Neuronhálózati reorganizáció vizsgálata humán temporális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő betegek műtétileg eltávolított hippocampusában

Doktori értekezés

Tóth Kinga

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Maglóczky Zsófia, PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Dobolyi Árpád, PhD, tudományos főmunkatárs
Dr. Rácz Bence, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kiss József, MD, DSc, tudományos tanácsadó, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ábrahám Hajnalka, MD, PhD, egyetemi docens
Dr. Székely Andrea, MD, PhD, egyetemi docens

Budapest
2012

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés 6.

1.1. A temporális lebeny eredetű epilepszia (TLE) 6.

1.2. A humán hippocampus anatómiája 7.

1.3. A hippocampus patológiai elváltozása TLE esetén 10.

1.4. Irodalmi áttekintés 12.

1.4.1. A substance P és receptorának szerepe a hippocampus aktivitásának szabályzásában 12.

1.4.2. A CR-tartalmú interneuronok szerepe a CA1 régió gátlórendszerében és érzékenységük epilepsziában 15.

2. Célkitűzések 17.

3. Módszerek 18.

3.1. Immunhisztokémia 19.

3.2. Kettős fluorescens immunfestés 20.

3.3. CR-CB kettős immunfestés 21.

3.4. Kvantitatív analízis 21.

3.4.1. Sejtszámolás – SPR-pozitív sejtek 21.

3.4.2. Sejtszámolás – CR-pozitív sejtek 22.

3.4.3. SPR-pozitív interneuronok dendritelágazási pontjainak meghatározása 23.

3.4.4. SPR-pozitív sejtek kolokalizációja interneuron markerekkel 23.

3.4.5. SPR-pozitív interneuronok szinaptikus borítottságának meghatározása 23.

3.4.6. A CR-pozitív interneuronok posztszinaptikus célelem eloszlásának meghatározása 24.

4. Eredmények 25.

4.1. Az immunfestés minősége az életkor, a fixálás és a post mortem idő függvényében 25.

4.2. Az epilepsziás minták patológiai csoportosítása 26.

4.3. Az SPR-immunreaktív sejtek száma, eloszlása és morfológiája 30.

4.4. Az SPR-pozitív sejtek kolokalizációja funkcionálisan különböző

interneuronok markereivel 40.
4.5. Az SPR-pozitív elemek elektronmikroszkópos vizsgálata 44.
4.5.1. Az SPR-pozitív elemek ultrastruktúrája a CA1 régióban 45.
4.5.2. Az SPR-pozitív sejtek szinaptikus borítottsága a CA1 régióban 46.
4.6. A CR-immunreaktív sejtek száma, eloszlása és morfológiája 50.
4.7. A CR-pozitív elemek elektronmikroszkópos vizsgálata 60.
4.7.1. A CR-pozitív elemek ultrastruktúrája 61.
4.7.2. A CR-pozitív terminálisok posztszinaptikus célelem eloszlása 61.
4.8. A CR-tartalmú interneuron-szelektív gátlósejtek célelemeinek azonosítása 66.
5. Megbeszélés 69.
5.1. SPR-immunpozitív sejtek változásai 69.
5.1.1. Az SPR-pozitív interneuronok részt vesznek a dendritikus gátlásban a humán hippocampusban 69.
5.1.2. Az SPR-pozitív sejteket érintő változások a humán epilepsziás CA1 régióban 70.
5.1.3. Az SPR-pozitív interneuronokat érintő szinaptikus reorganizáció a humán epilepsziás CA1 régióban 72.
5.2. A CR-immunpozitív sejtek változásai 73.
5.2.1. Az életkor, a fixálás és a post mortem idő hatása a CR-immunfestésre 73.
5.2.2. A CR-pozitív interneuronok érzékenyek epilepsziára 73.
5.2.3. A CR-pozitív interneuronok célelemei megváltoznak a humán epilepsziás CA1 régióban 76.
6. Következtetések 80.
7. Összefoglalás 82.
8. Summary 83.
9. Irodalomjegyzék 84.
10. Saját közlemények jegyzéke 101.
10.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények 101.
10.2. Disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények 101.
11. Köszönetnyilvánítás 102.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC: avidin-biotin-tormaperoxidáz komplex

BDNF: brain derived neurotrophic factor

BSA: szarvasmarha szérum-albumin

CA1-3: cornu Ammonis 1-3

CB: calbindin

CCK: cholecystokinin

CR: calretinin

DAB: 3,3'-diaminobenzidin-4HCl

EEG: elektroenkefalográfia

GABA: γ-amino-vajsav

GD: gyrus dentatus

MRI: mágneses magrezonancia képalkotás

NPY: neuropeptid Y

PB: foszfát puffer

PET: pozitronemissziós tomográfia

pm: post mortem

PV: parvalbumin

SOM: somatostatin

SP: substance P

SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography

SPR: substance P receptor

SUM: supramammillaris mag

TB: TRIS puffer

TBS: TRIS-sel pufferelt fiziológiás sóoldat

TLE: temporális lebeny eredetű epilepszia

TRIS: Tris (hydroxymetil)-aminometán

VIP: vazoactive intestinal polypeptide

1. BEVEZETÉS

1.1. A temporális lebeny eredetű epilepszia (TLE)

Az epilepszia krónikus agyi működészavar különböző etiológiával, amelyet visszatérő rohamok jellemeznek, hátterében az agyi neuronok excesszív kisülése áll és különböző klinikai és laboratóriumi manifesztációi lehetnek (Falconer et al., 1964; Margerison és Corsellis, 1966). A leggyakoribb neurológiai elváltozások közé tartozik, mely jelentős károsodásokat idéz elő a betegek életminőségében, életvitelében.

Az epilepszia nem tekinthető egységes betegségnek, hanem inkább egy olyan speciális működési zavarnak, mely különböző formákban és okokból jöhet létre (Halász, 1997). Kialakulásában külső (cerebrális inzultus, speciális provokáló tényezők) és belső (genetikus- és fejlődési rendellenesség) tényezők eltérő arányban vehetnek részt. Előfordulása az összpopulációban, életkorra való tekintet nélkül átlagosan 1-2%, de a pontos meghatározás több nehézségbe ütközik. Attól függően, hogy a ritka, szórványos rohamokat, vagy a lázas konvulziókat epilepsziaként definiálják-e, ill. hogy csak a rendszeres, gyakori rohamokat mutató betegeket veszik figyelembe, vagy mindenkit, akinek valaha volt epilepsziás rohama, nagy különbségek mutatkozhatnak. A helyzetet tovább nehezíti, hogy a betegek egy része egyáltalán nem fordul orvoshoz (Halász és Rajna, 1990).

A különböző agyi struktúrák epileptogén készsége nem egyforma. Egyes neuroncsoportok különösen hajlamosak arra, hogy kisülés sorozatokat képezzenek. Az epileptogenezis leggyakoribb helye a hippocampus és a neocortex.

A neuronok epilepsziás szinkronizációjának lehetősége több tényezőtől függ. Szinkronizáció létrejöhet szinaptikus úton kollaterális kapcsolatok révén; elektromos (gap junction) összeköttetések útján; direkt kapcsolat nélkül, elektromos mezőeffektusok révén; extracelluláris ionkoncentráció-eltolódások és neuromodulátorok befolyásoló hatása miatt (Halász és Rajna, 1990).

Az epilepsziás rohamok parciális és generalizált rohamokra különíthetők. Parciális esetben meghatározható a roham fókusza (EEG), mely a felnőttkori epilepsziák jelentős hányadában a temporális lebeny, azon belül is a hippocampus formáció (Margerison és Corsellis, 1966; Morrell, 1997).

Ma már az antiepileptikumok széles skálája áll rendelkezésre, azonban a betegek egy része gyógyszeres kezeléssel nem tünetmentesíthető. A gyógyszeres kezelés sikertelensége azt jelenti, hogy maximális monoterápiával (vagyis egyetlen gyógyszer alkalmazásával) mellékhatások nélkül nem sikerül kellő javulást elérni. A TLE-ben kiugróan magas a rezisztens esetek aránya, mely gyakran társul hippocampális szklerózissal (Meencke és Veith, 1991; Miller et al., 1993). A pontosan lokalizálható fókusszal rendelkező, súlyos klinikai következményekkel járó, gyógyszer-rezisztens epilepsziás betegeknél az epilepsziasebészet jön szóba. Ennek során a rohamkiindulás pontos anatómiai területének meghatározása után az epileptogén régiót eltávolítják a rohamok megszűntetése céljából. A parciális epilepsziák 85%-a a temporális lebenyből indul, ezért leggyakrabban anterior temporális lobectomiát végeznek, melynek során a hippocampus elülső 1/3-a és/vagy a temporális lebeny egyes részei kerülnek eltávolításra (Nakasato et al., 1992; Swanson, 1995; Morrell, 1997), melyek szövettani módszerekkel vizsgálhatóak. A betegek többsége a műtét után rohammentes, vagy jelentősen mérséklődik a rohamok száma. A temporális lobectomiát követően jók a kognitív funkciós vizsgálatok eredményei, azonban újabb információkat érintő időleges memóriazavar előfordulhat (Zola-Morgan és Squire, 1986; Hermann et al., 1992; Miller et al., 1993).

1.2. A humán hippocampus anatómiája

A hippocampus az ősi kéregterület, az archicortex részét képezi és olyan alapvető kognitív funkciókban van szerepe, mint a memórianyomok rögzítése, tanulás, emlékezés, térbeli tájékozódás, vizuális készségek, beszédértés. Kiterjedt szubkortikális kapcsolatai révén fontos szerepet játszik az emlősök viselkedésének szabályzásában (Duvernoy, 1998).

A hippocampális formáció anatómiailag két részre különül: a cornu Ammonisra és a gyrus dentatusra (GD), melyek két egymásba forduló U alakot képeznek (Duvernoy, 1998). A principális sejtek morfológiája, eloszlása és kapcsolatrendszere alapján a cornu Ammonis CA1, CA2, CA3 régiókra osztható (Lorente de No, 1934; Seress, 1988; Duvernoy, 1998; Amaral és Insausti, 2004). A CA3 régió esetében

további, CA3a-, b- és c részeket különítenek el. A CA1 régiót a cornu Ammonis folytatásában található subiculummal együtt Sommer-szektornak is hívják. E régiók a CA3c kivételével jellegzetes rétegződést mutatnak. A stratum pyramidale-ban találhatóak a principális sejtek teste, melyek itt a cornu Ammonisban piramissejtek. Ezek bazális dendritjei a stratum oriensben helyezkednek el, apikális dendritjeik pedig a stratum radiatumban futnak és a stratum lacunosum-moleculare-ban arborizálnak (Ramón y Cajal, 1909-11, 1968). Az alveusban futnak a piramissejtek axonjai. A CA3a és b régiókra ezenkívül jellemző a stratum pyramidale alatt elhelyezkedő stratum lucidum, mely moharostok nagy tömegét tartalmazza. A CA3c-ben nem figyelhető meg a principális sejtek és dendritjeik réteges elhelyezkedése.

A gyrus dentatus része a stratum granulosum, ez a szemcsesejtek tömött rétege, melyek dendritfája a stratum moleculare-ba fut. A szemcsesejtek rétege alatt helyezkedik el a hilus, melynek principális sejtjei a mohasejtek. A hilust és a szemcsesejtréteg szárai közé benyúló, a gyrus dentatushoz legközelebb eső CA3c régiót együttesen endfoliumnak is nevezik.

A hippocampusban a principális sejtek kapcsolatrendszere egy sajátságos triszinaptikus kört alkot. Az entorhinális kéregből eredő glutamáterg pálya a fasciculus perforans, mely a stratum lacunosum-moleculare-ban haladva szinapszisokat képez a CA1, CA3 piramisok apikális dendritjeivel, valamint a GD-ba lépve a szemcsesejtek dendritjeivel (első szinapszis). A szemcsesejtek axonjai a moharostok, melyek a hiláris mohasejtekkel valamint a CA3 piramisok dendritjeivel képeznek szinapszisokat (második szinapszis) (Treves, 1995; Lim et al., 1997). Az ingerület a CA3 piramisok Schaffer-kollaterálisain keresztül éri el a CA1 piramisok csúcsi denditjeinek bazális szakaszát (harmadik szinapszis) (Ramón y Cajal, 1909-11, 1968). A CA3 piramissejtek egymással is összeköttetésben vannak. A CA1 piramissejtek részben közvetlenül, részben a subiculumban átkapcsolódva vetítenek vissza az entorhinális kéregbe (Swanson és Cowan, 1977; Maclean, 1992).

A hippocampus két alapvető sejttípusa a principális sejtek és a nem-principális sejtek. A principális sejtek serkentőek (glutamátergek), ide tartoznak az Ammonszarv piramissejtjei, valamint a GD szemcse- és mohasejtjei. A hippocampus kimenetét a CA1 piramissejtjei alkotják a subiculum és az entorhinális kéreg felé. A nem-principális

sejtek zöme GABAerg interneuron (Babb et al., 1988), melyek lokálisan arborizálnak (Freund és Buzsaki, 1996).

A gátló interneuron kifejezés azonban nem felel meg a nem principális idegsejtek kategóriának, mivel ebben a csoportban találhatók olyan neuronok is, melyek a hippocampuson kívülre vetítenek, vagy nem GABAergek (Handelmann et al., 1983; Seress és Ribak, 1983; Toth és Freund, 1992; Toth et al., 1993).

Bár az interneuronok száma messzemenően elmarad a principális sejtekéhez képest, mégis funkcionálisan igen fontosak. Egy-egy interneuron kiterjedt axonfája révén számos principális sejtet innervál, így jelentős szerepük van a principális sejtek tüzelési mintázatának befolyásolásában (Freund és Buzsaki, 1996).

Az interneuronok a hippocampusban három fő funkcionális csoportra oszthatók, melynek alapján meghatározható az adott sejt neuronhálózatban betöltött szerepe. A periszomatikus gátlósejtek a principális sejtek testén és proximális dendritjein vagy axon iniciális szegmentumán végződnek (ezek a kosársejtek és axo-axonikus sejtek) (Handelmann et al., 1981; Emson et al., 1982; Somogyi et al., 1983; Kosaka et al., 1985; Kosaka et al., 1987; Katsumaru et al., 1988; Seress et al., 1991; Li et al., 1992; Ribak et al., 1993; Seress et al., 1993b; Halasy et al., 1996), és ezen sejtek kimenetének szabályzásában van szerepük (Arai et al., 1995; Freund és Buzsaki, 1996; Miles et al., 1996; Holmes és Levy, 1997). A dendritikus gátlósejtek a principális sejtek dendritjeire adnak szinapszisokat (Kawaguchi és Hama, 1988; Gulyas et al., 1993; Han et al., 1993; Buhl et al., 1994; Sik et al., 1994; Buckmaster és Schwartzkroin, 1995; Sik et al., 1995; Halasy et al., 1996; Sik et al., 1997), és a bemenet plaszticitásának kialakításában, a dendritek elektrogenezisében fontosak (Freund és Buzsaki, 1996; Miles et al., 1996). Az interneuron-specifikus gátlósejtek pedig más interneuronokon végződnek, így fontos szerepük lehet a dendritikus gátlás szinkronizációjában (Acsady et al., 1996; Gulyas et al., 1996; Hajos et al., 1996; Urban et al., 2002). E három csoport együttes működésének, és a régióba érkező szubkortikális pályarendszerek hatásának összegződése fogja meghatározni a terület principális sejtjeinek aktivitását (Freund és Buzsaki, 1996).

Az interneuronok nemcsak funkcionálisan, hanem neurokémiailag is heterogének. A GABAerg sejtek további típusokra különíthetőek kalciumkötő fehérje és neuropeptid tartalmuk alapján, mely csoportok részben át is fedhetnek egymással. Ilyen

markerek a calbindin (CB), parvalbumin (PV), calretinin (CR), substance P (SP), cholecystokinin (CCK), somatostatin (SOM), neuropeptid Y (NPY) és a vazoactive intestinal polypeptide (VIP), melyek funkcionálisan különböző sejtcsoportokban vannak jelen (Chan-Palay, 1987; Lotstra és Vanderhaeghen, 1987; Braak et al., 1991; Sloviter et al., 1991; Ribak et al., 1993; Seress et al., 1993b; Seress et al., 1993a; Nitsch és Ohm, 1995; Freund és Buzsaki, 1996; Katona et al., 2000; Urban et al., 2002; Wittner et al., 2002).

1.3. A hippocampus patológiai elváltozása TLE esetén

Az epilepsziás aktivitás folyamán megfigyelhető túlserkentés az oka, hogy a rohamok sejtpusztulással járnak, a leggyakrabban érintett terület a hippocampus (Meencke és Veith, 1991; Miller et al., 1993). A régiót érintő serkentés megnövekedését támasztja alá a moharostok sarjadzása, valamint a supramammillaris pálya kiterjedése, mely utóbbi a GD szemcsesejtjein és a CA2, CA3a-b piramissejtjein végződik és egy külső forrása lehet a túlserkentésnek (Sutula et al., 1992; Magloczky et al., 2000).

A hippocampus különböző régiói, valamint sejttípusai eltérő érzékenységet mutatnak epilepsziában. A principális sejtek közül a CA1 piramissejtjei, a hilus mohasejtjei, valamint a CA3c piramissejtjei mutatkoznak a legérzékenyebbnek (Sommer, 1880; Corsellis, 1955; Falconer, 1968). Míg a nem-szklerotikus hippocampusokban kismértékben, vagy foltokban pusztulnak, addig a szklerotikus hippocampussal rendelkező betegek esetén többségük elpusztult. A CA2 és CA3ab régió piramisai nagyrészt megmaradnak és egy ún. rezisztens zónát alkotnak (Morrell, 1997; de Lanerolle et al., 2003). Hasonlóan ellenállóak a GD szemcsesejtjei is, eloszlásuk és kapcsolatrendszereik azonban megváltoznak: gyakran szétvándorolnak, axonjaik sarjadzanak és a stratum moleculare-ban is szinaptizálnak főként szemcsesejt dendriteken (Represa et al., 1990; Babb et al., 1991; Houser, 1992; Houser et al., 1992; Isokawa et al., 1993). Megjegyzendő, hogy a majom és az ember hippocampusában a szemcsesejtek egy része (10 és 20 %) bazális dendritekkel is rendelkezik, melyek többsége a hilusban helyezkedik el, és ezeken kontroll körülmények között is

végződnek moharostok (Seress és Mrzljak, 1987; Seress és Frotscher, 1990), azonban a stratum moleculare-ba futó apikális dendriteken nem.

A változás azonban nemcsak a principális sejteket érinti, hanem a különböző típusú GABAerg sejteket is. A különböző interneuron típusok eltérő változásokat mutatnak epilepsziában. Egy részük rezisztensnek bizonyul, és nagy számban van jelen az epilepsziás szövetben is (Babb et al., 1989; Sloviter et al., 1991; Houser, 1992; Magloczky et al., 2000; Wittner et al., 2002), míg mások mennyisége jelentősen lecsökken (de Lanerolle et al., 1988; Magloczky és Freund, 1993; Magloczky et al., 2000; Sundstrom et al., 2001). Azonban a túlélő interneuronok nagy része különbözik a kontrollban megfigyelhető sejtektől, megváltozik a morfológiájuk, eloszlásuk, ki- és bemeneti jellegeik (Sutula et al., 1989; Mathern et al., 1995; Houser, 1999; Loup et al., 2000; Wittner et al., 2001; Ratzliff et al., 2002; Magloczky és Freund, 2005).

A principális sejtek kimenetének igen hatékony szabályzói a periszomatikus gátlósejtek. A szemcsesejtek periszomatikus beidegzéséről kimutatták, hogy megőrződik epilepsziában, sőt az axon iniciális szegmentumokra érkező gátló bemenet meg is erősödik (Wittner et al., 2001). A periszomatikus gátló beidegzés a CA1 régióban is megőrződik mindaddig, amíg a célelemek, a piramissejtek életben vannak (Wittner et al., 2005).

Míg a periszomatikus gátlás megerősödni látszik epilepsziában, addig a dendritikus gátlásról az ellenkezőjét mutatták ki epilepsziamodellben is (Cossart et al., 2001). A hippocampális dendritikus interneuronok hatékonyan tudják gátolni a dendritikus kalcium tüskék létrejöttét és ezáltal korlátozni a szinaptikus plaszticitást, de ehhez az szükséges, hogy szinkron tüzeljenek (Miles et al., 1996). A SOM- és a NPY-tartalmú dendritikus gátlósejtekről bebizonyosodott, hogy érzékenyek az epilepsziához kapcsolódó változásokra (de Lanerolle et al., 1988; Sundstrom et al., 2001), ami részben magyarázza a dendritikus gátlás csökkenését epilepsziában (Cossart et al., 2001). Azonban ezek a sejtek erőteljes sarjadzást mutatnak mind állatmodellben, mind az epilepsziás humán hippocampusban (de Lanerolle et al., 1989), és a CB-tartalmú interneuronok, melyek zöme szintén dendritikus gátlósejt, megőrződik epilepsziában (Sloviter et al., 1991) és szintén sarjadzik (Wittner et al., 2002). Ennek ellenére a dendritikus gátlás nem működik megfelelően epilepsziában (Cossart et al., 2001), ami arra utal, hogy egyéb faktoroknak is szerepe lehet.

Jelen tanulmányban két, egymással nem átfedő interneuron populációt vizsgáltunk TLE-ban szenvedő betegek műtétileg eltávolított hippocampusában: a substance P receptort (SPR) kifejező gátlósejteket és a CR-tartalmú interneuronokat. Mindkét sejttípus szerepet játszik a dendritikus gátlásban a humán hippocampusban, a CR-tartalmú sejtek egy része pedig az interneuron-specifikus gátlásban is részt vesz.

Vizsgálatunkat azért irányítottuk e két sejtpopulációra, mert egyrészt részük lehet a dendritikus gátlás epilepsziában tapasztalható csökkenésében, valamint a CR sejtek azáltal, hogy egy részük interneuron-specifikus gátlósejtként működik, a dendritikus gátlás szinkronitásának kialakításában is fontos.

1.4. Irodalmi áttekintés

1.4.1. A substance P és receptorának szerepe a hippocampus aktivitásának szabályzásában

A substance P (SP) egy, az idegsejtek serkenthetőségét növelő neuromodulátor peptid, mely a tachikininek molekulacsaládjába tartozik (Nawa et al., 1984). Az SP-receptor - melyet neurokinin-1 receptorként is szoktak említeni – $G_{q/11}$ fehérjéhez kötött receptor (Nakanishi, 1991), a humán idegrendszer számos területén megtalálható (Caberlotto et al., 2003). Nemrég azonosították az SP serkentő hatásának ioncsatorna effektorát: nem-receptor tirozin kinázon keresztül aktiválódik egy feszültségfüggetlen, nem inaktiválódó, folyamatos depolarizációt okozó Na-csatorna (sodium leak channel) (Lu et al., 2009).

Patkány striatumban kimutatták in vivo, hogy SP kezelés hatására az SP receptorok gyorsan internalizálódnak az endoszomális rendszerbe. Ez a mechanizmus feltételezhető az egész idegrendszerben is, a dendritek struktúrális átrendeződésével jár és szerepet játszik a receptor deszenzitizációban (Mantyh et al., 1995a; Mantyh et al., 1995b).

Az SPR-immunpozitív sejtek a központi idegrendszer számos területén jelen vannak (Kiyama et al., 1993; Shigemoto et al., 1993; Nakaya et al., 1994).

Az SP és receptora között csak kevesebb, mint 15%-ban találtak szinaptikus kapcsolatot patkányban. A többi esetben a „receptor mismatch” (receptor nem-

illeszkedés) jelensége figyelhető meg, miszerint az adott transzmitter felszabadulási helye és receptora között jelentős távolság van. A felszabadult anyag diffúzióval éri el célsejtjeit és nem-szinaptikus úton fejti ki hatását (Duggan et al., 1990; Liu et al., 1994; Mantyh et al., 1995a).

Az SP-nek, fontos szerepe lehet epilepsziás rohamok kialakulásában, fenntartásában. Állatmodellben a perforáns pálya stimulálás vagy kainát által kiváltott rohamok jóval előbb jelentkeznek és erőteljesebbek, ha előtte az állatok SP kezelést is kaptak (Zachrisson et al., 1998; Liu et al., 1999b; Liu et al., 1999a).

Megfigyelték, hogy status epilepticus alatt az SP megjelenik, és mennyisége megnő olyan sejtekben, melyekben normálisan nincsen: a szemcsesejtekben és a CA1, CA3 régiók piramissejtjeiben (Liu et al., 1999a; Liu et al., 2000; Wasterlain et al., 2000). Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal igazolták, hogy a moharostokban is megjelenik az SP immunfestés (Wasterlain et al., 2000). Továbbá kimutatták, hogy status epilepticus alatt a principális sejtek SP-t bocsátanak ki, melynek szerepe van a rohamok iniciálásában és fenntartásában, a megnövekedett SP szint hozzájárulhat a túlserkentéshez (Liu et al., 1999a; Lu et al., 2009).

Másrészt az SP receptorának (SPR) aktivációja protektív lehet epilepsziában: az SPR aktiváció a patkány entorhinális kéregben csökkenti az előidézett akut epileptikus aktivitást azáltal, hogy fokozza a GABA felszabadulást a kapcsolatban álló principális sejtekre (Maubach et al., 1998; Stacey et al., 2002). Patkány hippocampusban az SP direkt hatása az SPR-pozitív interneuronokra indirekt módon erősíti a gátló szinaptikus hatást a piramissejteken, azáltal, hogy megnöveli ezen interneuronok serkenthetőségét (Ogier és Raggenbass, 2003).

Az intrahippocampalis SP forrást a hippocampalis SP-immunreaktív sejtek jelentik, melyek elszórtan megtalálhatóak a cornu Ammonisban és a hilusban is, mind patkányban, majomban, és emberben (Roberts et al., 1984; Hurd et al., 1999). A hippocampalis SP legnagyobb része azonban extrahippocampális eredetű, a supramammillaris magból (SUM) származik (Gall és Selawski, 1984; Davies és Kohler, 1985; Ino et al., 1988; Yanagihara és Niimi, 1989; Nitsch és Leranth, 1994; Borhegyi és Leranth, 1997b; Borhegyi és Leranth, 1997a). Ez egy zömében serkentő bemenetet képez a hippocampusba (Mizumori et al., 1989; Carre és Harley, 1991; Magloczky et al., 1994; Nitsch és Leranth, 1994), de nemrég Soussi és munkatársai kimutatták, hogy a

patkány hippocampusban ezen rostok egy része GABÁ-t tartalmaz (Soussi et al.). A supramammillo-hippocampális pálya a principális sejteken végződik a stratum moleculare belső 1/3-ában, valamint a CA3ab és CA2 stratum pyramidale és oriens rétegeiben (Vertes, 1992; Magloczky et al., 1994; Nitsch és Leranth, 1994). További tanulmányok felfedték, hogy primatában ezek az afferensek gátló interneuronokon is végződnek, melyek a serkentő triszinaptikus kör különböző szintjein „szólnak bele" az információáramlásba (Nitsch és Leranth, 1994).

Számos publikáció beszámol arról, hogy a supramammillo-hippocampális projekciónak fontos szerepe lehet a rohamok kialakulásában, hiszen egy jelentős serkentő bemenetet képez a hippocampusba. Nem, vagy csak nehezen alakítható ki patkányban epilepsziás roham a supramammillaris pálya roncsolása esetében. A kainát indukálta limbikus rohamok nem terjednek át ez esetben a hippocampusra (Saji et al., 2000).

Az SPR-immunreaktív sejtek a patkány hippocampusban kizárólag GABAerg gátlósejtek (Acsady et al., 1997; Sloviter et al., 2001). Az SPR-immunreakció axonjelölést nem eredményez, csak a sejttest és a dendrit membránokat teszi láthatóvá (Acsady et al., 1997; Sloviter et al., 2001). Ez utalhat arra, hogy a receptorok nem vagy csak nagyon kis mennyiségben vannak jelen az axonokon, így az SP preszinaptikus hatásával valószínűleg nem kell számolni. E sejtek funkciójának feltárására kolokalizációs vizsgálatokat végeztek ismert más neurokémiai markerekkel (PV, CCK, CB, SOM, NPY, VIP, CR) a patkány hippocampusban. Patkányban az SPR-immunreaktív sejtek 80-90%-a kolokalizál valamilyen más kalciumkötő fehérjével vagy neuropeptiddel (Acsady et al., 1997). A patkány SPR-immunfestett sejtjei nemcsak neurokémiailag, funkcionálisan, de morfológiailag is rendkívül heterogének és a hippocampus összes régiójában előfordulnak (Acsady et al., 1997; Sloviter et al., 2001). Tüskés és tüske nélküli forma is van közöttük. A GD-ban leggyakoribbak a piramis formájú sejtek a szemcsesejtrétegben (Acsady et al., 1997).

Az SPR sejtek alakjuk és elhelyezkedésük alapján valószínűleg a humán hippocampusban is a GABAerg gátlósejtek közé tartoznak (Magloczky et al., 2000). Az SPR-pozitív sejtek mennyisége nem változik szignifikánsan az epilepsziás humán GD-ban, de az alakjuk és az elhelyezkedésük megváltozott. Míg a kontroll mintákban az immunfestett sejtek többsége a hilusban helyezkedett el, az epilepsziás mintákban a

legtöbb sejt a stratum moleculare-ban volt látható. Az epilepsziás hippocampusra jellemző a supramammillo-hippocampális pálya sarjadzása, mely következtében ezek az afferens rostok az egész stratum moleculare területét elfoglalták, ahol az SPR-pozitív sejtek elhelyezkedtek (Magloczky et al., 2000). Ennek az lehet a következménye, hogy míg kontrollban elsősorban egy feedeback drive volt jellemző ezekre a sejtekre, addig az epilepsziás GD-ban főként egy feedforward drive lesz jellemző rájuk mind az entorhinális, mind a supramammillaris bemenetek révén (Magloczky et al., 2000).

Ezért a jelen dolgozatban megvizsgáltuk, hogy megváltozik-e az SPR-immunreaktív sejtek morfológiája, elhelyezkedése és szinaptikus bemenete a humán epilepsziás CA1 régióban, mely a legérzékenyebb területnek bizonyul TLE-ban. A sejtek mennyiségét, morfológiai változásait kvantitatív módon is meghatároztuk, az immunpozitív sejtek denzitásának, valamint a dendritelágazási pontok számának meghatározásával. Az SPR-pozitív sejtek szinaptikus bemenetében bekövetkező változásokat szintén kvantifikáltuk, hogy feltárjuk milyen mértékben vesznek részt ezen sejtek az epilepsziás hippocampusra jellemző szinaptikus reorganizációban.

1.4.2. A CR-tartalmú interneuronok szerepe a CA1 régió gátlórendszerében és érzékenységük epilepsziában

A GABAerg gátlósejtek egy része, mely CR-t tartalmaz, érzékenynek bizonyult ischaemiában és epilepsziában mind állatmodellben (Freund és Magloczky, 1993; Magloczky és Freund, 1993; Andre et al., 2001; Slezia et al., 2004; van Vliet et al., 2004; Tang et al., 2006), mind humán mintákban (Magloczky et al., 2000; Suckling et al., 2000).

