

Az archi- és neocortex morfológiai elváltozásai tumor és agykérgi fejlődési rendellenesség által indukált epilepsziában

c. kutatási pályázat zárójelentése

A kutatás célja azoknak a morfológiai elváltozásoknak a felderítése volt, amelyek a temporális lebeny epilepszia két ismert etiológiájú csoportjában, az agyi tumorok, valamint az agykérgi fejlődési rendellenességek által okozott epilepsziában az agykéregben megtalálhatóak. A pályázatban megfogalmazott céljaink a sejtpusztulás, az interneuronok morfológiai és neurkémiai jellegzetességeinek, a szinaptikus reorganizációnak, a neurogenesisnek, a sejtváándorlás zavarának vizsgálata voltak a különböző etiológiájú temporális lebeny epilepsziákban. Vizsgálatainkat a Pécsi Tudományegyetem Idegsebészeti Klinikáján agykérgi fejlődési rendellenesség és agyi tumor által indukált gyógyszerrezisztens temporális lebeny epilepszia miatt eltávolított neocorticalis és archicorticalis (hippocampus, subiculum és entorhinalis kéreg) szöveten fény- és elektronmikroszkópos módszerekkel végeztük. A vizsgálatok során nyert szövettani adatokat hippocampus sclerosissal (HS) járó temporális lebeny epilepsziában találtakhoz hasonlítottuk.

A kutatás időtartama alatt 21 temporális lebeny epilepszia miatt operált beteg szövetmintáját dolgoztuk fel. Ezen újonnan feldolgozott esetek mellett az analízis során, 25 epilepsziás és 5 kontroll egyén korábban feldolgozott metszeteit is használtuk.

A cytoarchitektonikai eltérések és sejtpusztulás különböző etiológiájú temporális lebeny epilepsziában

Ismert, hogy HS-sel járó tenporális lebeny epilepsziában jellegzetes, bizonyos sejtcsoportok (pl. Ammon szarv CA1 területe) esetében konzisztensen megfigyelhető elváltozások vannak, beleértve a sejtpusztulást (Babb és mtsai., 1989; Magloczky és mtsai., 1997, 2000; Toth és mtsai. 2010; Zhu és mtsai., 1997). Ezzel szemben nem látható, vagy jelentősen enyhébb mértékben figyelhető meg neuron pusztulás kérgi malformációhoz társuló vagy tumor-által indukált epilepsziában (Blumcke és mtsai., 1999, 2000; de Lanerolle és mtsai., 2003; Fried és mtsai., 1992; Kim és mtsai., 1990; Sloviter, 1994). Ezért a tumor által indukált epilepszia miatt eltávolított hippocampust rendszeresen a HS-hez társuló epilepsziás szövet kontrolljaként alkalmazzák (Blumcke és mtsai., 1999, 2000, Selke és mtsai., 2006). Kérgi malformációhoz társuló epilepsziában jellemző elváltozásként ectopiás idegsejtek figyelhetők meg az Ammon szarvban (Sloviter és mtsai., 2004). Ugyanakkor a HS-sal társuló temporális lebeny epilepszia állapotmodelljeiben a gyrus dentatus hilusában nagyszámú ectopiásan elhelyezkedő szemcsesejtet írtak le, melyek fiziológiailag inkább a hiláris sejtekhez hasonlítottak, mint a rétegben elhelyezkedő szemcsesejtekhez, és rendszerint jelentős spontán szinaptikus aktivitással és szabályos burst kisülésekkel rendelkeztek (Scharfman és mtsai., 2000, 2002, 2007). Emberben nem ismert az ectopiás sejtek megjelenésének aránya HS és tumor-indukált epilepszia esetén, valamint nem ismertek a

morfológiai elváltozások azokban az esetben, amikor a hippocampus területén MRI-vel igazolható elváltozás nem írható le.

Ezért munkánk során a különböző etiológiájú temporális lebeny epilepsziákban az MR vizsgálatok diagnózisát és a cytoarchitectonika szövettannal megfigyelhető elváltozásait hasonlítottuk össze. Ennek során a HS-ban leírt egyes sejtcsoportokat érintő elváltozásokat hasonlítottuk agykérgi dysgenesishoz társuló és/vagy hippocampális MR negativitással járó, valamint tumor által indukált epilepsziában találtakhoz.

Megállapítottuk, hogy olyan az esetekben, ahol az MR felvételen egyértelmű a hippocampus sclerosis, a CA1 piramisneuronok jelentős pusztulása minden esetben megfigyelhető, míg kifejezett end-folium (CA3c) sclerosis csak az esetek 80%-ban látható. Ezzel szemben, MR negativitással vagy agykérgi malformációval járó (továbbiakban dysgenesissel járó) epilepsziában a CA1 piramisneuronok pusztulása nem jellemző, az end-folium (CA3c) sclerosis pedig az esetek 17%-ban volt megfigyelhető. Ezzel szemben az esetek egyharmadában szembevetve a CA1 piramisneuronok kb. 500 µm-nyi területre lokalizálódó kiszélesedése, amely a piramisneuronok vándorlási zavarára utal. Tumor indukált epilepsziában, abban az esetben, ha a térfoglaló folyamat nem infiltrálja a hippocampust, neuronpusztulás az Ammon szarv vagy a gyrus dentatus területén csak az esetek 11%-ban látható beleértve a CA1 piramisneuronokéit is. Ugyanakkor az esetek 40%-ban megfigyelhető a CA1 piramisneuronok dysgenesis során leírt kiszélesedése, aminek funkcionális jelentősége egyelőre nem világos. Ectopiás piramisneuronok HS-ban egyetlen esetben sem voltak megfigyelhetők.

A gyrus dentatus szemcsesejtrétegében a HS-hez társuló epilepsziában az esetek 69%-ban figyelhető meg a szemcsesejt réteg elvékonyodása, illetve foltokban a sejtek hiánya. Ezek az elváltozások az esetek felében kifejezettebbek a szemcsesejtréteg ventrális karjában. Dysgenesishoz társuló epilepsziában csak az esetek egyharmadában látható a szemcsesejt pusztulásra utaló, főként foltokban megjelenő sejthiány, míg tumor indukált epilepsziában ez egyáltalán nem jellemző. Szemcsesejt diszperzió HS során az esetek 77%-ban fordul elő. Ezeknek a betegeknek az egyharmadánál, a klasszikus diszperzió mellett, a normál szemcsesejtréteg felett egy második sejtréteg is látható. A szemcsesejtek rendellenes elhelyezkedésének másik típusa, a HS-sel járó epilepsziás betegek egynegyedében fordult elő, amikor is a gyrus dentatus molekuláris rétegében ectopiás szemcsesejtek csoportjai voltak megfigyelhetők. Ez legtöbb esetben a szemcsesejtek jelentős mértékű pusztulásával járt együtt. A kérgi fejlődési rendellenesség által okozott epilepsziában a szemcsesejtdiszperzió enyhe volt, és a betegek egyharmadában jelentkezett. Tumor-indukált epilepsziában diszperzió kilenc betegből egyben fordult elő.

