

Doktori értekezés

**Myelinizáció vizsgálata normál és Down-szindrómás emberi
hippocampusban, valamint az egér központi
idegrendszerében**

Dr. Vincze András

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Dr. Komoly Sámuel
Egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Ábrahám Hajnalka
Egyetemi docens

Pécs, 2011

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	5
Bevezetés	6
1. Oligodendroglia sejtek, myelinizáció.....	6
2. A PACAP szerepe a myelinizációban.....	9
3. Hippocampus anatómiája és kapcsolatrendszere.....	10
4. A hippocampus funkciója, valamint szerepe egyes kórképekben.....	12
5. Az emberi hippocampus fejlődése.....	15
6. Myelinizáció a hippocampusban.....	17
7. Down-szindróma.....	18
Célkitűzések	21
Anyagok és módszerek	22
1. Felhasznált állatok.....	22
2. Emberi minták.....	22
3. Luxol Fast Blue festés.....	24
4. MBP-immunhisztokémia.....	24
5. Elektronmikroszkópia.....	25
6. Az MBP-denzitometria.....	26
Eredmények	27
1. Myelinizáció vizsgálata fény- és elektronmikroszkópos módszerekkel az egér corpus callosumában.....	27
Myelinizáció a születés utáni 3. napon.....	27
Myelinizáció a születés utáni 5. napon.....	27
Myelinizáció a születés utáni 7. napon.....	27
Myelinizáció a születés utáni 10. napon.....	28
Myelinizáció a születés utáni 14. napon.....	31
Myelinizáció a születés utáni 21. napon.....	31
Myelinizáció a születés utáni 28. napon.....	34
2. Myelinizáció az emberi hippocampusban.....	36
Myelinizáció magzati korban.....	36
Myelinizáció a születés körüli időszakban.....	36
Myelinizáció a születés után.....	38

3. Myelinizáció vizsgálata emberi hippocampusban Down-szindrómában.....	45
Myelinizáció magzati korban.....	45
Myelinizáció a 37. terhességi héten.....	45
Myelinizáció a születés utáni 1-3. hónapban.....	48
Myelinizáció a szülteés utáni 5-6. hónapban.....	48
Myelinizáció a szülteés utáni 8-11. hónapban.....	49
Myelinizáció a 2. életévben.....	51
Myelinizáció a 11-12. életévben.....	51
Az MBP-immunreakció denzitása.....	54
4. Myelinizáció vizsgálata hipofízis adenilát cikláz aktivátor polipeptid (PACAP) deficiens egerekben.....	56
Myelinizáció a születés utáni 3. napon.....	56
Myelinizáció a születés utáni 5. napon.....	57
Myelinizáció a születés utáni 8. napon.....	57
Myelinizáció a születés utáni 10. napon.....	60
Myelinizáció a születés utáni 15. napon.....	62
Myelinizáció a születés utáni 21. napon.....	64
Myelinizáció a születés utáni 28. napon.....	66
Myelinizáció a születés utáni 44. napon.....	66
Myelinizáció a születés utáni 60. napon.....	68
Myelinizáció vizsgálata LFB festéssel.....	68
Myelinizáció vizsgálata elektronmikroszkóp segítségével.....	68
Az eredmények megbeszélése.....	70
1. Myelinizáció vizsgálata C57BL/6-os törzsbe tartozó egérben.....	70
2. Myelinizáció vizsgálata PACAP-deficiens egérben.....	72
3. Myelinizáció az emberi hippocampusban.....	75
4. Myelinizáció az emberi hippocampusban Down-szindrómában.....	79
A Down-szindrómában szenvedők hippocampusának mérete.....	79
A hippocampus myelinizációja Down-szindrómában.....	79
Myelinizáció a gyrus dentatus hilusában.....	81
A legfontosabb eredmények összefoglalása.....	82
Irodalomjegyzék.....	84
Az értekezéstervezet alapjául szolgáló közlemények.....	96
Az értekezéstervezet alapját nem képező közlemények.....	96

Az értekezéstervezet témájában készült absztraktok.....	96
Az értekezéstervezet alapját nem képező absztraktok.....	97
Köszönetnyilvánítás.....	98

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

a	alveus
ALL	akut lymphoid leukémia
AS	Alzheimer-kór (Alzheimer-syndrome)
ASD	pitvari septum defektus (atrial septum defect)
ATP	adenozin-trifoszfát
ARDS	felnettkori respiratórikus distress szindróma
Ax	axon
BPD	bronchopulmonális dysplasia
BS	agytörzs (brainstem)
CA1, CA2, CA3	Ammon-szarv régiói
C	cerebellum
CC	corpus callosum
CHD	veleszületett szívbetegség (congenital heart disease)
Ci	cingulum
CiC	cinguláris kéreg
CPU	putamen-nucleus caudatus
CRI	cardiorespiratórikus insufficiencia
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DG	gyrus dentatus (dentate gyrus)
dhc	commisura hippocampalis dorsalis (dorsal hippocampal commissure)
DS	Down-szindróma
f	fimbria fornix/fornix
g	gyrus dentatus szemcsesejt rétege
GW	terhességi hét (gestational week)
h	hilus
IRDS	infantil respiratórikus distress szindróma
K	kontroll
KO	knock out
LFB	Luxol Fast Blue
LIF	leukéma inhibitoros faktor
l-m	stratum lacunosum-moleculare
M	motoros kéreg
m	a gyrus dentatus molekuláris rétege
MBP	myelin bázikus protein
N	nucleus
NRG	neuregulin
o	stratum oriens
OLG	oligodendroglia
p	stratum pyramidale
PACAP	hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid
PAC1, VPAC1, VPAC2	hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid receptorai
PB	foszfát puffer
PDGF	tromocita eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor)
PI	plexus choroideus
PLP	proteolipid protein
Pu	putamen
r	stratum radiatum
SIDS	csecsemőkori hirtelen halál szindróma
SS	ézőkéreg
VIP	vazoaktív intesztinális peptid
VSD	kamrai septum defektus (ventricular septum defect)
WT	vad típus (wild type)

BEVEZETÉS

Oligodendroglia sejtek, myelinizáció

A központi idegrendszerben az oligodendroglia (OLG) sejt képezi a myelinhüvelyt. Az érett OLG sejteknek két típusát különböztetjük meg: az interfaszikuláris, valamint a szatellita típust, melyek rutin festési eljárásokkal (hematoxin-eozin, vagy krezil-ibolya) és speciális módszerekkel (pl. immunhisztokémia) is elkülöníthetőek a többi gliasejtől. Az interfaszikuláris OLG sejtek a fehérállományban az axonok között sorban helyezkednek el, a szatellita sejtek a szürkeállományban az idegsejtek közvetlen szomszédságában találhatók. Az OLG sejtek funkciója -az idegsejtek mikrokoznyezetének a kialakítása mellett- a myelin képzése és fenntartása (Baumann és Pham-Dinh, 2001).

Mori és Leblond 1970-ben elektronmikroszkóppal az OLG sejteket világos, közepesen sötét (*intermedier*) és sötét fejlődési alakokra osztotta fel. A világos OLG sejtek osztódó sejtek, nagy, világos sejtmaggal, illetve citoplazmával. Jellemző rájuk, hogy a sejt méretéhez képest kevés intracelluláris organellumot tartalmaznak. A sejt felszínén számos nyúlvány kezdeti szakasza figyelhető meg, ezek a nyúlványok viszont nincsenek kapcsolatban az axonokkal. A közepesen sötét, *intermedier* OLG sejtek korlátozott számban osztódnak, kisebbek és magjuk mérsékelten sötétebb, mint a világos OLG-é. Citoplazmájuk alaplátrixa közepesen sötét, számos, jól fejlett sejtoranellum található meg benne. Ezen sejt feladata a myelin képzése a fejlődő idegrendszerben. A sejt aktivitását mutatja, hogy minden egyes OLG sejt körülbelül $5\text{-}50 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ myelin membránfelszín szintetizál naponta (Pfeiffer és mtsai, 1993). Az érett OLG sejtek felnőtt idegrendszerben az ott található OLG sejtek 90%-át teszik ki, feladatuk a myelin fenntartása (Parnavelas és mtsai, 1983). Citoplazmájuk nagyon gazdag sejtoranellumokban, melyek ferritin tartalmú, elektronenz alaplátrixba (Qi és mtsai, 1995) vannak beágyazva.

A foszfolipid kettősréteget elektronmikroszkóp segítségével vizsgálva 3 különálló rétegre oszthatjuk fel, mely alapján a sejtmembránt trilamináris *unit* membránnak nevezték el. A myelinizáció során az OLG sejt nyúlványa elkeskenyedik, elnyúlik, és a széli két trilamináris membrán belső fele összetapad, melynek eredménye egy pentamináris membrán. Az összetapadt belső membrán képezi a myelin erősen elektronenz, vastag, denz (*major dense*) vonalát, melyek között egy kevésbé elektronenz vonal (*intrapériod line*) jön létre. Ezen speciális szerkezet kialakításában

számos fehérje játszik szerepet (Baumann és Pham-Dinh, 2001). A kompaktálódott myelin összes fehérjéinek a 80%-át a proteolipid protein (PLP) és a myelin bázikus protein (MBP) teszi ki (Morell és mtsai, 1989). Jelentőségükre a fehérjéket kódoló génszakaszokban bekövetkezett mutációk világítottak rá. A PLP mutáns *jimpy* egérben a myelin kompaktáció zavarát írták le (Sidman és mtsai, 1964). A *shiverer* egérben, melyben az MBP génje szenvedett mutációt, jóval kevesebb myelinizált axont figyeltek meg, mint vad-típusú állatokban, és a myelinhüvely szintén nem kompaktálódott. Az egereknél tremort, gyakori epilepsziás rohamot és korai halálozást észleltek (Privat és mtsai, 1979, Readhead és Hood, 1990, Roach és mtsai, 1985). Mindez jelzi, hogy az MBP és a PLP elengedhetelen funkciót töltenek be a myelin kompaktációban, a myelin lamellái közti távolság megtartásában, valamint a *major dense line* kialakításában.