A CR egy kalciumkötő fehérje, melyet a hippocampusban kizárólag nem-principális sejtekben mutattak ki eddig (Jacobowitz és Winsky, 1991; Gulyas et al., 1992; Miettinen et al., 1992; Resibois és Rogers, 1992; Seress et al., 1993a; Nitsch és Ohm, 1995). A nagyszámban fellelhető CR-tartalmú interneuron mellett, található néhány megmaradt Cajal-Retzius sejt is, melyek szintén CR-immunreaktívak (Abraham és Meyer, 2003). A CR-pozitív interneuronok eloszlása és morfológiája a humán hippocampusban (Nitsch és Ohm, 1995; Urban et al., 2002) különbözik a patkányban megfigyelttől (Gulyas et al., 1992; Miettinen et al., 1992). A patkány CA3 stratum lucidumban megfigyelhető tüskés CR-pozitív sejtek a emberben hiányoznak, viszont itt

található egy jellegzetes multipoláris sejtekből álló sejtcsoportosulás a CA1 stratum lacunosum-moleculare határán, valamint számos kis sejt elszórtan a GD-ban, melyek patkányban nem figyelhetőek meg. A feltehetően Cajal-Retzius sejtek közé tartozó orsó alakú, horizontális fekvésű CR-pozitív sejtek a stratum lacunosum-moleculare és a stratum moleculare mentén helyezkedtek el a fissura mentén (Abraham és Meyer, 2003).

A patkány hippocampus CA1 régiójában a CR-tartalmú interneuronok más interneuronokat idegzenek be (Gulyas et al., 1996), főleg azokat, melyek CB-t tartalmaznak, és részt vesznek a piramis sejtek dendritikus gátlásában (Gulyas és Freund, 1996). A humán CA1 régióban funkcionális szempontból egy heterogén csoportot alkotnak, nemcsak interneuron-szelektív-, de dendritikus gátlósejt is található köztük (Urban et al., 2002).

A CR-tartalmú interneuronoknak szerepük lehet a dendritikus gátlósejtek szinkronizálásában (Gulyas et al., 1996), ami fontos a principális sejtek bemenetének hatékony kontrollálásában (Miles et al., 1996).

A CR-tartalmú sejteket vizsgálták epilepszia modellben és epilepsziás humán mintákban is. Az irodalmi adatok azonban ellentmondóak. A legtöbb esetben a CR-pozitív interneuronok érzékenységét és pusztulását figyelték meg mind állatmodellben (Magloczky és Freund, 1993, 1995; Andre et al., 2001; Slezia et al., 2004; van Vliet et al., 2004; Tang et al., 2006), mind az epilepsziás humán GD-ban (Magloczky et al., 2000). Azonban a CR-immunreaktív sejtek megőrződését és a sejtek számának növekedését írta le Blümcke és munkatársai humán TLE-ban (Blumcke et al., 1996; Blumcke et al., 1999; Thom et al., 2002).

Mivel a CR-tartalmú sejtek fontosak a hippocampális neuronhálózat aktivitási szintjének beállításában, célul tűztük ki, hogy egy részletes kvantitatív analízissel meghatározzuk a CR-pozitív sejtek számát az epilepsziás hippocampus valamennyi régiójában. Különböző post mortem idejű kontroll mintákat vizsgáltunk, hogy megállapítsuk, hogy a minták különböző megőrzöttsége befolyásolja-e a CR-pozitív sejtek denzitását. Megvizsgáltuk továbbá a CR-pozitív interneuronok szinaptikus célelemeit és ezek esetleges változását epilepsziában, hogy kiderítsük milyen mértékben változik a CR-tartalmú interneuronok szerepe az átrendeződött idegsejt-hálózatban.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Sokfajta állatkísérletes modellt hoztak létre az epilepszia tanulmányozására, azonban egyik modell sem tükrözi mindazon változások összességét, amelyet humán agyban leírtak. Ezért fontos a humán minták vizsgálata, mert csak így tudhatjuk meg, hogy milyen elváltozások kísérik a humán TLE-t és az ebből nyert ismeretek lehetővé tennék pontosabb, realisztikusabb epilepszia modellek kifejlesztését.

Jelen tanulmányban két egymással nem átfedő interneuron populációt – SPR-pozitív és CR-tartalmú sejtek - vizsgáltunk humán kontroll és epilepsziás hippocampusban. Számos jelenség utal arra, hogy a SP-nek fontos szerepe van a principális sejtek aktivitásának szabályzásában és az epileptogenezisben, a CR-tartalmú sejtek pedig állatkísérletes modellben érzékenynek bizonyultak epilepsziára

Ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az epilepsziás neuronhálózatban betöltött szerepüket.

Kísérleteink célja:

- az SPR-t expresszáló interneuronok eloszlásának, mennyiségének és morfológiájának vizsgálata kontroll és epilepsziás humán hippocampus CA1 régiójában
- az SPR-t expresszáló interneuronoknak a humán hippocampus gátlórendszerében betöltött funkcionális szerepének tanulmányozása kolokalizációs kísérletekkel
- az SPR-t expresszáló interneuronok szinaptikus bemenetének összehasonlítása humán kontroll és epilepsziás hippocampus CA1 régiójában
- a CR-tartalmú sejtek mennyiségi és morfológiai változásainak tanulmányozása rövid és hosszú post mortem idejű kontroll mintákban és az epilepsziás humán hippocampusban
- a CR-tartalmú interneuronok szinaptikus reorganizációjának vizsgálata az epilepsziás humán CA1 régióban és összehasonlítása kontroll mintákkal

3. MÓDSZEREK

Az SPR és a CR tartalmú interneuronok morfológiai változásait vizsgáltuk 72 gyógyszerrezisztens TLE-ban szenvedő páciens agyából műtéti úton eltávolított **(1. Táblázat)** és 11 kontroll humán agyból származó hippocampusban. 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 műtötték. A betegek egy írásos beleegyező nyilatkozatot 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 és Spencer, 1985) távolították el a temporális lebeny anterior egyharmadát a temporomediális struktúrákkal együtt. Kihagytuk a kvantitatív vizsgálatokból a tumor-asszociált epilepsziában szenvedő betegek adatait.

A felhasználásra kerülő kontroll idegszövetet a Lenhossék program bocsátotta rendelkezésünkre, olyan elhunytakból származik, akiknek ismert neurológiai megbetegedése nem volt. A boncolást a Semmelweis Egyetemen Igazságügyi Kórbonctani Intézetében hajtották végre, az Egészségügyi Minisztérium és a Helsinki Deklaráció rendelkezéseinek megtartásával. A kontroll személyek életkora 37 és 74 év között volt. A post mortem idő a vizsgálatba bevont kontroll idegszövet esetében 2-10 óra volt. Vizsgálatainkat a Kutatásetikai Bizottság rendelkezéseinek megtartásával végeztük (TUKEB 5-1/1996, kiterjesztve 2005).

Az epilepsziás idegszövetet a sebészeti eltávolítás után 4-5 mm széles blokkokra vágtuk, és 4% paraformaldehidet, 0,05% glutáraldehidet és 0,2% pikrinsavat tartalmazó 0,1 M foszfát puffer alapú fixáló oldatba helyeztük. 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.

A 11 kontroll agyból 9 esetén ugyanezt az eljárást követtük. A másik két kontroll agyat (HK10 és HK11) a halál beállta után kettő illetve négy órával a koponyából kiszedve,

a két-két artéria carotis internán, és 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, 2 mm vastagságú blokkokra vágtuk, melyeket ugyanabban a fixáló oldatban posztfixáltuk egy éjszakán át.

A kvantitatív vizsgálatokra felhasznált metszetek a hippocampus ugyanazon részéből származtak, és a hippocampus minden vizsgált régióját tartalmazták.

3.1. Immunhisztokémia

A blokkokból vibratómmal 60μm vastag metszeteket vágtunk, és egymást követő foszfát pufferes (PB, pH=7,4) mosások után a metszeteket immunfestettük. Az immunfestés során a következő eljárást követtük: a nem kötött fixálót 6x20 perces 0,1 M PB-vel kimostuk, és szacharóz oldatba helyeztük a metszeteket (30% 0,1M PB-ben) 1 napra, majd folyékony nitrogén felett 3-szor megfagyasztottuk őket. A metszetek egy részét eppendorf csőbe helyezve eltartalékoltuk – 80°C-os hűtőben, későbbi kísérletek céljára. PB-ben történő mosás 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 H_2O_2 1%-os oldatát tettük a metszetekre, 10 percre. TBS-ben történő mosás után blokkoló anyagot (2% BSA + 5%-os tejpor oldat) tettünk a metszetekre, 1 órára, a nem-specifikus fehérjekötés csökkentése érdekében. Ezt követte a primer szérumokban történő inkubáció 2 napig, 4°C-on. Poliklonális nyúl-anti SPR (1:1000, (Shigemoto et al., 1993)) és monoklonális egér-anti CR (1:5000, SWANT, Bellinzona, Switzerland) primert használtunk. Ezután biotinilált kecske-anti-nyúl vagy biotinilált ló-anti-egér IgG szekunder szérumot tettünk a metszetekre, 2 órára (Vector, 1:250). Ezt követte az avidin-biotin-tormaperoxidáz komplexszel történő inkubáció (ABC, Vector 1:250) 1,5 óráig. A metszeteket kimostuk TBS-ben, majd TRIS pufferben (TB, pH=7,6) és 0,05 M koncentrációjú DAB-ban (3,3'-diaminobenzidin-4HCl) előinkubáltuk 20 percig, ezután

a DAB kromogénhez 0,01%-os hidrogénperoxidot adva előhívtuk. Az immunpozitív sejtekben barna reakcióvégtermék halmozódott fel.

A metszeteket ozmifikáltuk (1% OsO_4, 30 percig), felszálló etanol sorban (1% uranil-acetátot tettünk a 70%-os alkoholba, 30 percig) és propilénoxidban dehidráltuk, majd Durcupanba (ACM; Fluka) ágyaztuk. A fénymikroszkópos vizsgálat után a részletes vizsgálatot igénylő területeket átágyaztuk, ultramikrotommal 60 nm vastag sorozatmetszeteket készítettünk belőlük és elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (Hitachi 7100).

3.2. Kettős fluorescens immunfestés

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, Switzerland), monoklonális egér-anti PV (1:1000, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA), poliklonális egér-anti CR (1:1000, SWANT, Bellinzona, Switzerland), poliklonális egér-anti cholecystokinin (CCK) (1:1000, JN Walsh, UCLA), monoklonális patkány-anti somatostatin (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-488-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.

3.3. CR-CB kettős immunfestés

Az eljárás hasonló volt a feljebb vázolt egyszeres immunfestéshez. Az endogén peroxidáz blokkolására H_2O_2 1%-os oldatát tettük a metszetekre, 10 percre. TBS-ben történő mosás után 10%-os normál ló szérumot alkalmaztunk (Vector, 40 perc) a nem-specifikus 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 óra, Vector). Ezúttal a CR-t ammónium nikkel-szulfáttal intenzifikált DAB kromogénnel hívtuk elő (DAB-Ni, fekete színű csapadék). Az első immunreakció után a metszeteket alaposan mostuk TBS-ben (4x10 perc), majd a nem-specifikus fehérjekötés csökkentése érdekében 10%-os normál kecske szérumot alkalmaztunk (Vector, 20 perc). Ezután poliklonális nyúl-anti CB (1:1000, (Baimbridge et al., 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 óra, Vector). A második immunreakciót DAB kromogénnel hívtuk elő (barna csapadék). A metszeteket felszálló etanol sorban és propilénoxidban dehidráltuk (ozmium és uranil-acetát kezelés nélkül) és Durcupanba (ACM; Fluka) ágyaztuk. Az immunjelölt elemek a színkülönbség alapján megkülönböztethetőek voltak fénymikroszkópos szinten (a CR-pozitívak feketék, a CB-pozitívak barnák).

3.4. Kvantitatív analízis

3.4.1. Sejtszámolás – SPR-pozitív sejtek

Az SPR-pozitív sejtek mennyiségének változását vizsgáltuk a CA1 régióban. 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 SPR-jelölt sejttel. A rajzokat lekicsinyítettük, és beszkenneltük. 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. Mivel az adatok nem voltak normális eloszlásúak, ezért a nem parametrikus Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk a kontroll és az egyes epilepsziás mintákból származó adatok összehasonlítására ($p<0,05$).

3.4.2. Sejtszámolás – CR-pozitív sejtek

A CR-tartalmú sejtek mennyiségét vizsgáltuk a hippocampus összes régiójában. 3-4 reprezentatív metszetet kirajzoltunk camera lucida segítségével különböző post mortem idejű kontroll mintákból (rövid post mortem idejű~2-4 óra: HK6, HK7, HK10 és hosszú post mortem idejű~8-10 óra: 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 beszkenneltük. 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, stratum granulosum + stratum moleculare. A stratum 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 stratum moleculare és a fissura határán elhelyezkedő, CR-pozitív, feltételezett Cajal-Retzius sejtek számát külön is meghatároztuk és a stratum 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. Mivel az adatok nem voltak normális eloszlásúak, ezért a nem parametrikus Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk a kontroll és az egyes epilepsziás mintákból származó adatok összehasonlítására ($p<0,05$).

3.4.3. SPR-pozitív interneuronok dendritelágazási pontjainak meghatározása

A dendritelágazási pontok számának változását camera lucida rajzok segítségével vizsgáltuk kontroll és epilepsziás esetekben (kontroll: HK6, HK10; epilepsziás enyhe típus: HH24, HH28; foltos típus: HH9, HH33 és szklerotikus: HH5, HH16, HH27). Az egyes mintákban azonos vastagságú szelvényeket választottuk ki a CA1 régióból. A szelvények hossztengelye a rétegekre merőlegesen helyezkedett el, így egy-egy szelvény a CA1 régiónak valamennyi rétegét tartalmazta és ezek egyforma szélesek voltak. Ezekben a szelvényekben található összes SPR sejtet kirajzoltuk camera lucida segítségével 20-szoros nagyításon, a 60 mikrométeres metszetbe beleeső dendritjeikkel együtt. A rajzokon meghatároztuk az egyes sejtek összes dendritelágazási pontjainak számát. Az adatokat a Statistica 6.0 programmal értékeltük ki. Mivel az adatok nem voltak normális eloszlásúak, ezért a nem parametrikus Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk a kontroll és az egyes epilepsziás mintákból származó adatok összehasonlítására ($p<0,05$), valamint a nem parametrikus Kruskall-Wallis ANOVA-t több csoport adatainak az összehasonlítására ($p<0,05$).

3.4.4. SPR-pozitív sejtek kolokalizációja interneuron markerekkel

Az SPR-immunfestés nem eredményez axonjelölést, ezért fluoreszcens kettős immunfestéseket végeztünk ismert neurokémiai markerekkel (CB, PV, CR, CCK, SOM), hogy kiderítsük az SPR-t expresszáló interneuronoknak a hippocampális gátlórendszerben betöltött funkcionális szerepét. Az immunfestett metszeteken meghatároztuk az SPR-pozitív, az adott markerrel jelölt és a kettős-jelölt sejtek számát, és meghatároztuk ezek egymáshoz viszonyított arányát %-ban a CA1 régióban. A következő mintákat használtuk: HK4, HK5, HK11 (kontroll); HH17, HH28, HH31, HH33, HH67 (nem-szklerotikus); HH3, HH5, HH6, HH60, HH63, HH82 (szklerotikus). A sejtszámolásokat a vizsgált minták 3-4 metszetében végeztük el.

3.4.5. SPR-pozitív interneuronok szinaptikus borítottságának meghatározása

Az SPR-pozitív elemek szinaptikus borítottságának kvantifikálásához a stratum 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 ultramicrotómmal lemetszettük

elektronmikroszkópos vizsgálat céljára. A szklerotikus esetekben a stratum oriens, pyramidale és radiatum nem elkülöníthető ezért egyben ágyaztuk át. A szisztematikus random mintavételezés szabályainak megfelelően minden tizedik metszetet vizsgáltuk, hogy elkerüljük ugyanannak a szinapszisnak 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. Mivel az adatok nem voltak normális eloszlásúak, ezért a nem parametrikus Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk a kontroll és az egyes epilepsziás mintákból származó adatok összehasonlítására ($p<0,05$), valamint a nem parametrikus Kruskall-Wallis ANOVA-t több csoport adatainak az összehasonlítására ($p<0,05$).

3.4.6. A CR-pozitív interneuronok posztszinaptikus célelem eloszlásának meghatározása

A CR-pozitív axon terminálisok posztszinaptikus célelemeinek eloszlását vizsgáltuk 2 perfúzióval fixált kontroll mintában (HK10, HK11) és epilepsziás szövetekben (enyhe: HE54, foltos: HE79, HE38; szklerotikus: HE21, HE71, HE75). A stratum orienst, pyramidale-t, radiatumot és lacunosum-moleculare-t átágyaztuk a CA1 régióból, és ultramicrotómmal lemetszettük elektronmikroszkópos vizsgálat céljára. A szklerotikus esetekben a stratum oriens, pyramidale és radiatum nem elkülöníthető ezért egyben 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.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az immunfestés minősége az életkor, a fixálás és a post mortem idő függvényében

Megvizsgáltuk, hogy a beteg/elhunyt kora, a fixálás minősége, és a post mortem idő hossza hogyan befolyásolja az immunfestés minőségét és mennyiségét.

A post mortem perfundált kontroll minták (HK10, 11) és az immerziós fixáláson átesett rövid post mortem idejű minták megőrzöttsége hasonló volt a rögtön fixálóba került epilepsziás minták és perfundált állati szövetek megőrzöttségéhez. A 2-4 órás post mortem idejű kontroll minták elektronmikroszkópos vizsgálata elfogadható ultrastruktúrális megőrzöttséget mutatott, még az immerziósan fixált kontroll minták esetében is, noha egyes esetekben a perfundált mintákhoz képest valamivel gyengébb volt.

Egy előzetes tanulmányban összehasonlítottak 12 kontroll mintát, melyek különböző neműek, korúak, és post mortem idejűek voltak. Azt találták, hogy az elhunyt kora nem befolyásolta az immunfestések minőségét és mennyiségét, ha az alany semmilyen központi idegrendszeri rendellenességgel nem rendelkezett. Az SPR-immunreakció gyengébb jelölést és kisebb számú pozitív sejtet eredményezett az idősebb elhunytaknál, akiknél arteriosclerosis volt megfigyelhető. Ezért kizártuk a vizsgálatból az összes 80 évnél idősebb alanyt.

Bár a CR-pozitív sejtek általános eloszlása és morfológiája hasonló volt minden mintában, a hosszú post mortem idő befolyásolta a festés minőségét és mennyiségét. Egy korábbi vizsgálatban a CR-immunfestés érzékenynek bizonyult a hosszú post mortem időre (Urban et al., 2002). A CR-pozitív interneuronok ischaemiára való érzékenysége szintén bizonyított (Freund és Magloczky, 1993). Egy másik tanulmány azonban rezisztensnek mutatta a CR-pozitív sejteket epilepsziában, igaz ebben a vizsgálatban hosszú post mortem idejű kontroll mintákat használtak (Blumcke et al., 1996). Jelen dolgozatban kvantitatív módszerekkel is megvizsgáltuk a hosszú post mortem idő hatását a CR-immunpozitív elemek eloszlására, mennyiségére, az epilepsziás szöveteket különböző post mortem idejű kontroll mintákkal vetettük össze.

4.2. Az epilepsziás minták patológiai csoportosítása

A vizsgálatba bevont összes beteg terápia rezisztens TLE-ban szenvedett (**1. Táblázat**). A betegek hippocampusára különböző fokú atrófia és/vagy szklerózis volt jellemző. A vizsgált metszetek a hippocampus elülső harmadából származtak.

A laborunkban végzett és más korábbi munkákhoz hasonlóan (Wittner et al., 2002; de Lanerolle et al., 2003; Wittner et al., 2005) az epilepsziás betegeket a fénymikroszkópos szinten megfigyelhető principális sejt pusztulás és az interneuronokat érintő változások alapján osztályoztuk a következőképpen: 1. típus (enyhe) (N=12): kontrollhoz hasonló, nincs számottevő principális sejt pusztulás a CA1 régióban, a rétegek jól láthatóak és épek, a határok elkülöníthetőek. Egyes interneuron típusok érzékenysége megfigyelhető, főképp a hilusban és a CA1 stratum oriensben. 2. típus (foltos) (N=22): a CA1 régióra a foltokban történő piramis sejt pusztulás jellemző, de ezek a részek nem atrófiásak, a rétegek jó elkülöníthetőek. Az interneuron pusztulás kifejezettebb. 3. típus (szklerotikus) (N=38): a CA1 régió összezsugorodott, atrófiás, a piramissejtek több, mint 90%-a elpusztult. A rétegek elkülönítése nem lehetséges a piramis sejtek és dendritjeik hiánya, valamint a szövet összezsugorodása miatt, csak a stratum lacunosum-moleculare alkot egy elkülöníthető réteget. Az interneuronok eloszlásában, morfológiájában bekövetkező markáns változások jellemzőek erre a típusra. 4. típus (gliotikus): az egész hippocampus zsugorodott, atrófiás, nemcsak a CA1 régió. A sejtpusztulás az összes sejttípust érinti, még a rezisztens neuronokat is (szemcse sejtek, CB-pozitív interneuronok). A jelen dolgozatban szereplő minták egyike sem tartozott ebbe a típusba.

A dolgozatban vizsgált sejttípusok (SPR- és CR-pozitív sejtek) általános kvalitatív leírása a vizsgálatba bevont minták (N= 72) mindegyikének alapos tanulmányozásán alapul.

A sejtek száma, morfológiája, eloszlása hasonló volt az azonos patológiai típusba tartozó minták esetében, és különbözött a csoportok között. Az azonos post mortem idejű kontroll minták hasonlóak voltak és különböztek az epilepsziás mintáktól. Ezért kijelenthetjük, hogy az epilepsziás szövetekben a kontrollhoz képest megfigyelt eltérések nagy valószínűséggel az epilepszia következtében alakultak ki, kapcsolatban állnak az epilepsziás megbetegedéssel.

A CR-tartalmú sejtek számában, morfológiájában és szinaptikus célelem eloszlásában bekövetkező változásokat kvantitatív módszerekkel 17 epilepsziás és 7 kontroll hippocampusban vizsgáltuk. Az SPR-pozitív sejtek eloszlását, morfológiáját és szinaptikus bemeneti jellegeit kvantitatív módszerekkel 16 epilepsziás és 3 kontroll mintában hasonlítottuk össze. Azonban eredményeink és következtetéseink mind a 72 epilepsziás és mind a 11 kontroll mintánk körültekintő kvalitatív tanulmányozásán alapul.

1. Táblázat: A tanulmányban megvizsgált epilepsziás minták

Amerikai minta (az SPR-tartalmú sejtek vizsgálatában felhasznált minták)

Patológiai csoport	**sorszám**	**nem**	**kor (év)**	**epi. kezdete (életkor)**	**epi. fennállása (év)**
1 típus (enyhe)	HH 17	F	27	17	10
	HH 24	F	41	3	38
	HH 28	N	46	22	24
	HH 31	F	42	25	17
	HH 67	F	45	16	29
	HH 81	N	22	17	5
2 típus (foltos)	HH 9	N	32	1	31
	HH 33	F	38	28	10
	HH 34	N	34	5	29
	HH 43	N	44	4	40
	HH 84	N	42	29	13
	HH 96	N	26	7	19
3 típus (szklerotikus)	HH 3	N	22	8 hónap	21
	HH 4	F	31	24	7
	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	N	35	12	23
	HH 21	F	35	2	33
	HH 26	F	41	1	40
	HH 27	N	36	3	33
	HH 49	N	48	13	35
	HH 60	Nincs adat	Nincs adat	Nincs 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

Magyar minta (a CR-tartalmú sejtek vizsgálatában felhasznált minták)

Patológiai csoport	**sorszám**	**nem**	**kor (év)**	**epi. kezdete (életkor)**	**epi. fennállása (év)**
1 típus (enyhe)	HE 40	F	20	6	14
	HE 54	N	22	15	7
	HE 67	N	23	17	6
	HE 79	F	47	8	39
	HE 134	N	39	25	14
	HE 138	N	50	19	31
2 típus (foltos)	HE 15	F	25	8	17
	HE 16	F	23	16	7
	HE 30	N	40	1	39
	HE 31	N	23	2	21
	HE 38	N	23	10	13
	HE 41	F	16	2	14
	HE 42	N	43	13	30
	HE 46	N	37	37	2 hónap

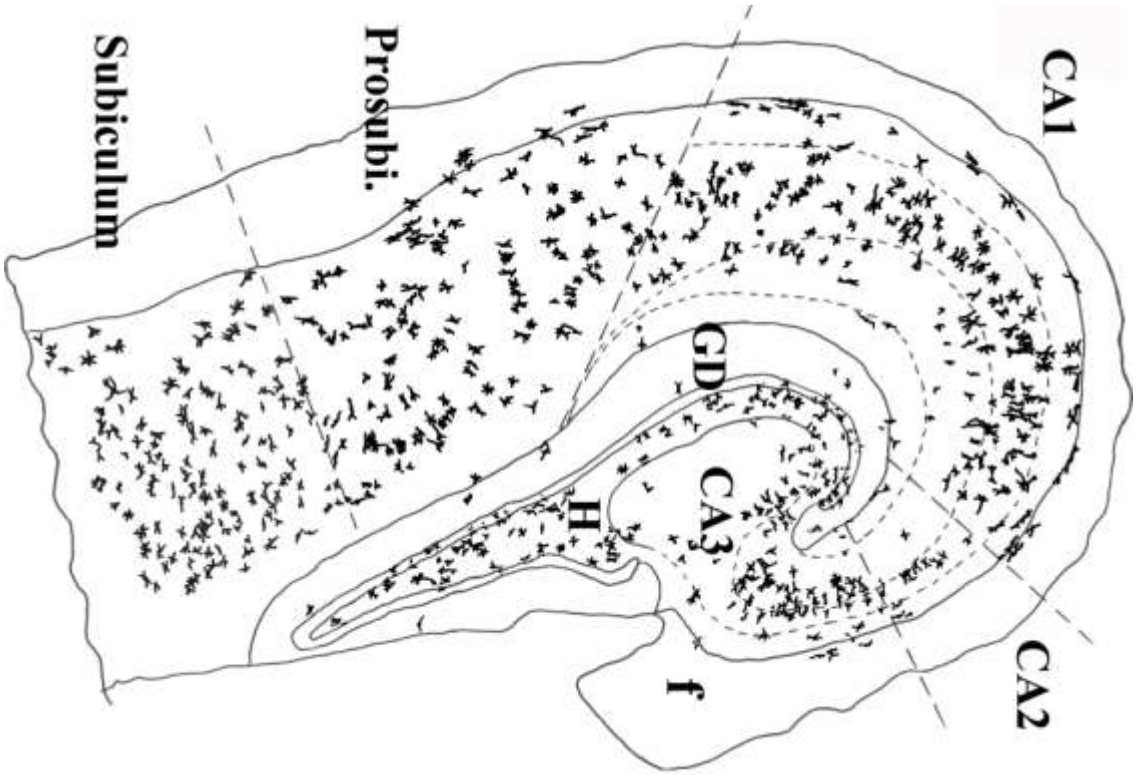
	HE 47	N	30	15	15
	HE 49	F	63	59	4
	HE 59	F	32	7	25
	HE 61	F	41	16	25
	HE 68	F	44	20	24
	HE 72	F	31	29	2
	HE 73	N	27	10	17
	HE 109	F	32	11 hónap	32
3 típus (szklerotikus)	HE 3	N	22	8 hónap	21
	HE 4	F	31	24	7
	HE 11	F	36	30	6
	HE 18	F	32	20	12
	HE 19	F	56	24	32
	HE 21	F	30	21	9
	HE 22	N	27	22	5
	HE 29	N	29	5	24
	HE 35	F	25	12	13
	HE 36	N	45	31	14
	HE 37	F	41	2	39
	HE 53	F	26	17	9
	HE 60	F	30	6	24
	HE 62	N	45	25	20
	HE 71	F	35	19	16
	HE 74	F	34	8	26
	HE 75	F	24	0.3	24
	HE 83	N	29	6	23
	HE 86	F	41	10	31
	HE 90	N	46	11	35
	HE 91	N	35	20	15
	HE 92	N	35	5	30

4.3. Az SPR-immunreaktív sejtek száma, eloszlása és morfológiája

A hippocampus SPR-pozitív sejtjei morfológiailag heterogén, nem-principális sejtcsoportot alkotnak, mely a patkányban leírt SPR-pozitív sejtpopulációtól jelentősen különbözik (Acsady et al., 1997). Morfológiájuk és elhelyezkedésük alapján a humán hippocampus SPR-t expresszáló sejtjei szintén gátlósejtek, a hippocampus összes alrégiójában megtalálhatóak, különböző morfológiájú sejtek tartoznak közéjük, általában sima, ritkábban tüskés dendritekkel. Az immunfestés kizárólag a sejttest és dendrit membránokat teszi láthatóvá, axonjelölést nem kaptunk.

A kontroll humán hippocampusban a különböző morfológiájú SPR-immunfestett interneuronok előfordulása és gyakorisága nagy változatosságot mutat a különböző hippocampális régiók között **(1. Ábra)**. A GD-ban a sejttestek többsége a hilusban található és két típusra osztható a dendritfa elhelyezkedése alapján: 1) multipoláris sejtek 5-8 dendrittel, melyek dendritfája a hilusra korlátozódik, és 2) multipoláris vagy „bitufted" sejtek, melyek dendritjeik egy részét a stratum moleculare-ba küldik (Magloczky et al., 2000). A stratum moleculare-ban csak néhány, „bitufted" típusú SPR-sejt látható. A cornu Ammonisban a sejtek többsége a CA1 és CA3 a, b régiókban helyezkedik el, legnagyobb számban a stratum pyramidale-ban és radiatumban **(1. Ábra)**. Kevés sejt található a CA2-ben és a CA3 c-ben, melyek többsége multipoláris morfológiát mutat.

A CA1 régióban legnagyobb mennyiségben multipoláris sejtek fordulnak elő, melyek főként a stratum pyramidale és radiatum területén helyezkednek el **(2. Ábra)**. Rendszerint egy vastagabb és több vékonyabb elsődleges dendrittel rendelkeznek **(3A Ábra)**. A CA1 régió SPR-immunfestett sejtjei között csepp alakú sejtek is találhatóak 1-2 elsődleges dendrittel, melyek a stratum lacunosum-moleculare felé futnak **(3C Ábra)**. Megfigyelhetőek „bitufted" sejtek is a stratum radiatum és lacunosum-moleculare határán. A stratum oriens jellegzetes sejttípusa a horizontálisan elhelyezkedő, orsó alakú bipoláris sejt 2 elsődleges dendrittel, melyek szintén horizontálisan futnak **(3B Ábra)**. A CA1 régió SPR-pozitív sejtjei hosszú, sima dendritekkel rendelkeznek, az elsődleges dendritelágazási pontok általában a sejttesthez közel helyezkednek el **(3. Ábra)**. Előfordulnak óriássejtek is a CA3 régióban és a GD-ban, ezek sejtteste nagyobb, dendritfája kiterjedtebb, mint a többi SPR-immunpozitív sejté.