HS esetén a betegek 25%-ban találtunk ectopiás szemcsesejteket a hilusban vagy a molekuláris rétegben. Kérgi malformáció esetében, a betegek 83%-ának voltak ectopiás szemcsesejtjei. Abban az esetben, amikor nem volt MR-rel megfigyelhető eltérés a hippocampusban, minden esetben megfigyelhető volt az ectopiás szemcsesejtek jelenléte a hilusban. Tumor indukált epilepsziában a betegek 22%-nak voltak hiláris ectopiás szemcsesejtjei.

Ezeket az eredményeket a következő cikkben közzétettük:

Ábrahám H, Richter Z, Gyimesi C, Horváth Z, Janszky J, Dóczi T, Seress L. Degree and pattern of calbindin immunoreactivity in granule cells of the dentate gyrus differ in mesial temporal sclerosis, cortical malformation- and tumor-related epilepsies. Brain Research 2011 May 12. doi: 10.1016/j.brainres.2011.05.010

A hiláris mohasejtek pusztulásának vizsgálata

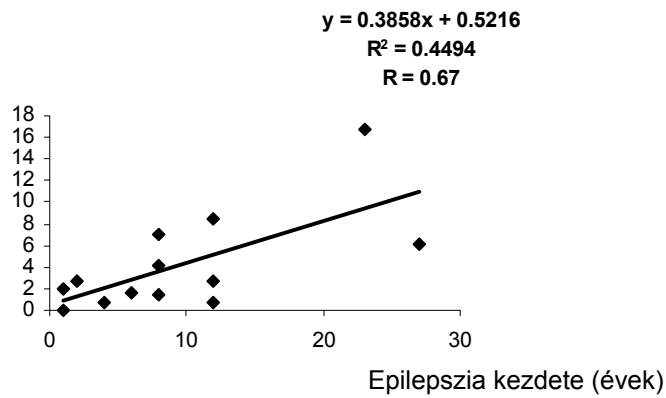
A mesialis temporalis sclerosissal járó epilepsziában a CA1 régió és a subiculum területén megfigyelhető jelentős piramisneuronpusztulás mellett a CA3c piramisneuronok és a hiláris mohasejtek is nagymértékben pusztulnak (end folium sclerosis). Korábbi vizsgálatok a mohasejtek szelektív érzékenységére, gyors és szinte teljes mértékű pusztulására utaltak (Blümcke és mtsai., 1999, Sloviter és mtsai., 2003). Ezen eredmények alapján látott napvilágot az epileptogenezis egyik általánosan elfogadott elmélete, az „alvó kosársejt” (dormant basket cell) teória, amely szerint a mohasejtek nagymértékű pusztulása miatt megszűnik a kosársejtek serkentése, és ezáltal azok képtelenek a szemcsesejtek periszomatikus gátlására, aminek eredményeképp túlserkentés alakul ki (Sloviter, 1991, Sloviter és mtsai., 2003). Ugyanakkor, mivel az emberi mohasejteknek nem volt ismert hisztológiai markere, szelektív pusztulásuk nem volt igazolható.

Korábban laboratóriumunkban kimutattuk, hogy a cocaine- amphetamine regulated transcript (CART) peptid a mohasejtek szelektív markere emberben és primátákban is (Seress és mtsai., 2004, Ábrahám és mtsai., 2005).

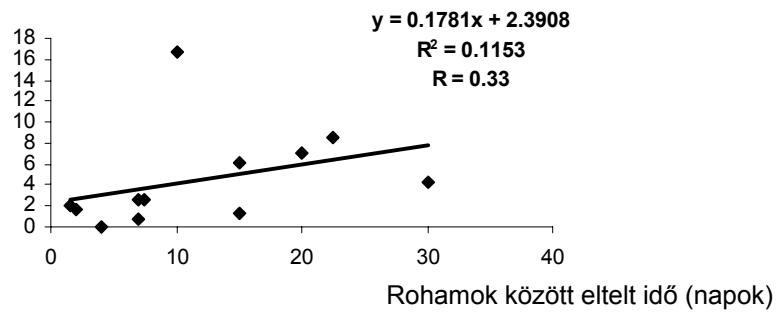
Jelen projektben a CART peptid immunhisztokémiai kimutatásával a hiláris mohasejtek pusztulását vizsgáltuk temporális lebeny epilepsziában (TLE). A CART peptid immunhisztokémia mellett a mohasejteket konvencionális festéssel és NeuN, valamint neurofilamentum immunhisztokémiával is vizsgáltuk, melyek a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek illetve az Ammon szarv piramisneuronjainak, valamint interneuronjainak pusztulását is jelzi. Megállapítottuk, hogy noha a hiláris mohasejtek jelentős arányban pusztulnak TLE-ban, pusztulásuk nem nagyobb mértékű CA1 és CA3 piramisneuronok pusztulásánál. Kimutattuk, hogy még évtizedekig fennálló epilepszia esetén is található mohasejtek a gyrus dentatus hilusában, és teljes hiányuk csak akkor figyelhető meg, ha jelentős mértékű Ammon szarv sclerosis mellett a gyrus dentatus szemcsesejtjei is nagy arányban pusztulnak (1. táblázat). Annak ellenére, hogy jelentős különbség látható a túlélő mohasejtek számát illetően egy beteg különböző metszeteiben, megállapítható volt, hogy a mohasejt pusztulás szignifikáns korrelációt mutat a betegség kezdetével ($R = 0,67$), és a műtéig eltelt időtartamával ($R = - 0,52$), míg laza korreláció figyelhető meg a mohasejt pusztulása és rohamok frekvenciája között ($R = 0,33$) (1. ábra).