Az OLG sejtek fehérje expresszióját több tanulmányban vizsgálták, melyek szerint az MBP már akkor expresszálódik, amikor a sejt még nem képez myelint (Agrawal és mtsai, 1984, Baumann és Pham-Dinh, 2001, Hardy és Reynolds, 1993, Kuhlmann-Krieg és mtsai, 1988). Immunhisztokémiai vizsgálatok alapján az MBP mind a már myelint képző, mind a még nem myelinizáló OLG sejtekben megtalálható (Sternberger és mtsai, 1978a, b). Az MBP-immunhisztokémia lehetővé teszi a myelinizált axonok korai kimutatását, emellett pedig alkalmas a demyelinizáció detektálására is (Roussel és Nussbaum, 1981, Webster és mtsai, 1985). Nem ismert viszont, hogy az ontogenezis során a myelinizációban megjelenő és elektronmikroszkóppal elkülöníthető különböző denzitású OLG sejtek expresszálják-e MBP-t. Feltételezhető, hogy a különböző érési fázisban lévő OLG sejteket egymás mellett lehet látni. Az MBP-immunhisztokémia kiváló módszer a myelinizáció és a demyelinizáció vizsgálatára emberi mintákon is (Prineas és mtsai, 1984, Takamaya és mtsai, 1991), melyekben a postmortem elváltozások miatt nehéz a részleteket is megtartó elektronmikroszkópos preparátumokat készíteni. Ezért emberi szöveten a myelinizáció vizsgálatára elsősorban fénymikroszkópos módszereket alkalmaznak. Az MBP-immunhisztokémia mellett a velőshüvely festésére a rutin patológiában a módosított Klüver-Barrera módszert, a *Luxol Fast Blue* (LFB) festést használják (Klüver és Barrera, 1953). Az LFB módszer egy sav-bázis reakción alapul, melynek segítségével a magas lipoprotein tartalmú képletek válnak láthatóvá. Több, fejlődő emberi idegrendszerrel foglalkozó munka alapján a magzati korban, illetve a születés után megfigyelhető myelinizáció kimutatására az MBP-immunhisztokémia az LFB

festésnél érzékenyebbnek bizonyult (Bodhireddy és mtsai, 1994, Hasegawa és mtsai, 1992).

Idegrendszeri lokalizációtól függően egyetlen OLG sejt 15-50 nyúlvánnyal rendelkezik (Ludwin, 1997). Patkány nervus opticusában 35-50 nyúlványt írtak le (Peters, 1964). Az axon és az OLG közötti kapcsolatot számos mediátor befolyásolja. Az egyik ilyen myelinizációs szignál az idegsejt aktivitása (Bradl és Lassmann, 2010, Demerens és mtsai, 1996, Gyllensten és mtsai, 2009, Omlin, 1997), melynek során ATP és más adenosin mediátorok szabadulnak fel (Kuperman és mtsai, 1964, Maire és mtsai, 1984, Stevens és Fields, 2009). Az adenosin mediátorok az OLG prekursor sejtek differenciálódását és myelinizációját serkentik. Az ATP-re pedig az astrocyta reagál leukemia inhibitoros faktor (LIF) termelésével, mely az OLG sejteket myelinizációra serkenti (Ishibashi és mtsai, 2006). (Coman és mtsai, 2005). Ez a magyarázata a LIF *knock out* (KO) egérben látható erőteljes myelinizációs zavaroknak (Bugga és mtsai, 1998). Az astrocyta szerepét a myelinizációban megerősíti az astrocytára jellemző gliális fibrilláris savanyú protein KO egerekben (Liedtke és mtsai, 1996) és egy ritka, fatális, astrocytát érintő genetikai rendellenességgel járó kórképben, az Alexander szindrómában (Mignot és mtsai, 2004) megfigyelt myelinizációs zavar is. Ezen túlmenően az idegsejteknek is el kell érniük egy bizonyos szintű érettséget ahhoz, hogy képesek legyenek stimulálni a myelin képzését például neuregulin (NRG) és néhány axonális sejtadhéziós molekula (contactin) termelésével, melyek elősegítik az OLG sejtek differenciációját és a myelinizációt is (Charles és mtsai, 2002, Hu és mtsai, 2003, Nie és mtsai, 2003, Park és mtsai, 2001, Simons és Trajkovic, 2006). Továbbá, a myelinizáció előfeltétele egyes axonális fehérjék (pl. NCAM) expressziós mintázatának a megváltoztatása is

Az OLG sejtek többnyire a 0,2 μm átmérő feletti axonokat myelinizálják (Baumann és Pham-Dinh, 2001, Foster és mtsai, 1982, Hildebrand és mtsai, 1993, Voyvodic, 1989). Minél vastagabb egy axon, annál vastagabb a burkoló myelin réteg is, tehát az axonok átmérője és a myelin lemezek számának az aránya állandó, amit „*g-ratio*”-nak neveztek el (Friede, 1972). A látóideg axonjai vékonyabbak, és az OLG sejtek kevesebb számú lamellával borítják be ott az axonokat. Ha ezen OLG sejteket átültetjük a gerincvelő nagyméretű axonokkal rendelkező részeibe, a vastagabb axonoknak megfelelő számú lamellával hüvelyezik be az axont (Fanarraga és mtsai, 1998). Emellett kimutatták, hogy ha az axon átmérője csökken, a myelin rétegek száma is redukálódik (Elder és mtsai, 2001). A perifériás idegrendszerben az NRG polipeptid

1-es, illetve 3-as típusának a mennyisége az axon felszínén pozitív korrelációt mutat az axon átmérőjével, és ezen növekedési faktor meghatározhatja a myelin jelenlétét, illetve vastagságát (Michailov és mtsai, 2004, Taveggia és mtsai, 2005). Erre utal, hogy az NRG egyes típusait a normálisnál nagyobb mértékben expresszáló egerekben szignifikánsan vastagabb myelin volt az axonok körül (Brinkmann és mtsai, 2008), azonban NRG hiányos egerekben kevesebb réteget figyeltek meg a normálisnál (Roy és mtsai, 2007). Ezzel szemben viszont normális myelinizációt mutattak azon egér mutánsok, amelyek kisebb mértékben ugyan, mint a vad-típusú csoport, de expresszálták az NRG fehérjét (Piaton és mtsai, 2010). A központi idegrendszerben még nem ismert, milyen molekuláris mechanizmusokon keresztül ismeri fel az OLG a neki megfelelő átmérőjű axont. A myelinizáció szabályozásában számos, fentebb már említett, a sejt felszínhez kötődő és a két sejt fizikai kapcsolatát kialakító faktorok (pl. integrin β 1, NCAM, notch, lingo-1, contactin), illetve különböző mediátorok, növekedési faktorok (ATP, adenosin, LIF, PDGF, FGF) vesznek részt, mely hatások eredőjeként alakul ki a tényleges myelinizáció folyamata az ontogenezis folyamán (Coman és mtsai, 2005, Michailov és mtsai, 2004, Taveggia és mtsai, 2005). A folyamatban növekedési faktorok mellett trophikus hatású polipeptidok is részt vesznek, mint pl. a hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP), amely *in vitro* vizsgálatok alapján az OLG sejtek proliferációját serkenti (Lee és mtsai, 2001).

A PACAP szerepe a myelinizációban

A PACAP egy 38 aminosavból álló polipeptid, mely a szekretin/glukagon/vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP) család tagja (Arimura, 1998, Miyata és mtsai, 1989, Mustafa és Eiden, 2008). A PACAP-ot először a hipofízisben azonosították, mint egy polipeptidet, mely hatékonyan aktiválja az adenilát-cikláz enzimet (Miyata és mtsai, 1989), ezáltal növeli a sejtben található cAMP szintet. Később kiderült, hogy a polipeptid a központi és a perifériás idegrendszerben szinte mindenhol megtalálható (Arimura, 1998, Köves és mtsai, 1990, Vaudry és mtsai, 2000). A sejt típusok közül kimutatták, hogy az idegsejtek (Nielsen és mtsai, 1998a, b) és az astrocyták is expresszálják a polipeptidet (Tatsuno és mtsai, 1990), az OLG prekursor sejtek pedig a polipeptid receptorait (Lelievre és mtsai, 2006). A PACAP a PAC1, valamint VPAC1 és VPAC2 receptorokon keresztül fejti ki hatását. Mindhárom G-protein mediálta transzmembrán receptor fehérje (Laburthe és mtsai, 2007). A PACAP neuroprotektív szerepét számos vizsgálat bizonyította, rendelkezik neurotrophikus

hatásokkal, részt vesz a sejtproliferáció szabályozásában, hatást gyakorol az idegsejtek túlélésére, differenciációjára és nyúlványaik fejlődésére (Dicicco-Bloom és mtsai, 2000, Lu és Dicicco-Bloom, 1997, Vaudry és mtsai, 1999, Waschek és mtsai, 1998). Számos növekedési faktor, citokin és tirozin-kináz receptor mennyiségét szabályozza (Lelievre és mtsai, 2006, Waschek, 2002). PACAP-deficiens egerekben kimutatták az állatok korai mortalitását, a cerebellum szemcsesejtjeinek késői differenciálódását, emelkedett apoptózisra való hajlamukat és a sérült axonok regenerációjának a késését (Allais és mtsai, 2007, Armstrong és mtsai, 2008, Hashimoto és mtsai, 2001). Az ontogenezis során viszont korlátozott adataink vannak a PACAP OLG sejtek proliferációjára és myelinizációjára gyakorolt hatásairól. Lee és munkatársai 2001-ben leírták, hogy a PACAP *in vitro* stimulálja az OLG prekursor sejtek proliferációját, viszont késlelteti a progenitor sejtek differenciálódását. Az azonban, hogy az endogén PACAP *in vivo* hatással van-e a myelinizációra, még nem ismert.