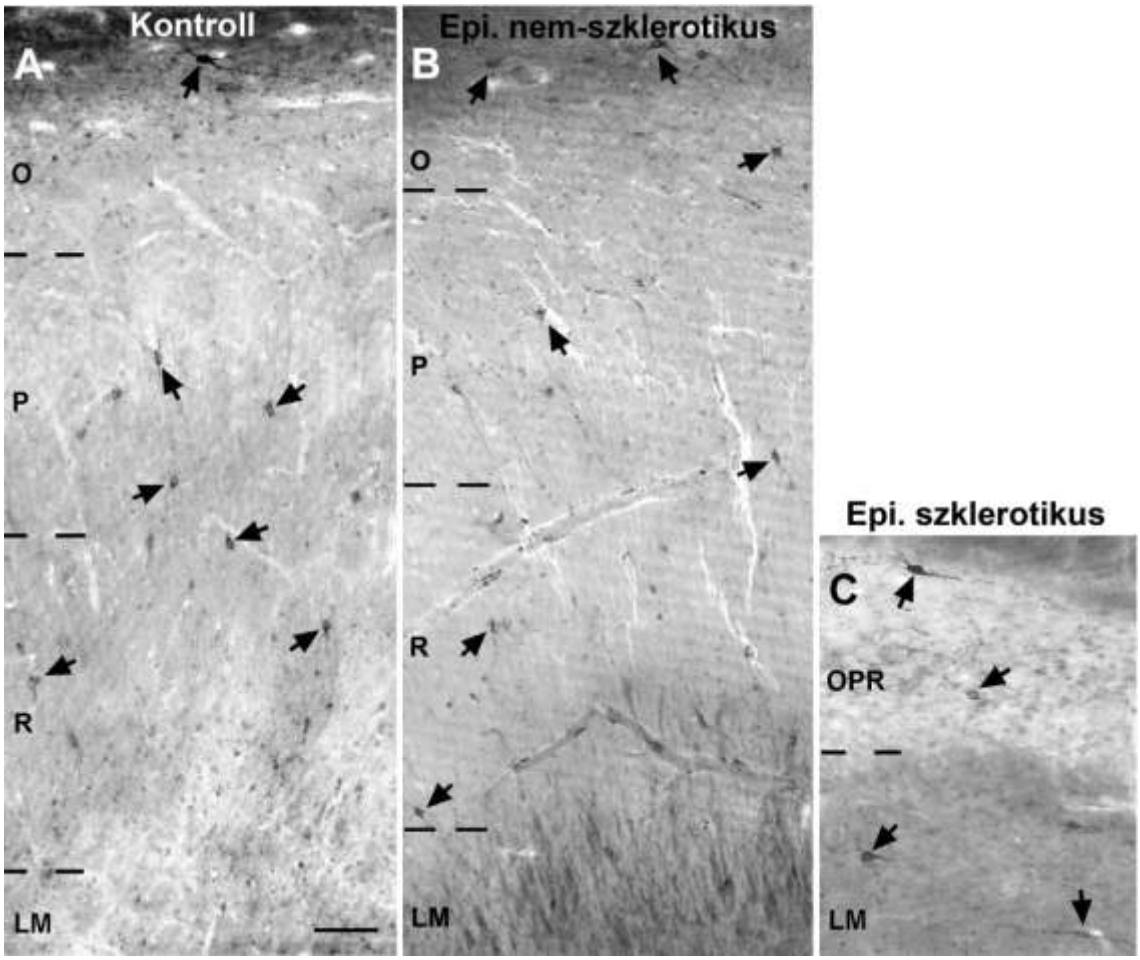


1. Ábra

A camera lucida rajz az SPR-pozitív sejtek eloszlását szemlélteti a humán kontroll hippocampusban. Az immunjelölt sejtek a hippocampus összes régiójában megtalálhatóak, különösen nagy gyakoriságban a stratum pyramidale és radiatum területén vannak. A stratum lacunosum-moleculare és a stratum moleculare területén csak szórványosan fordulnak elő immunpozitív sejtek.

Rövidítések: H: hilus; f: fimbria

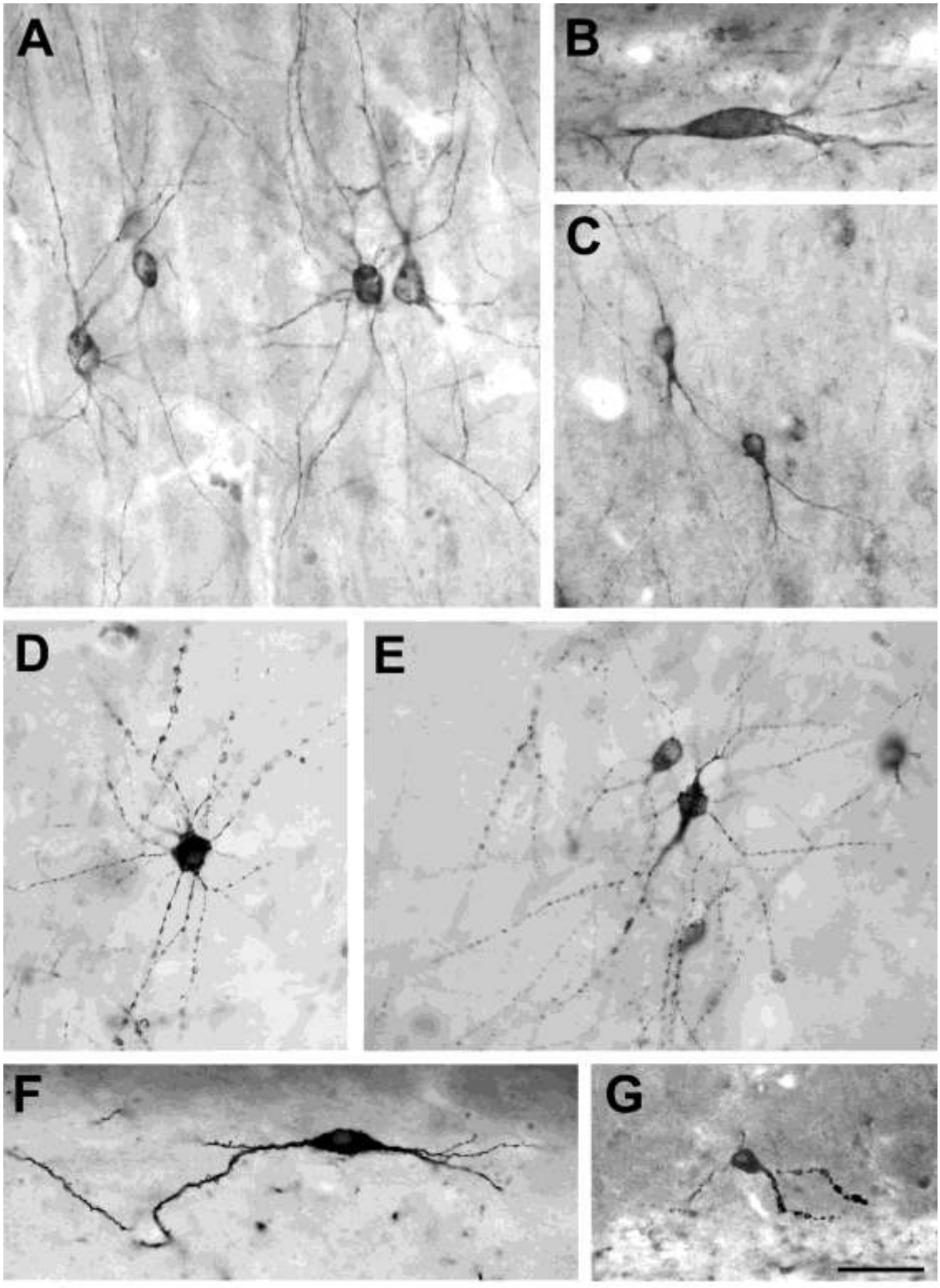
(A rajzot Weisz Ilona készítette.)



2. Ábra

A kisnagyítású fénymikroszkópos ábra az SPR-immunreaktív elemek eloszlását mutatja kontroll **(A)**, epilepsziás nem-szklerotikus **(B)** és szklerotikus **(C)** hippocampus CA1 régiójában. Néhány immunfestett sejtet nyíllal jelöltünk. Az SPR-immunreaktív interneuronok megőrződnek epilepsziában, hasonló mennyiségben vannak jelen a nem-szklerotikus mintában, míg számuk jelentősen lecsökken a szklerotikus esetekben. Az ábrán ezen kívül megfigyelhetjük a szklerózis okozta területcsökkenést is, mely a piramissejtek pusztulása következtében jön létre. Skála: 100 μm

Rövidítések: O: stratum oriens; P: stratum pyramidale; R: stratum radiatum; LM: stratum lacunosum-moleculare; OPR: stratum oriens-pyramidale-radiatum



3. Ábra

SPR-immunpozitív sejtek kontroll **(A, B, C)** és epilepsziás **(D,E,F, G)** hippocampusok CA1 régiójából. A: Az SPR-pozitív sejtek zöme a cornu Ammonisban multipoláris sejt,

több vékonyabb elsődleges dendrittel, melyek a piramissejt rétegre merőlegesen futnak. **B:** A horizontálisan elhelyezkedő orsó alakú sejtek a stratum oriensre jellemzőek, a CA1 és CA3 régiókban. Általában két fő dedritjük van, melyek szintén horizontálisan futnak e rétegben. **C**: A csepp alakú sejtek a stratum radiatumra jellemzőek. Egyetlen fő dendritjük a sejttesthez közel kettéágazik és a stratum lacunosum-moleculare felé fut. **D-E**: A nem-szklerotikus epilepsziás mintákban a dendritmorfológia erőteljesen megváltozik, rövidebb, gyakran torz, vagy gyöngyözött dendritek jellemzőek. **F-G:** A szklerotikus epilepsziás mintákban kevés sejt marad meg, két típus különböztethető meg: a kevés dendrittel rendelkező horizontális sejtek **(F)** és a göndör, varikóz, szegmentált dendritekkel rendelkező sejtek **(G)**. Skála: 50 μm.

Az SPR-immunpozitív sejtek morfológiája jelentősen megváltozik epilepsziában. A változások mértéke jelentősen függ a hippocampális sejtpusztulás és szklerózis mértékétől. A nem-szklerotikus esetekben („enyhe" és „foltos") az összes jellemző SPR-immunpozitív sejttípus megfigyelhető hasonló mennyiségben és eloszlásban, mint kontrollban **(2. Ábra)**. A szklerotikus mintákban azonban nagyon kevés sejt marad meg a cornu Ammonisban, ezek főként a multipoláris és a horizontális, orsó alakú sejtek közé tartoznak **(2, 3. Ábra)**. Az epilepsziás mintákban is megfigyelhető volt kevés tüskés dendritű sejt **(3F Ábra)**.

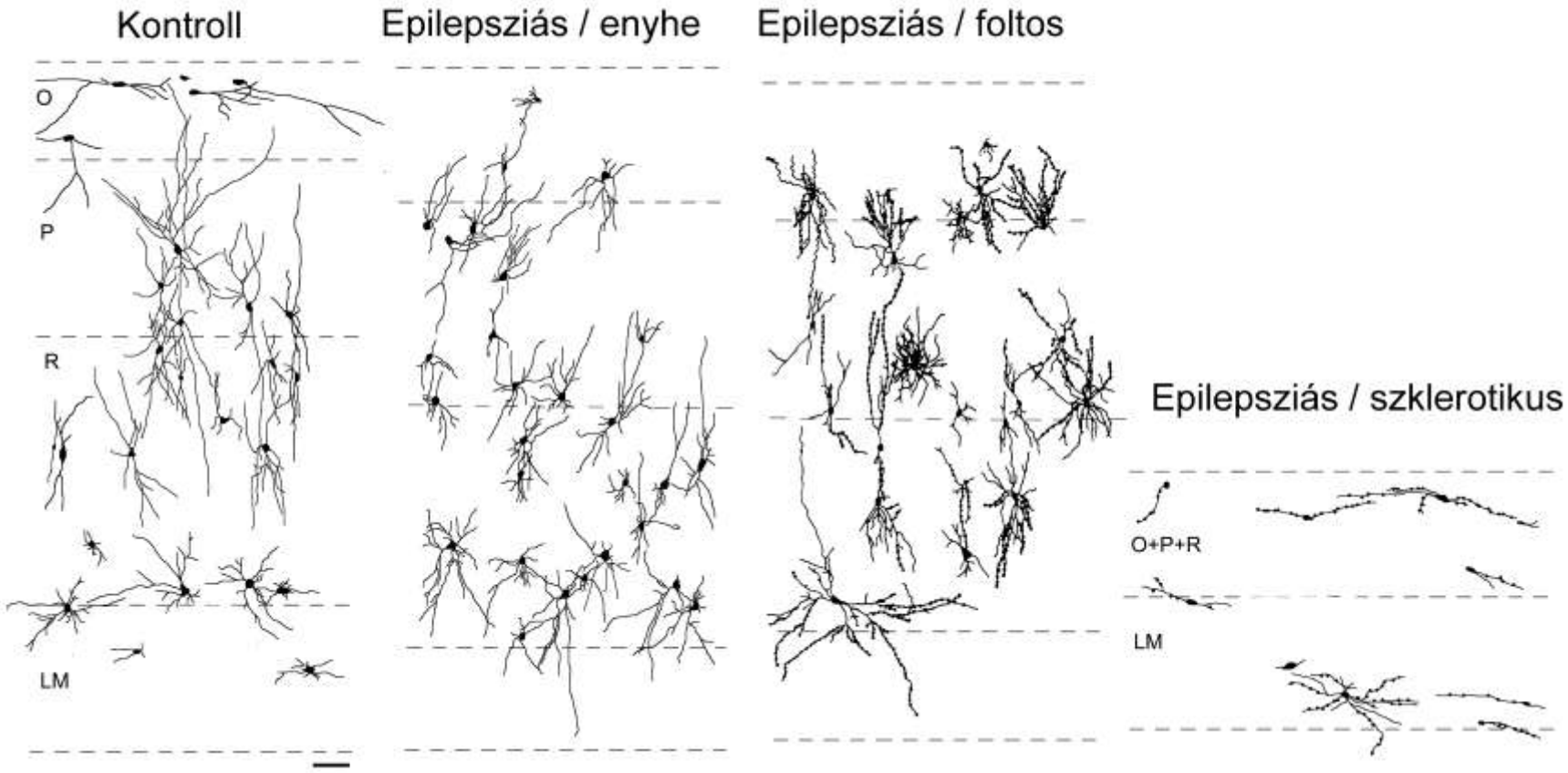
A GD-ban markánsabb változások figyelhetők meg. A stratum moleculare-ban van a sejtek többsége, ahol kontrollban szinte egyáltalán nem volt immunpozitív sejt, míg a hiláris régióban, ahol a GD SPR-immunreaktív sejtjeinek zöme volt, csak kevés SPR-immunfestett sejt látható, melyek dendritjei nem lépnek be a stratum moleculare rétegébe (Magloczky et al., 2000). Jelen dolgozatban a CA1 régióban vizsgáltuk meg részletesen ezen sejtek eloszlását.

Camera lucida rajzok szemléltetik az SPR-immunjelölt sejtek számában, eloszlásában és morfológiájában bekövetkezett változásokat az epilepsziás CA1 régióban **(4. Ábra)**. A nem-szklerotikus esetekben nagy mennyiségű sejt található a CA1 régióban, melyek kontrollhoz hasonló eloszlást mutatnak, jelentős részük a stratum pyramidale és radiatum területén helyezkedik el. A szklerotikus mintákban azonban szignifikánsan kevesebb sejt látható.

Camera lucida rajzokon meghatároztuk a sejtek területegységre eső számát kontroll és epilepsziás CA1 régióban. Az SPR-pozitív sejtek mennyisége változatlan volt a nem-szklerotikus hippocampusokban (kontroll: 12,5 ± 2,14 sejt/mm^2, enyhe: 11,53 ± 1,01 sejt/mm^2, foltos: 12,68 ± 1,84 sejt/mm^2; Mann-Whitney U-teszt, $p<0,05$). Azonban a szklerotikus mintákban szignifikánsan lecsökken az SPR-immunreaktív sejtek száma (4,97 ± 1,25 sejt/mm^2; Mann-Whitney U-teszt, $p<0,05$) **(5. Ábra, 2. Táblázat)**.

Az epilepsziás szövetekben az SPR-immunfestett dendritek morfológiai változását a **3. Ábra** és a CA1 régió egy-egy szegmenséből készített camera lucida rajz **(6. Ábra)** is demonstrálja. A kontroll minták SPR-immunpozitív sejtjei hosszú sima dendritekkel rendelkeznek a CA1 régióban. Ezzel szemben az epilepsziás sejtekre nagyobb számú, rövidebb, gyakran erősen gyöngyözött és torz dendritek jellemzőek. A dendritek gyöngyözötté válása, felszegmentálódása már a nem-szklerotikus mintákban is kifejezett, szklerotikus esetekben pedig erősen varikóz, göndör, rövid dendriteket láthatunk, melyek a CA1 régió zsugorodása miatt szétterülnek, és gyakran horizontális orientációt vesznek fel **(3, 6. Ábra)**.

A nem-szklerotikus mintákban, különösen a foltos típusban a sejtek dendritfája kiterjedtebb, több elágazást tartalmaz, mint kontroll esetekben, a szklerotikus mintákban azonban a dendritfa kiterjedése lecsökken **(6. Ábra)**. A dendritelágazásra vonatkozó megfigyeléseinket kvantifikáltuk is. A CA1 régió sejtjeiről készült camera lucida rajzokon **(6. Ábra)** megszámoltuk az dendritelágazások számát. Az elágazási pontok számának növekedése már az enyhe típusban kimutatható, de szignifikáns változásról a foltos típus esetén beszélhetünk. A szklerotikus mintákban a dendritelágazási pontok átlagos száma a kontroll mintákban megfigyelt átlag értékhez képest lecsökken **(3. Táblázat)**.


Kontroll
Epilepsziás / enyhe
Epilepsziás / foltos
Epilepsziás / szklerotikus
O
P
R
LM
O+P+R
LM

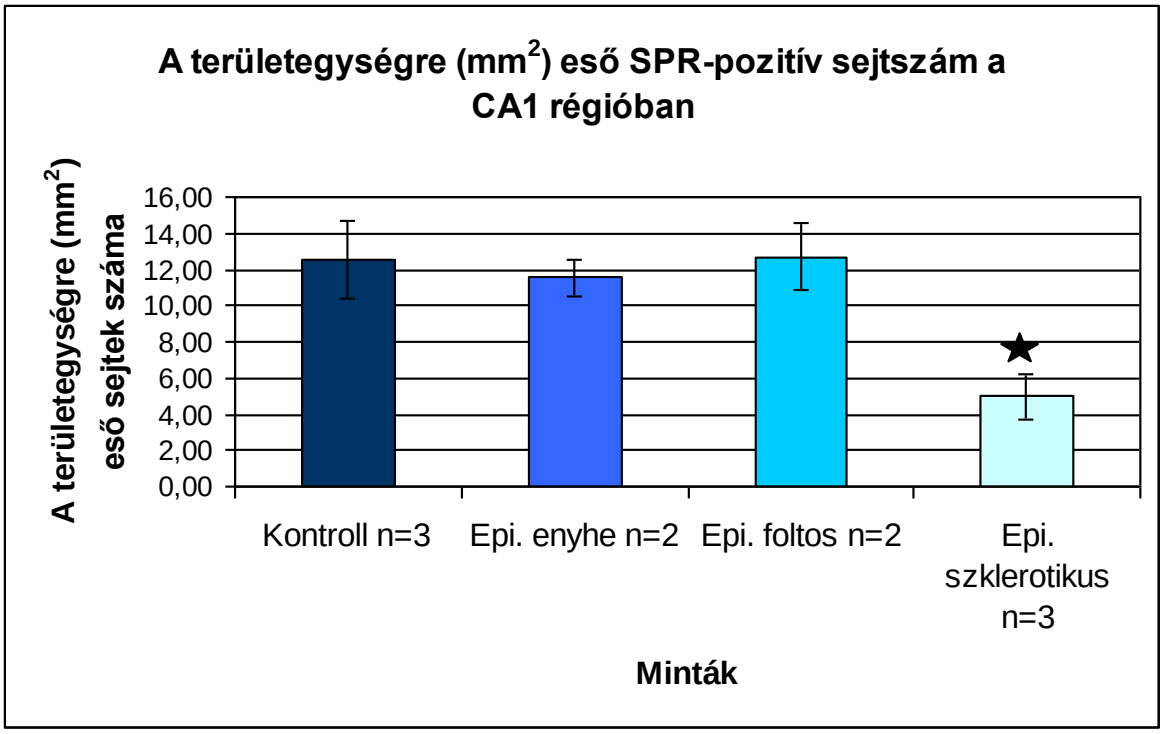
4. Ábra

A CA1 régióból készült camera lucida rajzon megfigyelhetjük az SPR-immunreaktív interneuronok eloszlásában és morfológiájában bekövetkező változásokat. Megfigyelhető, hogy a sejtek mennyisége és eloszlása a nem-szklerotikus esetekben (enyhe és foltos típus) kontrollhoz hasonló. Azonban a dendritfa több elágazást tartalmaz, különösen a foltos típusban, és a dendritek gyöngyözötté válnak. A stratum oriensre jellemző orsó alakú sejtek sem figyelhetők meg. Szklerotikus esetben a sejtek mennyisége lecsökken, és többségük csupán néhány torz dendrittel bír. Jellegzetes a sejtek horizontális elhelyezkedése. Skála: 0.1 mm

2. Táblázat:

Az SPR-tartalmú sejtek denzitása a hippocampus CA1 régiójában. A szignifikáns különbséget csillag jelzi (Mann-Whitney U-teszt, $p<0,05$).

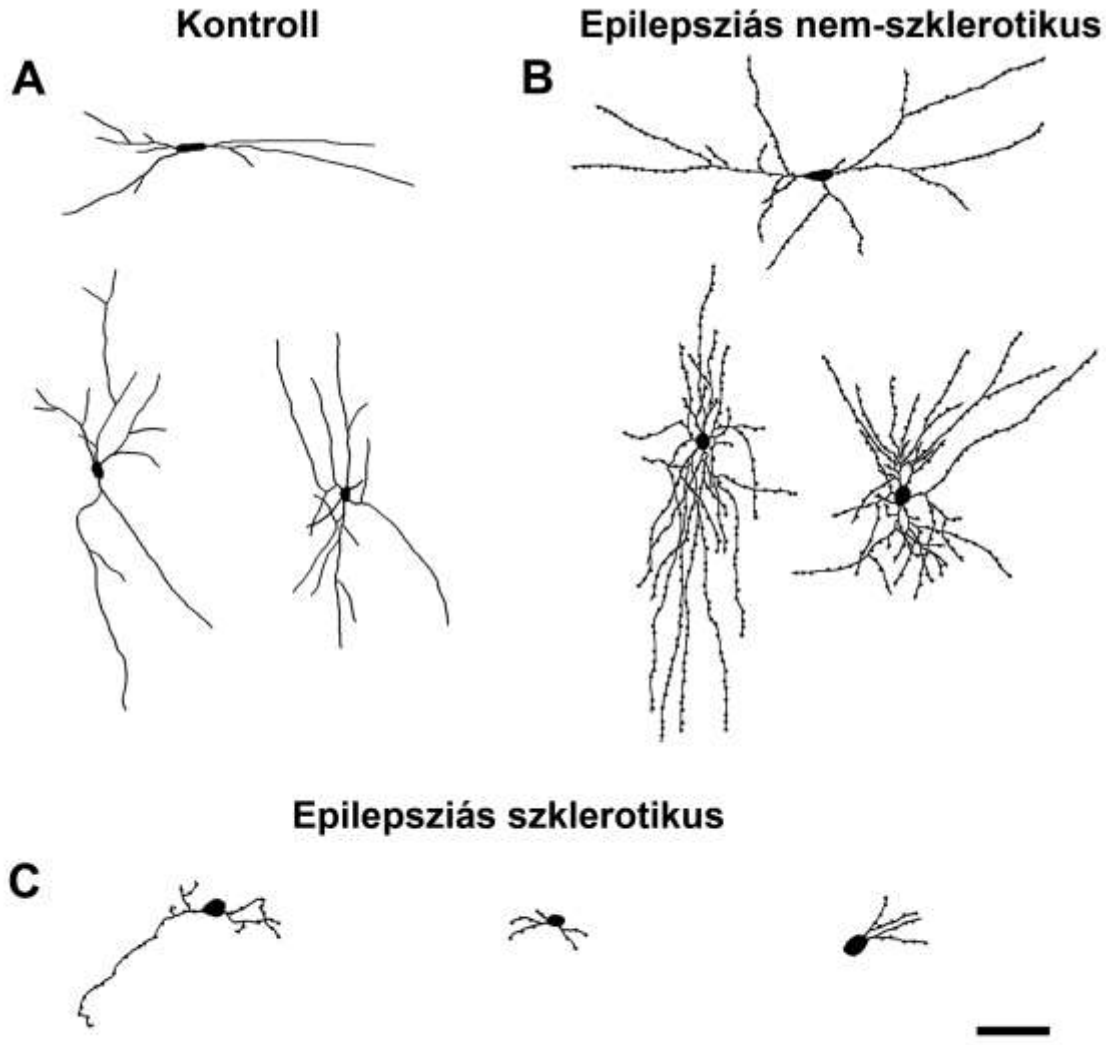
	Átlag ± Szórás			
	Kontroll *n*=3	**Epilepsziás / enyhe** *n*=2	**Epilepsziás / foltos** *n*=2	**Epilepsziás / szklerotikus** *n*=5
CA1 (sejt/mm^2)	12,5±2,1	11,5±1,0	12,7±1,8	* 5,0±1,3



5. Ábra

Meghatároztuk az SPR-pozitív sejtek területegységre eső számát kontroll és epilepsziás CA1 régióban. Az SPR-pozitív sejtek mennyisége változatlan volt a nem-szklerotikus hippocampusokban (kontroll: 12,5 ± 2,14, enyhe: 11,53 ± 1,01, foltos: 12,68 ± 1,84). Azonban a szklerotikus mintákban szignifikánsan lecsökken az SPR-immunreaktív sejtek száma (4,97 ± 1,25). Csillag jelöli a szignifikáns különbséget a kontroll és a szklerotikus minták között (Mann-Whitney U-teszt, $p<0,05$).

n: vizsgált minták száma



6. Ábra

Meghatároztuk az SPR-pozitív sejtek dendritelágazási pontjait kontroll **(A)** és epilepsziás **(B, C)** hippocampusok CA1 régiójában. Camera lucida rajzot készítettünk a sejtekről, és az elágazási pontokat megszámoltuk. A dendritelágazási pontok száma szignifikánsan megnőtt a nem-szklerotikus esetek közül a foltos típusban **(B)**. A szklerotikus minták esetében **(C)** az elágazási pontok száma jelentősen lecsökkent, jelezve a dendritfa degenerációját. Skála: 0,1 mm

3. Táblázat: Az SPR-pozitív interneuronok dendritelágazási pontjainak száma kontroll és epilepsziás mintákban. A szignifikáns eltérést csillag jelöli (Mann-Whitney U-teszt, Kruskall-Wallis ANOVA, $p < 0,05$).

	Dendritelágazási pontok száma/sejt (átlag±szórás)	
Vizsgált sejtek száma	*stratum oriens*	*stratum pyramidale + radiatum*
Kontroll (n=33)	4,25 ± 1,04	10,52 ± 3,28
Epi. enyhe (n=30)	6,63 ± 2,88	11,59 ± 4,62
Epi. foltos (n=28)	* 7,25 ± 1,91	* 21,15 ± 4,68
Epi. szklerotikus (n=18)	*stratum oriens + pyramidale + radiatum* * 3,22 ± 1,26	

4.4 Az SPR-pozitív sejtek kolokalizációja funkcionálisan különböző interneuronok markereivel

Az SPR-immunfestés nem eredményez axonjelölést. Így kolokalizációs vizsgálatokat végeztünk ismert neurokémiai markerekkel, hogy kiderítsük az SPR-t expresszáló interneuronoknak a hippocampális gátlórendszerben betöltött funkcionális szerepét. A különböző funkcionális típusba tartozó interneuronokra más-más neurokémiai marker tartalom jellemző.