A

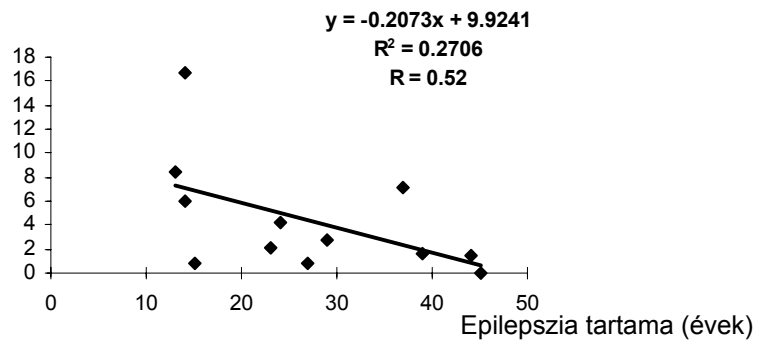
CARTir mohasejtek
száma / mm²

**B**

CARTir mohasejtek
száma / mm²

**C**

CARTir mohasejtek
száma / mm²



1. ábra. A CART-immunreaktív mohasejtek denzitása korrelál az epilepszia kezdetével (A) és a rohamok között eltelt idővel (B). Negatív korreláció figyelhető meg a mohasejtek denzitása és a betegség időtartama között (C).

1. táblázat. CART-immunreaktív mohasejtek száma a gyrus dentatus hilusában

Betegek	CART-ir mohasejtek száma / mm ² ± SD
C23	16.76 ± 3.88
C24	19.82 ± 5.19
C25	12.91 ± 2.86
C26	10.87 ± 2.15
<i>átlag</i>	<i>15.09 ± 4.79</i>
HER1	2.68*
HER3	0.79*
HER4	16.68*
HER5	0.73*
HER6	8.50 ± 4.31
HER7	0**
HER 9	2.07 ± 1.09
HER10	1.39 ± 0.90
HER11	6.08 ± 4.80
HEP1	4.21 ± 1.76
HEP2	2.69 ± 1.08
HEP3	1.7 ± 0.65
HEP4	7.1 ± 5.19
<i>átlag</i>	<i>4.22 ± 4.38</i>

Rövidítések: SD, standard deviáció, ir, immunreaktív, * a metszetek limitált száma miatt a SD-t nem számítottuk ki, ***, nem volt CART-ir mohasejt a beteg metszeteiben.

Kontroll betegek (C23-26) gyorsan növekvő tumor miatt kerültek operációra.

Az itt leírtakat az alábbi cikkben közöltük:

Seress L, Abrahám H, Horváth Z, Dóczi T, Janszky J, Klemm J, Byrne R, Bakay RA. Survival of mossy cells of the hippocampal dentate gyrus in humans with mesial temporal lobe epilepsy. J Neurosurg. 2009 Dec;111(6):1237-47.

A calbindin expresszió vizsgálata a gyrus dentatus szemcsesejtjeiben

Korábbi munkákból ismert, hogy a szemcsesejtek calbindin (CB) expressziója korán eltűnik HS-hoz társuló epilepsziában a hippocampusban mind emberben, mind az epilepszia kísérletes állatmodelljeiben (Baimbridge és mtsai., 1985; Miller és Baimbridge, 1983, Maglóczy és mtsai., 1997). Ezzel szemben, tumor indukált epilepszia esetén, ha a tumor nem infiltrálja a hippocampust, arról számoltak be, hogy a szemcsesejtekben megmarad a CB expresszió. Emiatt a tumor-indukált epilepszia miatt eltávolított hippocampust kontroll mintaként alkalmazták (Blumcke és mtsai., 1999; 2000; Selke és mtsai., 2006). A kérgi malformációhoz társuló epilepszia esetén azonban nem ismert, változik-e az epilepszia hatására a szemcsesejtek CB tartalma. Ezért megvizsgáltuk a szemcsesejtek CB tartalmának változását különböző etiológiájú temporális lebeny epilepsziában.

Megállapítottuk, hogy az etiológiától függetlenül a temporális lebeny epilepszia valamennyi formájában a CB expressziójának csökkenése megfigyelhető a gyrus dentatus szemcsesejtjeiben. Olyan agyi tumor miatt eltávolított hippocampusban, amelynél a betegeknek nem voltak epilepsziás roszullétei, a szemcsesejt réteg valamennyi sejtje, dendritjei és axonterminálisai is expresszálják a CB-t, hasonlóan, mint a nem epilepsziás kontroll felnőttek hippocampusában. Nissl háttérfestéssel és NeuN, valamint neurofilamentum immunhisztokémiával igazoltuk, hogy a CB expresszió csökkenése nem a sejtek epilepszia okozta pusztulása miatt figyelhető meg, mivel a rétegben CB pozitív és CB negatív sejtek egyaránt jelen vannak. A CB immunreaktivitás csökkenése a legnagyobb mértékű HS-sel járó epilepsziában, ahol a szemcsesejteknek csak 17%-a expresszált CB-t. Kérgi malformációval járó epilepsziában a szemcsesejtek 19%-a volt CB-pozitív. Ezzel szemben tumor-indukált epilepsziában a CB-t tartalmazó sejtek aránya 34% volt. Kimutattuk, hogy a szemcsesejtekben CB expresszió csökkenése összefügg az epilepszia kezdetével ($R= 0.34$) és negatív korreláció figyelhető meg a CB expresszió és az epilepszia fennállásának időtartamával ($R= - 0.51$). Az epilepszia állatmodelljeiben megfigyelt jelenség, miszerint a szemcsesejtek CB immunreaktivitás csökkenése az epilepsziás görcstevékenység következménye, vizsgálataink alapján az emberi temporális lebeny epilepsziára is érvényes. Eredményeink megerősítik és kiegészítik azokat a korábbi megfigyeléseket, miszerint a temporális lebeny léziója által indukált epilepsziában, beleértve a tumor által indukált epilepsziát, mind a fókuszként funkcionáló lézió, mind pedig a hippocampus részt vesz az epileptogenezisben és a krónikus rohamok fenntartásában (Awad és mtsai., 1991; Berger és mtsai., 1993; Cascino és mtsai., 1993; Mathern és mtsai., 1995).

Emellett leírtuk, hogy a CB expresszió mintázata is különbözött a három betegcsoportban. Kimutattuk, hogy hippocampus sclerosisban és dysgenesishoz társuló epilepsziában a CB immunreaktív szemcsesejtek több mint 62-65%-a a réteg külső felében található, míg a szemcsesejtréteg külső felében a szemcsesejtek csak 35-38%-a volt CB pozitív. Abban az esetben, ha a szemcsesejtréteg külső felében található CB tartalmú szemcsesejtek számához a rétegen kívül, a molekuláris rétegben elhelyezkedő CB tartalmú szemcsesejteket is hozzáadjuk, ez az arány dysgeneszis esetén 70, hippocampus sclerosis esetén 73%-ra emelkedik. Tumor által indukált epilepsziában nem volt szignifikáns különbség a szemcsesejtréteg belső és külső felében található CB-pozitív szemcsesejtek száma között, az arány 46:54 volt.