Hippocampus anatómiája és kapcsolatrendszere

A hippocampus az archicortex része. A neocortex felől a hippocampus felé haladva az első archicortikális terület az entorhinális kéreg, melyet a subiculáris komplex követ. A hippocampust feloszthatjuk két fő komponensre, az Ammon-szarvra és a gyrus dentatusra. Az Ammon-szarv a subiculum folytatásaként tartalmazza a CA1, a kisméretű, CA3 régiótól nehezen elkülöníthető CA2 és a CA3 régiót. Az Ammon-szarvon belül külön rétegben helyezkedik el a piramis típusú idegsejtek sejttestjeit tartalmazó piramisest réteg, az ezen sejtek bazális dendritjeit tartalmazó oriens réteg, az axonokat tartalmazó alveus, valamint a piramisestek apikális dendritjeit magába foglaló stratum radiatum és lacunosum-moleculare. Ugyancsak külön rétegben helyezkednek el a gyrus dentatus nagymértékben egyedi, specializálódott sejtjei, a szemcsesejtek. A szemcsesejtek dendritjei a molekuláris rétegben találhatóak, ahol az entorhinális kéregben levő idegsejtek axonterminálisaival szinaptizálnak. Axonjaik a gyrus dentatus hilusában és a CA3 régió piramisestjeinek apikális dendritjein végződnek a stratum lucidumban. A fornix a hippocampus fő bemenő és kimenő axonjait tartalmazza, melyek a hippocampust subcortikális struktúrákkal kötik össze.

Az entorhinális kéreg idegsejtjei valamennyi asszociációs agykérgi területről kapnak axonokat, valamint a subiculumból és az Ammon-szarv CA1 régiójából (Amaral és Witter, 1995, Insausti és Amaral, 2004). Az entorhinális kéregből ered a hippocampus egyik legfontosabb bemenete, a perforáns pálya, melynek axonjai az

entorhinális kéreg II. és III. rétegének idegsejtjeiből indulnak, és a subiculáris komplexen keresztül, egészen a molekuláris rétegig futnak, ahol a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek, valamint a stratum lacunosum-moleculare-ban, a CA1 régió piramissejtjeinek a dendritjeivel szinaptizálnak. Az entorhinális kéreg III. rétegének neuronjai elsősorban a CA1 régió piramissejtjein végződnek. A perforáns pálya axonjai nemcsak az izgató típusú piramissejteken, hanem a közöttük lévő interneuronokon (GABAerg gátló sejteken) is végződnek, ha nem is azonos módon és nem azonos sűrűséggel (Freund és Buzsáki, 1996). A szemcsesejtek axonjai, amiket jellegzetes szinapszisuk alapján moharostoknak hívunk, a hilus sejtjein, és -a hiluson keresztül futva- főleg a CA3 régió piramistrétegében elhelyezkedő idegsejtek apikális dendritjeivel szinaptizálnak. A CA3 régió piramistrétegében elhelyezkedő neuronok axonjainak kollaterálisai (Schaffer-kollaterális) a CA1 régió piramistrétegének idegsejtjeivel szinaptizálnak. A perforáns pálya, a szemcsesejtektől a CA3 régió idegsejtjeihez futó moharost köteg és a Schaffer-kollaterális együttesen alkotja a hippocampus belső glutamáterg, izgató funkciót ellátó neuronális körét, a triszinaptikus kört. A CA1 régió piramis típusú neuronjai kölcsönös kapcsolatban állnak a subiculáris komplex idegsejtjeivel, és axonokat küldenek az entorhinális kéreg mélyebb rétegeiben (IV-V.) elhelyezkedő idegsejtekhez. A hippocampus egyik lényeges subcortikális bemenete a septális idegsejtekből ered, mely sejtek axonjai a fornixon keresztül érik el a hippocampust. A septumban eredő kolinerg axonok a hippocampus valamennyi régiójának valamennyi rétegét beidegzik. Ugyanakkor a mediális septum GABAerg sejtjeiből eredő gátló axonok specifikusan csak gátló idegsejteken végződnek úgy a gyrus dentatusban, mint az Ammon-szarvban (Freund és Antal, 1988, Freund és Buzsáki, 1996, Gulyás és mtsai, 1990, Kiss és mtsai, 1990). A fornixon keresztül érkeznek a hippocampusba afferens axonok a bazális előagyi és hypothalamikus magvak felől is. Ezek a axonok az alveusban, a hiluson keresztül futva érik el célsejtjeiket a gyrus dentatusban, és az Ammon-szarvban.

A hippocampus triszinaptikus belső kapcsolatában (gyrus dentatus, CA3, CA1) nem figyelhető meg klasszikus értelemben vett kétirányú kapcsolat a serkentő idegsejtek között (Amaral és Witter, 1989). Az egyedüli visszacsatolás a hiláris mohasejtek és a gyrus dentatus szemcsesejtjei között található, de ez sem nevezhető tényleges reciprok kapcsolatnak, ugyanis a mohasejtek nem ugyanazon szemcsesejtet idegzik be, amelyektől bemenetet kaptak. Az Ammon-szarvon belül tehát egyirányú a kapcsolat, míg az Ammon-szarv CA1 régiója és a mellette található subiculum, majd a

még távolabbi entorhinális kéreg között a kapcsolat topográfiailag rendezett módon, reciprok létezik.

A hippocampus funkciója, valamint szerepe egyes kórképekben

A hippocampus kiterjedt, kérgi és subcortikális agyi régiók felől érkező bemenetei, valamint saját, belső neuronális kapcsolatai révén hatékonyan vesz részt olyan alapvető kognitív folyamatokban, mint a tanulás és emléknymok rögzítése, vagy például a téri tájékozódás.

A téri tájékozódás tekintetében a hippocampus fő feladata a külvilág tárgyait és ezek térbeli elhelyezkedését reprezentáló térkép létrehozása, tárolása és felhasználása (O'Keefe és Nadel, 1978). Patkányokban egysejt-aktivitás vizsgálata segítségével O'Keefe és Dostrovsky (1971) megfigyelték azt, hogy a hippocampus egyes sejtjei (*place* sejtek) csak a patkány rendelkezésére álló terület egy bizonyos pontján mutattak nagyobb tüzelési frekvenciát, valamint azt is, hogy a sejtaktivitás pontos helyét és mintázatát a környezet tájékozódási pontjai határozták meg. Ha ezen tájékozódási pontokat elforgatták, a helysejtek mezeje (*place field*) a forgatás irányának és mértékének megfelelően megváltozott. Majmokban is találhatóak hasonló funkciójú sejtek, melyek akkor tüzelnek amikor az állat a környezet egy adott pontjára tekint („hova nézek” sejtek, *spatial view* sejtek, Rolls és O'Mara, 1995). A hippocampus szerepét számos kísérlettel támasztották alá, melyben a patkányok téri tájékozódását vizsgálták, többek között Morris-féle vízi, vagy radiális labirintusban (Eichenbaum és mtsai, 1990, Morris és mtsai, 1982, 1990, Whishaw és mtsai, 1995). A hippocampus léziója esetén a vízi labirintusban megtanult információ teljesen elveszik, és erősen károsodik a feladat újratanulásának a képessége is (Bolhuis és mtsai, 1994, Sutherland és mtsai, 2001).

A sejtek aktivitását tekintve különbség van a neocortex és a hippocampus között. A neocortex idegsejtjei meglehetősen magas frekvenciájú (20 Hz) alapaktivitással bírnak, míg a hippocampus idegsejtjei ennek csak a töredékét mutatják (0,01-0,1 Hz), ami viszont ennek sokszorosára nőhet (10-20 Hz) pl. a helysejtek aktivitása révén (Quirk és mtsai, 1992). A fentiek alapján a neocortex és a hippocampus más-más kódot használ az információk feldolgozására. Ez magyarázatot adhat pl. arra is, hogy miért nem képes a hippocampus funkcióját átvenni más kéregterület. A neocortex „sűrűbb kódot” (*dense coding*) használ, ami valószínűleg alkalmasabb általánosításra, az információk integrálására és nagyobb tárolókapacitást tesz lehetővé.

Ezzel szemben a hippocampus „ritkább kódot” (*sparse coding*) használ, ahol jobb a jel-zaj arány, a kódolásban pedig kisszámú sejt vesz részt egyszerre, mely alkalmasabbá teszi nagyszámú, egymástól független információ, interferenciáktól mentes tárolására. A hippocampusra jellemző alacsony tüzelési frekvenciáért egy speciális elrendezés felelős. A neocortextól eltérően itt a serkentő sejtek négyszer-ötször több gátló idegsejten végződnek, mint serkentő sejten (Acsády és mtsai, 1998). Ugyanakkor a gátlósejtek szinapszisai is szinte kizárólag serkentő sejteken végződnek, és csak kismértékben alakítanak ki kapcsolatokat más gátló idegsejtekkel, tehát a diszinhibíció minimális mértékű (Acsády és mtsai, 2000). A gyrus dentatus valószínűleg az entorhinális kéregből kapott sűrű kódot fordítja le a fenti speciális elrendezés segítségével a saját ritka kódjára. Az átfordításra azért lehet szükség, mert ha egy neuronhálózatban a tárolni kívánt mintázatok egymással átfednek, akkor egymás előhívását akadályozzák, és ez az interferencia annál erősebb, minél több mintázat, minél nagyobb mértékben fed át (Rolls, 1996). A zavaró kölcsönhatások elkerülése érdekében célszerű a tárolni kívánt mintázatok hasonlóságának a csökkentése. Ennek egyik legegyszerűbb eszköze a mintázat alkotásában résztvevő sejtek számának csökkentése.

