucia Wittner, Loránd Erőss, Sándor Czirják, Péter Halász, Tamás F. Freund and Zsófia Maglóczky (2005) Surviving CA1 pyramidal cells receive intact perisomatic inhibitory input in the human epileptic hippocampus. Brain, **128**, 138-152.

Maglóczky Zs. A hippocampális neuronhálózatok átalakulása krónikus temporális lebeny epilepsziában. In: Halász P (ed.) Hippocampus, mint neuropszichiátriai betegségek közös nevezője.

Budapest: Melinda Kiadó, 2005. pp. 61-101.

Magloczky, Z. & Freund, T.F. (2005) Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. Trends Neurosci, **28**, 334-340.

Toth, K., Wittner, L., Urban, Z., Doyle, W.K., Buzsaki, G., Shigemoto, R., Freund, T.F. & Magloczky, Z. (2007) Morphology and synaptic input of substance P receptor-immunoreactive interneurons in control and epileptic human hippocampus. Neuroscience, **144**, 495-508.

Zsófia Maglóczky: Sprouting in human temporal lobe epilepsy: Excitatory pathways and axons of interneurons. Epilepsy Research, 89, 52-59. (2010)

Zsófia Maglóczky, Kinga Tóth, Rita Karlócai, Sára Nagy, Loránd Erőss, Sándor Czirják, János Vajda, György Rásonyi, Anna Kelemen, Vera Juhos, Péter Halász, Ken Mackie, Tamás

F. Freund: Dynamic changes of CB1 receptor expression in hippocampi of epileptic mice and humans. Epilepsia, 51(Suppl. 39: 115-120, (2010)

Kinga Tóth, Loránd Erőss, János Vajda, Péter Halász, Tamás F. Freund and Zsófia Maglóczky: Loss and reorganization of calretinin-containing interneurons in the epileptic human hippocampus. Brain, 133; 2763-77 (2010)

Karlocai MR, Toth K, Watanabe M, Ledent C, Juhasz G, Freund TF, <u>Magloczky Z (2011)</u> Redistribution of CB1 Cannabinoid Receptors in the Acute and Chronic Phases of Pilocarpine-Induced Epilepsy. *PLOS ONE* 6:(11) p. e27196. (2011)

X. A pályaműhöz fel nem használt, epilepsziával foglalkozó cikkek

Katona I., Sperlágh B., Maglóczky Zs., Sántha E., Kőfalvi A., Czirják S., Mackie K., Vizi E.S., Freund T.F. (2000): GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. Neuroscience, 100: 797-804

István Ulbert, Zsófia Maglóczky, Loránd Erőss, Sándor Czirják, János Vajda, László Bognár, Szabolcs Tóth, Zerind Szabó, Péter Halász, Dániel Fabó, Eric Halgren, Tamás F. Freund, George Karmos (2004) In vivo laminar electrophysiology co-registered with histology in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. Experimental Neurology, 187(2):310-8.

Slézia, A. K. Kékesi, T. Szikra, A. M. Papp, K. Nagy, M. Szente, Zs. Maglóczky, T. F. Freund and G. Juhász (2004): Uridine release during aminopyridine-induced epilepsy. Neurobiology of Desease, 16: 490-499 (2004)

Fabo D, Magloczky Z, Wittner L, Pek A, Eross L, Czirjak S, Vajda J, Solyom A, Rasonyi G, Szucs A, Kelemen A, Juhos V, Grand L, Dombovari B, Halasz P, Freund TF, Halgren E, Karmos G, Ulbert I. Properties of in vivo interictal spike generation in the human subiculum. BRAIN *131*:(Pt 2) 485-499 (2008)

Ludanyi A, Eross L, Czirjak S, Vajda J, Halasz P, Watanabe M, Palkovits M, Magloczky Z, Freund TF, Katona I. Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus. J NEUROSCI 28:(12) 2976-2990 (2008)

Wittner L, Huberfeld G, Clemenceau S, Eross L, Dezamis E, Entz L, Ulbert I, Baulac M, Freund TF, Magloczky Z, Miles R The epileptic human hippocampal cornu ammonis 2 region generates spontaneous interictal-like activity in vitro BRAIN 132:(Pt 11) 3032-3046 (2009)

Richárd Csercsa, Balázs Dombovári, Dániel Fabó, Lucia Wittner, Loránd Erőss, László Entz, András Sólyom, György Rásonyi, Anna Szűcs, Anna Kelemen, Rita Jakus, Vera Juhos, László Grand, Andor Magony, Péter Halász, Tamás F. Freund, Zsófia Maglóczky, Sydney S. Cash, László Papp, György Karmos, Eric Halgren and István Ulbert: Laminar analysis of the slow wave activity in humans. Brain 133;2814-2829, (2010)

Ludányi A, Hu SS, Yamazaki M, Tanimura A, Piomelli D, Watanabe M, Kano M, Sakimura K, Maglóczky Z, Mackie K, Freund TF, Katona I. (2011)

Complementary synaptic distribution of enzymes responsible for synthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the human hippocampus. <u>Neuroscience</u>. 174:50-63.