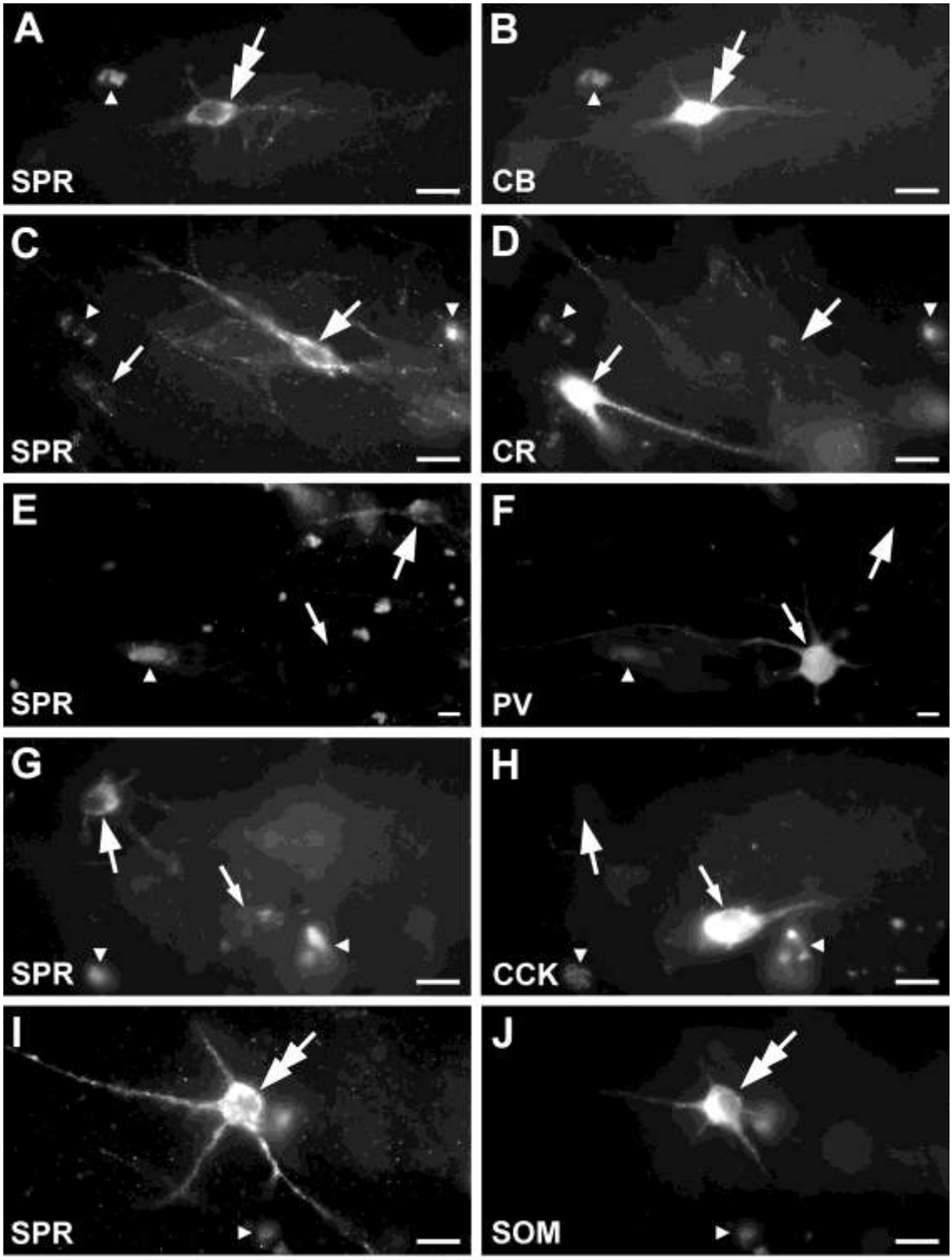
A humán hippocampusban a CB-tartalmú interneuronok többsége dendritikus gátlósejt (Sloviter et al., 1991; Seress et al., 1993b), de a periszomatikus gátlósejtek közé tartozó axo-axonikus sejtek egy részében is kimutatták a CB jelenlétét (Wittner et al., 2002). A PV- tartalmú interneuronok a principális sejtek periszomatikus gátlásában vesznek részt (Braak et al., 1991; Seress et al., 1993b), a CR-tartalmú sejtek pedig a dendritikus és interneuron-specifikus gátlásban (Urban et al., 2002). A somatostatin dendritikus gátlósejteket jelöl az axonok elhelyezkedése alapján (Chan-Palay, 1987). A cholecystokinin mind periszomatikus gátlósejtekre, mind dendritikus gátlósejtekre jellemző marker (Nunzi et al., 1985; Lotstra és Vanderhaeghen, 1987; Katona et al., 2000). Rágcsálóban kimutatták, hogy a hippocampális SOM-, CB- és PV-tartalmú

gátlósejtek egy része vetít a mediális septumba (Toth és Freund, 1992; Zappone és Sloviter, 2001; Jinno és Kosaka, 2002), azonban emberben hasonló információ nem áll rendelkezésre.

Fluorescens kettős festést használtunk, hogy vizsgáljuk az átfedést az SPR-t expresszáló interneuron populáció és a kalciumkötő fehérjét (CB, PV, CR), valamint neuropeptideket (SOM, CCK) tartalmazó interneuron populáció között **(7. Ábra)**.

A patkánnyal ellentétben (Acsady et al., 1997) az SPR-pozitív sejtek többsége a humán hippocampusban nem mutat átfedést a vizsgált neurokémiai markerekkel **(7. Ábra)**. Az SPR-immunreaktív interneuronok nem tartalmaztak CCK-t sem a kontroll, sem az epilepsziás mintáinkban. Az SPR-tartalmú interneuronok csak kismértékű átfedést mutattak a CR-nel, a PV-nal és a SOM-nal (**4. Táblázat**). A legnagyobb mértékű átfedés a CB-tartalmú interneuronokkal volt megfigyelhető: 8,7%-a az SPR-immunpozitív sejteknek CB-ra is pozitív volt a CA1 régióban, míg 20,8 %-a a CB-tartalmú gátlósejteknek SPR-t is expresszált.

Mivel a kontroll szövetekben az SPR-tartalmú sejtek a legnagyobb átfedést a CB-nal mutatták, az epilepsziás mintákban csak ezzel a markerrel végeztük vizsgálatainkat. A SOM tartalmú interneuronokat - melyekkel a CB mellett a legnagyobb átfedés figyelhető meg - nem vizsgáltuk, mert nagy részük elpusztul az epilepsziás hippocampusban (de Lanerolle et al., 1987). Eredményeink azt mutatják, hogy a CB tartalmú SPR sejtek aránya (8,7% kontrollban) nem változik az enyhe típusban (9,6 %), viszont megnő a foltos és a szklerotikus hippocampusban (14,5 % és 16,9 %). Továbbá, az SPR-pozitív CB tartalmú sejtek aránya is megnő mindhárom patológiai típusba sorolt minták esetén (**5. Táblázat**).



7. Ábra

Fluorescens kettős festés mutatja az SPR és kalciumkötő fehérjék valamint neuropeptidek kolokalizációját a kontroll hippocampus CA1 régiójában. Az autofluorescens szemcsék könnyen elkülöníthetőek a jóval homogénebb specifikus jelöléstől. A-B: SPR kolokalizációja egy CB-tartalmú interneuronnal (kettősnyíl). C-D:

az SPR-pozitív interneuron (vastag nyíl) nem kolokalizál a CR tartalmú sejttel (vékony nyíl). E-F: az SPR-pozitív sejtek nem tartalmaznak PV-t (vastag nyíl) és a PV-tartalmú sejtek nem SPR-pozitívak (vékony nyíl). G-H: az SPR-pozitív sejt nem tartalmaz CCK-t (vastag nyíl), és a CCK-tartalmú sejt nem tartalmaz SPR-t (vékony nyíl). I-J: a kettős nyíl az SPR és a SOM együttes előfordulását mutatja egy interneuronban. A kis nyílhegy autofluorescens szemcsét jelöl. Skála: 20 μm

4. Táblázat: Az SPR és különböző neurokémiai markerek kolokalizációja a humán kontroll hippocampusban (n=3).

Az SPR-pozitív sejtek arányában

	CB	**PV**	**CR**	**SOM**	**CCK**
A vizsgált SPR-pozitív sejtek száma	325	524	335	566	217
A más markereket is tartalmazó SPR-pozitív sejtek aránya	8,7 %	4 %	2,6 %	3,4 %	0 %

A különböző markereket tartalmazó sejtek arányában

	CB	**PV**	**CR**	**SOM**	**CCK**
A vizsgált különböző marker tartalmú sejtek száma	190	281	280	188	103
Az SPR-t is tartalmazó marker-pozitív sejtek aránya	20,8 %	7,3 %	2,6 %	7,8 %	0 %

5. Táblázat: Az SPR és a CB kolokalizációja az epilepsziás humán hippocampusban.

Az SPR-pozitív sejtek arányában

	Kontroll (n=3)	**Epilepsziás 1 típus (n=3)**	**Epilepsziás 2 típus (n=2)**	**Epilepsziás 3 típus (n=6)**
A vizsgált SPR-pozitív sejtek száma	860	642	896	245
A CB-t is tartalmazó SPR-pozitív sejtek aránya	8,7 %	9,6 %	14,5 %	16,9 %

A CB-tartalmú sejtek arányában

	Kontroll (n=3)	**Epilepsziás 1 típus (n=3)**	**Epilepsziás 2 típus (n=2)**	**Epilepsziás 3 típus (n=6)**
A vizsgált CB-tartalmú sejtek száma	424	162	426	173
Az SPR-t is tartalmazó CB-pozitív sejtek aránya	20,8 %	38,2 %	23,7 %	32,2 %

4.5. Az SPR-pozitív elemek elektronmikroszkópos vizsgálata

Az SPR-immunpozitív sejtek szinaptikus bemeneti jellegeit, és ezek esetleges változását epilepsziában elektronmikroszkópos szinten vizsgáltuk. 2 kontroll és 8 epilepsziás mintát vizsgáltunk (2 enyhe, 3 foltos és 3 szklerotikus). A mintavételezés minden esetben a CA1 régióból történt, a stratum oriens, pyramidale és radiatum került átágyazásra. A szklerotikus esetekben a str oriens, pyramidale és radiatum nem alkot elkülöníthető rétegeket, ezért ott mintánként 1 átágyazás történt.

4.5.1. Az SPR-pozitív elemek ultrastruktúrája a CA1 régióban

A receptor a sejttest és a dendritek membránjaiban helyezkedik el. Az SPR-immunjelölés nagyrészt a plazmamembránra koncentrálódik, de kevés citoplazmatikus jelölés szintén megfigyelhető, feltehetően a receptor szintézis helyein. A DAB-reakció szolubilitása miatt időnként előfordult, hogy a végtermék a teljes dendritet kitöltötte. A sejtmag körül sok mitokondriumot tartalmazó vékony citoplazmaréteg jellemző. Az általunk átvizsgált minták között nem fordult elő egyetlenegyben sem volt SPR-immunpozitív axon, vagy axonterminális.

A szinaptikus bemenetek a dendritekre korlátozódtak, a sejttesten egyetlen esetben sem volt megfigyelhető szinapszis **(8. Ábra)**. A szimmetrikus és aszimmetrikus kapcsolatok egyértelműen megkülönböztethetőek voltak a posztszinaptikus denzitás alapján. A dendritekre érkező szinaptikus bemenetek többsége (~90%-a) aszimmetrikus volt (feltételezhetően serkentő). Szimmetrikus (feltételezhetően gátló) bemenet ritkábban volt megfigyelhető mind a kontroll, mind az epilepsziás mintákban. Az epilepsziás esetekben alkalmanként zona adherentia is előfordult SPR-pozitív dendritek között, a kontroll mintákban azonban ilyenek nem voltak megfigyelhetők **(8, 9. Ábra)**.

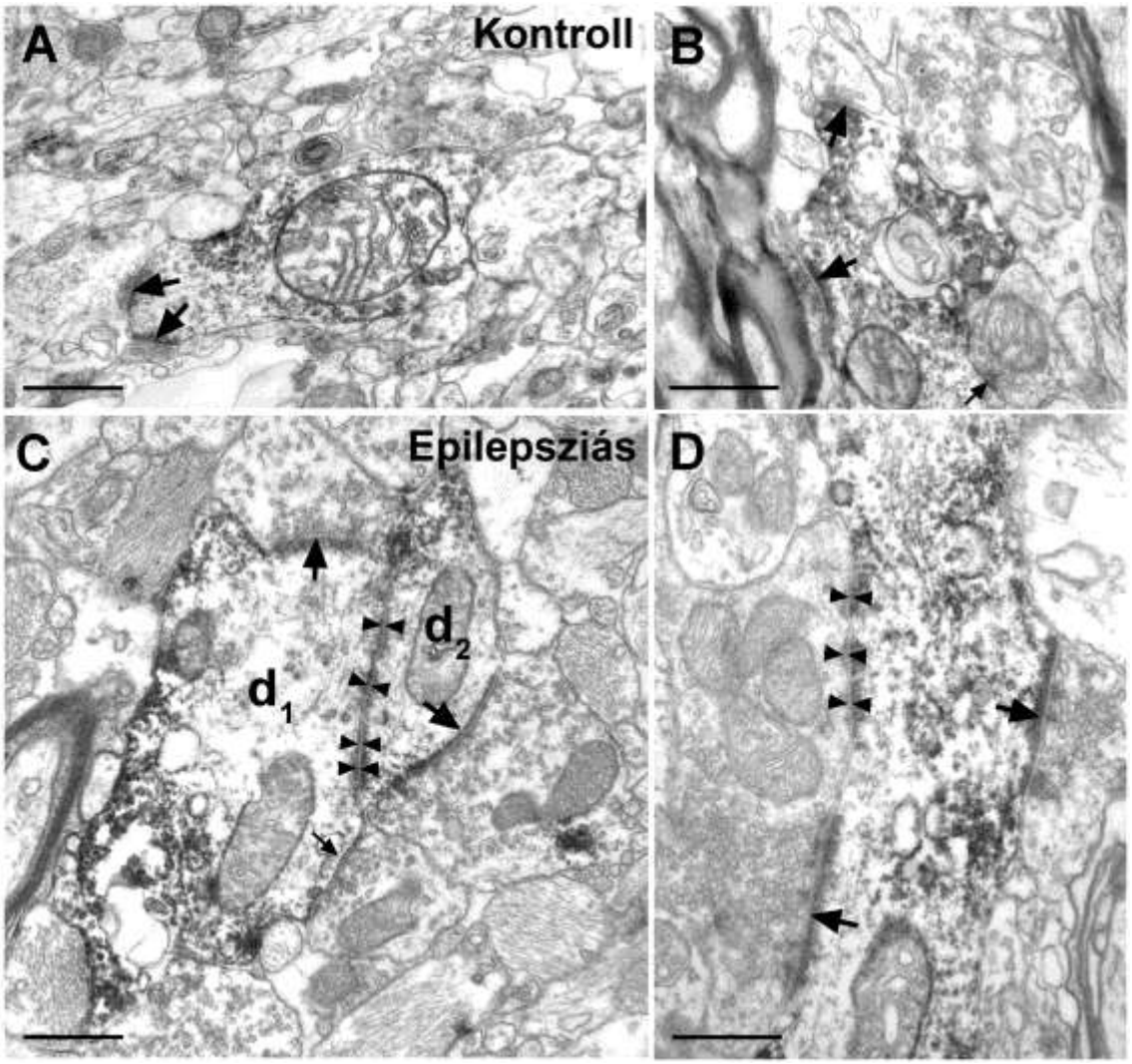
Bár az SPR-pozitív dendritek általában számos szinaptikus bemenetet kapnak az epilepsziás mintákban, a szklerotikus esetekben jellegzetes, hogy a jelölt dendriteket asztrociták ölelik körül **(9. Ábra)**. A kontroll és nem-szklerotikus szövetekhez viszonyítva erőteljesen megnő a gliális elemek mennyisége. Nagy, mohaterminálisokra emlékeztető terminálisok gyakran létesítettek kapcsolatot SPR-pozitív dendritekkel az epilepsziás CA1 régióban, különösen a szklerotikus esetekben. Ezek a terminálisok hosszú szinaptikus aktív zónával rendelkező aszimmetrikus szinapszisokat adtak az SPR-jelölt profilokra.

A szklerotikus epilepsziás mintákban elektronmikroszkópos szinten számos degenerálódó SPR-immunfestett elem figyelhető meg, degenerálódó mitokondriumokkal és citoplazmatikus mátrix-szal. Gyakoriak a hiányos, szakadozott membránnal rendelkező dendritek. Előfordulnak ép membránú, de „üres”, megemésztődött állományú dendritek is, melyekről csupán a membránjelölés alapján tudhatjuk, hogy SPR-immunreaktív dendritek maradványai.

4.5.2. Az SPR-pozitív sejtek szinaptikus borítottsága a CA1 régióban

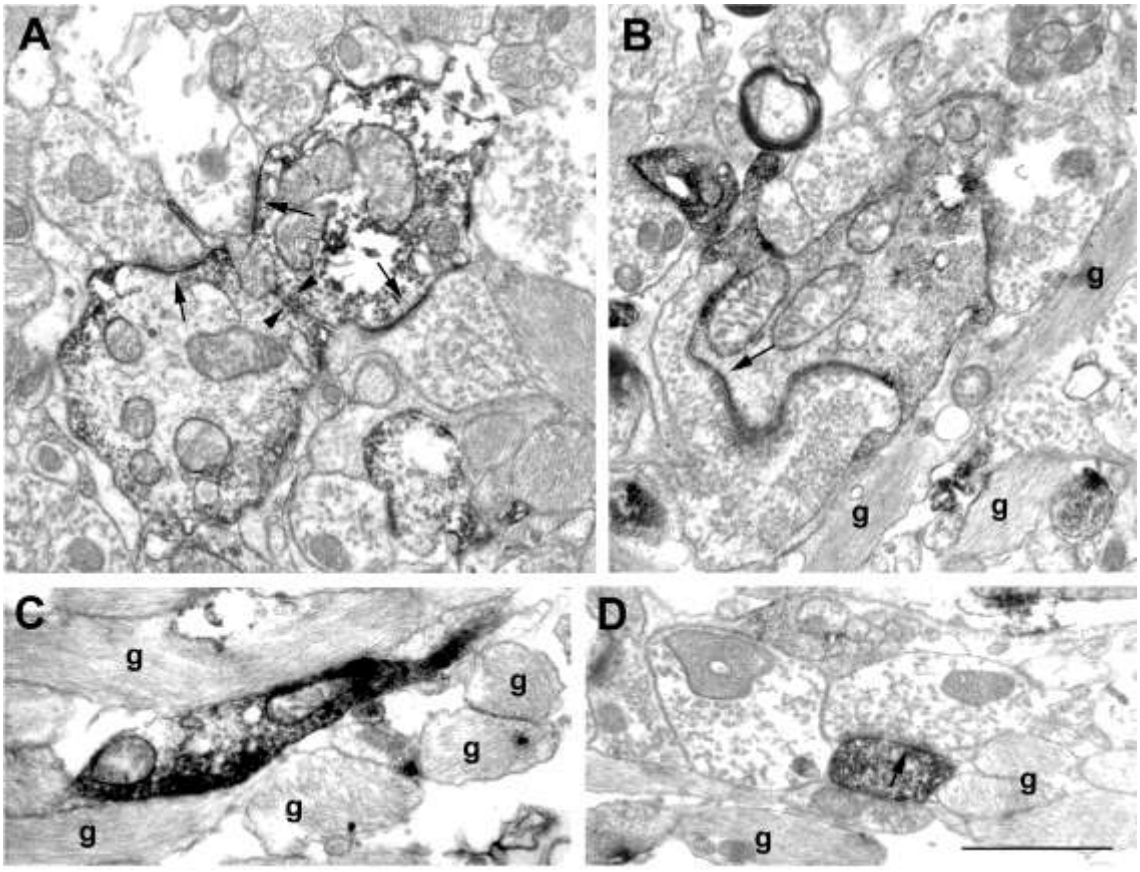
Megvizsgáltuk az SPR-immunpozitív sejtek szinaptikus borítottságát kontroll és epilepsziás mintákban annak érdekében, hogy kiderítsük, részt vesznek-e ezen sejtek az epilepsziás hippocampusra jellemző szinaptikus reorganizációban.

Szinaptikus borítottság alatt μm szinapszishossz/100μm dendritkerületet értünk. Ehhez az adott mintavételezési területen az összes SPR-pozitív dendritet lefényképeztük, és meghatároztuk rajtuk a szinapszisokat. A szinapszisok azonosításánál a következő kritériumok teljesülését vettük figyelembe: szinaptikus rés megléte, vezikula akkumuláció a preszinaptikus terminálisban, jól látható posztszinaptikus denzitás. Megmértük az aszimmetrikus, valamint a szimmetrikus szinapszisok aktív zónájának hosszát, és ezeket viszonyítottuk a dendritprofil kerületéhez. Minden mintában találtunk olyan dendritprofilokat is, melyekre nem érkezett szinaptikus bemenet, természetesen ezeket is bevontuk a vizsgálatba. Kihagytuk azonban azokat az átmetszeteket, melyek annyira hiányosak, „szakadtak" voltak, hogy nem lehetett megállapítani a pontos határokat és a szinapszisok jelenlétét.



8. Ábra

Az elektronmikroszkópos ábrán SPR-immunreaktív dendritek átmetszetei láthatók a CA1 régióból kontroll **(A, B)** és epilepsziás **(C, D)** mintákból. A dendritekre sok bemenet érkezik, többségükben aszimmetrikusak **(A, B, D, vastag nyilak)**. Jóval kisebb arányban fordultak elő szimmetrikus szinapszisok **(C, d2 dendrit, vékony nyíl)**. **d1** és **d2** dendrit között zona adherentia van **(C, nyílhegyek)**. Az epilepsziás mintákban perforált szinapszisokat is találtunk **(D)**. Skála: 1 μm



9. Ábra

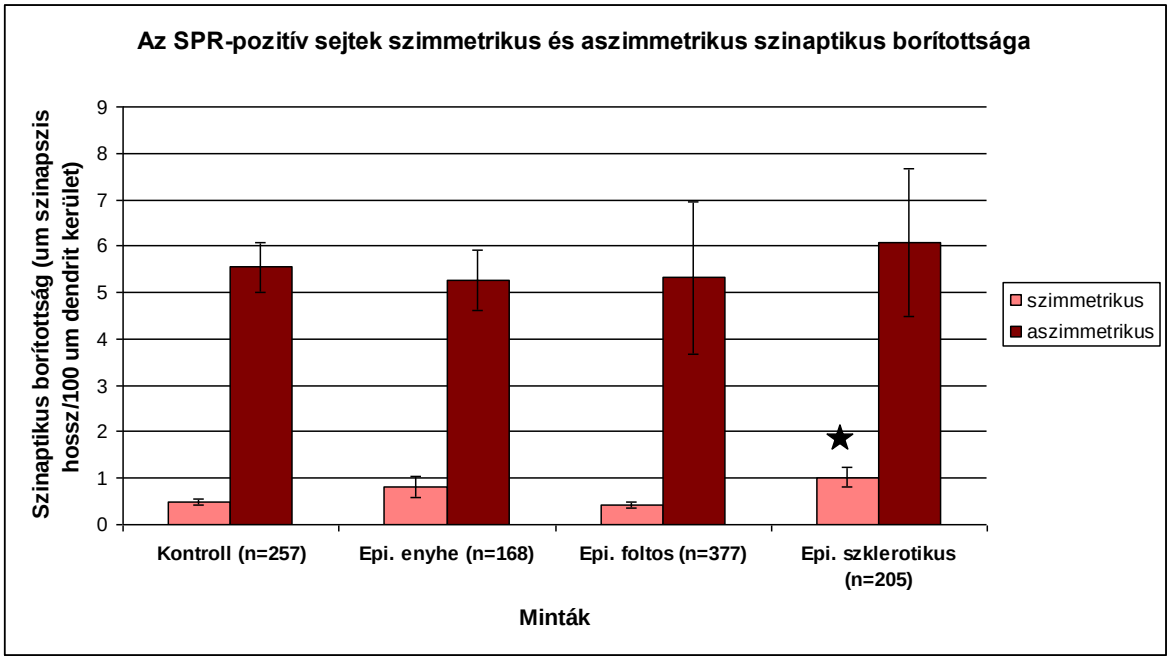
A szklerotikus CA1 régióban az SPR-pozitív dendriteket beidegző terminálisok esetén sokszor voltak megfigyelhetőek hosszú szinaptikus aktív zónák **(A, B, D, nyilak)**. Dendritek közötti kontaktusok, zona adherentiák **(A, nyílhegyek)**, és asztrocitákkal körülvett SPR-pozitív elemek **(B, C, D, g)** szintén gyakran megfigyelhetőek voltak. Skála: 1 μm

A kontroll CA1 régióban az SPR-pozitív interneuron dendritek legnagyobb része aszimmetrikus (feltehetően serkentő) bemeneteket kap, szimmetrikus (feltehetően gátló) szinaptikus kapcsolatok ritkán voltak megfigyelhetőek. Az epilepsziás mintákban a szinaptikus bemenetek legnagyobb része kontrollhoz hasonlóan aszimmetrikus volt **(10. Ábra)**.

Megvizsgáltuk, hogy megváltozik-e a szinaptikus borítottság mértéke, valamint a szimmetrikus és aszimmetrikus bemenetek aránya az SPR-pozitív dendriteken. Megmértük az SPR-pozitív dendrit profilok kerületét, valamint a szinaptikus aktív

zónák hosszát, és meghatároztuk a szinaptikus borítottságot (µm szinapszishossz/100µm dendritkerület).

A teljes szinaptikus borítottságot (szimmetrikus + aszimmetrikus) illetően nem mutatható ki szignifikáns különbség az epilepsziás mintákban (kontroll, n=257: 6,02±0,6; enyhe, n=168: 6,07±0,9; foltos, n=377: 5,73±1,71; szklerotikus, n=205: 7,1±1,8; Mann-Whitney U-teszt, Kruskall-Wallis ANOVA, $p<0,05$). Hasonló mondható el az aszimmetrikus, tehát serkentő borítottságról is (kontroll: 5,54±0,54; enyhe: 5,26±0,66; foltos: 5,32±1,64; szklerotikus: 6,08±1,59; Mann-Whitney U-teszt, Kruskall-Wallis ANOVA, $p<0,05$). A szklerotikus mintákban azonban szignifikánsan megnőtt a gátló szinapszisok aránya (kontroll: 0,48±0,07; 1. típus: 0,81±0,24; 2. típus: 0,42±0,07; 3. típus: 1,02±0,21; Mann-Whitney U-teszt, Kruskall-Wallis ANOVA, $p<0,05$) **(10. Ábra)**. A stratum oriens, pyramidale és radiatum között nem találtunk különbséget, sem kontroll, sem epilepsziás mintákban.



10. Ábra

A szimmetrikus és az aszimmetrikus szinaptikus borítottság átlagos értékeit mutatja a grafikon. Az aszimmetrikus borítottságban nem mutatható ki szignifikáns eltérés a kontroll mintáktól. A szimmetrikus borítottság, azonban a szklerotikus esetekben

szignifikánsan nagyobb A kontrolltól való szignifikáns különbséget csillag jelzi (Mann-Whitney U-teszt, Kruskall-Wallis ANOVA, $p<0,05$).
n: vizsgált dendritátmetszetek száma.

4.6. A CR-immunoreaktív sejtek száma, eloszlása és morfológiája

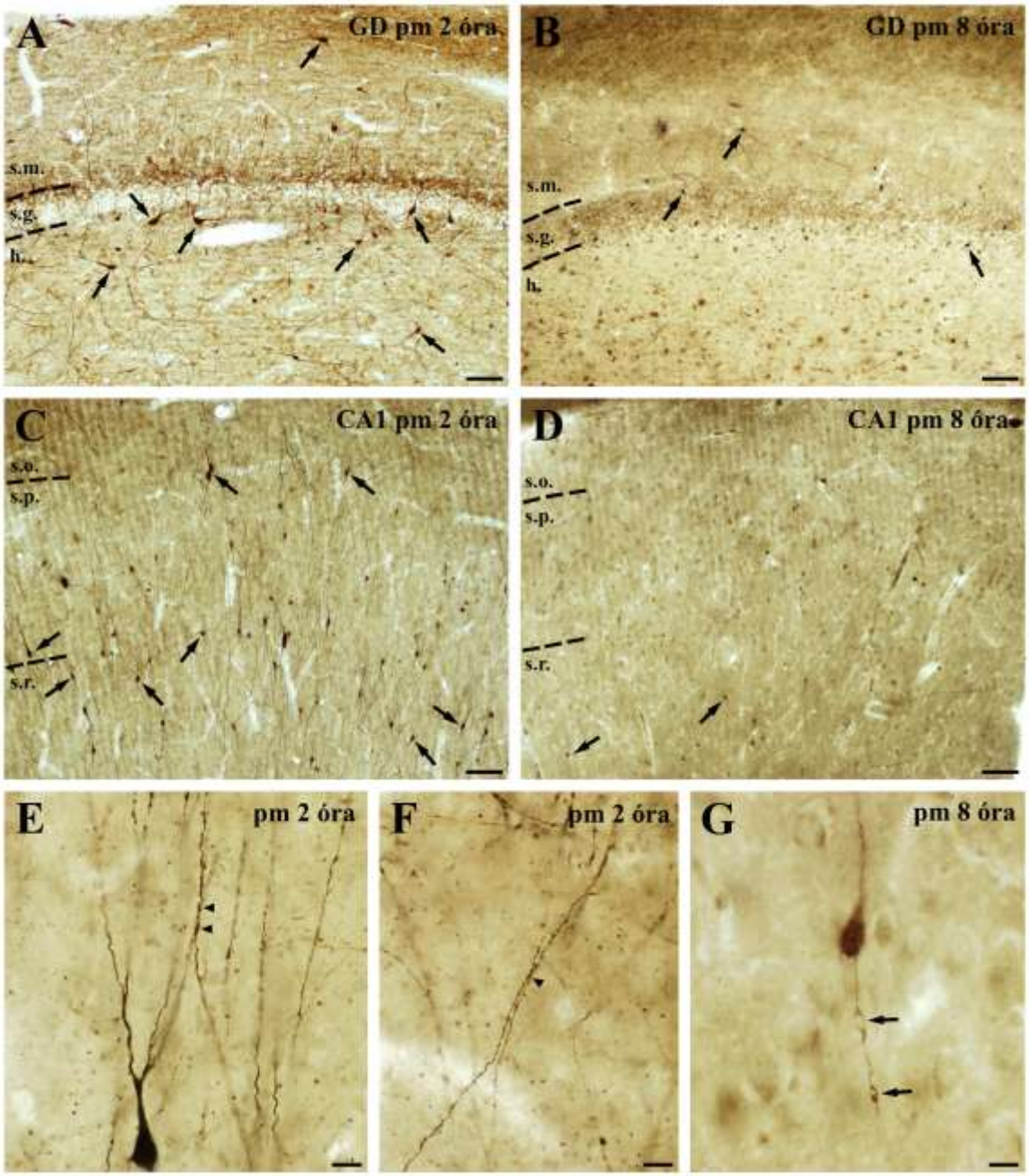
A humán kontroll hippocampus CR-pozitív sejtjeinek morfológiáját leírta korábban Nitsch és Ohm (Nitsch és Ohm, 1995). Heterogén sejtpopulációt alkotnak, legjellemzőbb sejttípusok a következők: nagy, multipoláris sejtek a hilusban, horizontális, orsó alakú sejtek a stratum moleculare-ban és az oriensben, kisméretű sejtek populációja az egész GD-ban és multipoláris sejtek elszórtan a CA1-3 rétegeiben. A CR-pozitív sejtek általában néhány fő dendritággal rendelkeznek, a dendritek a sejtek többsége esetében simák, de kevés, tüskés dendrittel rendelkező sejt is előfordul. A CA1 régió sejtjeire a hosszú, sima, radiálisan elhelyezkedő dendritek jellemzőek, melyek gyakran közel egymáshoz párhuzamosan futottak, és pontokban érintkeztek. Elektronmikroszkópos szinten ezeken a pontokon gyakran volt megfigyelhető puncta adherentia (Urban et al., 2002).

Megvizsgáltuk a CR-tartalmú interneuronok mennyiségét, eloszlását és morfológiáját különböző post mortem idejű kontroll és az egyes patológiai csoportokba tartozó epilepsziás mintákban.

A rövid post mortem idejű kontroll mintákban (2-4 óra) a hippocampus összes alrégiójában megtalálhatók a CR-immunfestett sejtek **(11, 13. Ábra)**. Sok immunpozitív sejt látható a hilusban és a CA1 stratum pyramidale-ban és radiatumban, különös tekintettel a stratum radiatum és lacunosum-moleculare határra. Ezzel szemben kevés immunfestett sejt van jelen a stratum granulosumban és moleculare-ban, valamint a stratum oriensben és lacunosum-moleculare-ban a CA1 régióban. A CA2 és CA3 régiók kevés immunjelölt sejtet tartalmaznak (Urban et al., 2002).

A hosszú post mortem idejű kontroll mintákban (8-10 óra) a CR-pozitív sejtek eloszlása hasonló volt, de szignifikánsan kevesebb immunfestett sejt volt látható minden alrégióban (stratum granulosum+moleculare: 34,3%, hilus: 43,9%, CA1: 23,5%, CA3:

28% a rövid post mortem idejű kontroll mintákhoz viszonyítva; Mann-Whitney U-teszt, $p<0,05$) **(11, 13, 14. Ábra, 6. Táblázat)**.