A szemcsesejtek az információt szinte teljes egészében átadják a CA3 régió piramisesejteknek, mivel a szemcsesejtek meglehetősen nagy határfokkal képesek kisütni a posztszinaptikus CA3 régió piramisesejtjeit (Henze és mtsai, 2001). Ennek a magyarázata a szemcsesejt speciális axonterminálisa, a mohaterminális. Ezen óriási terminálisokkal egy szemcsesejt mindössze 12-15 piramisesejtet innervál, viszont a terminálisok segítségével egyetlen idegsejten 30-40 szinapszist alkot (Acsády és mtsai, 1998, Chicurel és Harris, 1992). Mivel a szemcsesejtek a CA3 régió piramisesejtjei mellett nagyszámú gátló idegsejtet is innerválnak, képesek az éppen szemcsesejtek által nem serkentett piramisesejtek tüzelési frekvenciájának a csökkentésére, tehát az adott tanulási folyamatban csak azok a piramisesejtek lesznek aktívak, melyeket a szemcsesejtek „kijelöltek”. A kiválasztott CA3 régióbeli sejtcsoportok rövid idegig (50-120 ms) tartó együttes tüzelése (éles hullámok) valószínűleg az információ szelekció alapját képezik (Buzsáki, 1986). A tényleges információtárolás az Ammon-szarv CA3 régiójában alakul ki. Mivel a CA3 régió piramisesejtjei, hasonlóan a neocortex piramisesejtjeihez, rendelkeznek nagyszámú reciprok kapcsolattal is, ezen rekurrens kapcsolatok szinaptikus plaszticitás útján való megerősödése, vagy gyengülése befolyásolja azt, hogy mely mintázatok képesek hosszabb távon fennmaradni. A megerősödött aktivitás mintázatok emléknymokként elraktározódnak, és szükség

esetén előhívhatóak kívülről érkező olyan bemenetekkel, melyek hasonlítanak az eredeti mintázathoz. A fentiek alapján a hippocampus funkciójával kapcsolatosan kialakult egy modell, ami több munkafázist ír le. A modell megkülönböztet „tanuló”, „előhívó” és „visszajátszó” állapotokat, melyek között subcortikális eredetű (például GABAerg és kolinerg axonok a mediális septumból), moduláló bemenetek hatására történhet átváltás. A tanuló állapotban a már fentebb leírt éles hullámok segítségével megtörténik az emléknymokban résztvevő sejtek kiválasztása, melyet a sejtek közötti szinaptikus kapcsolatok megerősödése követ. A szinaptikus kapcsolatok megerősítésére az egyik legelfogadottabb magyarázat a hosszú távú potenciáció (*long term potentiation*, LTP). Az „előhívó” állapotban -egy, az emléknymhoz részlegesen, vagy teljesen hasonló, esetleg módosított hívóinger segítségével- az emlékképet reprezentáló szinaptikus hálózat tüzelési frekvenciája megnő. Fiziológiai adatok alapján feltételezhetünk egy harmadik állapotot is. A „visszajátszó” állapot során a mintázatok nem külső előhívó inger hatására, hanem hippocampuson belüli, autonóm módon választódnak ki. Ez a hippocampalis aktivitás elvezethet a vele kapcsolt agykérgi régiók, illetve mintázatok újraaktiválódásához (Chobrak és Buzsáki, 1996), ami a kérgi plaszticitáson keresztül hozzájárulhat az emlék hippocampustól függetlenné váláshoz, konszolidációjához.

A fentiek alapján következik, hogy bármilyen károsodás, mely a hippocampus valamely bemenetét vagy saját belső neuronális kapcsolatait érinti, nagymértékű funkcióvesztéshez vezethet. A károsodás megnyilvánulhat az idegsejtek számának a csökkenésében, vagy az ontogenezis során rendellenes vándorlásukban, lokalizációjukban, a szinapszisok számának a csökkenésében vagy éppen az axon rendellenes, nem megfelelő vastagságú, esetleg a fejlődés során túl későn megjelenő myelinizáltságában. A kiterjedt és összefüggő belső kapcsolatrendszer miatt a fentiekben említett bármelyik károsodás a teljes hippocampus működésére hatással lehet.

Amnéziával kapcsolatos neuropszichológiai megfigyelések szerint a hippocampus kulcsszerepet játszik emberben is egyes memórianyomok kialakításában és valószínű átmeneti tárolásában. Az emléknymok később részleges, vagy módosított hívóingerek segítségével előhívhatók emberben is (Corkin 2002, Scoville és Milner, 1957). Gyógyszerre nem reagáló epilepsziás betegek esetén, ahol elektródokat ültetnek be a fókusz pontos meghatározása érdekében, lehetőség nyílt egysejt-aktivitás vizsgálatára a műtét előtt és alatt. Kiderült, hogy a hippocampus, amygdala, és az entorhinális kéregben vannak olyan specifikus sejtek, melyek akkor tüzeltek, ha egy

adott arcot mutattak a betegek, néhány közülük pedig akkor is aktív maradt, amikor a beteget megkérték, hogy idézze fel a látott arcot (Kreiman és mtsai, 2000). Valószínűsíthető, hogy emberben is komplex ingerekre reagálnak a hippocampus sejtjei, és feltételezhetően (legalábbis rövid távon) ugyanazok a sejtek játszanak szerepet a memória felidőzésében is. A fenti emlékyomokra érzékeny sejteket a helysejtek analógiájára memóriasejteknek nevezték el.

A téri tájékozódás és az ehhez szükséges vizuális memória mellett a hippocampus szerepet játszik a verbális memóriában is. Emberben a jobb oldali hippocampus főként a vizuális memóriában, a bal oldali a verbális memóriában játszik szerepet. A deklaratív memóriát tekintve bizonyos kérgi struktúrák (entorhinális-, perirhinális-, parahippocampalis kérgi részek) is elengedhetetlenek a memóriafunkciókhoz a hippocampus funkcionális épsége mellett (Mishkin és Murray, 1994, Squire és Zola, 1996). Abban az esetben, ha a hippocampus, a subiculum és az entorhinális kéreg mindkét oldalon sérült, súlyos anterográd amnézia alakul ki az időben gradált retrográd amnézia mellett, mely akár 25 évre visszamenőleg is jelen van (Rempel-Clower és mtsai, 1996). Ezekben az esetekben az anterográd-, illetve a retrográd amnézia foka a legtöbb esetben korrelált a neuropatológiai feldolgozás során észlelt károsodás mértékével. Azon a betegeknél, akiknél a károsodás főként a hippocampus CA1 régiójára korlátozódott, csak kismértékű (körülbelül 1-2 éves) retrográd amnézia alakult ki (Rempel-Clower és mtsai, 1996), viszont azokban az esetekben, ahol a károsodás kiterjedt több hippocampalis régióra és az entorhinális kéregre is, a retrográd amnézia mértéke is sokkal súlyosabb (körülbelül 15 év) volt (Rempel-Clower és mtsai, 1996).

Nem meglepő tehát, hogy a rendkívül eltérő kóroki és az életkor különböző szakaszaiban keletkező hippocampalis károsodások (Down-szindróma, Alzheimer-kór, epilepsia) esetében közös jellemző a memóriafunkció zavara.

Az emberi hippocampus fejlődése

A hippocampus idegsejtjei a germinatív mátrixból származnak. A neocortexszel ellentétben, az archicorticális hippocampus germinatív mátrixában csak ventrikuláris zóna található, a subventrikuláris zóna teljesen hiányzik. Az Ammon-szarv leendő idegsejtjei innen vándorolnak a piramissejt rétegbe, viszont a gyrus dentatusba vándorló idegsejtek a hilusba vándorolnak először, ahol visszanyerve osztódási potenciáljukat, egy másodlagos germinatív mátrixot alakítanak ki, ahonnan majd a szemcsesejt rétegbe

mennek. A 12. terhességi héten, mely a legkorábbi vizsgált időpont, a hippocampus Ammon-szarva, valamint gyrus dentatusa egyenes vonal mentén helyezkedik el (Hines 1922, Humphrey, 1967). Ekkor az osztódó sejtek, melyek később az Ammon-szarv piramisajt rétegébe és a gyrus dentatusba vándorolnak, szintén egyvonalban helyezkednek el a germinatív mátrixban. A 14. terhességi héten a gyrus dentatus már az Ammon-szarv CA1 régiója felé hajlik és messzebb helyezkedik el a germinatív mátrixtól. A fentiek alapján elmondhatjuk, hogy emberben a hippocampus idegsejtjei korán képződnek és differenciálódnak, aminek révén már a 15. terhességi héten kialakulnak az egyes rétegek (Arnold és Trojanowski, 1996, Seress és Ábrahám, 2008). A 22. terhességi héten az osztódó sejtek teljesen eltűnnek az Ammon-szarv CA3 régiójának ventrikuláris zónájából, és jelentős számú osztódó idegsejtet már csak a hilusban látni. Az Ammon-szarv CA1 régiójában az idegsejtek lassabban differenciálódnak, mint a CA3 régióban, és ugyanitt a germinatív mátrix is később tűnik el. A 28 hetes magzatban már nagyon vékony a germinatív mátrix, és csak elvétve tartalmaz osztódó sejteket. Ugyanakkor, teljesen csak a születés utáni 3 hónapban tűnik el a mátrix. Ezzel szemben pl. a temporális kéregben még a születés utáni 5. hónapban is felismerhető a germinatív zóna, és teljesen csak az első életévben tűnik el (Seress, 2001). A gyrus dentatus hilusában jelentős számú osztódó sejtet figyeltek meg a 16-22. terhességi hét alatt is, mely számottevően lecsökkent a 24. terhességi hétre (Seress, 2001). Ugyanakkor alacsony százalékban (>0,1%) egészen a 6. születés utáni hónapig megfigyeltek osztódó sejteket.

Az Ammon-szarv idegsejtjei hamarabb differenciálódnak, mint a gyrus dentatus szemcsesejtjei, de pl. a hilus neuronjai korábban differenciálódnak, mint a legtöbb Ammon-szarvbéli piramisajt. Ugyanakkor a terhesség 3. trimeszterében képződött szemcsesejtek a gyrus dentatusban csak későn, a születés után érik el a teljes morfológiai, neurokémiai és funkcionális integritásukat (Ábrahám és mtsai, 2009, Seress, 1992). A szemcsesejtek elnyújtott érése hatást gyakorol a célsejtek morfológiai fejlődésére, éppen ezért a mohasejtek, a CA3 és a CA1 régió piramisajtjei csak későn, az első évtized második felében érik el a felnőttre jellemző érési szintet (Seress, 2001, Seress és Mrzljak, 1992). Mind a gyrus dentatus, mind az Ammon-szarv több rétegből áll, valamint kiterjedt afferens és efferens kapcsolatrendszerrel rendelkező struktúra. Az afferens és efferens kapcsolatok ugyancsak nem egyidőben fejlődnek. A septumban eredő kolinerg axonok, melyek beidegzik a hippocampust, már a 10. terhességi héten azonosíthatóak a fornixban (Kostović, 1986).

A hippocampus funkcióját nem képes ellátni a belső triszinaptikus kör megléte nélkül, tehát az entorhinális kéreg, az Ammon-szarv idegsejtjei és a gyrus dentatus szemcsesejtjei, valamint azok megfelelő szinaptikus kapcsolatai nélkül. Emellett a gátló sejteknek, valamint azok GABAerg szinapszisainak, a felnőttre jellemző fejlettséget kell mutatniuk. A szemcsesejtek és a GABAerg idegsejtek morfológiai és neurokémiai fejlődése arra utal, hogy a hippocampus idegi kapcsolatai a felnőttre jellemző szintet a 2-8. életév között érik el. Noha a hippocampus már csecsemőkorban szerepet játszhat bizonyos memóriafolyamatokban (de Haan és mtsai, 2006), a felnőttre jellemző, hippocampus-függő memóriaképzés nem tehető korábbra, mint a korai gyerekkor (3-5. év).