NeuN és neurofilamentum immunhisztokémiával megfigyeltük azt is, hogy a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek pusztulása kifejezettebb a szemcsesejtréteg ventralis karjában, mint a dorsalis karjában, ahol mint már ismert, főként szemcsesejt diszperzió látható. Ezen eredményeink összhangban vannak Pauli és mtsai. 2006-ban közölt eredményeivel.

Rágcsálókban és primátákban is ismert, hogy a dorsalis kar szemcsesejtjeinek keletkezése megelőzi a ventralis kar sejtjeit. Ugyancsak ismert, hogy a szemcsesejtek CB expressziója korán eltűnik az epilepsziás hippocampusban mind embenben, mind az epilepszia állatmodelljeiben (Baimbridge és mtsai., 1985; Miller és Baimbridge, 1983, Maglóczy és mtsai., 1997). Ezen kívül feltételezik, hogy

összefüggés van az idegsejtek CB tartalma és epilepsziás érzékenysége között (Bouilleret és mtsai., 2000; Gary és mtsai., 2000; Nagerl és Mody, 1998; Nagerl és mtsai., 2000). Ezért megvizsgáltuk, hogy megfigyelhető-e korreláció a szemcsesejtek CB expressziójának a fejlődés során történő megjelenése és az epilepsziás érzékenység között. Megállapítottuk, hogy a dorsális kar szemcsesejtjei a CB-t már prenatálisan expresszálják, ugyanakkor a ventrális karban a CB megjelenése a sejtekben hosszan tartó posztnatalis folyamat, és a szemcsesejtréteg CB expressziója 2-3 éves korban felel meg felnőttnek. Ugyanakkor CB immunhisztokémiával a szemcsesejtek felnőttre jellemző nagy moha terminálisai a hilusban ebben a korban még nem láthatók, ami a szemcsesejtek és a mohasejtek közötti kapcsolat éretlenségére utal (2. táblázat).

A szemcsesejtek elhúzódó CB expresszióval is jelzett hosszan tartó érése, különösen a szemcsesejtréteg ventralis karjának a területén magyarázatként szolgálhat a ventralis kar idegsejtjeinek fokozottabb érzékenységére epilepsziában, különösen epilepsziát megelőző lázgörcs esetén.

A dorsális és ventralis kar szemcsesejtjeinek CB expressziójában megfigyelhető időbeli különbséghez hasonló látható a szemcsesejtréteg hilus felőli és a molekuláris réteg felőli részében. Ismert, hogy a gyrus dentatus fejlődése során a CB a szemcsesejtek bizonyos fokú érettségi állapotával párhuzamosan jelenik meg. Vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a CB először a szemcsesejtréteg külső, a molekuláris réteggel szomszédos sejtjeiben detektálható, majd később, főként posztnatalis első hónapoktól kezdve fokozatosan a belső, hilus felőli sejtekben is megjelenik. A szemcsesejtréteg külső és belső felében lévő szemcsesejtek fejlődés során eltérő időpontban megfigyelhető CB expressziója magyarázatot adhat a temporális lebeny epilepsziára jellemző, a sejtréteg külső és belső felében látható, a CB expressziót érintő különbségre. Ennek megfelelően HS-ben és kérgi malformációhoz társuló epilepsziában főként azok a szemcsesejtek veszítik el a CB tartalmukat, amelyek az ontogenezis során a CB-t később expresszálták. Ezekben a csoportokban a betegek életkora az epilepszia kezdetekor viszonylag alacsony volt (HS: 7 év, kérgi malformáció: 18,5 év átlagosan). Ezzel szemben tumor indukált epilepsziában, ahol a szemcsesejtréteg külső és belső sejtjeinek CB expressziója között nem volt különbség, a betegek átlagos életkora a betegség kezdetén magasabb volt (34,4 év). Mindez arra utal, hogy korai posztnatalis trauma, lázgörcs, illetve az epilepszia korai (1-2 éves kor) kezdete, különösen HS esetén, szerepet játszhat az egyébként is később érő, ezáltal érzékenyebb szemcsesejtcsoport károsításában.

2. táblázat. CB immunreaktivitás különböző korcsoportokban a gyrus dentatusban

Age	Dentate gyrus									Str. lucidum of CA3			
	Molecular layer		Granule cell layer						Hilus				
	Dorsal blade	Ventral blade	Dorsal blade			Ventral blade							
			Lateral	Medial		Superficial	Deep						
Superficial	Deep	Superficial	Deep	Superficial	Deep			c	b	a			
14-18GW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19-21GW	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22-23GW	-	-	++	-	-/+	-	-/+	-	-	-	-	-	-
24-32GW	-	-	+++	-/+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
33-36GW	+	-	+++	+	++	+	+++	-	-	-	+	++	++
37-40GW	++	+	++++	++	+++	++	+++	++	-	+	++	+++	+++
1-3 M	+++	++	++++	+++	++++	++	+++	++	+	+	++	+++	+++
5-8 M	+++	+++	++++	+++	++++	+++	++++	+++	++	++	+++	++++	++++
2-3 Y	++++	++++	++++	+++	++++	+++	++++	+++	++	+++	+++	++++	++++
8-11 Y	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Rövidítések: GW, gestatios hét; M, hónap; Y, év.

'+' gyenge, '++' közepes, '+++' erős '++++' nagyon erős CB immunreaktivitás

Eredményeinket az alábbi cikkekben közöltük:

Abrahám H, Veszprémi B, Kravják A, Kovács K, Gömöri E, Seress L. Ontogeny of calbindin immunoreactivity in the human hippocampal formation with a special emphasis on granule cells of the dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci.* 2009 Apr;27(2):115-27.