11. Ábra

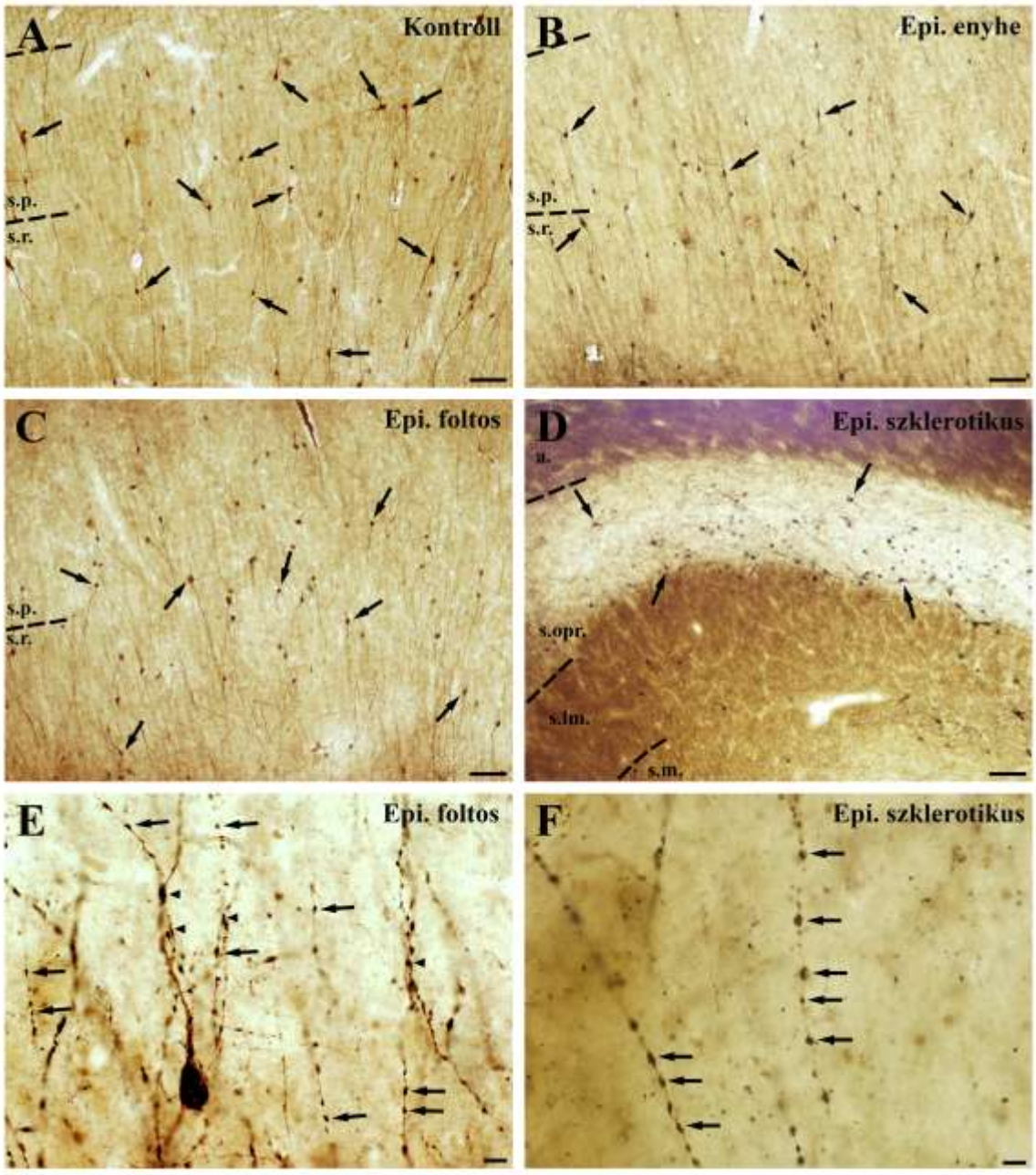
A CR-pozitív sejtek eloszlása a kontroll hippocampusban. **A**: GD, post mortem 2 óra. Jellegzetesek a hilusban található nagy sejtek, a stratum moleculare-ban található

horizontális sejtek, valamint a kisebb méretű CR-pozitív sejtek, melyek a GD minden rétegében láthatók **(nyilak)**. **B**: GD, post mortem 8 óra. Nagyon kevés CR-immunreaktív sejt látható a GD-ban **(nyilak)**. **C**: CA1 régió, post mortem 2 óra. Számos immunreaktív sejt látható az összes rétegben, hosszú sima dendritekkel **(nyilak)**. A radiálisan elhelyezkedő sejtek leggyakoribbak a stratum pyramidale-ban és a stratum radiatumban. **D**: CA1 régió, post mortem 8 óra. Alig látható néhány CR-immunjelölt sejt ezekben a mintákban. A meglévőket degenerálódó dendritfa jellemzi **(nyilak)**. **E, F, G**: nagy nagyítású fénymikroszkópos képeken a CR-pozitív dendritek morfológiája figyelhető meg kontroll CA1 régióban. Hosszú, sima dendritek jellemzőek, melyek gyakran egymás mellett párhuzamosan futnak hosszabb-rövidebb szakaszokon **(E, F nyílhegy)**. A hosszú post mortem idejű kontrol mintákban azonban a dendritek degenerálódnak, gyöngyözötté válnak **(G, nyilak)**. Skála: A-D: 100 μm; E-G: 20 μm
Rövidítések: s.m.: stratum moleculare; s.g.: stratum granulosum; h: hilus; s.o.: stratum oriens; s.p.: stratum pyramidale; s.r.: stratum radiatum.

A nem-szklerotikus epilepsziás hippocampusban a CR-pozitív sejtek mennyisége hasonló volt a rövid post mortem idejű kontroll mintákhoz, egyedül a CA3 régióban és a hilusban volt kimutatható szignifikáns csökkenés az immunfestett sejtek számában (stratum granulosum+moleculare: 74,9%, hilus: 65,4%, CA1: 66,7%, CA3: 60,5% a rövid post mortem idejű kontroll mintákhoz viszonyítva; Mann-Whitney U-teszt, $p<0,05$) **(12, 13, 14. Ábra, 6. Táblázat)**. Ezzel szemben, a nem-szklerotikus hippocampus minden alrégiójában jelentősen több immunpozitív sejt látható, mint a hosszú post mortem idejű kontroll szövetekben **(11, 12, 13, 14. Ábra, 6. Táblázat)**.

A szklerotikus epilepsziás esetekben a CR-jelölt sejtek száma szignifikánsan lecsökkent a CA3-ban, a hilusban, a stratum granulosumban valamint a stratum moleculare-ban (stratum granulosum+moleculare: 35,2%, hilus: 32,1%, CA1: 76,1%, CA3: 21,9% a rövid post mortem idejű kontroll mintákhoz viszonyítva, Mann-Whitney U-teszt, $p<0,05$) **(12, 13, 14. Ábra, 6 Táblázat)**. A szklerotikus esetekben a CA1 régió számottevően zsugorodik, térfogata jelentősen kisebb, mint a kontroll, vagy a nem-szklerotikus hippocampusé **(13. Ábra)**. Ez okozhatja, hogy a szklerotikus CA1 régióban nem találtunk változást a CR-pozitív sejtek területegységre megadott számában. Ha a

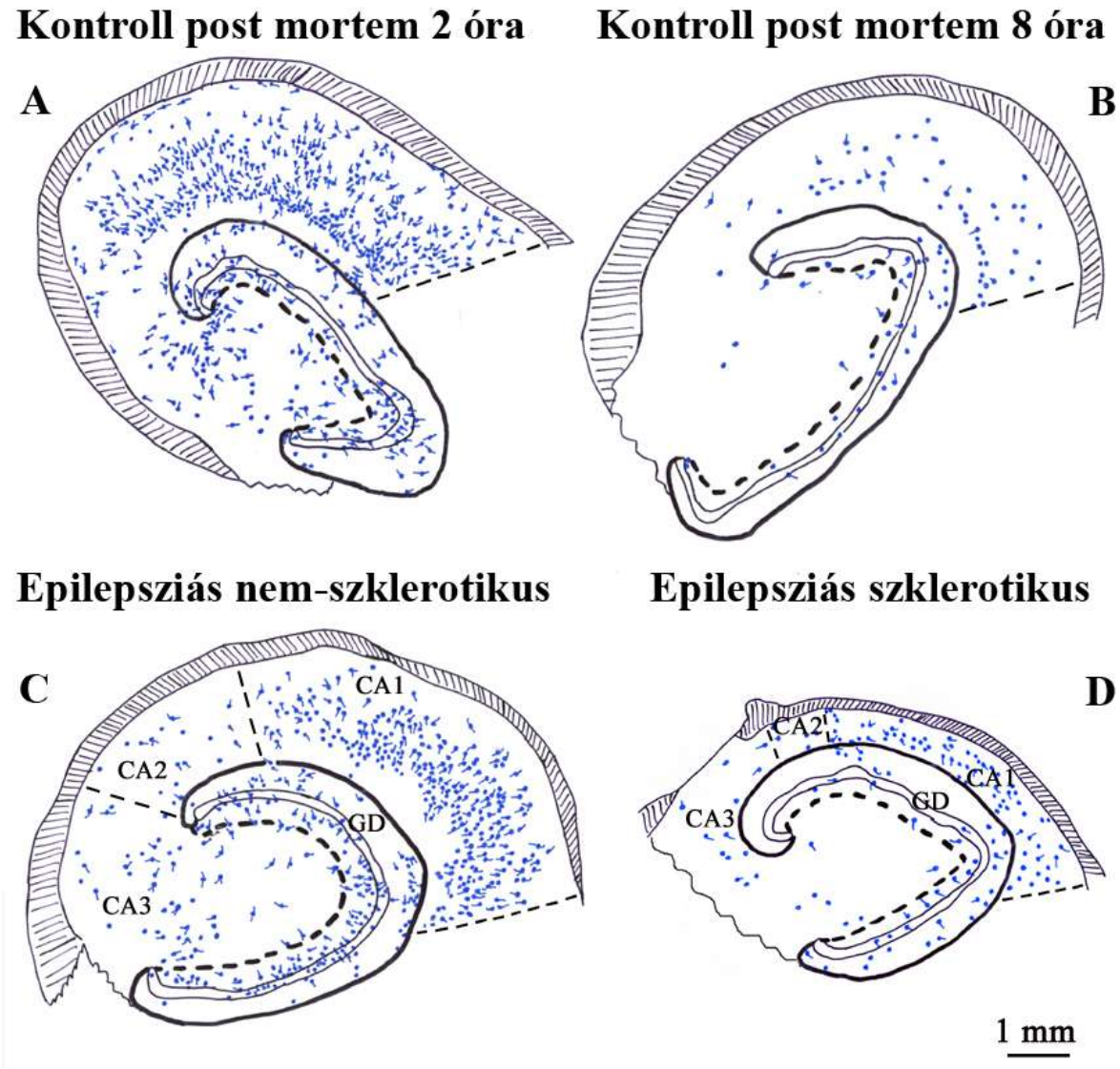
sejtszámot a CA1 régió egységnyi hosszára adjuk (mm) meg szignifikáns sejtszám csökkenést kaptunk ebben az alrégióban is (34,1% a rövid post mortem idejű kontroll mintákhoz viszonyítva; Mann-Whitney U-teszt, $p<0,05$) **(14. Ábra, 6. Táblázat)**.



12. Ábra

A CR-pozitív sejtek eloszlása a kontroll és az epilepsziás hippocampus CA1 régiójában. **A**: a rövid post mortem idejű kontroll mintákban számos immunreaktív sejt látható a CA1 régióban **(nyilak)**. **B, C**: az immunreaktív sejtek mennyisége, valamint a dendritfa kiterjedése kontrollhoz hasonló a nem-szklerotikus enyhe típusban **(B, nyilak)**, és a foltos típusban **(C, nyilak)**. **D**: a szklerotikus esetekben az immunpozitív neuronok száma szignifikánsan lecsökkent **(nyilak)**. A szklerotikus CA1 régió térfogata kisebb a nagyarányú principális sejtpusztulás miatt. **E, F**: nagy nagyítású fénymikroszkópos képeken a CR-pozitív dendritek morfológiai változása figyelhető meg. A nem-szklerotikus foltos típusba sorolható minták esetén **(E)** az immunreaktív dendritek gyöngyözöttek, szegmentáltak, a degeneráció jeleit mutatják **(nyilak)**. A dendritek közötti kapcsolatok ritkábban figyelhetőek meg, mint a kontroll mintákban **(nyílhegyek)**. A szklerotikus esetekben **(F)** többnyire csak erőteljesen felszegmentálódott dendritek láthatók **(nyilak)**. Skála: A-D: 100 μm; E-F: 20 μm

Rövidítések: a.: alveus; s.p.: stratum pyramidale; s.r.: stratum radiatum; s.opr.: stratum oriens-pyramidale-radiatum; s.lm: stratum lacunosum-moleculare; s.m.: stratum moleculare.



13. Ábra

Camera lucida rajzok szemléltetik a CR-pozitív sejtek eloszlását a humán 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)**. Számuk jelentősen lecsökken a hosszú post mortem idejű kontroll mintákban **(B)** és a szklerotikus epilepsziás esetekben **(D).** A nem-szklerotikus mintákban **(C)** a mennyiségük hasonló a rövid post mortem idejű kontroll mintákhoz. A szklerotikus hippocampus térfogata jelentősen lecsökken a CA1 piramissejtek intenzív pusztulása miatt **(D)**. Skála: 1mm

A stratum moleculare és a fissura határán elhelyezkedő, CR-pozitív, feltételezhetően részben Cajal-Retzius sejtek (Abraham és Meyer, 2003) számát külön is meghatároztuk, mivel korábbi közlemények szerint epilepsziában megnő a mennyiségük (Blumcke et al., 1999; Thom et al., 2002). Mi azt találtuk, hogy mennyiségük szignifikánsan lecsökkent mind a hosszú post mortem idejű kontroll mintákban, mind a szklerotikus és a nem-szklerotikus epilepsziás hippocampusban (24,8%, 46,4% és 56,8% a rövid post mortem idejű kontroll mintákhoz viszonyítva; Mann-Whitney U-teszt, $p<0,05$) **(14. Ábra, 6. Táblázat)**.

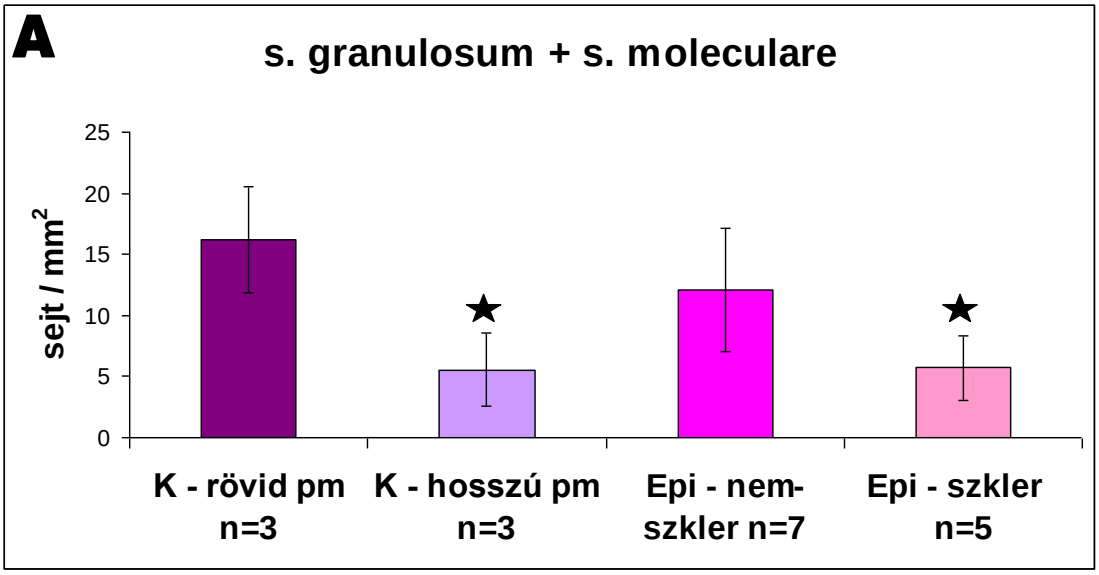
A CR-tartalmú sejtek számbeli csökkenése mellett a morfológiájuk is megváltozik a hosszú post mortem idejű kontroll mintákban. A néhány immunjelölt sejt 1 vagy 2 erősen varikóz, rövid, degenerálódó dendrittel rendelkezik **(11. Ábra)**.

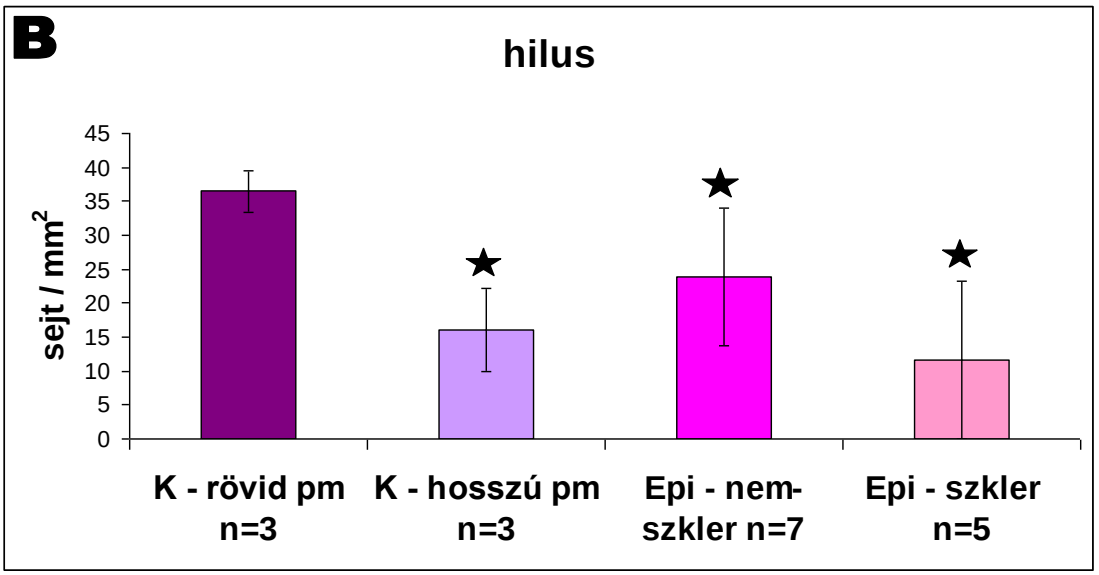
A nem-szklerotikus epilepsziás esetekben a CR-pozitív sejtek megőrződnek ugyan, de alakjuk jelentősen megváltozik. A dendritfa kiterjedése és orientációja hasonló a kontrollhoz, de a dendritek gyöngyözöttek, szegmentáltak, és a degenerálódás jeleit mutatják. A varikóz dendritrészeket elvékonyult szakaszok kötik össze. Különböző CR-pozitív sejtek közötti kontaktusokat ritkábban lehetett látni az epilepsziás mintákban **(12. Ábra)**.

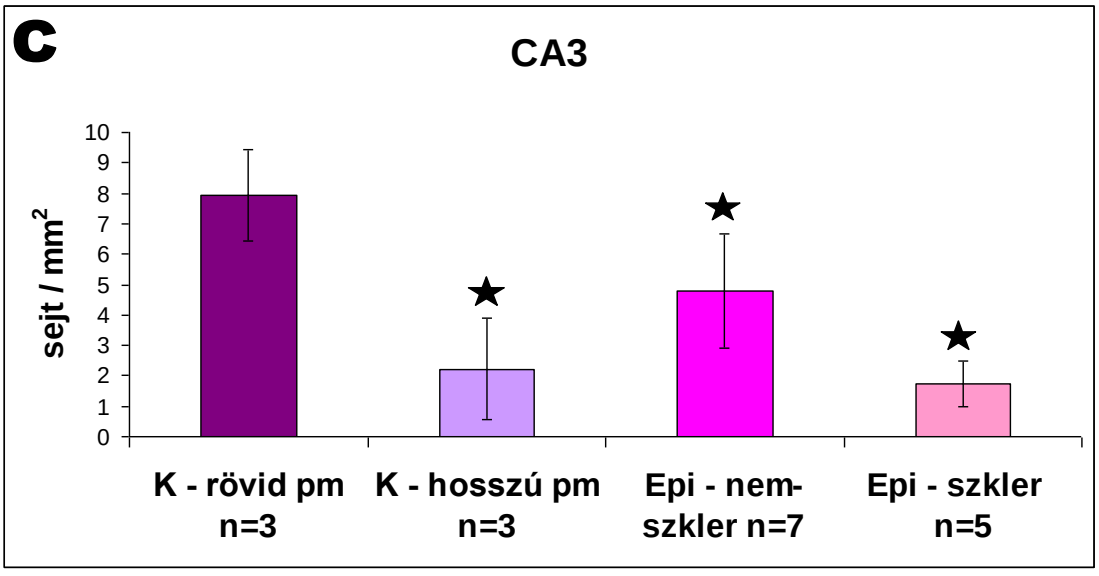
A szklerotikus epilepsziás esetekben a megmaradó immunjelölt sejtek többsége csak 1-2 rendkívül rövid és szegmentált dendrittel bír. A CA1 régióban a dendritek többsége horizontális elhelyezkedést mutatott.

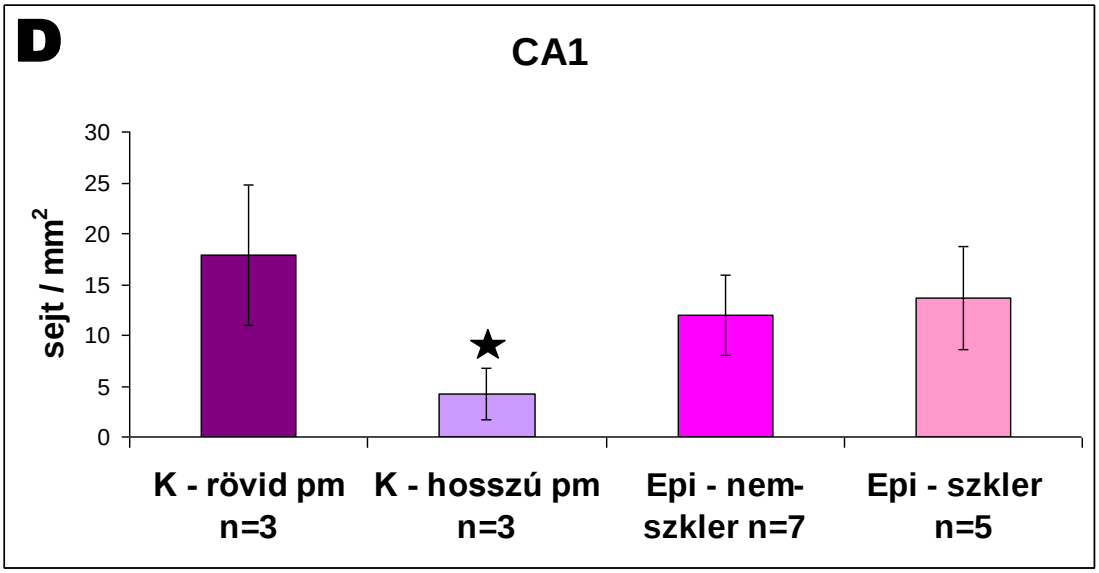
6. Táblázat: A CR-tartalmú sejtek denzitása a hippocampusban. Csillag jelzi a szignifikáns különbséget (Mann-Whitney U-teszt, $p<0,05$).

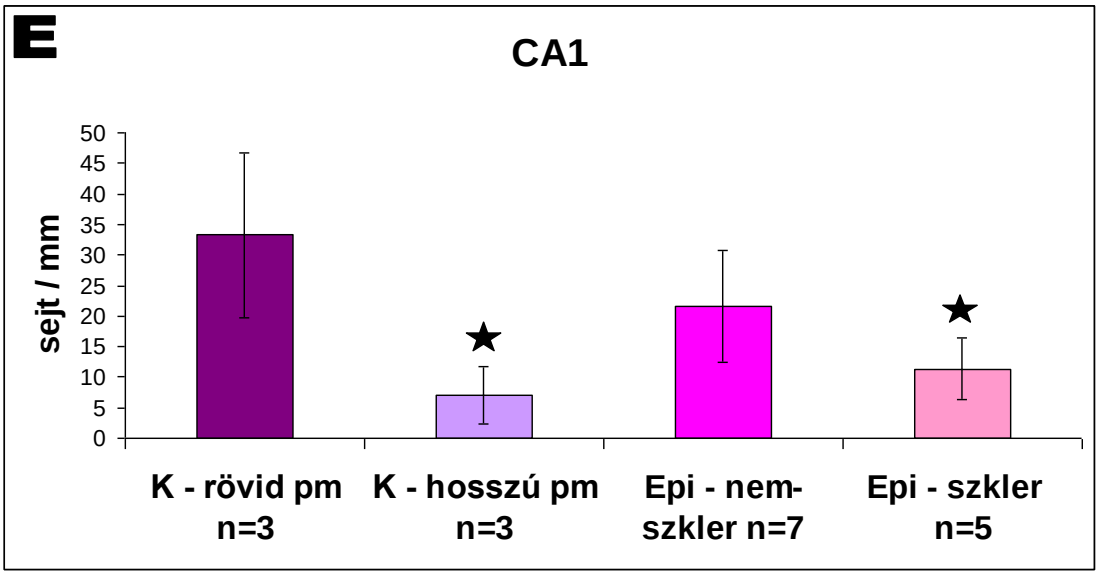
	Átlag ± Szórás			
	Kontroll / rövid post mortem idő (2-4 óra) *n*=3	**Kontroll / hosszú post mortem idő (8-10 óra)** *n*=3	**Epilepsziás / nem-szklerotikus** *n*=7	**Epilepsziás / szklerotikus** *n*=5
Granulosum + moleculare (sejt/mm^2)	16,2±4,3	* 5,6±3,0	12,1±5,0	* 5,7±2,7
hilus (sejt/mm^2)	36,5±3,1	* 16,0±6,1	* 23,8±10,1	* 11,7±11,6
CA3 (sejt/mm^2)	7,9±1,5	* 2,2±1,7	* 4,8±1,9	* 1,7±0,8
CA1 (sejt/mm^2)	17,9±7,0	* 4,2±2,6	11,9±3,9	13,6±5,1
CA1 (sejt/mm)	33,2±13,5	* 7,1±4,7	21,7±9,1	* 11,3±5,0
Horizontális sejtek a stratum moleculare-lacunosum-moleculare határán (sejt/mm)	2,2±0,5	* 0,6±0,2	* 1,3±0,4	* 1,0±0,4

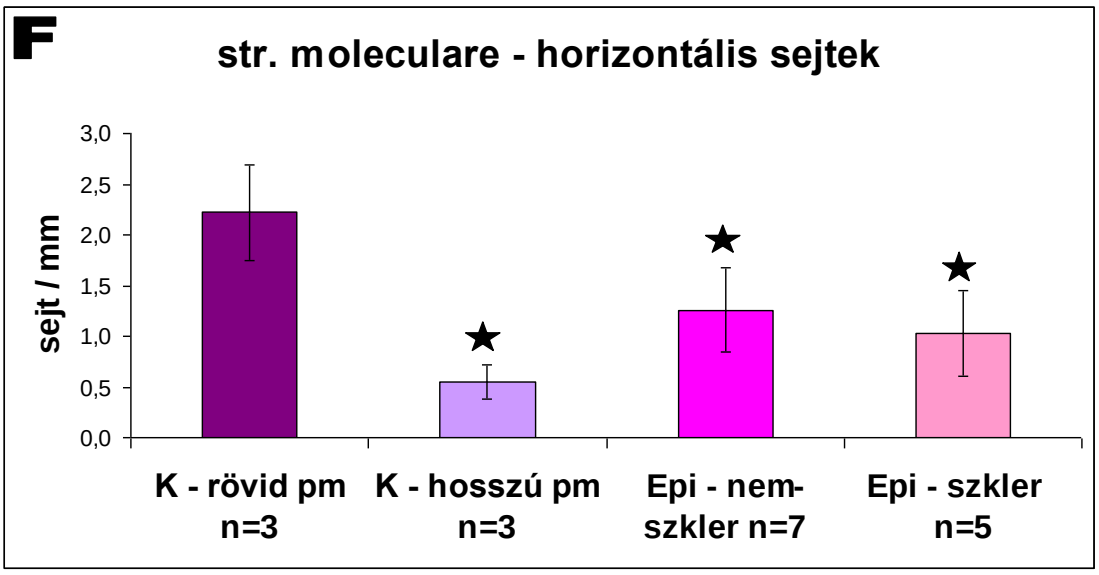

A
s. granulosum + s. moleculare
sejt / mm2
25
20
15
10
5
0
K - rövid pm n=3
K - hosszú pm n=3
Epi - nem-szkler n=7
Epi - szkler n=5


B
hilus
sejt / mm2
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
K - rövid pm n=3
K - hosszú pm n=3
Epi - nem-szkler n=7
Epi - szkler n=5


C
CA3
sejt / mm2
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
K - rövid pm n=3
K - hosszú pm n=3
Epi - nem-szkler n=7
Epi - szkler n=5


D
CA1
sejt / mm2
30
25
20
15
10
5
0
K - rövid pm n=3
K - hosszú pm n=3
Epi - nem-szkler n=7
Epi - szkler n=5


E
CA1
sejt / mm
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
K - rövid pm n=3
K - hosszú pm n=3
Epi - nem-szkler n=7
Epi - szkler n=5


F
str. moleculare - horizontális sejtek
sejt / mm
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
K - rövid pm n=3
K - hosszú pm n=3
Epi - nem-szkler n=7
Epi - szkler n=5

14. Ábra

A CR-pozitív sejtek denzitását kvantitatív módszerekkel is 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 stratum moleculare határán fellelhető, horizontális, feltehetően részben Cajal-Retzius sejtek denzitását **(F)** külön vizsgáltuk. Szignifikánsan kevesebb CR-pozitív sejt található a hippocampus összes alrégiójában a hosszú post mortem idejű mintákban **(A-E)**. A nem-szklerotikus esetekben a CA3-ban **(C)** és a hilusban **(B)** figyelhető meg szignifikáns sejtszám csökkenés. A többi régióban a CR-immunreaktív sejtek mennyisége a rövid post mortem idejű kontrollhoz hasonló. 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, ez magyarázza, miért nem található itt szignifikáns különbség felületegységre vonatkoztatva **(D)**. a CA1 régió egységnyi hosszára vonatkoztatva azonban e régióban is szignifikáns sejtszám csökkenés figyelhető meg **(E)**. A stratum moleculare határán található, feltételezhetően CR-pozitív Cajal-Retzius sejtek mennyisége minden epilepsziás esetben szignifikánsan kisebb volt, és a hosszú post mortem idejű kontroll mintákban is **(F).** A kontrolltól való szignifikáns különbséget csillag jelzi (Mann-Whitney U-teszt, $p<0,05$).