A hippocampus funkciója, a hippocampus belső neuronális körei mellett, erősen függ a más agyterületekről beérkező afferens pályák érésétől. Ezen pályák nagyrészt myelinizáltak. Mivel a myelinhüvely befolyásolja az axon vezetési sebességét, ezért a hippocampus teljes funkcionális éréséhez szükséges a megfelelő időben és az axon átmérőjéhez képest megfelelő lamellával rendelkező myelinhüvely képzése is, mely a neuronok érése után kezdődhet meg.

Myelinizáció a hippocampusban

Emberben a hippocampus és a hippocampushoz futó afferensek myelinizációjának pontos időperiódusa nem ismert, de tudjuk, hogy a myelinizáció az emberi agykéregben születés után lezajló folyamat (Kinney és mtsai, 1988). Ismert, hogy MBP-immunhisztokémiával az első myelinizált axonokat már a születéskor ki lehet mutatni a subicularis komplexben, entorhinális kéregben, alveusban és a CA1 régió subiculumhoz közeli részein, ami arra utal, hogy a perforáns pálya korán myelinizálódik (Arnold és Trojanowski, 1996). Ezen megfigyelés összhangban van az entorhinális kéreg idegsejtjeinek korai differenciálódásával (Kostović és mtsai, 1989, 1993). Arnold és Trojanowski (1996) megfigyelései alapján a hippocampus myelinizációja emberben a 16. életévben éri el a felnőttre jellemző szintet.

A hippocampusban az első szinapszisok már 16 hetes magzatokban megjelennek (Kostović és mtsai, 1989), ezzel szemben a myelinizáció születés körül kezdődik (Arnold és Trojanowski, 1996). A jelentős mértékű myelinizáció kialakulásához azonban a myelint termelő sejtek szaporodása és érése szükséges, valamint joggal feltételezhető, hogy az OLG sejtekben a myelin specifikus fehérjék termelése már a születés előtt kimutatható. Mivel az Ammon-szarv és a gyrus dentatus egyes rétegeinek

sejtjei, valamint afferens és efferens kapcsolatai eltérő időpontokban fejlődnek, valószínű, hogy a myelinizáció is eltérő időpontban történik az egyes régiókban, rétegekben. Jelenleg nincs adatunk a myelin megjelenésének az időpontjáról, valamint a myelinizáció folyamatáról és arról, hogy az mikor éri el a felnőttre jellemző szintet a hippocampus egyes rétegeiben.

Down-szindróma

A Down-szindróma a leggyakoribb genetikai megbetegedés (1/700-800 élve születés), mely mentális retardációhoz vezet (Epstein, 1995, Nadel, 2003). A betegek intelligencia hányadosa 20-80-as értékek között mozog, ami utal a szindróma heterogenitására. A betegség alapvető oka a számfeletti 21-es kromoszóma (21-triszómia). Leggyakrabban meiotikus nondiszjunkció által jön létre. Ritkábban előfordul, hogy a 21-es kromoszóma más kromoszómára transzlokálódik, megteremtve ezzel a lehetőséget Down-szindrómás egyén születésére. Kismértékben a korai egyedfejlődés során végbement mitotikus nondiszjunkció (mozaikosság) során is kialakulhat a betegség. Utóbbi esetben nem az összes testi sejt tartalmazza a számfeletti 21-es kromoszómát. A betegség vezető tünete a mentális retardáció, de gyakoriak emellett, a sokszor műtéti beavatkozást igénylő szívfejlődési rendellenességek (septum defektusok), vagy ritkábban a vesék fejlődési rendellenességei. A beteg várható életkorát döntően a központi idegrendszert nem érintő fejlődési rendellenességek határozzák meg. Amennyiben ezek korrigálhatóak, a betegek az átlagéletkornak megfelelő ideig is élhetnek. A Down-szindrómában szenvedő gyerekeknek speciális, személyre szabott oktatásra van szükségük, mivel a tanulási képességük elmarad a kortársaikhoz képest. Megfelelő oktatással viszont képesek beilleszkedni a társadalomba, de életük végéig felügyeletet igényelnek. A betegek életminőségét rontja, hogy Down-szindrómában 35 éves kor után sokkal nagyobb a valószínűsége az Alzheimer-kór kialakulásának, mint egészséges emberekben (Tyrell és mtsai, 2001, Zigman és mtsai, 1996). Gyakorlatilag valamennyi Down-szindrómában szenvedő betegen megjelennek az Alzheimer-kórra jellemző plakkok, és állapotuk a kor előrehaladtával súlyosbodik. A jelenlegi ellátás mellett 1-1 Down-szindrómában szenvedő beteg a 65 évet is megéri. A mentális retardáció pontos patogenezise nem ismert. MRI volumetriával kimutatták, hogy Down-szindrómások agya, különösen a hippocampus és a kérgi szürkeállomány térfogata kisebb az egészséges csoportoknál (Raz és mtsai, 1995, Pinter és mtsai, 2001). Ugyanakkor, ez az eltérés önmagában nem

ad magyarázatot a Down-szindrómában megfigyelhető mentális retardációra, mivel az agytérfogat és a intelligencia között nem sikerült szoros kapcsolatot bizonyítani.

Számos korai fejlődéssel foglalkozó szerző arra a következtetésre jutott, hogy nem sokkal születés előtt a Down-szindrómások agya nem különbözik az egészségesekétől, nevezetesen, mindkét esetben megfelelő volt a koponya, illetve az agy alakja, súlya, a kérgi régiók aránya, a kisagy, agytörzs mérete, és az egyes neurotranszmitterek előfordulása is (Bar-Peled és mtsai, 1991, Brooksbank és mtsai, 1989, Flórez és mtsai, 1990, Schmidt-Sidor és mtsai, 1990). Bizonyos eltérések megfigyelhetők már a 22. gesztációs héten (Engidawork és Lubec, 2003, Golden és Hyman 1994, Schmidt-Sidor és mtsai, 1990, Wisniewski és Kida, 1994). Születés után számos kérgi struktúra térfogata kisebb volt az egészségesekénél, a kérgen belül szabálytalan rétegezettséget figyeltek meg, illetve az egyes idegsejtek a kontrolloktól eltérő dendritfával, dendrittüskével, kevesebb, és abnormális szinapszissokkal jellemezhetők (Becker és mtsai, 1986, Marin-Padilla 1976, Suetsugu és Mehraein, 1980, Takashima és mtsai, 1989, 1994, Weitzdoerfer és mtsai, 2001). A hippocampus méretcsökkenésének egyik lehetséges magyarázata lehet az, hogy Down-szindrómásokban alacsonyabb idegsejtképződést figyeltek meg az Ammon-szarv és a gyrus dentatus germinális rétegeiben (Contestabile és mtsai, 2010, Guidi és mtsai, 2008). Születés után az Ammon-szarvban, és a gyrus dentatusban már csak jelentéktelen mértékű sejtújdonképződés figyelhető meg (Seress és mtsai, 2001). A sejtképződés mellett az agy térfogatát az axonok, dendritek növekedése, érése, valamint a szinapszisképződés és a myelinizáció is jelentős mértékben növeli. MRI volumetriával kimutatták, hogy a hippocampus térfogata születés után is jelentősen növekszik, ami alátámasztja a fenti elképzelést. A hippocampusban a dendritikus és az axonális növekedés hosszan tartó folyamat (Ábrahám és mtsai, 2009, Purpura 1975, Seress és Ábrahám, 2008). Például a gyrus dentatusban a szemcsesejtek és a mohasejtek érése eltart egészen késő gyermekkorig (Ábrahám és mtsai, 2009, Seress 1992, 2001, Seress és Mrzljak, 1992). Mindazonáltal a hippocampus születés utáni növekedésében bizonyára szerepet játszik a myelinizáció folyamata is. (Giedd és mtsai, 1996, Suzuki és mtsai, 2005). A myelinizáció jelentősége az egészséges emberi agy funkcionális érése során ismert (Deoni és mtsai, 2011). Éppen ezért a myelinizációs zavarok fontos szerepet játszhatnak a hippocampus Down-szindrómásokban megfigyelhető térfogatcsökkenésében. A fenti feltételezésünket megerősíti, hogy Down-szindrómában kimutattak közvetlen, vagy kevesebb idegsejtszámmal, ezáltal kevesebb axonnal

magyarázható myelinizációs eltéréseket (Koo és mtsai, 1992, Wisniewski, 1990), ugyanakkor közöltek a myelinizációs zavarra elsődlegesen utaló adatokat is (Palminiello és mtsai, 2008, Vlkolinský és mtsai, 2001).