Ábrahám H, Richter Z, Gyimesi C, Horváth Z, Janszky J, Dóczi T, Seress L. Degree and pattern of calbindin immunoreactivity in granule cells of the dentate gyrus differ in mesial temporal sclerosis, cortical malformation- and tumor-related epilepsies. *Brain Research* 2011 May 12. 2011.10.1016/j.brainres.2011.05.010

A szemcsesejtek CB tartalma és az epilepsziás betegek kognitív teljesítménye közötti összefüggés

A CB immunreaktivitás csökkenésének jelentőségét illetően, azaz, hogy előnyös, káros, vagy semleges hatással bír a szemcsesejtek túlélését tekintve, egymásnak ellentmondóak az adatok (Bouilleret és mtsai., 2000; Gary és mtsai., 2000; Nagerl és Mody, 1998; Nagerl és mtsai., 2000). Ugyanakkor ismert, hogy CB knock-out egerekben a CB hiánya memóriazavarokat okoz, valamint az is, hogy a CB fontos szerepet játszik az LTP-ben (Molinari és mtsai., 1996, Jouvenceau és mtsai., 2002). A CB memória folyamatokban betöltött szerepére utal továbbá, hogy patkányban a szemcsesejtekben való

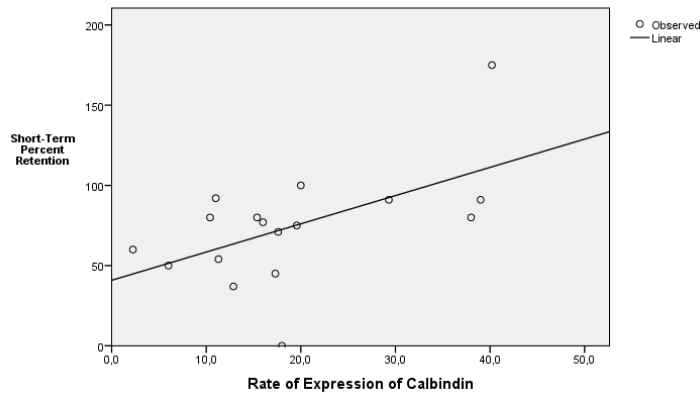
megjelenése az ontogenezis folyamán korrelál a gyrus dentatus funkcionális érésével, és az állatok magatartásának fejlődésével (Nadel és Willner, 1989; Abraham és mtsai., 2007).

A temporális lebeny epilepsziás betegeknél régóta ismert a betegség következtében kialakuló memóriazavar (Herfurth és mtsai, 2010, McConley és mtsai., 2008, Alessio és mtsai. 2004). A deklaratív memóriában megfigyelhető zavar korrelál a HS MRI-vel megfigyelhető mértékével (Helmstaedter és mtsai. 2009). Proton MR spektroszkópiával epilepsziás betegekben nyert adatok, amelyek a neuronális pusztulás és a gliózis mértékéről adnak információt, korrelációt mutattak a verbális memória zavarának mértékével (Hanoglu és mtsai., 2004). Posztoperatív hisztológiai vizsgálatok alapján a hippocampalis piramis sejtek pusztulása szignifikánsan korrelál a betegek műtét előtti memóriazavarával (Rausch és Babb, 1993; Sass és mtsai., 1990, 1992, 1995; Pauli és mtsai., 2006). Továbbá, a hiláris neuronok, valamint a szemcsesejtek pusztulása szintén korrelál a memóriefunkciók érintettségével (Sass és mtsai., 1990, 1992, 1995; Pauli és mtsai., 2006).

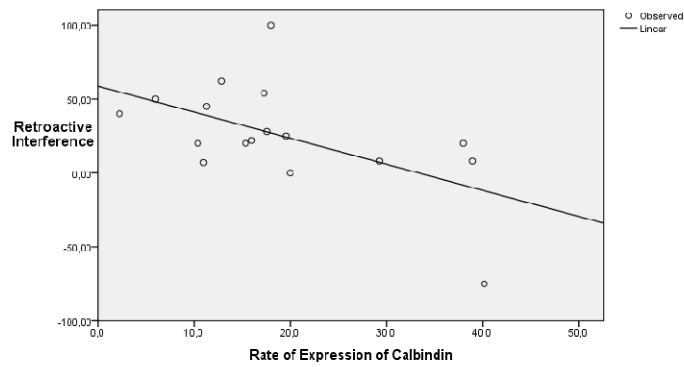
Nem ismert azonban, hogy a CB immunreaktivitás csökkenése és a betegek memóriazavara között van-e összefüggés. Ezért munkánk során ezt az összefüggést vizsgáltuk.

Kimuttatuk, hogy szignifikáns negatív korreláció van a CB-t expresszáló sejtek aránya és az IQ ($r=-0.86$, $p<0.05$), a verbális ($r=-0.72$, $p<0.05$), és a gyakorlati intelligencia hányados ($r=-0.81$, $p<0.05$) között. Megállapítottuk azt is, hogy az epilepszia időtartama negatívan korrelál a Boston Megnevező teszt eredményeivel ($r=-0.72$, $p<0.05$). Lineáris regresszió analízissel szignifikáns lineáris összefüggést találtunk a CB-t expresszáló szemcsesejtek aránya és a verbális tanulás és memória Rey Auditoros Verbális Memória Teszttel mért (Auditory Verbal Learning Test, AVLT) eredményeivel a rövid távú memória ($F(1,14)=5,98$; $p<0.05$) (2. ábra) és hosszú távú memória ($F(1,14)=6,18$; $p<0.05$) (3. ábra), valamint az AVLT retroaktív interferencia ($F(1,14)=6,03$; $p<0.05$) (4. ábra) vizsgálatán.

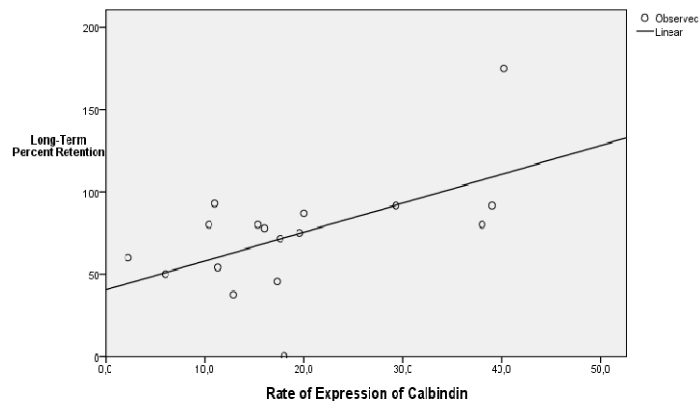
Emellett megvizsgáltuk, hogy jelentősebb-e a verbális memória-deficit azokban a betegekben, akiknél a CB-t expresszáló sejtek aránya az átlag ($19.06 \pm 11.26\%$) alatti vagy átlag feletti értéket mutat. Egy-utas ANOVA teszttel kimutattuk, hogy szignifikáns különbség van a rövid távú ($F(1,15)=8,08$; $p<0.05$), és a hosszú távú retenció ($F(1,15)=7,15$; $p<0.05$), az AVLT retroaktív interferenciája ($F(1,15)=8,02$; $p<0.05$) és aközött, hogy a betegek szemcsesejtjei az átlag alatti, vagy átlag feletti arányban expresszáltak CB-t.