4.7. A CR-pozitív elemek elektronmikroszkópos vizsgálata

Elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk, hogy megvizsgáljuk, változik-e a CR-pozitív interneuronok szinaptikus célelem eloszlása az epilepsziás hippocampusban. 2 perfúzióval fixált kontroll és 6 epilepsziás mintát tanulmányoztunk (3 nem-szklerotikus és 3 szklerotikus). Választásunk a CA1 régióra esett, hogy megvizsgáljuk, a CR-pozitív interneuronok részt vesznek-e a szinaptikus reorganizációban, és ez kapcsolatban áll-e a principális sejtek pusztulásának mértékével.

4.7.1. A CR-pozitív elemek ultrastruktúrája

A CR-tartalmú sejtek ultrastruktúrális jellemzői hasonlóak voltak, a korábban leírtakhoz (Seress et al., 1993a; Nitsch és Ohm, 1995; Urban et al., 2002). A citoplazma általában vékony, kevés számú mitokondriumot tartalmaz. A szinaptikus bemenetek többsége a dendritekre korlátozódott. A 23 megvizsgált CR-pozitív sejttestből mindössze kettő esetében találtunk szimmetrikus szinapszist a szómán. A CR-pozitív dendritek szinaptikus bemenete gyér volt mind a kontroll, mind az epilepsziás mintákban. Zona adherentia jellegű kapcsolatok gyakran voltak megfigyelhetők a CR-pozitív dendritek között, akárcsak patkányban (Gulyas et al., 1992).

A nem-szklerotikus epilepsziás mintákban a CR-immunjelölt sejttestek többsége kontrollhoz hasonló volt. Szklerotikus esetekben azonban, számos degenerálódó CR-pozitív sejttest volt látható erősen karéjos, vagy részben felszeldelt sejtmaggal. A sejtalkotók teljes szétesése is gyakran megfigyelhető volt. Az epilepsziás hippocampusban sok esetben megfigyeltük, hogy a gyöngyözött, szegmentált CR-pozitív dendritek még a nem-szklerotikus mintákban is a degeneráció jeleit mutatták elektronmikroszkópos szinten **(15. Ábra)**. Torz mitokondriumok, felbomló citoplazmatikus mátrix jellemezte a megduzzadt dendritrészeket, míg a környezetükben levő nem-immunpozitív dendritek többsége épnek bizonyult. A CR-pozitív dendritek között zona adherentia jellegű kapcsolatok ritkábban voltak megfigyelhetőek az epilepsziás mintákban, mind nem-szklerotikus, mind a szklerotikus esetekben.

Az epilepsziás mintákban megnövekedett a gliális elemek mennyisége, a CR-pozitív dendritek többsége glia nyúlványokkal volt körülvéve.

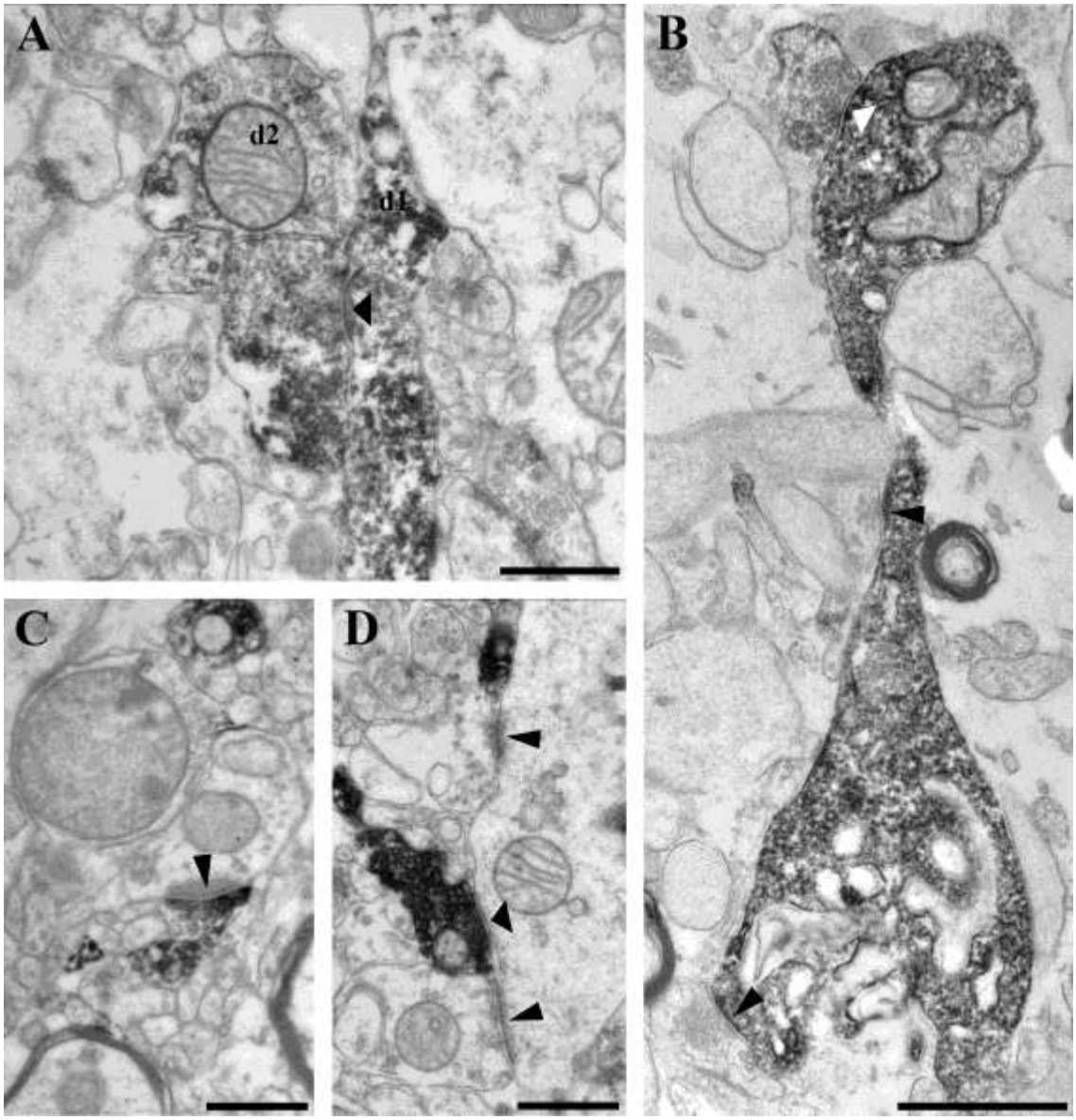
4.7.2. A CR-pozitív terminálisok posztszinaptikus célelem eloszlása

Kétféle CR-pozitív terminálist találtunk a CA1 régióban: az egyik típus szimmetrikus szinapszist adott és a CA1 régió minden rétegében fellelhető volt, a másik aszimmetrikus kapcsolatot hozott létre és zömmel a stratum lacunosum-moleculare területére korlátozódott (Urban et al., 2002). Az előbbiek a lokális CR-tartalmú interneuronok axonterminálisai, míg az utóbbiak feltehetően a thalamikus reuniens magból származnak (Amaral és Cowan, 1980; Bokor et al., 2002). A szimmetrikus és aszimmetrikus kapcsolatok egyértelműen megkülönböztethetőek voltak a posztszinaptikus denzitás alapján **(15. Ábra)**.

A kontroll mintákban a CR-pozitív terminálisok többsége szimmetrikus szinaptikus kapcsolatot hozott létre a stratum oriensben (100% szimmetrikus, n=54) és pyramidale-ban (98% szimmetrikus, n=83), míg a stratum lacunosum-moleculare területén a CR-pozitív terminálisok majdnem fele (44% aszimmetrikus, *n*=98) aszimmetrikus szinapszist adott főként jelöletlen dendritekre és tüskékre **(15. Ábra)**. Az aszimmetrikus szinapszist adó CR-pozitív terminálisok aránya megnőtt az epilepsziás CA1 régióban. A szimmetrikus szinapszist adó terminálisok aránya lecsökkent a stratum oriensben (84% szimmetrikus, n=81) és lacunosum-moleculare-ban (20% szimmetrikus, n=175) a nem-szklerotikus szövetekben és a stratum oriens-pyramidale-radiatumnak megfelelő területen a szklerotikus minták esetében (66% szimmetrikus, n=91) **(16. Ábra)**.

Jelen dolgozatban a lokális CR-tartalmú interneuronokra fókuszáltunk, így a szimmetrikus szinapszist adó CR-pozitív terminálisok célelemeit vizsgáltuk meg részletesen.

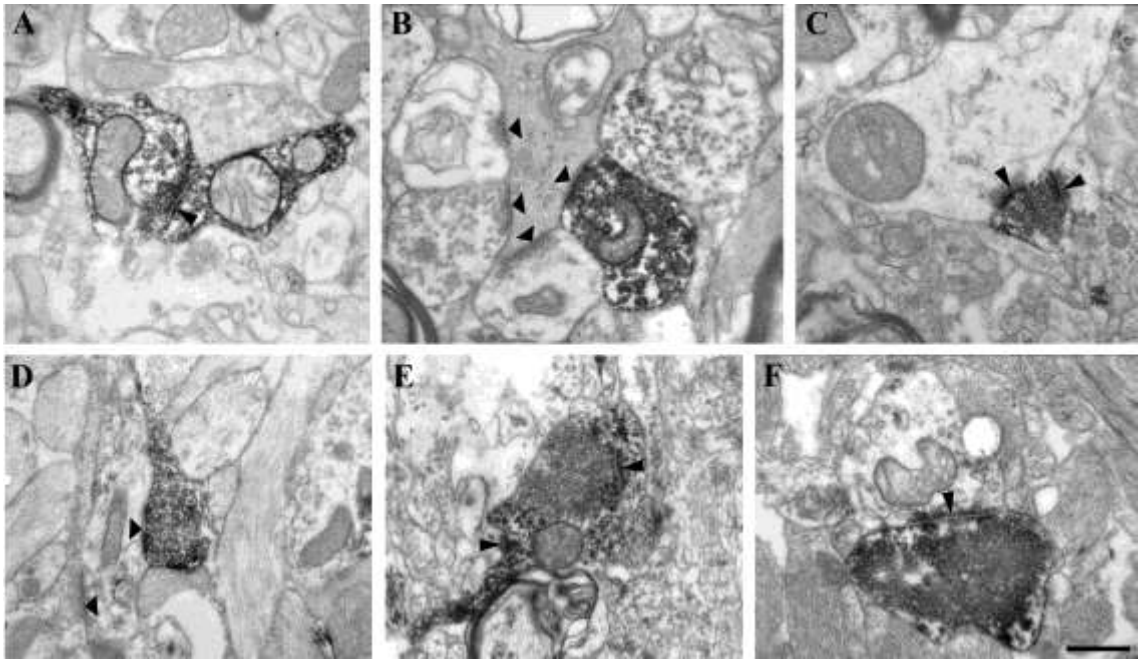
A posztszinaptikus célelemeket az elektronmikroszkópos morfológiájuk vagy CR tartalmuk alapján osztályoztuk piramissejt dendritként, jelöletlen interneuron dendritként, CR-pozitív interneuron dendritként és tüskeként. Mindig találtunk olyan posztszinaptikus elemeket is, melyeket nem tudtunk besorolni, ezeket azonosítatlan dendritként említjük. A posztszinaptikus dendritek beazonosítása a dendritek helye, morfológiája, és szinaptikus bemeneteinek mennyisége és minősége alapján történt. Az interneuron dendritek általában nagyobb, jellegzetes morfológiájú mitokondriumokkal rendelkeznek, valamint a piramissejt dendritek (a tüskékkel ellentétben) általában nem kapnak aszimmetrikus szinaptikus bemenetet a patkány CA1 régió radiatum és oriens rétegeiben (Megias et al., 2001).



15. Ábra

Nagy nagyítású elektronmikroszkópos képek kontroll **(A, C, D)** és epilepsziás **(B)** CA1 régióból. A CR-pozitív interneuronok terminálisai szimmetrikus szinaptikus kapcsolatot létesítenek **(A, B, D, vastag nyílhegyek)** gyakran CR-pozitív dendriteken **(A, d1)**. Nem jelölt interneuron dendritek szintén kapnak szinaptikus bemenetet CR-pozitív feltehetően gátló terminálisoktól **(D)**. A stratum lacunosum-moleculare határán a CR-tartalmú terminálisok egy része aszimmetrikus szinaptikus kapcsolatot létesít leggyakrabban nem jelölt dendritekkel, jellegzetesen vastag posztszinaptikus denzitással **(C, vékony nyílhegyek)**. A **B** ábrán egy-egy varikóz dendritszakaszt láthatunk gliális elemekkel körülvéve. A dendrit kiszélesedő szakasza degenerálódó citoplazmatikus organellumokat tartalmaz, de szinaptikus bemenetek még megfigyelhetőek, egy

szimmetrikus szinaptikus kapcsolat egy CR-pozitív terminálistól **(vastag fehér nyílhegy)** és két aszimmetrikus szinaptikus kapcsolat jelöletlen terminálisoktól **(vékony fekete nyílhegyek)**. Skála: A, C, D: 0,5 μm; B: 10 μm



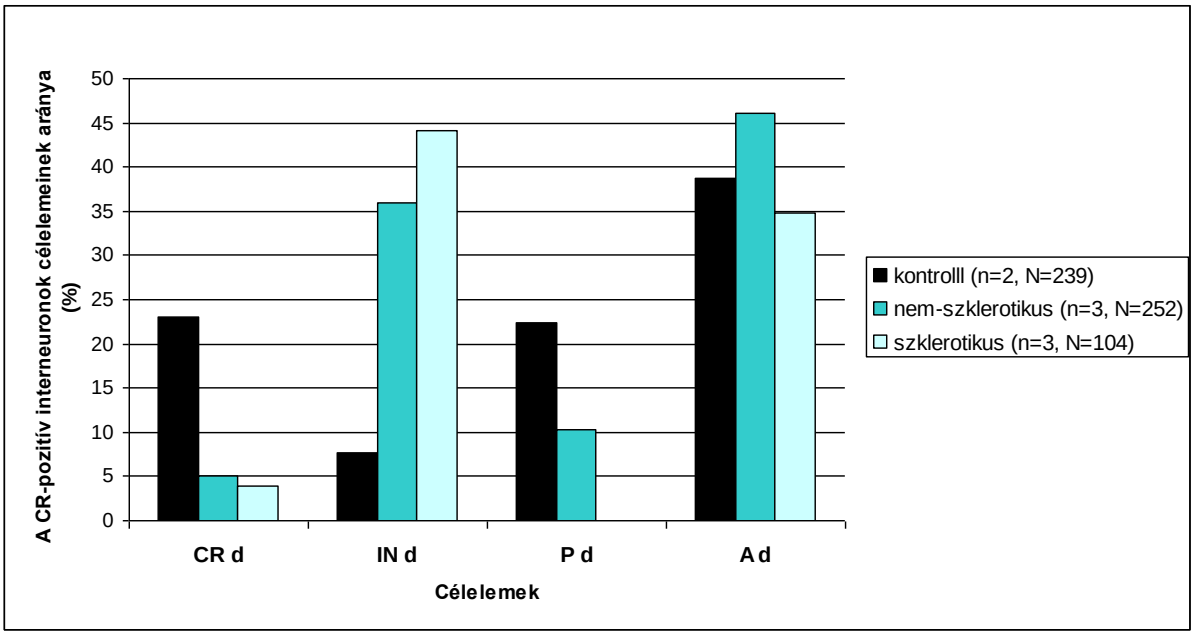
16. Ábra

Nagy nagyítású elektronmikroszkópos képek epilepsziás nem-szklerotikus **(A, B, C)** és szklerotikus **(D, E, F)** CA1 régióból. CR-pozitív interneuron terminálisokat, melyek CR-tartalmú dendriteket idegeznek be, ritkábban látni az epilepsziás mintákban **(A)**. Főleg nem jelölt interneuron dendriteken végződnek mind nem-szklerotikus **(B)**, mind szklerotikus **(D)** esetekben. A **B** ábrán egy degenerálódó, nem jelölt interneuron dendritet láthatunk, mely számos szinaptikus kapcsolatot kap, egyet egy CR-pozitív- és hármat nem jelölt interneuronoktól. A **C** ábrán egy stratum lacunosum-moleculare-beli CR-pozitív terminális látható, mely egy nem-jelölt dendrittel és egy tüskével szinaptizál. A szklerotikus mintákban a CR-pozitív interneuronok leggyakoribb célelemei szintén nem jelölt interneuron dendritek **(D).** Az aszimmetrikus szinapszist adó CR-tartalmú terminálisok aránya megnő epilepsziában. Az **E** és az **F** ábrán CR-pozitív terminálisok figyelhetők meg, melyek egy CR-tartalmú dendriten, egy tüskén **(E)**, és egy nem jelölt interneuron dendriten végződnek **(F)**. Skála: 0,5 μm.

A kontroll mintákban a CR-tartalmú interneuronok leggyakoribb posztszinaptikus célelemei CR-pozitív dendritek (23%) és piramis sejt dendritek (22,4%) voltak **(17. Ábra)**. Jelöletlen interneuron dendritek és tüskék ritkábban voltak megfigyelhetők a célelemek között (7,6% és 2,12%) **(17. Ábra)**. A célelemek maradék 44%-a nem volt beazonosítható. Ehhez képest az epilepsziás mintákban szignifikánsan kevesebb CR-pozitív dendrit fordult elő a célelemek között (5,13% a nem-szklerotikusban és 3,16% a szklerotikusban) **(17. Ábra)**.

A nem-szklerotikus esetekben a leggyakoribb célelemek nem-jelölt interneuron dendritek voltak (35,9%). Piramis sejt dendritek szintén előfordultak a célelemek között, bár kisebb számban, mint a kontroll mintákban (10,3%) **(17. Ábra)**. Tüskék csak ritkán voltak megfigyelhetőek (2,56%).

A szklerotikus esetekben a leggyakoribb célelem szintén interneuron dendrit volt (44,19%). Piramis sejt dendritek nem voltak jelen a célelemek között, mely magyarázható a nagyfokú principálissejt-pusztulással **(17. Ábra)**.



17. Ábra

A CR-pozitív interneuronok szinaptikus target szelektivitása megváltozik az epilepsziás CA1 régióban. A kontroll mintákban a CR-tartalmú interneuronok terminálisai

interneuron dendriteken (nagyobbrészt CR-pozitívakon, és kisebb részt nem-jelölteken) és principális sejt dendriteken végződnek. A CR-tartalmú dendritek aránya a posztszinaptikus célelemek között lecsökken mind a nem-szklerotikus, mind a szklerotikus mintákban. A nem jelölt interneuron dendritek aránya a célelemek között megnő mindkét patológiai csoportban. A piramis sejt dendritek aránya lecsökken a nem-szklerotikus esetekben, a szklerotikus mintákban pedig egyáltalán nem szerepeltek a célelemek között.

Rövidítések: CR d: CR-pozitív dendrit; IN d: interneuron dendrit; P d: piramis sejt dendrit; A d: azonosítatlan dendrit; n: mintaszám; N: a megvizsgált CR-pozitív axonterminálisok száma.

4.8. A CR-tartalmú interneuron-szelektív gátlósejtek célelemeinek azonosítása

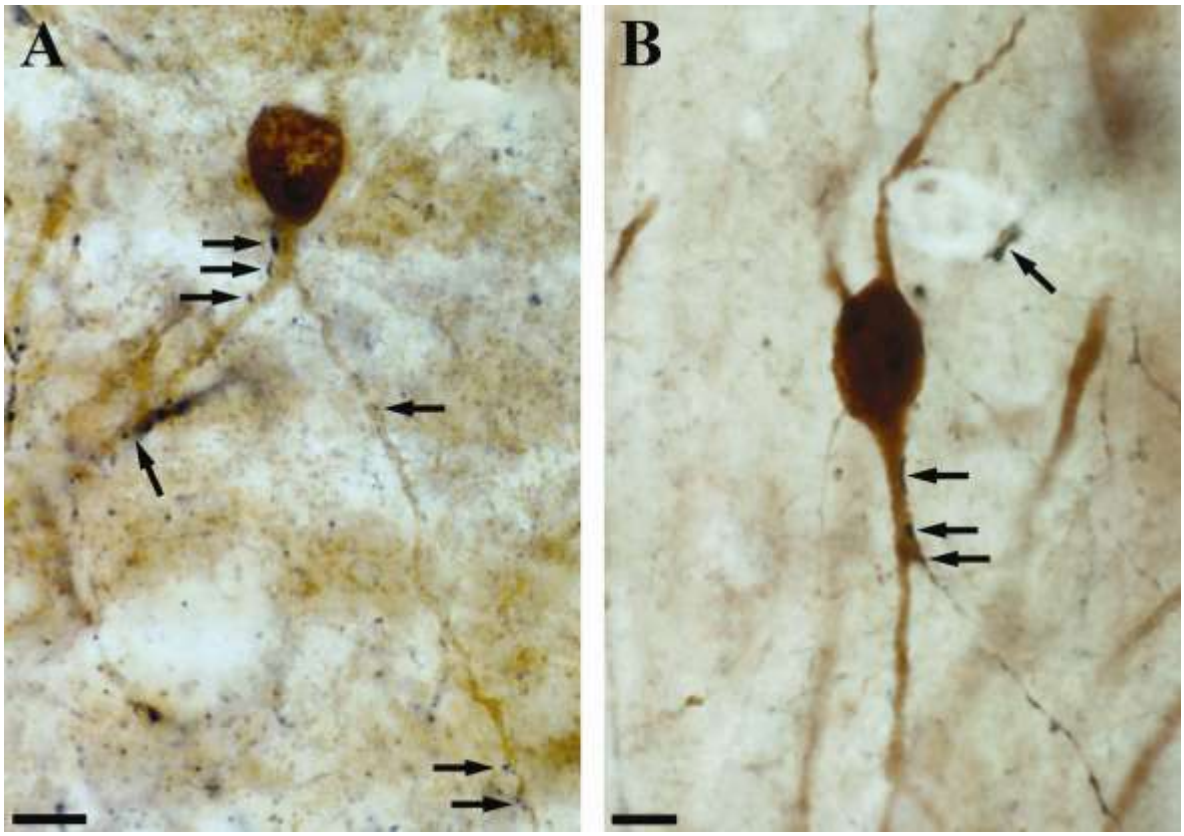
A patkány hippocampus CR-pozitív sejtjei interneuron-szelektív gátló sejtek, melyek főként a CB-tartalmú interneuronokat idegzik be a CA1 régióban (Gulyas et al., 1996). A humán hippocampusban található CR-pozitív sejtek egy része szintén ebbe a funkcionális típusba tartozik (Urban et al., 2002), azonban azt még nem vizsgálták, hogy ezek a humán hippocampusban szintén beidegzik-e a CB-tartalmú interneuronokat.

CR-CB kettős immunfestést alkalmaztunk a DAB-DAB-Ni módszerrel annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy a CB-pozitív interneuronok – melyek nagyrészt a piramissejtek dendritikus régióját idegzik be és nagyszámban túlélnek az epilepsziás hippocampusban (Wittner et al., 2002) – a humán hippocampusban is célelemei-e a CR-tartalmú interneuronoknak. Az immunpozitív elemek könnyen megkülönböztethetőek voltak: a CR-pozitív elemek feketék, a CB-pozitívak pedig barnák voltak a fénymikroszkópban.

A CB immunfestés (barna csapadék) a humán kontroll CA1 régióban interneuronokat és piramis sejteket jelöl, melyek megkülönböztethetőek voltak, hiszen az interneuronok erősebben festődnek (Seress et al., 1991, 1992; Wittner et al., 2002), bipoláris vagy multipoláris alakkal rendelkeznek (Seress et al., 1991) és minden rétegben fellelhetőek (Freund és Buzsaki, 1996). A CR immunfestés (fekete csapadék)

interneuronokat jelölt a CA1 régióban (lásd fentebb) és axonokat, legnagyobb sűrűségben a stratum moleculare belső harmadában és a stratum lacunosum-moleculare stratum radiatumhoz közelebb eső harmadában.

A CR-tartalmú axonterminálisok sokszor létesítettek kontaktusokat CB-pozitív interneuron dendritekkel mind a kontroll, mind a nem-szklerotikus epilepsziás esetekben **(18. Ábra)**. Ezek feltehetően a lokális CR-tartalmú interneuronokból származó gátló szinaptikus kapcsolatok voltak, tekintve, hogy a vizsgált CB-pozitív dendritek a stratum oriensben vagy a stratum radiatumban, közel a stratum pyramidale-hoz helyezkedtek el, és ezekről a rétegekről egy korábbi elektronmikroszkópos vizsgálat már kimutatta, hogy aszimmetrikus szinapszist adó CR-pozitív terminálisokat nem tartalmaz (Urban et al., 2002) és ezt a mi elektronmikroszkópos vizsgálataink is igazolták. Tehát bizonyítottuk, hogy patkányhoz (Gulyas et al., 1996) hasonlóan a humán hippocampus CR-pozitív interneuronjai is végződnek CB-tartalmú gátlósejteken.



18. Ábra

CB-CR kettős immunfestés a DAB-DAB-Ni módszert alkalmazva. A CB immunfestés (DAB, barna csapadék) interneuronokat valamint piramis sejteket jelöl a CA1 régióban. A CB-tartalmú interneuronok és piramis sejtek egyértelműen megkülönböztethetőek a festés intenzitása, a morfológiájuk, és helyük alapján. A CR-immunfestés (DAB-Ni, fekete csapadék) számos interneuront jelöl a CA1 régióban. A CB-pozitív interneuronok dendritjei gyakran kapnak vélhetően szinaptikus kapcsolatokat CR-tartalmú axon terminálisoktól mind kontroll **(A)**, mind nem-szklerotikus epilepsziás **(B)** mintákban. Ezek vélhetően lokális interneuronoktól származó gátló kapcsolatok, mivel a vizsgált CB-pozitív dendritszakaszok a stratum oriensben és radiatumban (közel a stratum pyramidale-hoz) voltak megfigyelhetők, és az elektronmikroszkópos vizsgálatok eredménye szerint ezek a területek mentesek az aszimmetrikus (feltehetően serkentő) szinapszist adó CR-pozitív terminálisoktól. Skála: 10 μm

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. SPR-immunpozitív sejtek változásai

5.1.1. Az SPR-pozitív interneuronok részt vesznek a dendritikus gátlásban a humán hippocampusban

A humán hippocampus SPR-pozitív interneuronjai különböznek a patkányban leírt SPR-pozitív gátlósejtektől. Patkány hippocampusban az SPR-tartalmú sejtek morfológiai és funkcionális értelemben is heterogének, és sok más neurokémiai markerrel kolokalizálnak (Acsady et al., 1997; Sloviter et al., 2001). Ezzel szemben a humán hippocampusban immunfluorescens kettős festésekkel kimutattuk, hogy csupán a dendritikus gátlósejteket festő CB-nal mutatnak átfedést. A többi dendritikus gátlósejt markerrel (CCK, SOM, CR), a periszomatikus gátlósejt markerekkel (PV, CCK) és az interneuron szelektív gátlósejt markerrel (CR) nem volt kimutatható számottevő kolokalizáció **(5. Ábra, 5, 6. Táblázat)**.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az SPR-pozitív interneuronok egy része a dendritikus gátlásban vesz részt. Mivel az SPR-tartalmú sejtek nagy részét nem tudtuk más ismert neurokémiai markerekkel vizualizálni, ezért a kérdés nyitott marad, hogy e sejtek többsége a dendritikus, interneuron-specifikus vagy a periszomatikus gátlásban vesz-e részt a humán hippocampusban.

Kimutattuk, hogy jelentős átfedés van az SPR- és a CB-tartalmú sejtek között, és a kettős jelölt sejtek aránya megnőtt az epilepsziás mintákban **(4, 5. Táblázat)**. A CB-pozitív interneuronokról kimutatták, hogy megmaradnak az epilepsziás hippocampusban mind humán mintákban (Sloviter et al., 1991; Magloczky et al., 2000; Suckling et al., 2000; Wittner et al., 2002), mind epilepszia modellben (Sloviter, 1989; Freund et al., 1992; Magloczky és Freund, 1993; Bouilleret et al., 2000). A CB/SPR kettős jelölt interneuronok nagyobb aránya az epilepsziás mintákban utalhat arra, hogy a CB-t is tartalmazó SPR-pozitív sejtek kevésbé érzékenyek epilepsziára, mint a CB-t nem tartalmazók, vagy a CB megjelenik az életben maradó sejtekben.

5.1.2. Az SPR-pozitív sejteket érintő változások a humán epilepsziás CA1 régióban

Eredményeink szerint az SPR-tartalmú interneuronok megőrződnek az epilepsziás humán hippocampus CA1 régiójában. A nem-szklerotikus esetekben a mennyiségük és eloszlásuk hasonló a kontroll mintákhoz, míg a szklerotikus esetekben a számuk lecsökken **(2, 4, 5. Ábra)**. Azonban a sejtek morfológiája jelentősen megváltozik az epilepsziás mintákban. A nem-szklerotikus szövetben az SPR-pozitív sejtek dendritjei gyöngyözötté válnak, és dendritfájuk kiterjedtebbé válik, több elágazást tartalmaz, amit kvantitatív vizsgálattal is igazoltunk **(3, 4, 6. Ábra)**.

A varikozitások jelenléte csökkentheti a dendritek passzív elektromos tulajdonságait azáltal, hogy az elkeskenyedő szakaszokon megnő a dendritek belső ellenállása (Ellias és Stevens, 1980). Elképzelhető, hogy ezáltal a varikozitások aktívan szerepet játszanak abban, hogy lecsökkenjen a dendritekben a serkentő és gátló szinaptikus áramok elektrotónusos vezetése (Hahm et al., 2011).

Ez a morfológiai változás, több folyamat eredményeképpen is létrejöhet. In vivo kísérletekben kimutatták, hogy az SPR-tartalmú sejtek dendritjei varikózzá válnak, ha SP-t juttatnak a vizsgált agyterületre, mely a receptorok endoszomális rendszerbe történő visszavételével jár (Mantyh et al., 1995a; Mantyh et al., 1995b) és a mikrotubulusok lokális átrendeződése, depolimerizációja okozza (Ellias és Stevens, 1980; McNeil et al., 1999; Hahm et al., 2011). A kontroll humán hippocampus SP forrását egyrészt SP-tartalmú sejtek adják, melyek nagy számban fellelhetőek ezen agyterületen (Lotstra et al., 1988), másrészt a supramammillaris magból a GD-ba és a CA2-be vetítő axonköteg, melyről kimutatták, hogy SP-t is tartalmaz (Gall és Selawski, 1984; Davies és Kohler, 1985; Ino et al., 1988; Yanagihara és Niimi, 1989; Nitsch és Leranth, 1994; Borhegyi és Leranth, 1997a; Borhegyi és Leranth, 1997b). Állatmodellben kimutatták, hogy a hippocampális principális sejtek erőteljesen megnövelik SP-expressziójukat epilepsziában (Liu et al., 1999a; Liu et al., 2000; Wasterlain et al., 2000). Továbbá a supramammillo-hippocampális pálya – ami a hippocampális SP fő forrása – sarjadzik, kiterjed a humán epilepsziás hippocampusban (Magloczky et al., 2000). Mindezek arra utalnak, hogy a megnövekedett SP szint a legvalószínűbb oka a varikóz SPR-pozitív dendritek megjelenésének a nem-szklerotikus epilepsziás mintákban. A nagyobb mennyiségű endogén SP hatására kialakuló

varikozitásoknak a fent említett mechanizmus révén protektív szerepe is lehet azáltal, hogy csökkenthetik a serkentő bemenetek elektrotónusos terjedését (Hahm et al., 2011).