Tekintettel a Down-szindróma komplex tünetegyüttesére, joggal feltételezhető, hogy több agyterület károsodása áll e genetikus kórkép tüneteinek mögött. Down-szindrómában vezető tünet a mentális retardáció, aminek része a memória beírásának zavara a születéstől kezdve. Logikusan feltételezhető, hogy részben a hippocampus valamilyen fejlődési, vagy funkcionális zavara állhat a Down-szindróma tünetegyüttese mögött, melynek háttérében a myelinizáció zavara is állhat.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Célul tűztük ki, hogy a myelin kimutatására használható módszerek közül kiválasztjuk a myelinizáció vizsgálatára számunkra legalkalmasabb módszert. Ehhez modellként az egéragy corpus callosumát választottuk, ahol vizsgálni kívántuk az OLG sejteknek, azok nyúlványainak, valamint a myelinizált axonok megjelenését, a citoplazma és a myelinhüvely szerkezetét az ontogenezis során. A módszerek közül rutin patológiai eljárásban a myelin kimutatására használt módosított Klüver-Barrera, azaz *Luxol Fast Blue* (LFB) festést, a myelin bázikus protein (MBP) kimutatását lehetővé tevő immunhisztokémiát és az ultrastruktúra vizsgálatára alkalmas elektronmikroszkópiát kívántuk összehasonlítani.
2. A PACAP széles körű citoprotetktív hatása ismert. Számos *in vitro* adat bizonyítja a PACAP szerepét az idegrendszer fejlődésében, beleértve a myelinizációt is. Nem ismert azonban, hogy az endogén PACAP milyen szerepet tölt be a myelinizációban *in vivo*. A PACAP-deficiens egerek kiváló lehetőséget nyújtanak arra, hogy vad-típusú állatokkal összehasonlítva tanulmányozzuk a PACAP hatásait az egyes idegrendszeri folyamatokra. Ezért célul tűztük ki, hogy összehasonlíttjuk PACAP-hiányos, és vad típusú egerekben a myelinizáció folyamatát az ontogenezis során.
3. Vizsgálni kívántuk emberi hippocampus egyes rétegeiben az első OLG sejtek, valamint myelinizált axonok megjelenését és a myelinizációt. Ehhez MBP-immunhisztokémiát használtunk.
4. A Down-szindrómában megfigyelhető mentális retardáció korábbi tanulmányokban is megemlített lehetséges összefüggéseinek tisztázása céljából vizsgálni kívántuk a myelinizációt Down-szindrómában. Az általunk találtakat össze kívántuk hasonlítani a kontrollban megfigyelt myelinizációval.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Felhasznált állatok

Kísérleteinkhez C57BL/6-os törzsbe tartozó vad, és PACAP-deficiens (Hashimoto által rendelkezésünkre bocsátott, Hashimoto és mtsai, 2001) egereket használtunk fel. Az összes felhasznált egér hímnemű volt. A myelinizáció fejlődésének vizsgálatára a célkitűzésekben megfogalmazott 1. kísérlethez, a C57BL/6 törzsbe tartozó egerek közül a születés utáni 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 napos, valamint a célkitűzésekben megfogalmazott 2. kísérlethez, a C57BL/6 törzsbe tartozó vad típusú és PACAP-deficiens egerek közül postnatális 3, 5, 8, 10, 15, 21, 28, 44, 60 napos egereket használtuk. A egerek születésének napja a 0. napnak felelt meg. Minden egyes vizsgált korban minimálisan 2 egeret dolgoztunk fel. A születés utáni 3, 5, 7 napos egereket mély altatás után dekapitáltuk, majd az agy eltávolítását követően foszfát pufferben (PB, 0,1M, pH 7,4) oldott 4%-os paraformaldehidben, egy éjszakán keresztül fixáltuk. Az idősebb állatokat (8, 10, 14, 15, 21, 28, 44, 60) először PB-vel (0,1M, pH 7,4), majd PB-ben oldott 4%-os paraformaldehiddel perfundáltuk. Az agy eltávolítását követően a perfúzióhoz is használt fixáló oldatban 4 órán keresztül fixáltunk szobahőmérsékleten.

A fixálást követően az agyakat dehidráltuk, majd paraffinba ágyasztuk. A beágyasztott blokkokat coronalis, néhányukat sagittalis síkban metszettük szánkamikrotómmal (Reichert, Németország). A 10 µm-es metszeteket króm-zselatinos, a LFB festéshez felhasznált metszeteket 3-aminopropil-triethoxi-silánnal bevont tárgylemezekre vettük fel.

Emberi minták

Kutatásainkhoz kontrollként összesen 10 magzat illetve koraszülött, 2 születés körüli újszülött (38-41 hetes) és 8 születés után elhunyt csecsemő, gyermek, fiatal, és felnőttből származó hippocampus szövetblokkot használtunk fel. Kontroll esetekben a halálok nem függött össze neurológiai kórképekkel, szellemi retardációval vagy koponyasérüléssel. Felhasználtunk továbbá még 10 magzat illetve koraszülött, 10 születés után elhunyt csecsemő, gyermek illetve fiatal felnőtt Down-szindrómás emberből származó hippocampus szövetblokkot is. A 17-21 hetes magzatok a szülészeti klinika genetikai tanácsadása során azonosított, megindított abortuszról származtak.

1. táblázat: A vizsgálathoz használt magzatok és felnőttek adatai

Esetszám	Nem	Születési súly	Terheségi kor (hetekben)	Posztnatális életkor	Kor elhalálozáskor	Halálók
K 1.	♀	NA	17	-	17 hét	fiatalkorú anya
K 2.	♀	320g	20	-	20 hét	spontán vetélés
K 3.	♀	NA	21	-	21 hét	spontán vetélés
K 4.	♀	410g	22	-	22 hét	spontán vetélés
K 5.	♂	560g	24	-	24 hét	spontán vetélés
K 6.	♀	585g	29	3 nap	29 hét	CRI, IRDS
K 7.	♀	1670g	33	-	33 hét	CRI
K 8.	♂	1890g	35	2 nap	35 hét	CHD, IRDS
K 9.	♂	2500g	37	3 nap	37 hét	BPD
K 10.	♂	2800g	39	1 nap	39 hét	CRI
K 11.	♂	2160g	36	4 hét	40 hét	CRI
K 12.	♂	4380g	41	-	41 hét	vena pulmonalis transpozíció
K 13.	♀	2780g	39	3 hónap	3 hónap	CRI, sepsis
K 14.	♀	2700g	40	5 hónap	5 hónap	SIDS
K 15.	♀	3050g	40	2 év	2 év	Wilms tumor
K 16.	♀	3100g	41	2 év	2 év	pneumonia, sepsis
K 17.	♀	2860g	38	3 év	3 év	CRI
K 18.	♀	2810g	40	8 év	8 év	ALL
K 19.	♀	3000g	40	11 év	11 év	ALL
K 20.	-	NA	-	felnőtt	felnőtt	CRI
DS 1.	♂	170g	17	-	17 hét	megindított vetélés
DS 2.	♀	220g	19	-	19 hét	megindított vetélés
DS 3.	♂	NA	19	-	19 hét	megindított vetélés
DS 4.	♂	250g	19	-	19 hét	megindított vetélés
DS 5.	-	350g	19	-	19 hét	megindított vetélés
DS 6.	♂	350g	20	-	20 hét	megindított vetélés
DS 7.	♂	340g	20	-	20 hét	megindított vetélés
DS 8.	-	-	20	-	20 hét	megindított vetélés
DS 9.	♀	620g	22	-	22 hét	megindított vetélés
DS 10.	♀	1890g	34	4 hét	38 hét	CRI, VSD
DS 11.	-	-	-	2 hónap	2 hónap	VSD, ASD
DS 12.	-	-	-	5 hónap	5 hónap	ASD
DS 13.	-	-	-	6 hónap	6 hónap	CRI
DS 14.	-	-	-	6 hónap	6 hónap	ASD, sepsis
DS 15.	♂	-	-	8 hónap	8 hónap	VSD, ASD
DS 16.	♂	-	-	2 év	2 év	IRDS
DS 17.	♂	-	-	12 év	12 év	ARDS
DS 18.	-	-	-	15 év	15 év	tüdőgyulladás
DS 19.	♂	2700g	-	17 év	17 év	CRI
DS 20.	♀	-	-	23 év	23 év	ARDS, ASD

Rövidítések: ALL, acut lymphoid leukémia; BPD, broncho-pulmonáris dysplasia; CHD, veleszületett szívbetegség; CRI, Cardiorespiratórikus insufficiencia; g, gramm; IRDS, infantilis respiratórikus distressz szindróma; ARDS, felnőttkori respiratórikus distressz szindróma; SIDS, csecsemőkori hirtelen halál; VSD, kamrai szeptum defektus; ASD, pitvari szeptum defektus, AS, Alzheimer-kór, K, kontroll, DS, Down szindróma

Az autopszia a PTE ÁOK Pathológiai Intézetében és a Bécsi Orvostudományi Egyetem Neuropatológiai Intézetében történt. A Down-szindróma diagnózisát a PTE ÁOK OEC Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján állították fel. Csak olyan esetekből származó agyakat használtunk, ahol a halál oka nem állt összefüggésben más genetikai megbetegedéssel, fejsérüléssel, vagy neurológiai kórképekkel. A boncolási eredmények egy esetben sem diagnosztizáltak periventrikuláris leukomaláciát, és a kórtörténetben nem volt epilepsziás roham. A gesztációs kor, születési súly, nem, születés utáni élettartam és a halál oka megtalálható egy összefoglaló táblázatban (1. táblázat). A gesztációs kort az utolsó menstruációs ciklustól számították, és szülészeti mérésekkel támasztották alá. A szekció és a kutatás minden lépése a Magyar Egészségügyi Minisztérium, valamint a Helsinki Deklaráció összes ide vonatkozó pontja figyelembevételével történt.

A 17-24 hetes magzatok bal és jobb féltekéjét a corpus callosum mediansagittális átvágásával választottuk el egymástól. Az elválasztott féltekék 1-1,5 cm nagyságú, paraffinba beágyazott szövetblokkjait coronalis síkban metszettük le. A 24. héttől a féltekék már túl nagyok voltak ahhoz, hogy egy normál méretű tárgylemezre felvegyük őket, ezért az agy eltávolítása után a hippocampust, és mérettől függően a temporális kérget is tartalmazó 1 cm széles szövetblokkokat készítettünk. A blokkokat 4%-os, pufferolt (PB, 0,1M, pH 7,4) paraformaldehid oldatban fixáltuk, paraffinba ágyaztuk, majd a 10 µm vastag metszeteket króm-zselatinos tárgylemezre vettük fel.

Luxol Fast Blue festés

A deparaffinálást követően, a metszeteket 56 °C-on, *Luxol Fast Blue* festék 0,1%-os oldatát, 96%-os etanol és 0,05%-os ecetsavat tartalmazó oldatban inkubáltuk 24 órán keresztül. A 96% etanolban, valamint desztillált vízben történő mosás után a metszeteket lítium-karbonát 0,05%-os oldatába helyeztük, majd 70%-os alkoholban differenciáltunk és xilolban mostunk. Ezt a lépést krezil-ibolya festék 0,1%-os oldatában történő háttérfestés követte. A 2 csepp tömény ecetsavat tartalmazó 96%-os etanol oldatban történő mosás után a metszeteket dehidráltuk, xilolban derítettük, majd Canada balzsammal lefedtük.