2. ábra Lineáris regresszió a CB-expresszió és a rövid távú verbális memória (retenció) között



3. ábra. Lineáris regresszió a CB expresszió és az AVLT (Auditory Verbal Learning Test) retroaktív interferencia között



4. ábra. Lineáris regresszió a CB-expresszió és a hosszú távú verbális memória (retenció) között

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a szemcsesejtek CB expressziójának csökkenése korrelál az epilepsziás betegek műtét előtt mérhető verbális memória zavarával, ami arra utal, hogy a CB immunreaktivitás csökkenése a neuronok élettani funkciójának is indikátora.

Eredményeinket az alábbi cikkben tervezzük közzéadni:

Karadi K, Janszky J, Gyimesi C, Horvath Z, Dózsi T, Kallai J, Abraham H. Relationship between calbindin expression in the hippocampal dentate gyrus and verbal memory in patients with temporal lobe epilepsy (előkészületben)

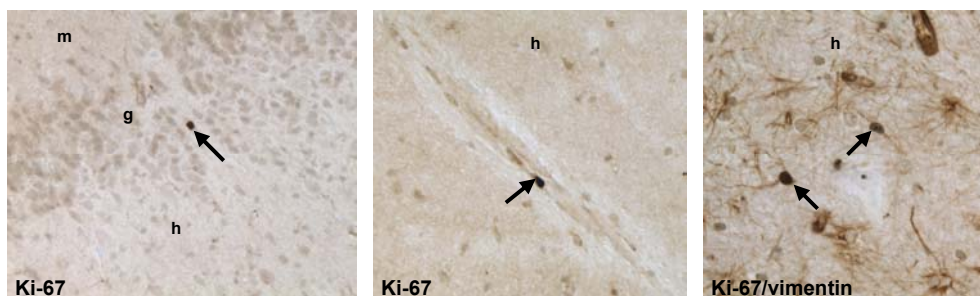
A neurogenesis vizsgálata a gyrus dentatusban

A temporális lebeny epilepszia rágszálakon létrehozott modelljeiben korábban kimutatták, hogy a az epilepsziás aktivitás fokozza a gyrus dentatus szemcsesejtrétegében a neurogenesis (Parent és mtsai., 1997). Az újonnan képződött sejtek a szemcsesejtréteg hilus felőli subgranuláris rétegében keletkeznek (Eriksson és mtsai., 1998, Kuhn és mtsai., 1996). Megfigyeléseink szerint, a CB expresszió hiánya kifejezettebb volt a sejtréteg hilus felőli felében, és ismert, hogy a szemcsesejtek a mitózist követően, egy bizonyos érettségi fokot elérve expresszálják a CB-t. Emiatt elképzelhető, hogy a CB-t nem expresszáló sejtek között újonnan képződött idegsejtek is találhatóak. Ezért fénymikroszkópos immunhisztokémiával vizsgáltuk az újonnan képződött szemcsesejtek arányát TLE-ban. A Ki-67 sejtproliferációs marker segítségével, melyet közel 20 esetben alkalmaztunk, megállapítottuk, hogy nem epilepsziás kontroll, valamint epilepsziás betegekben a gyrus dentatus szemcsesejtrétegében a Ki-67 immunreaktív sejtek 99%-a endothelsejt vagy glia (5. ábra). Kontrollban az osztódó sejtek aránya $1,4 \pm 1,14/1000$ szemcsesejt volt (3. táblázat). Magasabb értékét találtunk HS-ben ($2,3 \pm 3,82 / 1000$ sejt) és kérgi malformációhoz társuló epilepsziában ($2,6 \pm 1,65 / 1000$ sejt). Azokban a tumor indukált epilepsziás esetekben, amikor a tumor nem infiltrálta a hippocampust, a Ki-67 immunreaktív sejtek aránya alacsony ($1,2 \pm 1,32 / 1000$ szemcsesejt) volt (3. táblázat). Pozitív kontrollként olyan tumoros betegek hippocampusát használtuk, ahol a daganat infiltrálta a hippocampust. Ezekben az esetekben mindig jelentős (80% feletti) sejtproliferáció volt megfigyelhető.

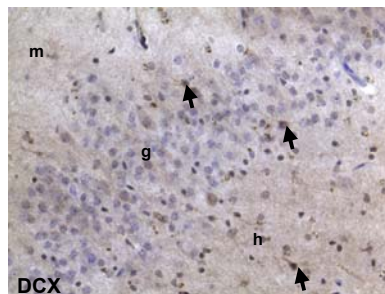
Az újonnan képződött posztmitotikus szemcsesejtek differenciációjuk során nagy mennyiségben expresszálják egy mikrotubulushoz kötődő fehérjét, a doublecortint (DCX) (Couillard-Despres és mtsai., 2005, Jessberger és mtsai., 2005). A DCX immunhisztokémiai detektálása során megfigyeltük, hogy míg a posztnatalis fejlődés során a DCX-t az éretlen szemcsesejtek nagy száma expresszálja, felnőttkorban, a kontroll, nem epilepsziás gyrus dentatusban csak elvétve láthatók DCX-immunreaktív sejtek ($0,5 \pm 0,5 / 1000$ szemcsesejt). HS-ban $0,9 \pm 0,66$ DCX pozitív sejt jut 1000 szemcsesejtre, kérgi malformációhoz társuló epilepsziában ez az arány $0,5 \pm 0,44 / 1000$ szemcsesejt. A hippocampust nem infiltráló tumor okozta epilepsziában 1000 szemcsesejtből $0,3 \pm 0,31$ sejt expresszált DCX-t (6. ábra, 3. táblázat).

3. táblázat. Ki-67 és DCX pozitív sejtek aránya a gyrus dentatus subgranularis rétegében 1000 szemcses sejtre számítva

	control	HS	malformáció	tumor
Ki-67	1,45 ± 1,14	2,35 ± 3,82	2,65 ± 1,65	1,23 ± 1,32
DCX	0,565 ± 0,50	0,925 ± 0,66	0,5 ± 0,44	0,35 ± 0,31



5. ábra. Ki-67 pozitív sejtek a gyrus dentatusban hilusában (h) HS-ban



6. ábra. DCX-immunreaktív sejtek (nyilak) a gyrus demtatusban

Eredményeink egyöntetűen arra utalnak, hogy krónikus temporális lebeny epilepsziában nagyon kis arányú a sejtproliferáció és jelentősen nem különbözik a kontrollban megfigyeltektől az újonnan képződött szemcses sejtek száma. Eredményeink összhangban vannak Fahrner és mtsai. (2007) adataival, akik szintén nem találtak több osztódó sejtet HS-hoz társuló temporális lebeny epilepsziában. Ugyanakkor eredményeink ellentmondásban vannak más munkák eredményeivel, amelyekben fokozott szemcses sejt képződésről számolnak be (Thom és mtsai., 2005).