A sejtek kiterjedtebb dendritfája a nem-szklerotikus mintákban szintén a substance P rendszer működésének fokozódását jelentheti, mely valószínűleg egy kompenzációs mechanizmus mely a dendritikus gátlás hatékonyságát növelheti.

Egy másik lehetséges magyarázat a dendritek gyöngyözötté válására az excitotoxikus sérülés. Ezt a szklerotikus minták esetében alátámasztja, hogy sok degenerálódó SPR-pozitív elemet lehetett látni a szklerotikus epilepsziás CA1 régióban **(2, 3, 4, 6. Ábra)**, valamint az, hogy a szklerotikus esetekben az SPR-tartalmú sejtek mennyisége jelentősen lecsökken **(2, 4, 5. Ábra)**. A dendritelágazási pontok számának csökkenése a szklerotikus CA1-ben tovább erősíti ezt a hipotézist **(3, 4, 6. Ábra, 3. Táblázat)**. Az SP jelentősen képes növelni a sejtek serkenthetőségét (Lu et al., 2009), ezért a fokozott SP tónus excitotoxikus lehet ezeken a sejteken.

A nem-szklerotikus esetekben a dendritfa kiterjedését tapasztaltuk **(4, 6. Ábra)**. A nagyszámú rövid, torz, varikóz dendrit jellegzetesen az éretlen sejtekre jellemző (Seress és Ribak, 1990; Seaylowe és Claiborne, 1992), melyek létrejöttét a fejlődéshez hasonlóan epilepsziában is indukálhatják a neurotrophinok. A brain derived neurotrophic factor (BDNF) szintjéről (Mathern et al., 1997b; Poulsen et al., 2004), valamint specifikus receptorának a TrkB-nek a mennyiségéről (Rocamora et al., 1992; Dugich-Djordjevic et al., 1995; Goutan et al., 1998) kimutatták, hogy megemelkedik epilepsziás aktivitás után. A fejlődés során a CB-tartalmú interneuronok túlélését, és differenciálódását elősegíti a BDNF (Lowenstein és Arsenault, 1996; Pappas és Parnavelas, 1997; Fiumelli et al., 2000). Mivel a CB-tartalmú SPR-pozitív sejtek túlélnek az epilepsziás mintákban, elképzelhető, hogy a megnövekedett BDNF szint segíti elő a túlélésüket, valamint a dendritfájuk kiterjedését.

Több jelenség is utal arra, hogy epilepsziában a dendritikus gátlás nem működik megfelelően. Epilepsziában a dendritikus gátlósejtek érzékenységéről számol be számos publikáció. A somatostatin- és a neuropeptid Y-tartalmú dendritikus gátlósejtek is érzékenynek bizonyultak (de Lanerolle et al., 1988; Sundstrom et al., 2001) és a dendritikus gátlás csökkenéséről számol be Cossart és munkatársai állatmodellben is (Cossart et al., 2001). Az SPR-pozitív sejtek dendritfájának kiterjedése a nem-szklerotikus esetekben utalhat az SP-rendszer fokozott működésére, mely elképzelhető,

hogy egy kompenzációs mechanizmus, és az SPR-tartalmú gátlósejtek által közvetített dendritikus gátlás hatékonyságát növeli.

5.1.3. Az SPR-pozitív interneuronokat érintő szinaptikus reorganizáció a humán epilepsziás CA1 régióban

A CB-tartalmú interneuron dendritekhez hasonlóan (Wittner et al., 2002) az SPR-pozitív interneuron dendritekre érkező gátló bemenetek aránya is megnő a szklerotikus CA1 régióban **(10. Ábra).** Ez a növekedés magyarázható a rezisztens interneuronok axonjainak sarjadzásával, ahogy azt leírták a CB-tartalmú interneuronok esetében is (Wittner et al., 2002). Az aszimmetrikus szinaptikus bemenet megőrződése a szklerotikus mintákban utalhat a régióban végződő serkentő pályák sarjadzására, hiszen a régió principális sejtjei, a CA1 piramissejtek többsége elpusztul. A fent idézett korábbi tanulmányhoz hasonlóan (Wittner et al., 2002) mi is megfigyeltünk mohaterminális-szerű axonvégződéseket a CA1 régióban az SPR-pozitív dendriteken. Elképzelhető, hogy ezek a terminálisok a szemcse-sejtekből erednek, mely azt jelentené, hogy a moharost sarjadzás a CA1 régiót is eléri a szklerotikus humán hippocampusban (Mathern et al., 1997a; Wittner et al., 2009). Emelett a rezisztens CA2 és CA3 piramis sejtek is képezhetik egy lehetséges forrását az SPR-pozitív sejtekre érkező aszimmetrikus bemeneteknek. A CA1 régió entorhinális kéregből származó bemeneteinek sarjadzását (Shetty, 2002), valamint a subiculumból a CA1 stratum radiatumba érkező serkentő vetítés megjelenését leírták epilepszia állatmodellben (Lehmann et al., 2001), de emellett a thalamikus nucleus reuniensből érkező serkentő bemenetek sarjadzása sem elképzelhetetlen.

5.2. A CR-immunpozitív sejtek változásai

5.2.1. Az életkor, a fixálás és a post mortem idő hatása a CR-immunfestésre

Eredményeink azt mutatják, hogy a CR-immunfestett sejtek számát a hippocampusban jelentősen befolyásolja a post mortem idő hossza. A legjobb immunfestést, és a legmagasabb CR-immunjelölt sejtszámot a rövid post mortem idejű, perfundált kontroll minták esetén kaptuk. A hosszú post mortem idejű kontroll mintákban az immunpozitív sejtek száma jelentősen kisebb volt **(11, 13, 14. Ábra, 6. Táblázat)**.

Állatmodellben kimutatták, hogy a CR-tartalmú interneuronok érzékenyek ischaemiára és ischaemia előidézése után 6 órával argirofillé válnak (Freund és Magloczky, 1993). Eredményeink utalhatnak arra, hogy ezek a sejtek az emberi hippocampusban is érzékenyek oxigén- és energiaszegény állapotokra és a fixálás előtti hosszú post mortem időre. Lehetséges továbbá, hogy a sejtek változatlan formában jelen vannak, csupán az immunfestés érzékeny a hosszú post mortem időre a calretinin fehérje gyors lebomlása miatt. Ezért fontos rövid post mortem idejű, jól fixált kontroll mintákat használni, amikor e sejttípust érintő változásokat vizsgáljuk az epilepsziás humán hippocampusban.

5.2.2. A CR-pozitív interneuronok érzékenyek epilepsziára

A CR-tartalmú sejtek az állatmodellekhez hasonlóan (Magloczky és Freund, 1993; Andre et al., 2001; Slezia et al., 2004; Tang et al., 2006) a humán hippocampusban is érzékenyek epilepsziára. A principális sejtpusztulás mértékétől függően számuk megváltozik: míg a nem-szklerotikus mintákban megőrződnek, addig a szklerotikus esetekben mennyiségük szignifikánsan lecsökken (**12, 13, 14. Ábra, 6. Táblázat)**. Az epilepsziás CA3 régióban és a hilusban csak kevés CR-pozitív sejt marad meg még a nem-szklerotikus esetekben is **(14. Ábra, 6. Táblázat)**, ezeken a területeken mutatják a CR-tartalmú sejtek a legnagyobb érzékenységet, mely összefüggésben állhat

a sarjadzott mohaterminálisok által közvetített megnövekedett serkentő bemenettel (Shan et al., 2002).

Megfigyeléseink ellentétben állnak Blümcke és munkatársai eredményeivel, miszerint a CR-tartalmú sejtek megőrződnek epilepsziában, és mennyiségük meg is nő (Blumcke et al., 1996; Blumcke et al., 1999). Ez valószínűleg az általuk használt hosszú post mortem idejű kontroll mintákkal magyarázható, melyekről kimutattuk, hogy szignifikánsan csökken a CR-immunfestés bennük.

A horizontális CR-pozitív sejtekről a stratum moleculare-fissura határán (feltételezett Cajal-Retzius sejtek) kimutatták, hogy megnő a számuk epilepsziában (Blumcke et al., 1996; Thom et al., 2002). Ábrahám és Meyer bizonyították, hogy a többsége ezeknek a CR-pozitív sejteknek valóban reelint expresszáló Cajal-Retzius sejt (Abraham és Meyer, 2003). A Cajal-Retzius sejtekről és az általuk termelt reelinről kimutatták, hogy részt vesznek az epilepsziás funkciózavarban, epilepsziamodellben a szemcsesejtek diszperzióját megakadályozta az exogén reelin alkalmazása (Heinrich et al., 2006; Muller et al., 2009). Ezért fontos tisztázni a sorsukat humán epilepsziában. Jelen tanulmányban a kérdéses terület részletes elemzésével bizonyítottuk, hogy a CR-pozitív sejtek száma ebben a régióban is lecsökkent **(14. Ábra, 6. Táblázat)**.

Eredményeink megerősítik azokat a vizsgálatokat, melyek kimutatták, hogy a CR-tartalmú sejtek érzékenyek epilepsziára mind állatmodellben, mind humán TLE-ban (Magloczky és Freund, 1993; Magloczky et al., 2000; Suckling et al., 2000; Andre et al., 2001; Slezia et al., 2004; van Vliet et al., 2004; Tang et al., 2006), továbbá arra utalnak, hogy a Cajal-Retzius sejtek szintén érzékenyek.

Felmerül a kérdés, hogy a CR-tartalmú sejtek valóban elpusztulnak a szklerotikus mintákban, esetleg a CR expressziója csökken le bennük, vagy az antigén felismerése gátolt a fehérje valamilyen konformáció-változása miatt, mint egy másik kalciumkötő fehérje, a parvalbumin esetén (Johansen et al., 1990; Magloczky és Freund, 1995; Wittner et al., 2001). Az utóbbi két lehetőség valószínűtlen, mivel a CR-pozitív sejtek degenerálódására utaló jelek mind fény- mind elektron mikroszkópos szinten megfigyelhetőek epilepszia és ischaemia modellekben (Magloczky és Freund, 1993; Andre et al., 2001; Slezia et al., 2004) (Freund és Magloczky, 1993; Tang et al., 2006), valamint humán TLE-ban (Magloczky et al., 2000; Suckling et al., 2000) beleértve a

jelen tanulmányt is. Ezért a CR-tartalmú sejtek számának csökkenése a szklerotikus humán hippocampusban nagy valószínűséggel ezen sejtek irreverzibilis sérülésére utal.

A túlélő CR sejtek dendritjeinek morfológiája megváltozik az epilepsziás mintákban, a dendritek gyöngyözötté, szegmentálttá válnak **(12. Ábra)**. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a dendritek szerkezete sérült, már a nem-szklerotikus esetekben is **(15. Ábra)**, ahol mind a CR-pozitív sejtek, mind a principális sejtek még változatlan mennyiségben vannak jelen **(12, 13, 14. Ábra)**. A varikóz dendritek kialakulását valószínűleg az excitotoxikus sérülés okozza, mely a megnövekedett serkentés következtében intenzívebb víz és ionbeáramlásra vezethető vissza (Olney, 1978; Olney et al., 1986; Seitelberger et al., 1990; Emery és Lucas, 1995; Park et al., 1996; Hasbani et al., 1998).

A kontroll mintákban megfigyelhető, hogy a CR-pozitív sejtek dendritjei gyakran szorosan egymás mellett futnak és zona adherentiával kapcsolódnak egymáshoz **(11, 15. Ábra)** (Urban et al., 2002). Hasonlóan, zona adherentia figyelhető meg a PV-pozitív dendritek között is kontroll és epilepsziás humán hippocampusban (Seress et al., 1993b) (Wittner et al., 2005), valamint patkányban a gap junction-ok között (Kosaka és Hama, 1985) és vélhetően a gap junction-nal összekötött dendritek mechanikai stabilitását szolgálják. Elképzelhető, hogy ez a CR-tartalmú sejtek esetében is így van, és ez esetben e struktúrák jelenléte a CR-pozitív sejtek dendritjei között a sejtek egy elektromosan összekapcsolt, szinkronizált hálózatát hozhatja létre. Zona adherentia ritkán volt megfigyelhető az epilepsziás mintákban.

A dendritek sérülése – varikozitások kialakulása, szegmentálódás – és a zona adherentiák hiánya csökkentheti a dendritikus gátlósejteknek az interneuron-specifikus gátlósejtek általi hatékony szinkronizációját.

Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy a CR-tartalmú gátlósejtek működése és hatékonysága a nem-szklerotikus epilepsziás mintákban is lecsökken, melyekben változatlan mennyiségben vannak jelen.

5.2.3. A CR-pozitív interneuronok célelemei megváltoznak a humán epilepsziás CA1 régióban

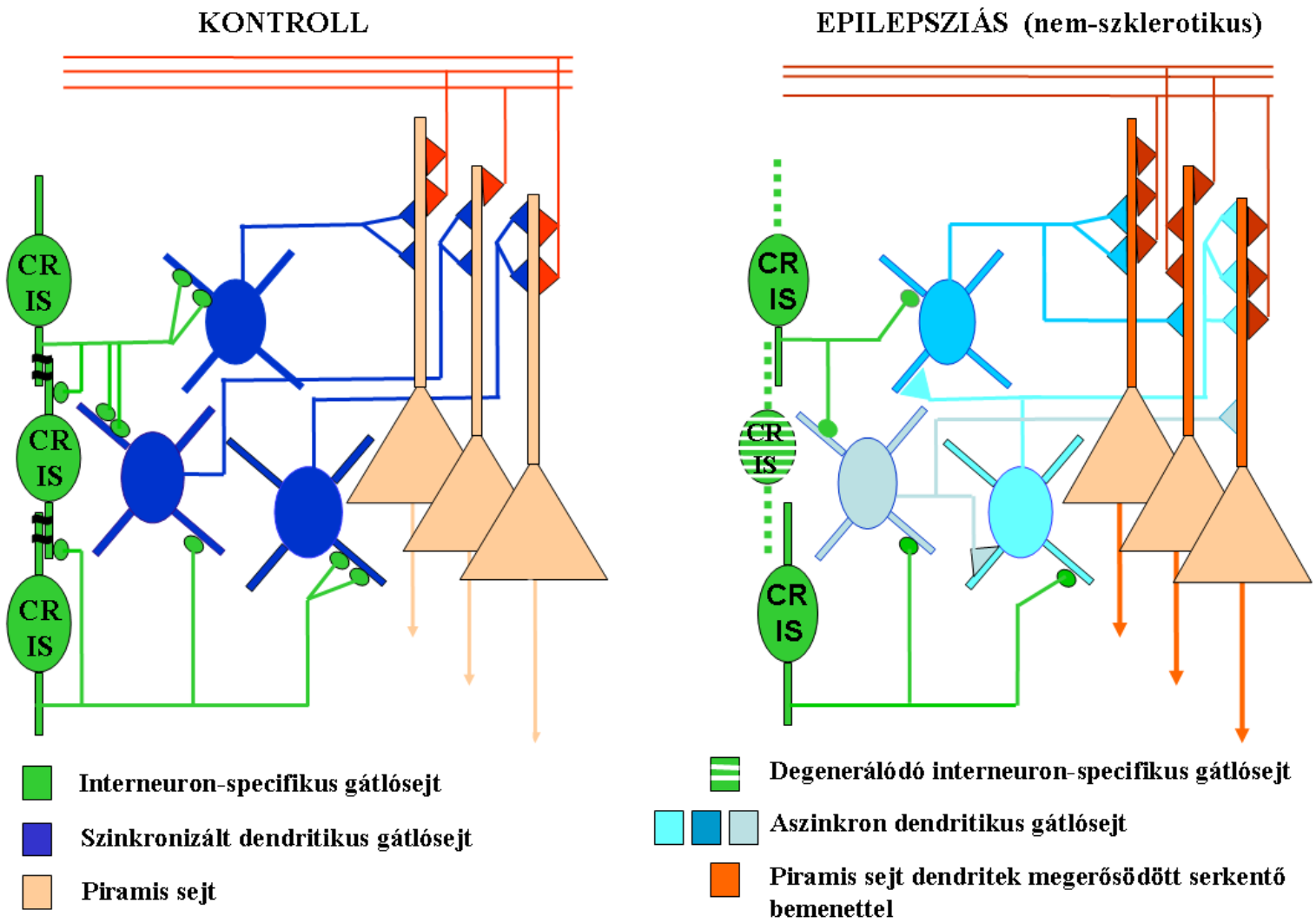
Az aszimmetrikus szinapszist adó CR-pozitív terminálisok aránya megnőtt az epilepsziás mintákban. Ez egyrészt magyarázható a CR-tartalmú interneuronok terminálisainak degenerálódásával a nem-szklerotikus szövetben, a szklerotikus esetekben pedig a CR-tartalmú interneuronok kiterjedt pusztulásával. Másrészt nem zárható ki az extrahippocampális (nucleus reuniens) eredetű serkentő bemenetek sarjadzása sem, mint ahogy azt leírták a GD-ban és a CA2-ben végződő supramammillaris bemenet esetében (Magloczky et al., 2000) is.

A CR-pozitív interneuronok célelemeinek eloszlása megváltozott az epilepsziás humán hippocampus CA1 régiójában. Kontroll mintákban a CR-pozitív interneuronok leggyakrabban CR-tartalmú dendriteken, piramis sejt dendriteken és jelöletlen interneuron dendriteken végződtek. Ezzel szemben az epilepsziás mintákban szignifikánsan kevesebb CR-pozitív dendrit és piramissejt dendrit volt célelemek között **(17. Ábra)**.

Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a hippocampális interneuron hálózat (beleértve a CR-pozitív sejteket is) reorganizációjával már azokban a mintákban is számolni kell, ahol nincs jelentős principális sejt- és CR-tartalmú interneuron pusztulás a CA1 régióban. Az, hogy a nem-szklerotikus esetekben is kevesebb piramis sejt dendritet találtunk a posztszinaptikus célelemek között, utalhat CR-tartalmú interneuronok dendritikus gátlósejtként funkcionáló hányadának nagyobb érzékenységére. A CR-pozitív dendritek kisebb arányú beidegzése magyarázható a CR-tartalmú célelemek degenerálódásával. A szklerotikus esetekben, a természetes célelemek (CR-pozitív dendritek, piramissejt dendritek) intenzív pusztulása okozza azt, hogy nagyobb arányban találtunk a célelemek között jelöletlen interneuron dendriteket.

A CR-tartalmú interneuronok azon csoportjának, mely más interneuronokon végződik szerepe lehet a dendritikus gátlósejtek tüzelésének szinkronizálásában (Gulyas et al., 1996; Magloczky és Freund, 2005), mely elengedhetetlen a dendritikus elektrogenezis (Miles et al., 1996) és a szinaptikus plaszticitás kontrollálásában. Ezt a hipotézist erősíti az a megfigyelésünk, hogy a CB-tartalmú dendritikus gátlósejteken végződnek CR-pozitív bouton-ok mind a kontroll, mind az epilepsziás mintákban **(18. Ábra)**.

Eredményeink arra utalnak, hogy a CR-pozitív interneuronoknak mind a szinaptikus kapcsolatai, mind a dendritek közötti kapcsolatai módosulnak, sérülnek epilepsziában, még a nem-szklerotikus esetekben is, ahol az idegsejtek zöme nem pusztul el. A CR-tartalmú interneuronok dendritfája sérült, ami ezen interneuronoknak kevésbé hatékony szinkronizációját vonhatja maga után és következésképpen az általuk beidegzett dendritikus gátlósejtek szinkronizációjának csökkenését. Ez hozzájárulhat az epilepsziás aktivitás kialakulásához azáltal, hogy a piramissejtek dendritikus régiójába érkező serkentő bemenetek hatékonyságának fokozódásához vezethet **(19. Ábra)**. Ezekről a serkentő bemenetekről pedig megállapították, hogy mind állatmodellben (Perez et al., 1996; Esclapez et al., 1999; Lehmann et al., 2001), mind humán mintákban sarjadzanak (Lehmann et al., 2000).


KONTROLL
CR
IS
CR
IS
CR
IS
Interneuron-specifikus gátlósejt
Szinkronizált dendritikus gátlósejt
Piramis sejt
EPILEPSZIÁS (nem-szklerotikus)
CR
IS
CR
IS
CR
IS
Degenerálódó interneuron-specifikus gátlósejt
Aszinkron dendritikus gátlósejt
Piramis sejt dendritek megerősödött serkentő bemenettel

19. Ábra

Összefoglaló ábra a CR-pozitív interneuronokat és dendritikus gátlósejteket érintő gátló szinaptikus reorganizációról a nem-szklerotikus epilepsziás CA1 régióban. Kontroll: a humán hippocampusban a CR-tartalmú sejtek (zöld) egy része interneuron-szelektív gátlósejt, melyek dendritikus gátlósejteket (sötétkék) és más CR-pozitív interneuronokat (zöld) idegeznek be. A CR-tartalmú sejtek dendritjei egymással is kapcsolatban állnak. Az elektromos szinapszisokkal összekapcsolt CR-tartalmú sejtek hatékonyan tudják szinkronizálni a dendritikus gátlósejtek által a piramis sejt dendritekre (narancssárga) érkező gátlást. Epilepsziás, nem-szklerotikus: a CR-tartalmú sejtek egy része degenerálódik, melynek következtében sérül e sejtek dendritjei közti kapcsolat, és így az elektromos összeköttetésük. Ez a beidegzett dendritikus gátlósejtek aszinkron tüzeléséhez vezethet (világoskék), ami egy kevésbé hatékony dendritikus gátlást eredményez a piramis sejt dendriteken, melynek következtében abnormálisan felerősödhet az amúgy is sarjadzott serkentő bemenetek hatása (sötét narancssárga).

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Összegfoglalásként elmondható, hogy az általunk vizsgált mindkét interneuron populáció sejtjei – SPR-pozitív interneuronok és CR-tartalmú interneuronok – megőrződnek a nem-szklerotikus epilepsziás humán hippocampusban, azonban számuk jelentősen lecsökken a szklerotikus esetekben. Annak ellenére, hogy ezek a sejtek változatlan mennyiségben vannak jelen a nem-szklerotikus mintákban, mégsem tekinthetők kontrollszerűnek. Ezek a sejtek plasztikusan megváltoznak epilepsziában, mely változás korrelál a principális sejtpusztulás mértékével. A sejtek morfológiája megváltozik: az SPR-pozitív interneuronok dendritarborizációja megnő, a nyúlványok gyöngyözötté válnak, a CR-tartalmú sejtek dendritjei pedig a degenerálódás jeleit mutatják.

Patkányban kimutatták, hogy az SP és agonistái direkt hatnak az SPR-immunpozitív interneuronokra, és így indirekt módon erősítik a gátló szinaptikus hatást a piramissejteken (Maubach et al., 1998; Stacey et al., 2002). Egy ilyen nagyobb aktivitást kompenzáló mechanizmus emberben is magyarázná az SPR-immunpozitív sejtek életben maradását epilepsziában. A kiterjedtebb dendritfa által, a nagyobb mennyiségű aktivitásnak megfelelően az SPR sejtek receptív felülete megnő. Ezek a megfigyelések erősítik azt a hipotézist, hogy interneuronokat érintő, intenzív szinaptikus reorganizáció a nem-szklerotikus CA1 régióban is jelen van, noha jelentős principális sejtpusztulás nincs bennük (Lehmann et al., 2001; Wittner et al., 2002; Wittner et al., 2005). Az SPR sejtek erőteljes morfológiai változása egy megváltozott funkcióra és az SP-rendszer hatékonyságának növekedésére utal a nem-szklerotikus epilepsziás humán hippocampusban. Ezért az SP-rendszer egy új terápiás célpontot jelenthet az epilepszia kezelésében.

Míg az SPR sejtek hatékonysága valószínűleg fokozódik a nem-szklerotikus humán hippocampusban, addig a CR-tartalmú interneuronok működéséről az ellenkezője látszik bebizonyosodni, a nem-szklerotikus esetekben is a degenerálódás jeleit mutatják. Ezzel valószínűleg a hiperaktivitás irányában tolják el a rendszert, hiszen az interneuron specifikus CR sejtek sérülése folytán a dendritikus gátlósejtek szinkronizációja csökkenhet, másrészt a dendritikus gátlósejtek közé tartozó CR sejtek

is nagy valószínűséggel sérültek, tovább csökkentve ezzel a dendritikus gátlás hatékonyságát. Ehhez járul még hozzá az , hogy a CR sejtek célelemei megváltoznak, a nem-szklerotikus esetekben is: az interneuronok innervációja megnőtt, míg a piramis sejtek beidegzése csökkent, ami szintén vezethet a dendritikus gátlás csökkenéséhez. Ez magyarázhatja, hogy miért vannak jelen súlyos rohamok a nem-szklerotikus epilepsziás betegekben is, ahol jelentős hippocampális sejtpusztulásról nem beszélhetünk, viszont szinaptikus reorganizáció jellemző a szövetre. A CR-tartalmú interneuronok mellett a somatostatin és a neuropeptid Y-tartalmú dendritikus gátlósejtek érzékenységét is megfigyelték epilepsziában (de Lanerolle et al., 1988; Sundstrom et al., 2001), ami szintén hozzájárulhat a dendritikus gátlás csökkenéséhez. Elképzelhető, hogy ezeket a jelenségeket részben kompenzálja az SPR-pozitív gátlósejtek fokozódó bemenetérzékenysége a nem-szklerotikus esetekben.

A hippocampális neuronhálózat reorganizációja már a nem-szklerotikus betegekben is megfigyelhető, mindamellett a hippocampus fő kimenetété képező CA1 piramis sejtek jelen vannak, melyek együttesen lehetővé teszik, hogy a régió egy epileptogén fókuszként viselkedjen.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Két, egymással nem átfedő interneuron populációt – substance P receptort (SPR) expresszáló és calretinin-tartalmú (CR) sejtek – vizsgáltunk TLE-ban szenvedő betegek műtéti úton eltávolított hippocampusában (n=72) és összehasonlítottuk post mortem kontroll mintákkal (n=11). A CR-t főként a dendritikus és az interneuron-specifikus gátlásban résztvevő interneuronok expresszálják az emberi hippocampusban. Kolokalizációs vizsgálatok alapján az SPR-pozitív sejtek egy része a dendritikus gátlósejtek közé tartozik. Eredményeink szerint mind az SPR-, mind a CR-pozitív sejtek mennyisége szignifikánsan lecsökken a szklerotikus epilepsziás mintákban. Ezzel szemben a nem-szklerotikus hippocampusokban - ahol a CA1 piramissejtek életben maradnak - megőrződnek, azonban morfológiájuk megváltozik. Az SPR-pozitív sejtek dendritfája kiterjedtebb, több elágazást tartalmaz, a dendritek varikózak, mely a substance P-rendszer működésének fokozódását jelentheti. E változások a dendritikus gátlás hatékonyságát növelő kompenzációs mechanizmus részei. Az SPR-pozitív sejtek szinaptikus borítottságának elektronmikroszkópos vizsgálatával kimutattuk, hogy a gátló bemenetek mennyisége megnő rajtuk. Az aszimmetrikus szinaptikus bemenet megőrződése a szklerotikus mintákban a régióban végződő serkentő pályák sarjadzására utal. CR-tartalmú sejtek a nem-szklerotikus esetekben is érzékenyek, gyakoriak a szegmentált, degenerálódó dendritek. Elektronmikroszkópos vizsgálataink szerint a kontroll mintákban a CR-tartalmú interneuronok 23%-a CR-pozitív dendriten végződik. Ez az epilepsziás mintákban 3-5%-ra csökken, valamint a jelöletlen interneuron dendritek aránya megnő, a piramissejt dendritek aránya pedig lecsökken a célelemek között. A CR-pozitív dendritek közötti kapcsolatok szintén leépülnek epilepsziában. Ezek a jelenségek együttesen a hiperaktivitás irányában tolják el a rendszert azáltal, hogy az interneuron specifikus CR sejtek sérülése folytán a dendritikus gátlósejtek szinkronizációja és ezáltal hatékonyságuk csökkenhet. Megfigyeléseink összhangban állnak korábbi tanulmányokkal, miszerint az epilepsziás hippocampusra jelentős principális sejtpusztulás hiányában is egy nagyfokú, interneuronokat érintő szinaptikus reorganizáció jellemző.

8. SUMMARY

Two non-overlapping interneuron populations – calretinin (CR)- and substance P receptor (SPR)-expressing cells - were studied in the surgically removed hippocampi of temporal lobe epileptic patients (72) and compared with post mortem control samples (11). CR is expressed mainly in interneurons that specialize to innervate either principal cell dendrites or other interneurons in the human hippocampus. According to colocalization studies at least a part of the SPR-positive cells in the human hippocampus participate in dendritic inhibition. Our results suggest that the number of both SPR-and CR-positive cells is decreased in sclerotic epileptic samples. In contrast, they are preserved in the non-sclerotic hippocampus, but their morphology is considerably altered. SPR cells show reactive changes in epilepsy including intense branching and growth of their dendritic tree, implying the enhanced efficacy of the substance P system, which may be a compensatory mechanism aiming to increase the efficacy of dendritic inhibition. The electron microscopic analysis of synaptic coverage uncovered a shift towards a stronger inhibitory innervation of the preserved SPR cells. The unchanged asymmetric synaptic coverage in the sclerotic samples may indicate the sprouting of excitatory pathways. In contrast, CR-containing cells were proved to be highly vulnerable even in the non-sclerotic cases; they had segmented and degenerated dendrites. Electron microscopic examination revealed that in controls, 23% of the CR-positive interneuronal terminals targeted CR-positive dendrites, whereas in the epileptic samples the proportion of CR-positive targets was reduced to 3-5%. The ratio of unstained interneuron dendrites increased among the targets, whereas the pyramidal cells were less frequently innervated. The amount of interdendritic contacts between CR-positive neurons also dropped. The present data suggest that, dendritic inhibition and the synchronization of dendritic inhibitory cells by interneuron-specific interneurons may be impaired in epilepsy. These observations support the hypothesis that an intense synaptic reorganization is under way even in the non-sclerotic epileptic CA1 region involving at least a part of the interneuron network, but without a massive pyramidal cell loss.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Abraham H, Meyer G (2003) Reelin-expressing neurons in the postnatal and adult human hippocampal formation. Hippocampus 13:715-727.