MBP-immunhisztokémia

A paraffinos beágyazást és metszést követően, a metszeteket deparaffináltuk, rehidráltuk, majd Tris pufferben (TB 0,05M, pH7,6) mostuk. Az antigén feltárása

érdekében a metszeteket egy 80 ml-es műanyag edényben citrát pufferrel (pH 6.0) mikrohullámú sütőben melegítettük (Moulinex, 2,45 GHz, 800W). Három 5 perces ciklus után a metszeteket szobahőmérsékleten hűlni hagytuk, majd TB-vel mostuk. Ezt követően a metszeteket TB-vel higított 1%-os normál lószérum (Vector Laboratories, Burlingame, CA) oldatában inkubáltuk 1 órán keresztül nedves kamrában, szobahőmérsékleten. A következő lépés az elsődleges, egérben termeltetett, monoclonális anti-MBP antitesttel (1:100, Novocastra, Newcastle upon Tyne, Egyesült Királyság) történő egy éjszakán át tartó inkubáció volt. A specifikus kötődést biotinilált, másodlagos antitest, majd az avidin-biotin-peroxidáz komplex használatával tettük láthatóvá (Universal Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Kromogénként 3,3'-diaminobenzidint (DAB) használtunk, és az immunreakciót fénymikroszkóppal ellenőriztük. A reakciót a DAB eltávolításával, és a metszetek TB-ben való mosásával állítottuk le. Az immunfestés után Nissl háttérfestést alkalmaztunk. Ezt követően a metszeteket dehidráltuk, xilolban derítettük, és végül DePeX-szel (Fluka, Svájc) fedtük.

Elektronmikroszkópia

Elektronmikroszkópos vizsgálatokra csak a C57BL/6-os törzsbe tartozó kontroll, születés utáni 7, 10, 14, 20, és 28 napos egereket használtuk fel a 10 napos PACAP-deficiens, valamint a hasonló korú vad típus mellett. Az egerek perfundálása során a 4%-os pufferolt paraformaldehid oldat tartalmazott 2,5%-os glutáraldehidet is. Az agy eltávolítása után a dorsalis hippocampus szintjén található corpus callosum testéből kb. 1mm³-es szövetblokkokat vágunk ki, melyeket 4 °C-on a perfúzióhoz is használt fixáló oldatban egy éjszakán át inkubáltunk. A blokkokat ezután PB-ban feloldott ozmium-tetroxid 1%-os oldatában utófixáltuk 30 percen keresztül, majd felszálló alkoholsorban dehidráltunk. A 70%-os etanol 1% uranil-acetátot is tartalmazott a kontraszt növelése érdekében. A víztelenítés után a blokkokat propilén-oxidba helyeztük, majd Durcupan gyantát (Sigma) tartalmazó zselatin kapszulába ágyasztuk be. A metszeteket Leica ultramikrotómmal metszettük. A félvékony metszeteket tárgylemezre vettük fel, majd toluidin-kék festést végeztünk. Az ultravékony metszeteket rácsos, valamint koloid membránnal bevont (Parlodion, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA), egylyukú, rézből készült gridekre vettük fel, majd az uranil acetátal és ólom citráttal végzett kontrasztozás után Jeol 1200EX-II típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

MBP-denzitometria

Emberi hippocampus metszetein, melyen MBP-immunhisztokémiai módszer alkalmaztunk, a gyrus dentatus molekuláris rétegében és hilusában, valamint az Ammon-szarv CA1-3 régiójának lacunosum-moleculare rétegében megmértük a DAB reakció intenzitását. A fent említett rétegekről digitális fényképeket készítettünk Olympus BX51 fénymikroszkóp segítségével, majd az AnalySIS szoftverrel megmértük a szürkeárnyalatos képek intenzitását.

Minden egyes szövetblokkban egy-egy területről 5-8 mérést végeztünk a hippocampus anterior-posterior irányában készített, nem egymást követő metszetekből. Minden egyes mérésnél megmértük a háttér intenzitását is. A háttér mérésekor 150-600, az immunreaktivitás mérésekor 20000-50000 pont intenzitását mértük. Az abszolút intenzitásértékeket az egyes értékek átlagolásával kaptuk. A relatív szürke intenzitás, melyet a továbbiakban denzitásnak nevezünk, az általunk vizsgált immunreaktív terület abszolút intenzitásának és a háttér abszolút intenzitásának a különbsége. Mivel a fénymikroszkópban használt fény intenzitása és az alkalmazott nagyítás is befolyásolja a mért intenzitást, ezért a háttérrel, valamint az általunk vizsgált immunreaktív területet azonos megvilágítással, és 10x-es objektív használata mellett mértük.

EREDMÉNYEK

1. Myelinizáció vizsgálata fény- és elektronmikroszkópos módszerekkel az egér corpus callosumában

Myelinizáció a születés utáni 3. napon

LFB festéssel nem láttunk myelinizált axonokat a corpus callosumban és az agy más területén sem, mint például a corpus callosumnál korábban fejlődő és myelinizálódó agytörzsi magvakban sem.

A corpus callosumban MBP-immunhisztokémiai eljárással már megfigyeltünk néhány nagyméretű ($13,3 \pm 1,73 \mu\text{m}$), rövid nyúlványokkal rendelkező OLG sejteket a septum és a dorsalis hippocampus síkjában (1. ábra A). OLG sejteket mindkét vizsgált síkban csupán a corpus callosum kis kiterjedésű, a fronto-parietális érzőkéreg alatti részén láttunk. Szemben a LFB festéssel, a MBP-immunfestéssel az agytörzsi régiókban már számos OLG sejtet, és myelinizált axont is láttunk (1. ábra B).

Myelinizáció a születés utáni 5. napon

LFB festéssel a corpus callosumban nem volt látható myelinfestődés.

MBP-immunhisztokémiával a septum és a hippocampus síkjaiban is már több, nagyméretű ($12,9 \pm 2,19 \mu\text{m}$) OLG sejt látszott a corpus callosum fronto-parietális érzőkéreg alatti részein (1. ábra C). A legtöbb immunpozitív sejt hosszabb és több nyúlvánnyal rendelkezett, mint a 3. napon.

Myelinizáció a születés utáni 7. napon

LFB festéssel ebben a korban sem volt myelin kimutatható a corpus callosumban.

Ezzel szemben, MBP-immunfestéssel számos, hosszú, erősen arborizált nyúlvánnyal rendelkező OLG sejtet ($12,1 \pm 1,77 \mu\text{m}$) figyeltünk meg a corpus callosum septális és hippocampalis síkjaiban (1. ábra E). A legintenzívebben festődő OLG sejteket a corpus callosum fronto-parietális érzőkéreg alatti részein láttuk, miközben tőlük mediális, illetve laterális irányban az OLG sejtek kisebbek voltak, kevesebb, rövidebb és vékonyabb nyúlvánnyal rendelkeztek. A fronto-parietális érzőkéreg alatt és annak VI. rétegében párhuzamosan rendeződő MBP-immunreaktív axonokat is láttunk

az OLG sejtek közelében (1. ábra D, E). Megjelentek az első OLG sejtek a cinguláris kéreg alatt is.

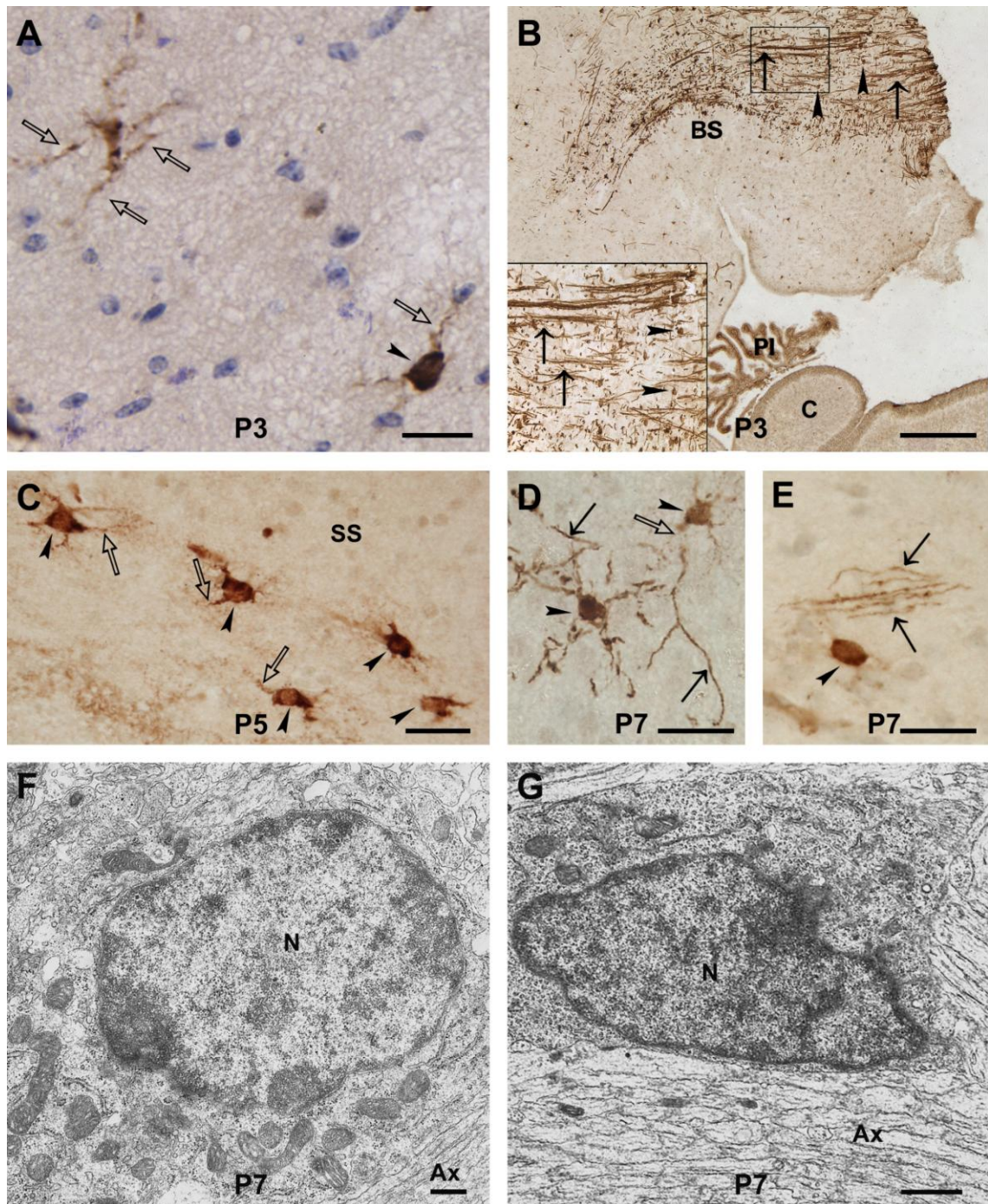
Elektronmikroszkópban mind világos, mind pedig közepes elektrondenzitású OLG sejteket is láttunk a corpus callosumban (1. ábra F, G). Néhány sejtet citoplazmájának viszonylag magas denzitása (a riboszómák nagy száma adja a denzitás alapját) és a nagyszámú durva felszínű endoplazmatikus retikulum alapján az érett és a közepes denzitású OLG sejtek közé soroltunk be.