Az eredmények közzését a közeljövőben tervezzük.

Az interneuronok morfológiai és neurokémiai jellegzetességeinek vizsgálata

Korábbi munkák alapján ismert, hogy HS-sel társuló temporális lebeny epilepsziában jellemző, az interneuronokat érintő morfológiai változások láthatók. Ilyen jellegű elváltozás a nagy CB tartalmú interneuronok megjelenése a gyrus dentatus hilusában, a (parvalbumin) PV kalcium-kötő fehérjét tartalmazó kosársejtek ectopiás, a szemcsesejtréteg helyett a gyrus dentatus molekuláris rétegében, vagy a molekuláris és lacunosum-moleculare réteg határán történő megjelenése (Maglóczky és Freund, 2005). Fokális cortikális dysplasiában és illetve periventricularis és subcorticalis heterotopiában a PV-tartalmú neuronok csökkent száma figyelhető meg a kérgi területeken (Thom és mtsai., 2004, Alonso-Naclares és mtsai., 2005). Nincsen viszont adat arra vonatkozóan, hogy tumor indukálta epilepsziában milyen interneuronokat érintő változások figyelhetők meg. Ezért munkánkban megvizsgáltuk, hogy a CB illetve PV tartalmú interneuronok morfológiájában a hippocampusban és kéregben milyen változások láthatók a kontrollhoz képest a három különböző etiológiájú epilepsziában. Vizsgálatinkat fénymikroszkópos immunhisztokémiai módszerrel végeztük.

Megállapítottuk, hogy a nagy CB tartalmú interneuronok megjelenése a gyrus dentatus hilusában a HS-hez társuló epilepsziás betegek 60%-ában figyelhető meg (4. táblázat). Ugyanakkor dysgenesissel járó epilepsziában az esetek 16%-ban fordult elő, míg tumor indukált epilepsziában 10%-ban. Ectopias kosársejtek 25%-ban figyelhetők meg a gyrus dentatusban HS-ben, az esetek felében kérgi malformációhoz társuló epilepsziában, és 20%-os az előfordulási arány tumor indukált epilepsziában (4. táblázat).

A neocortexben, vizsgálataink szerint nem csökkent a PV-immunreaktív interneuronok száma epilepsziában sem HS-hez, sem kérgi malformációhoz társuló epilepsziában. Tumor indukált epilepsziában, azokon a területeken, ahol nem volt jelentős tumorsejt infiltráció, a PV-immunpozitív sejtek száma szintén nem csökkent. Ugyanakkor HS-hoz és különösen kérgi malformációhoz társuló epilepsziában az archi- és neocortikális fehérállományban nagyszámú CB, PV és calretinin tartalmú interneuron található, melyeknek kvantifikációja folyamatban van. Mivel neuronális vándorlás során a kérgi neuronok többsége a későbbi fehérállomány területén keresztül jut el a végső szürkeállományi helyére, ezért ez a megfigyelésünk a neuronális vándorlás zavarára utal.

4. táblázat. A CB- és PV-immunreaktív interneuronok morfológiai elváltozása a gyrus dentatusban

	Nagy CB + interneuronok előfordulása a hilusban	PV + ectopias sejtek előfordulása a molekuláris rétegben
HS	60%	25%
Hippocampus malformáció	50%	50%
Hippocampus MR negatív	0%	50%
tumor	10%	20%

A neuronális vándorlás zavarának vizsgálata

Az agykérgi idegsejtek vándorlását irányító molekulák közül a leginkább ismert funkcióval a reelin extracelluláris mátrix fehérje rendelkezik, amelyet az ontogenezis során nagy számban jelenlévő Cajal-Retzius sejtek termelnek (D’Arcangelo és mtsai., 1995, Ogawa és mtsai., 1955, Meyer és mtsai., 2002). Noha az idegsejtek vándorlásának befejezésével a Cajal-Retzius sejtek száma jelentősen csökken, kis mennyiségben a felnőtt agykéreg I. rétegében is jelen vannak (Meyer és mtsai., 2002). Reelin mellett a Cajal-Retzius sejtek calretinint és egy, a p53 családban tartozó magfehérjét, a p73-at is expresszálnak (Meyer és mtsai., 2002, Ábrahám és Meyer, 2003).

A Cajal-Retzius sejtek számát az epilepsziás neo- és archicortexban tekintve eltérő adatok láttak napvilágot. Egyes eredmények szerint a Cajal-Retzius sejtek száma nő mesialis temporális sclerosisben és kérgi malformációhoz társuló epilepsziában (Meenke és Janz, 1984, Thom és mtsai., 2002), míg más szerzők a reelin-immunreaktív sejtek számának csökkenéséről számoltak be az epilepsziás hippocampusban (Haas és mtsai., 2002).

Saját vizsgálataink alapján nem tudunk egyértelmű változást kimutatni a Cajal-Retzius sejtek számának változását illetően a kérgi malformációhoz, valamint a HS-sel társuló epilepsziában.