Acsady L, Gorcs TJ, Freund TF (1996) Different populations of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. Neuroscience 73:317-334.

Acsady L, Katona I, Gulyas AI, Shigemoto R, Freund TF (1997) Immunostaining for substance P receptor labels GABAergic cells with distinct termination patterns in the hippocampus. J Comp Neurol 378:320-336.

Amaral DG, Cowan WM (1980) Subcortical afferents to the hippocampal formation in the monkey. J Comp Neurol 189:573-591.

Amaral DG, Insausti R (2004) Hippocampal Formation. In: The Human Nervous System. (Paxinos G, Mai, J.K., ed), pp 872-914. London: Elsevier Academic Press.

Andre V, Marescaux C, Nehlig A, Fritschy JM (2001) Alterations of hippocampal GAbaergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. Hippocampus 11:452-468.

Arai A, Silberg J, Lynch G (1995) Differences in the refractory properties of two distinct inhibitory circuitries in field CA1 of the hippocampus. Brain Res 704:298-306.

Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Brown WJ (1988) Distribution of glutamate-decarboxylase-immunoreactive neurons and synapses in the rat and monkey hippocampus: light and electron microscopy. J Comp Neurol 278:121-138.

Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Crandall PH (1989) Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. J Neurosci 9:2562-2574.

Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF (1991) Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. Neuroscience 42:351-364.

Baimbridge KG, Miller JJ, Parkes CO (1982) Calcium-binding protein distribution in the rat brain. Brain Res 239:519-525.

Blumcke I, Beck H, Suter B, Hoffmann D, Fodisch HJ, Wolf HK, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD (1999) An increase of hippocampal calretinin-immunoreactive neurons correlates with early febrile seizures in temporal lobe epilepsy. Acta Neuropathol (Berl) 97:31-39.

Blumcke I, Beck H, Nitsch R, Eickhoff C, Scheffler B, Celio MR, Schramm J, Elger CE, Wolf HK, Wiestler OD (1996) Preservation of calretinin-immunoreactive neurons in the hippocampus of epilepsy patients with Ammon's horn sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol 55:329-341.

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. Eur J Neurosci 16:1227-1239.

Borhegyi Z, Leranth C (1997a) Substance P innervation of the rat hippocampal formation. The Journal of comparative neurology 384:41-58.

Borhegyi Z, Leranth C (1997b) Distinct substance P- and calretinin-containing projections from the supramammillary area to the hippocampus in rats; a species difference between rats and monkeys. ExpBrain Res 115:369-374.

Bouilleret V, Schwaller B, Schurmans S, Celio MR, Fritschy JM (2000) Neurodegenerative and morphogenic changes in a mouse model of temporal lobe epilepsy do not depend on the expression of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, or calretinin. Neuroscience 97:47-58.

Braak E, Strotkamp B, Braak H (1991) Parvalbumin-immunoreactive structures in the hippocampus of the human adult. Cell Tissue Res 264:33-48.

Buckmaster PS, Schwartzkroin PA (1995) Physiological and morphological heterogeneity of dentate gyrus-hilus interneurons in the gerbil hippocampus in vivo. Eur J Neurosci 7:1393-1402.

Buhl EH, Halasy K, Somogyi P (1994) Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites [see comments] [published erratum appears in Nature 1997 May 1;387(6628):106]. Nature 368:823-828.

Caberlotto L, Hurd YL, Murdock P, Wahlin JP, 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.

Carre GP, Harley CW (1991) Population Spike Facilitation in the Dentate Gyrus Following Glutamate to the Lateral Supramammillary Nucleus. Brain Res 568:307-310.

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.

Corsellis JAN (1955) The incidence of Ammon's horn sclerosis. Brain 80:193-208.

Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, 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.

Davies S, Kohler C (1985) The substance P innervation of the rat hippocampal region. Anat Embryol (Berl) 173:45-52.

de Lanerolle NC, Thapar K, Partington JP, Robbins RJ (1987) Comparison of somatostatin immunoreactivity in epileptogenic and normal human hippocampi. Epilepsia 28:600-601.

de Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD (1989) Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. Brain Res 495:387-395.

de Lanerolle NC, Sloviter RS, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD (1988) Evidence for hippocampal interneuron loss in human temporal lobe epilepsy. Epilepsia 29:674.

de Lanerolle NC, Kim JH, Williamson A, Spencer SS, Zaveri HP, Eid T, Spencer DD (2003) A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories. Epilepsia 44:677-687.

Duggan AW, Hope PJ, Jarrott B, Schaible HG, Fleetwood-Walker SM (1990) Release, spread and persistence of immunoreactive neurokinin A in the dorsal horn of the cat following noxious cutaneous stimulation. Studies with antibody microprobes. Neuroscience 35:195-202.

Dugich-Djordjevic MM, Ohsawa F, Okazaki T, Mori N, Day JR, Beck KD, Hefti F (1995) Differential regulation of catalytic and non-catalytic trkB messenger RNAs in the rat hippocampus following seizures induced by systemic administration of kainate. Neuroscience 66:861-877.

Duvernoy HM (1998) The human hippocampus, 2 Edition. Berlin: Springer-Verlag.

Ellias SA, Stevens JK (1980) The dendritic varicosity: a mechanism for electrically isolating the dendrites of cat retinal amacrine cells? Brain Res 196:365-372.

Emery DG, Lucas JH (1995) Ultrastructural damage and neuritic beading in cold-stressed spinal neurons with comparisons to NMDA and A23187 toxicity. Brain Res 692:161-173.

Emson PC, Rehfeld JF, Rossor MN (1982) Distribution of cholecystokinin-like peptides in the human-brain. J Neurochem 38:1177-1179.

Esclapez M, Hirsch JC, Ben-Ari Y, Bernard C (1999) Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy. J Comp Neurol 408:449-460.

Falconer M, Serafetinides E, Corsellis JAN (1964) Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. ArchNeurol 10:233-248.

Falconer MA (1968) The significance of mesial temporal sclerosis (Ammon's horn sclerosis) in epilepsy. Guys Hosp Rep 117:1-12.

Fiumelli H, Kiraly M, Ambrus A, Magistretti PJ, Martin JL (2000) Opposite regulation of calbindin and calretinin expression by brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons. J Neurochem 74:1870-1877.

Freund TF, Magloczky Z (1993) Early degeneration of calretinin-containing neurons in the rat hippocampus after ischemia. Neuroscience 56:581-596.

Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. Hippocampus 6:347-470.

Freund TF, Ylinen A, Miettinen R, Pitkanen A, Lahtinen H, Baimbridge KG, Riekkinen PJ (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.

Gall C, Selawski L (1984) Supramammillary afferents to guinea pig hippocampus contain substance P-like immunoreactivity. NeurosciLett 51:171-176.

Goutan E, Marti E, Ferrer I (1998) BDNF, and full length and truncated TrkB expression in the hippocampus of the rat following kainic acid excitotoxic damage. Evidence of complex time-dependent and cell-specific responses. Brain Res Mol Brain Res 59:154-164.

Gulyas AI, Freund TF (1996) Pyramidal cell dendrites are the primary targets of calbindin D28k-immunoreactive interneurons in the hippocampus. Hippocampus 6:525-534.

Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996) Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. J Neurosci 16:3397-3411.

Gulyas AI, Miettinen R, Jacobowitz DM, Freund TF (1992) Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus--I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fibre system. Neuroscience 48:1-27.

Gulyas AI, Miles R, Hajos N, Freund TF (1993) Precision and variability in postsynaptic target selection of inhibitory cells in the hippocampal CA3 region. Eur J Neurosci 5:1729-1751.

Hahm ET, Hammond DL, Proudfit HK (2011) Substance P induces the reversible formation of varicosities in the dendrites of rat brainstem neurons. Brain Res 1369:36-45.

Hajos N, Acsady L, Freund TF (1996) Target selectivity and neurochemical characteristics of VIP-immunoreactive interneurons in the rat dentate gyrus. Eur J Neurosci 8:1415-1431.

Halasy K, Buhl EH, 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 (1997) Epilepsziás tünetegyüttesek. Budapest: Springer.

Halász P, Rajna P (1990) Epilepszia, 0 Edition. Budapest: Innomark.

Han ZS, Buhl EH, Lorinczi Z, Somogyi P (1993) A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. Eur J Neurosci 5:395-410.

Handelmann G, Meyer DK, Beinfeld MC, Oertel WH (1981) CCK-containing terminals in the hippocampus are derived from intrinsic neurons: an immunohistochemical and radioimmunological study. Brain Res 224:180-184.

Handelmann GE, Beinfeld MC, O'Donohue TL, Nelson JB, Brenneman DE (1983) Extra-hippocampal projections of CCK neurons of the hippocampus and subiculum. Peptides 4:331-334.

Hasbani MJ, Hyrc KL, Faddis BT, Romano C, Goldberg MP (1998) Distinct roles for sodium, chloride, and calcium in excitotoxic dendritic injury and recovery. Exp Neurol 154:241-258.

Heinrich C, Nitta N, Flubacher A, Muller M, Fahrner A, Kirsch M, Freiman T, Suzuki F, Depaulis A, Frotscher M, Haas CA (2006) Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus. J Neurosci 26:4701-4713.

Hermann BP, Wyler AR, Bush AJ, Tabatabai FR (1992) Differential Effects of Left and Right Anterior Temporal Lobectomy on Verbal Learning and Memory Performance. Epilepsia 33:289-297.

Holmes WR, Levy WB (1997) Quantifying the role of inhibition in associative long-term potentiation in dentate granule cells with computational models. J Neurophysiol 78:103-116.

Houser CR (1992) Morphological changes in the dentate gyrus in human temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res Suppl 7:223-234.

Houser CR (1999) Neuronal loss and synaptic reorganization in temporal lobe epilepsy. Adv Neurol 79:743-761.

Houser CR, Swartz BE, Walsh GO, Delgado-Escueta AV (1992) Granule cell disorganization in the dentate gyrus: possible alterations of neuronal migration in human temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res Suppl 9:41-48.

Hurd YL, Keller E, Sotonyi P, Sedvall G (1999) Preprotachykinin-A mRNA expression in the human and monkey brain: An in situ hybridization study. J Comp Neurol 411:56-72.

Ino T, Itoh K, Sugimoto T, Kaneko T, Kamiya H, Mizumo N (1988) The supramammillary region of the cat sends substance P-like immunoreactive axons

to the hippocampal formation and the entorhinal cortex. NeurosciLett 90:259-264.

Isokawa M, Levesque MF, Babb TL, Engel J, Jr. (1993) Single mossy fiber axonal systems of human dentate granule cells studied in hippocampal slices from patients with temporal lobe epilepsy. J Neurosci 13:1511-1522.

Jacobowitz DM, Winsky L (1991) Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. J Comp Neurol 304:198-218.

Jinno S, Kosaka T (2002) Immunocytochemical characterization of hippocamposeptal projecting GABAergic nonprincipal neurons in the mouse brain: a retrograde labeling study. Brain Res 945:219-231.

Johansen FF, Tonder N, Zimmer J, Baimbridge KG, Diemer NH (1990) Short-term changes of parvalbumin and calbindin immunoreactivity in the rat hippocampus following cerebral ischemia. Neurosci Lett 120:171-174.

Katona I, Sperlagh B, Magloczky Z, Santha E, Kofalvi A, Czirjak S, Mackie K, Vizi ES, Freund TF (2000) GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. Neuroscience 100:797-804.

Katsumaru H, Kosaka T, Heizmann CW, Hama K (1988) Immunocytochemical study of GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus. Exp Brain Res 72:347-362.

Kawaguchi Y, Hama K (1988) Physiological heterogeneity of nonpyramidal cells in rat hippocampal CA1 region. Exp Brain Res 72:494-502.

Kiyama H, Maeno H, Tohyama M (1993) Substance P receptor (NK-1) in the central nervous system:possible functions from a morphological aspect. RegulPept 46:114-123.

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. J Comp Neurol 231:150-161.

Kosaka T, Katsumaru H, Hama K, Wu JY, Heizmann CW (1987) GABAergic neurons containing the Ca2+-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. Brain Res 419:119-130.

Kosaka T, Kosaka K, Tateishi K, Hamaoka Y, Yanaihara N, Wu JY, Hama K (1985) GABAergic neurons containing CCK-8-like and/or VIP-like immunoreactivities in the rat hippocampus and dentate gyrus. J Comp Neurol 239:420-430.

Lehmann TN, Gabriel S, Eilers A, Njunting M, Kovacs R, Schulze K, Lanksch WR, Heinemann U (2001) Fluorescent tracer in pilocarpine-treated rats shows widespread aberrant hippocampal neuronal connectivity. Eur J Neurosci 14:83-95.

Lehmann TN, Gabriel S, Kovacs R, Eilers A, Kivi A, Schulze K, Lanksch WR, Meencke HJ, 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.

Li XG, Somogyi P, Tepper JM, Buzsaki G (1992) Axonal and dendritic arborization of an intracellularly labeled chandelier cell in the CA1 region of rat hippocampus. Exp Brain Res 90:519-525.

Lim C, Blume HW, Madsen JR, Saper CB (1997) Connections of the hippocampal formation in humans: I. The mossy fiber pathway. J Comp Neurol 385:325-351.

Liu H, Mazarati AM, Katsumori H, Sankar R, Wasterlain CG (1999a) 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.

Liu H, Sankar R, Shin DH, Mazarati AM, Wasterlain CG (2000) Patterns of status epilepticus-induced substance P expression during development. Neuroscience 101:297-304.

Liu H, Cao Y, Basbaum AI, Mazarati AM, Sankar R, Wasterlain CG (1999b) Resistance to excitotoxin-induced seizures and neuronal death in mice lacking the preprotachykinin A gene. Proc Natl Acad Sci U S A 96:12096-12101.

Liu H, Brown JL, Jasmin L, Maggio JE, Vigna SR, Mantyh PW, Basbaum AI (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.

Lorente de No R (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex - II. Continuation of the study of the ammonic system. JPsycholNeurol 46:113-177.

Lotstra F, Vanderhaeghen JJ (1987) Distribution of immunoreactive cholecystokinin in the human hippocampus. Peptides 8:911-920.

Lotstra F, Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1988) Substance P neurons in the human hippocampus: an immunohistochemical analysis in the infant and adult. J Chem Neuroanat 1:111-123.

Loup F, Wieser HG, Yonekawa Y, Aguzzi A, Fritschy JM (2000) Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. J Neurosci 20:5401-5419.

Lowenstein DH, Arsenault L (1996) The effects of growth factors on the survival and differentiation of cultured dentate gyrus neurons. J Neurosci 16:1759-1769.

Lu B, Su Y, Das S, Wang H, Wang Y, Liu J, Ren D (2009) Peptide neurotransmitters activate a cation channel complex of NALCN and UNC-80. Nature 457:741-744.

Maclean P (1992) The limbic system concept. In: The temporal lobes and the limbic system (Trimble M, Bolwig T, eds), pp 1-265: Wrighston Biomedical.

Magloczky Z, Freund TF (1993) Selective neuronal death in the contralateral hippocampus following unilateral kainate injections into the CA3 subfield. Neuroscience 56:317-335.

Magloczky Z, Freund TF (1995) Delayed cell death in the contralateral hippocampus following kainate injection into the CA3 subfield. Neuroscience 66:847-860.

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

Magloczky Z, Acsady L, Freund TF (1994) Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. Hippocampus 4:322-334.

Magloczky Z, Wittner L, Borhegyi Z, Halasz P, Vajda J, Czirjak S, Freund TF (2000) Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. Neuroscience 96:7-25.

Mantyh PW, Allen CJ, Ghilardi JR, Rogers SD, Mantyh CR, Liu H, Basbaum AI, Vigna SR, Maggio JE (1995a) Rapid endocytosis of a G protein-coupled receptor: substance P-evoked internalization of its receptor in the rat striatum in vivo. ProcNatlAcadSciUSA 92:2622-2626.

Mantyh PW, DeMaster E, Malhotra A, Ghilardi JR, Rogers SD, Mantyh CR, Liu H, Basbaum AI, Vigna SR, Maggio JE, et al. (1995b) Receptor endocytosis and dendrite reshaping in spinal neurons after somatosensory stimulation. Science 268:1629-1632.

Margerison JH, Corsellis JAN (1966) Epilepsy and the temporal lobe. Brain 89:499-530.

Mathern GW, Babb TL, Armstrong DL (1997a) Hippocampal Sclerosis. In: Epilepsy: A Comprehensive Textbook (Engel JJ, Pedley TA, eds), pp 133-155. Philadelphia: Lipincott-Raven.

Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK, Leite JP (1995) Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata. J Neurosci 15:3990-4004.

Mathern GW, Babb TL, Micevych PE, Blanco CE, Pretorius JK (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. MolChemNeuropathol 30:53-76.

Maubach KA, Cody C, Jones RS (1998) Tachykinins may modify spontaneous epileptiform activity in the rat entorhinal cortex in vitro by activating GABAergic inhibition. Neuroscience 83:1047-1062.

McNeil RS, Swann JW, Brinkley BR, Clark GD (1999) Neuronal cytoskeletal alterations evoked by a platelet-activating factor (PAF) analogue. Cell Motil Cytoskeleton 43:99-113.

Meencke HJ, Veith G (1991) Hippocampal sclerosis in epilepsy. In: Epilepsy surgery, 0 Edition (Luders H, ed), pp 705-715. New York: Raven Press Ltd.

Megias M, Emri Z, Freund TF, Gulyas AI (2001) Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. Neuroscience 102:527-540.

Miettinen R, Gulyas AI, Baimbridge KG, Jacobowitz DM, Freund TF (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 AI, Hajos N, Freund TF (1996) Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. Neuron 16:815-823.

Miller LA, Munoz DG, Finmore M (1993) Hippocampal sclerosis and human memory. Arch Neurol 50:391-394.

Mizumori SJY, Mcnaughton BL, Barnes CA (1989) A comparison of supramammillary and medial septal influences on hippocampal field potentials and single unit activity. JNeurophysiol 61:15-31.

Morrell MJ (1997) Epilepsia. Orvostudomány 1:1-18.

Muller MC, Osswald M, Tinnes S, Haussler U, Jacobi A, Forster E, Frotscher M, Haas CA (2009) Exogenous reelin prevents granule cell dispersion in experimental epilepsy. Exp Neurol 216:390-397.

Nakanishi S (1991) Mammalian tachykinin receptors. Annu Rev Neurosci 14:123-136.

Nakasato N, Levesque MF, Babb TL (1992) Seizure outcome following standard temporal lobectomy: correlation with hippocampal neuron loss and extrahippocampal pathology. J Neurosurg 77:194-200.

Nakaya YT, Kaneko R, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. JCompNeurol 347:249-274.

Nawa H, Kotani H, Nakanishi S (1984) Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. Nature 312:729-734.

Nitsch R, Leranth C (1994) Substance P-containing hypothalamic afferents to the monkey hippocampus: an immunocytochemical, tracing, and coexistence study. Exp Brain Res 101:231-240.

Nitsch R, Ohm TG (1995) Calretinin immunoreactive structures in the human hippocampal formation. J Comp Neurol 360:475-487.

Nunzi MG, Gorio A, Milan F, Freund TF, Somogyi P, Smith AD (1985) Cholecystokinin-immunoreactive cells form symmetrical synaptic contacts with pyramidal and nonpyramidal neurons in the hippocampus. J Comp Neurol 237:485-505.

Ogier R, Raggenbass M (2003) Action of tachykinins in the rat hippocampus: modulation of inhibitory synaptic transmission. Eur J Neurosci 17:2639-2647.

Olney JW (1978) Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: Kainic acid as a tool in neurobiology, 0 Edition (McGeer E, Olney JW, McGeer P, eds), pp 95-121. New York: Raven Press.

Olney JW, Collins RC, Sloviter RS (1986) Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. In: Basic mechanisms of the epilepsies: Molecular and cellular approaches, 0 Edition (Delgado-Escueta A, Ward A, Woodbury D, Porter R, eds), pp 857-877. New York: Raven Press.

Pappas IS, Parnavelas JG (1997) Neurotrophins and basic fibroblast growth factor induce the differentiation of calbindin-containing neurons in the cerebral cortex. Exp Neurol 144:302-314.

Park JS, Bateman MC, Goldberg MP (1996) Rapid alterations in dendrite morphology during sublethal hypoxia or glutamate receptor activation. Neurobiol Dis 3:215-227.

Perez Y, Morin F, Beaulieu C, Lacaille JC (1996) Axonal sprouting of CA1 pyramidal cells in hyperexcitable hippocampal slices of kainate-treated rats. Eur J Neurosci 8:736-748.

Poulsen FR, Lauterborn J, Zimmer J, Gall CM (2004) Differential expression of brain-derived neurotrophic factor transcripts after pilocarpine-induced seizure-like activity is related to mode of Ca2+ entry. Neuroscience 126:665-676.

Ramón y Cajal S (1909-11) Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertébrés. Maloine.

Ramón y Cajal S (1968) The structure of Ammon's horn. In, p 78: Springfield.

Ratzliff AH, Santhakumar V, Howard A, Soltesz I (2002) Mossy cells in epilepsy: rigor mortis or vigor mortis? Trends in neurosciences 25:140-144.

Represa A, Tremblay E, Ben-Ari Y (1990) Sprouting of mossy fibers in the hippocampus of epileptic human and rat. Adv Exp Med Biol 268:419-424.

Resibois A, Rogers JH (1992) Calretinin in Rat Brain - An Immunohistochemical Study. Neuroscience 46:101-134.

Ribak CE, 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.

Roberts GW, Woodhams PL, Polak JM, Crow TJ (1984) Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the hippocampus. Neuroscience 11:35-77.

Rocamora N, Palacios JM, Mengod G (1992) Limbic seizures induce a differential regulation of the expression of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3, in the rat hippocampus. Brain Res Mol Brain Res 13:27-33.

Saji M, Kobayashi S, Ohno K, Sekino Y (2000) Interruption of supramammillohippocampal afferents prevents the genesis and spread of limbic seizures in the hippocampus via a disinhibition mechanism. Neuroscience 97:437-445.

Seaylowe SL, Claiborne BJ (1992) Morphology of intracellularly labeled interneurons in the dentate gyrus of the immature rat. JCompNeurol 324:23-36.

Seitelberger F, Lassmann H, Hornykiewicz O (1990) Some mechanisms of brain edema studied in a kainic adic model. Acta NeurobiolExp 50:263-267.

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, Ribak CE (1983) GABAergic cells in the dentate gyrus appear to be local circuit and projection neurons. Exp Brain Res 50:173-182.

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, Frotscher M (1990) Morphological variability is a characteristic feature of granule cells in the primate fascia dentata: a combined Golgi/electron microscope study. J Comp Neurol 293:253-267.

Seress L, Ribak CE (1990) Postnatal development of the light and electron microscopic features of basket cells in the hippocampal dentate gyrus of the rat. Anat Embryol 181:547-565.

Seress L, Gulyas AI, Freund TF (1991) Parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of the macaque monkey. J Comp Neurol 313:162-177.

Seress L, Gulyas AI, Freund TF (1992) Pyramidal neurons are immunoreactive for calbindin D28k in the CA1 subfield of the human hippocampus. Neurosci Lett 138:257-260.

Seress L, Nitsch R, Leranth C (1993a) 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, Gulyas AI, Ferrer I, Tunon T, Soriano E, Freund TF (1993b) Distribution, morphological features, and synaptic connections of parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the human hippocampal formation. J Comp Neurol 337:208-230.

Shan W, Yoshida M, Wu XR, Huntley GW, Colman DR (2002) Neural (N-) cadherin, a synaptic adhesion molecule, is induced in hippocampal mossy fiber axonal sprouts by seizure. J Neurosci Res 69:292-304.

Shetty AK (2002) Entorhinal axons exhibit sprouting in CA1 subfield of the adult hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy. Hippocampus 12:534-542.

Shigemoto R, Nakaya YT, Nomura S, Ogawa-Meguro R, Ohishi H, Kaneko T, Nakanishi S, Mizuno N (1993) Immunocytochemical localization of rat substance P receptor in striatum. NeurosciLett 153:157-160.

Sik A, Penttonen M, Buzsaki G (1997) Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: an in vivo intracellular study. Eur J Neurosci 9:573-588.

Sik A, Ylinen A, Penttonen M, Buzsaki G (1994) Inhibitory CA1-CA3-hilar region feedback in the hippocampus. Science 265:1722-1724.

Sik A, Penttonen M, Ylinen A, Buzsaki G (1995) Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. J Neurosci 15:6651-6665.

Slezia A, Kekesi AK, Szikra T, Papp AM, Nagy K, Szente M, Magloczky Z, Freund TF, Juhasz G (2004) Uridine release during aminopyridine-induced epilepsy. Neurobiol Dis 16:490-499.

Sloviter RS (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. JCompNeurol 280:183-196.

Sloviter RS, Sollas AL, Barbaro NM, Laxer KD (1991) Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. J Comp Neurol 308:381-396.

Sloviter RS, Ali-Akbarian L, Horvath KD, Menkens KA (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.

Sommer W (1880) Erkrankung des Ammonshornes als Aetiologisches Moment der Epilepsie. ArchPsychiatNervKrankh 10:631-675.

Somogyi P, Nunzi MG, Gorio A, Smith AD (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.

Soussi R, Zhang N, Tahtakran S, Houser CR, Esclapez M Heterogeneity of the supramammillary-hippocampal pathways: evidence for a unique GABAergic neurotransmitter phenotype and regional differences. Eur J Neurosci 32:771-785.

Spencer DD, Spencer SS (1985) Surgery for epilepsy. Neurol Clin 3:313-330.

Stacey AE, Woodhall GL, Jones RS (2002) Activation of neurokinin-1 receptors promotes GABA release at synapses in the rat entorhinal cortex. Neuroscience 115:575-586.

Suckling J, Roberts H, Walker M, Highley JR, Fenwick P, Oxbury J, Esiri MM (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 LE, 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 TP, Golarai G, Cavazos J (1992) Assessing the functional significance of mossy fiber sprouting. Epilepsy Res Suppl 7:251-259.

Sutula TP, Cascino G, Cavazos JE, Ramirez L (1989) Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. AnnNeurol 26:321-330.

Swanson LW, Cowan WM (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. J Comp Neurol 172:49-84.

Swanson TH (1995) The pathophysiology of human mesial temporal lobe epilepsy. JClinNeurophysiol 12:2-22.

Tang FR, Chia SC, Jiang FL, Ma DL, Chen PM, Tang YC (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.

Thom M, Sisodiya SM, Beckett A, Martinian L, Lin WR, Harkness W, Mitchell TN, Craig J, Duncan J, Scaravilli F (2002) Cytoarchitectural abnormalities in hippocampal sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol 61:510-519.

Toth K, Freund TF (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, Borhegyi Z, Freund TF (1993) Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of broca complex. J Neurosci 13:3712-3724.

Treves A (1995) Quantitative estimate of the information relayed by the Schaffer collaterals. J Comput Neurosci 2:259-272.

Urban Z, Magloczky Z, Freund TF (2002) Calretinin-containing interneurons innervate both principal cells and interneurons in the CA1 region of the human hippocampus. Acta Biol Hung 53:205-220.

van Vliet EA, Aronica E, Tolner EA, Lopes da Silva FH, Gorter JA (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 RP (1992) PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. JCompNeurol 326:595-622.

Wasterlain CG, Liu H, Mazarati AM, Baldwin RA, Shirasaka Y, Katsumori H, Thompson KW, Sankar R, Pereira de Vasconselos A, Nehlig A (2000) Self-sustaining status epilepticus: a condition maintained by potentiation of glutamate receptors and by plastic changes in substance P and other peptide neuromodulators. Epilepsia 41 Suppl 6:S134-143.

Wittner L, Eross L, Czirjak S, Halasz P, Freund TF, Magloczky Z (2005) Surviving CA1 pyramidal cells receive intact perisomatic inhibitory input in the human epileptic hippocampus. Brain 128:138-152.

Wittner L, Magloczky Z, Borhegyi Z, Halasz P, Toth S, Eross L, Szabo Z, Freund TF (2001) Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. Neuroscience 108:587-600.

Wittner L, Eross L, Szabo Z, Toth S, Czirjak S, Halasz P, Freund TF, Magloczky ZS (2002) Synaptic reorganization of calbindin-positive neurons in the human hippocampal CA1 region in temporal lobe epilepsy. Neuroscience 115:961-978.

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

Yanagihara M, Niimi K (1989) Substance P-like immunoreactive projection to the hippocampal formation from the posterior hypothalamus in the cat. Brain Res Bull 22:689-694.

Zachrisson O, Lindefors N, Brene S (1998) A tachykinin NK1 receptor antagonist, CP-122,721-1, attenuates kainic acid-induced seizure activity. Brain Res Mol Brain Res 60:291-295.

Zappone CA, Sloviter RS (2001) Commissurally projecting inhibitory interneurons of the rat hippocampal dentate gyrus: a colocalization study of neuronal markers and the retrograde tracer Fluoro-gold. J Comp Neurol 441:324-344.

Zola-Morgan S, Squire LR (1986) Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus. Behav Neurosci 100:155-160.

10. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

10.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Toth K, Wittner L, Urban Z, Doyle WK, Buzsaki G, Shigemoto R, Freund TF, Magloczky Z

Morphology and synaptic input of substance P receptor-immunoreactive interneurons in control and epileptic human hippocampus.

Neuroscience, 2007 Jan 19;144(2):495-508. Epub 2006 Nov 13.

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. 2010 Sep;133(Pt 9):2763-77. Epub 2010 Jun 24.

10.2. Disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

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. 2010 Jul;51 Suppl 3:115-20.

Karlócai MR, Tóth K, Watanabe M, Ledent C, Juhász G, Freund TF, Maglóczky Z

Redistribution of CB1 cannabinoid receptors in the acute and chronic phases of pilocarpine-induced epilepsy

PLoS One. 2011;6(11):e27196. Epub 2011 Nov 4.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Maglóczky Zsófiának, témavezetőmnek, hogy önzetlen segítséget nyújtott a kutatómunka elméleti és gyakorlati alapjainak elsajátításában.

Köszönettel tartozom Dr. Freund Tamás professzornak, amiért lehetővé tette és mindenben támogatta, hogy az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben, csoportjában készíthettem el a doktori dolgozatomat.

Köszönettel tartozom Dr. Buzsáki György professzornak és Dr. Werner Doyle-nak a kollaborációs munkában való együttműködésért és az epilepsziás humán hippocampus mintákért, valamint Dr. Ryuichi Shigemotonak a substance P receptor elleni antitestekért. Köszönettel tartozom továbbá Dr. Palkovits Miklós, Dr. Sótonyi Péter és Dr. Borostyánkői Zsolt professzoroknak a humán kontroll hippocampusokért és Dr. Erőss Lorándnak, Dr. Vajda Jánosnak és Dr. Halász Péternek az epilepsziás mintákért.

Köszönettel tartozom a labor összes dolgozójának, különösen Dr. Wittner Lucának, hogy a kutatómunka során felmerülő elméleti és gyakorlati problémák megoldásában segítségemre voltak.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Varga Viktornak, hogy elvállalta dolgozatom házi bírálását, és sok hasznos tanáccsal látott el.