Irodalomjegyzék

- Ábrahám H, Meyer G. *Hippocampus*. 2003. 13:715-727.
- Abraham H, Czeh B, Fuchs E, Seress L. *Neuroscience*. 2005. 136:231-240.
- Ábrahám H., Orsi G., Seress L. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2007. 25:265-274.
- Alessio A., Damasceno B.P., Camargo C.H.P., Kobayashi E., Guerreiro C.A.M., Cendes F. *Epilepsy and Behavior*. 2004.5: 22-27.
- Alonso-Nanclares L, Garbelli R, Sola RG, Pastor J, Tassi L, Spreafico R, DeFelipe J. *Brain*. 2005. 128: 158-173.
- Awad I.A., Rosenfeld J, Ahl J, Hahn J.F., Lüders H. *Epilepsia*. 1991. 32:179-186.
- Babb T.L., Pretorius J.K., Kupfer W.R., Crandall P.H. *J. Neurosci.* 1989. 9:2562-2574.
- Baimbridge K.G., Mody I., Miller J.J. *Epilepsia*. 1985. 26:460-465.
- Berger M.S., Ghatan S., Haglund M.M., Dobbins J., Ojemann G.A. *J. Neurosurg.* 1993. 79:62-69.
- Blumcke I, Zusratter W, Schewe JC, Suter B, Lie AA, Riederer BM, Meyer B, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD. *J Comp Neurol*. 1999. 414:437-453.
- Blümcke I., Suter B., Behle K., Kuhn R., Schramm J., Elger C.E., Wiestler O.D. *Epilepsia. Suppl.* 2000. 6:S174-180.
- Bouilleret V., Schwaller B., Schurmans S., Celio M.R., Fritschy J.M. *Neuroscience*. 2000. 97:47-58.
- Cascino G.D., Jack C.R. Jr. Parisi J.E., Shambrough F.W., Schreiber C.P., Kelly P.J., Trenerry M.R. *Epilepsy Res.* 1993. 14:175-182.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L. *Eur J Neurosci*. 2005. 21:1-14.
- D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. *Nature*. 1995. 374:719-723.
- de Lanerolle N.C., Kim J.H., Williamson A., Spencer S.S., Zaveri H.P., Eid T., Spencer D.D. *Epilepsia*. 2003. 44:677-687.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. *Nat Med*. 1998. 4:1313-1317.
- Fahrner A, Kann G, Flubacher A, Heinrich C, Freiman TM, Zentner J, Frotscher M, Haas CA. *Exp Neurol*. 2007. 203:320-332.
- Fried I., Kim J.H., Spencer DD. *J. Neurosurg.* 1992. 76:735-740.
- Gary D.S., Sooy K., Chan S.L., Christakos S., Mattson M.P. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2000. 75:89-95.
- Haas CA, Dudeck O, Kirsch M, Huszka C, Kann G, Pollak S, Zentner J, Frotscher M. *J Neurosci*. 2002. 22:5797-5802.
- Hanoglu L, Ozkara C, Keskiniliç C, Altin U, Uzan M, Tuzgen S, Dinçer A, Ozyurt E. *Epilepsia*. 2004 45:632-640.
- Helmstaedter C., Wietzke J., Lutz M.T. *Epilepsy Research*, 2009. 87, 203-212

Herfurth K., Kasper B., Schwarz M., Stefan H., Pauli E. *Epilepsy and Behavior*. 2010. 19:365-371

Jessberger S, Romer B, Babu H, Kempermann G. *Exp Neurol*. 2005. 196:342-351.

Jouvenveau A., Potier B, Poindessous-Jazat F, Dutar P, Slama A, Epelbaum J, Billard J-M. *Neuropharmacology*. 2002. 42, 444-458

Kim J.H., Guimaraes P.O., Shen M.Y., Masukawa L.M., Spencer D.D. *Acta Neuropathol*. 1990. 80:41-45.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. *J Neurosci*. 1996. 16:2027-2033.

Magloczky Z, Halasz P, Vajda J, Czirjak S, Freund TF. *Neuroscience*. 1997. 76:377-35.

Maglóczy Z., Wittner L., Borhegyi Z., Halász P., Vajda J., Czirják S., Freund T.F. *Neuroscience*. 2000. 96:7-25.

Magloczky Z, Freund TF. *Trends Neurosci*. 2005. 28:334-340.

Mathern G.W., Babb T.L., Pretorius J.K., Melendez M., Lévesque M.F. *Epilepsy Res*. 1995. 21:133-147.

McConley R., Martin R., Palmer C.A., Kuzniecky R., Knowlton R., Faught E. *Epilepsy and Behavior*. 2008. 13: 174-177

Meencke HJ, Janz D. *Epilepsia*. 1984. 25:8-21.

Meyer G, Perez-Garcia CG, Ábrahám H, Caput D. *J Neurosci*. 2002. 22:4973-4986.

Miller J.J., Baimbridge K.G. *Brain Res*. 1983. 278:322-326.

Molinari S., Battini R., Ferrari S., Pozzi L., Killcross A.S., Robbins T.W., Jouvenceau A., Billard J.M., Dutar P., Baker W.A., Cox H., Emson P.C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996. 93:8028-8033.

Nadel L., Willner J In: *The hippocampus*. 1989. New Vistas. Eds: Chan-Palay V. and Köhler C. Alan R Liss, New York, pp 17-31.

Nagerl U.V., Mody I. *J. Physiol*. 1998. 509:39-45.

Nägerl U.V., Mody I., Jeub M., Lie A.A., Elger C.E., Beck H. *J. Neurosci*. 2000. 20:1831-1836.

Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K. *Neuron*. 1995. 14:899-912.

Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. *J Neurosci*. 1997. 17:3727-3238.

Pauli E, Hildebrandt M, Romstöck J, Stefan H, Blümcke I. *Neurology*. 2006 67:1383-1389.

Sass KJ, Spencer DD, Kim JH, Westerveld M, Novelly RA, Lencz T. *Neurology*. 1990 40:1694-1697.

Sass KJ, Sass A, Westerveld M, Lencz T, Novelly RA, Kim JH, Spencer DD. *J Clin Exp Neuropsychol*. 1992 14:662-72

Sass KJ, Buchanan CP, Kraemer S, Westerveld M, Kim JH, Spencer DD. *Neurology*. 1995 Dec;45(12):2154-8.

Scharfman H.E., Goodman J.H., Sollas, A.L. *J. Neurosci*. 2000. 20:6144-6158

Scharfman H.E., Sollas A.L., Goodman J.H. *Neuroscience*. 2002. 111:71-81.

Scharfman H., Goodman J., McCloskey D. *Dev. Neurosci*. 2007. 29:14-27.

Selke K., Müller A., Kukley M., Schramm J., Dietrich D. 2006. *Brain Res*. 1120:191-201.

Seress L, Abraham H, Doczi T, Lazar G, Kozicz T. *Neuroscience*. 2004b. 125:13-24.

- Sloviter RS. *Hippocampus* 1991. 1:41-66.
- Sloviter RS. *Ann Neurol.* 1994. 35:640-654.
- Sloviter RS, Zappone CA, Harvey BD, Bumanglag AV, Bender RA, Frotscher M. *J Comp Neurol.* 2003. 459:44-76.
- Sloviter RS, Kudrimoti HS, Laxer KD, Barbaro NM, Chan S, Hirsch LJ, Goodman RR, Pedley TA. *Epilepsy Res.* 2004. 59:123-153.
- Thom M, Sisodiya SM, Beckett A, Martinian L, Lin WR, Harkness W, Mitchell TN, Craig J, Duncan J, Scaravilli F. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002. 61:510-519.
- Thom M, Martinian L, Parnavelas JG, Sisodiya SM. *Epilepsia.* 2004. 45:916-923.
- Thom M, Martinian L, Williams G, Stoeber K, Sisodiya SM. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005. 64:194-201.
- Tóth K., Eross L., Vajda J., Halász P., Freund T.F., Maglóczy Z. *Brain.* 2010. 133:2763-2777.
- Zhu Z.Q., Armstrong D.L., Hamilton W.J., Grossman R.G. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1997. 56:988-998.