Myelinizáció a születés utáni 10. napon

A 10. születés utáni napon sem láttunk LFB festéssel myelint a corpus callosumban.

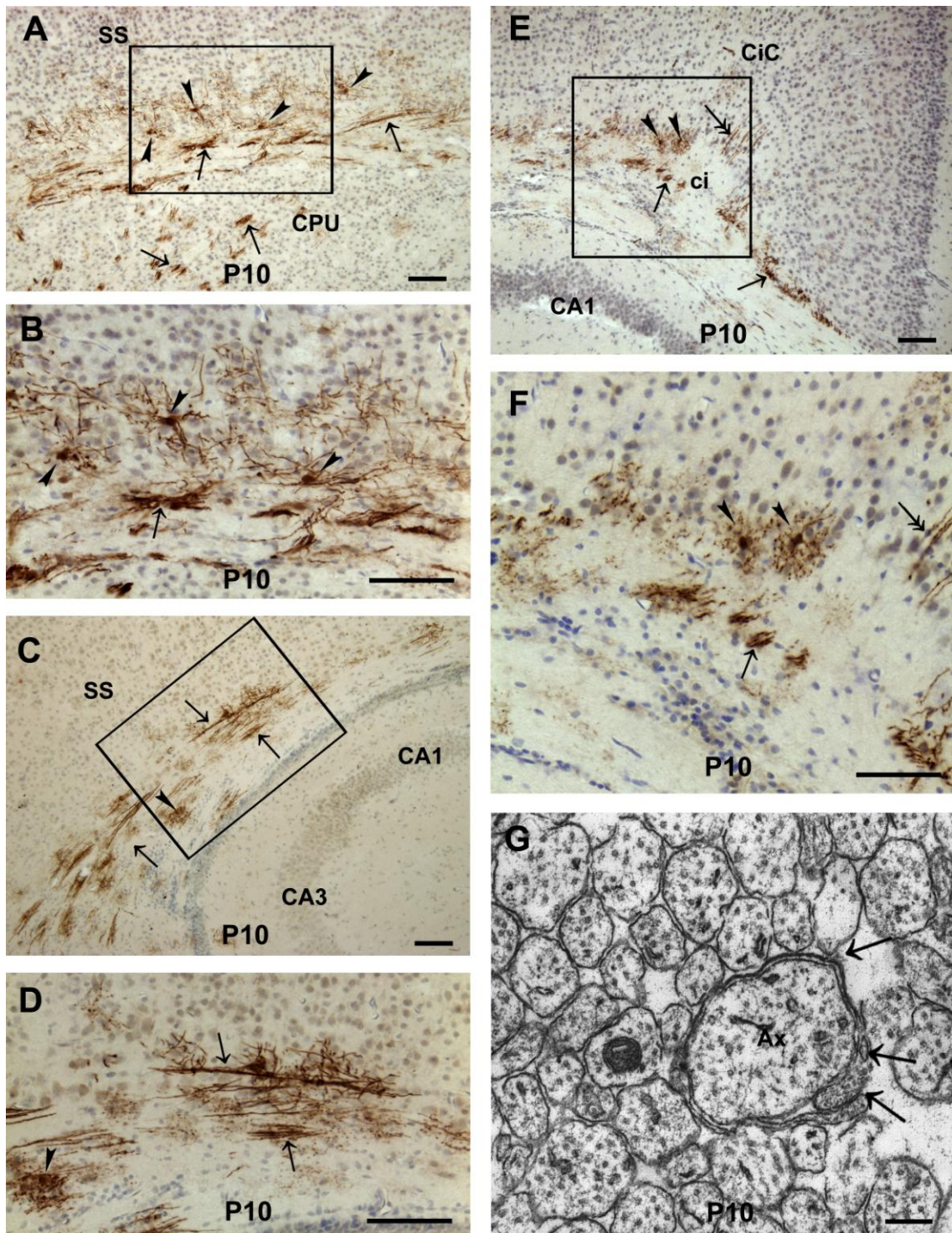
MBP-immunfestéssel a septális síkban számos, erősen arborizált, MBP-pozitív OLG sejtet és néhány myelinizált axont láttunk a fronto-parietális érzőkéreg alatti részen a corpus callosumban (2. ábra A, B). Az OLG sejtek átlagos átmérője $12 \pm 1,68$ μm volt, ami nagyobb, mint a felnőttben mért érték. A dorsalis hippocampus szintjén több OLG sejtet és hosszabb myelinizált axonokat figyeltünk meg a fronto-parietális érzőkéreg alatti corpus callosumban, mint a septális síkban (2. ábra C, D). Az OLG sejtek mellett néhány myelinizált axont is észleltünk a cingulumban és a cinguláris kéreg mélyebb rétegeiben (2. ábra E, F). Az OLG sejtek méretében nem volt különbség az egyes agyterületeken.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokban azt tapasztaltuk, hogy jelen voltak mind a myelint képző közepesen sötét, mind a myelint fenntartó sötét OLG sejtek a corpus callosumban, valamint több helyen láttunk OLG nyúlvánnyal körülvelt axonokat (2. ábra G), melyek az MBP-immunhisztokémiával látható vékony myelinizált axonoknak felelhetnek meg. A myelinnel körülvelt axonok nagyobb átmérővel ($0,6 \mu\text{m}$) rendelkeztek, mint a nem myelinizáltak ($0,2-0,5 \mu\text{m}$), ami ismert jelenség (Friede, 1972, Sturrock 1980), viszont a jelenség időbeli kialakulása az ontogenezis során új adat.



1. ábra

OLG sejtek és myelinizált axonok egér corpus callosumában (CC) (A, C-G), valamint agytörzsben (B) 3 (P3, A, B), 5 (P5, C) és 7 (P7, D-G) napos korban. A: corpus callosumban (CC) elhelyezkedő MBP-immunreaktív OLG sejtek (nyílhegy) néhány nyúlvánnyal (üres nyilak) 3 napos korban. B: 3 napos korban számos MBP-pozitív OLG sejt (nyílhegyek), valamint MBP-immunreaktív axon (nyilak) figyelhető meg az agytörzsben (BS). A betétben a kerettel jelzett terület nagyobb nagyítású képe látható. C: 5 napos egér corpus callosumában (CC) MBP-t expresszáló OLG sejtek (nyílhegyek) és rövid nyúlványaik (üres nyilak) az érzőkéreg (SS) alatt. D: 7 napos korban az MBP-immunreaktív OLG sejtek (nyílhegyek) és nyúlványok (üres nyíl) mellett már megjelennek myelinizált axonok is (nyilak) az érzőkéreg VI. rétegében. E: MBP-pozitív OLG sejt (nyílhegy) és axonok (nyilak) a corpus callosumban (CC), az érzőkéreg alatt. F: Corpus callosumban (CC) készített elektronmikroszkópos felvétel egy világos OLG sejtről és a környező, nem myelinizált axonokról (Ax) 7 napos korban. G: 7 napos korban corpus callosumban (CC) elhelyezkedő *intermediar* OLG sejt és nem myelinizált axonok (Ax). A skála A és C-E képen 25 μ m, B képen 250 μ m, F,G képen 1 μ m-t jelöl.



2. ábra

Myelinizált axonok és OLG sejtek 10 napos egér (P10) corpus callosumában (CC). A: Septális síkú metszeteken MBP-immunreaktív OLG sejtek (nyílhegyek) és myelinizált axonok (nyilak) láthatóak az érzőkéreg (SS) alatti corpus callosumban (CC), valamint a putamen-nucleus caudatusban (CPU). B: Az (A) képen keretbe foglalt terület nagyobb nagyítású képe. C: A hippocampus síkjában MBP-immunreaktív OLG sejtek (nyílhegy) és myelinizált axonok (nyilak) láthatóak az érzőkéreg (SS) alatti corpus callosumban (CC). D: A (C) képen keretbe foglalt terület nagyobb nagyítású képe. E: MBP-immunreaktív OLG sejtek (nyílhegyek) és myelinizált axonok a cingulumban (ci, nyilak), valamint a cinguláris kéreg (CiC) legmélyebb rétegében (kétfejű nyíl). F: Az (E) képen keretbe foglalt terület nagyobb nagyítású képe. G: A képen egy OLG sejt nyúlványa (nyilak) látható, ahogyan körbeveszi a myelinizálandó axont (Ax), melyet kisebb átmérőjű nem myelinizált axonok vesznek körbe. A skála A-F képen 100 µm, G képen 200 µm-t jelöl.

Myelinizáció a születés utáni 14. napon

Ebben a korban LFB festéssel láthatók voltak az első myelinizált axonok a fronto-parietális érzőkéreg alatti corpus callosumban (3. ábra A) és a cingulumban (3. ábra B). Emellett megfigyeltünk néhány axont a cinguláris kéreg mélyebb rétegeiben is (3. ábra B).

MBP-immunhisztokémiával már a corpus callosum teljes medio-laterális keresztmetszetében nagyszámú myelinizált axont láttunk (3. ábra C, E). A magas denzitású myelinizált axonok mellett OLG sejteket ritkábban láttunk, és sejttestjük átlagos átmérője kisebb volt ($7,4 \pm 1,42 \mu\text{m}$), mint a fiatalabb állatoké.

A myelinizált axonok legnagyobb számban a fronto-parietális érzőkéreg (3. ábra C, E) és a cinguláris kéreg (3. ábra D) alatti corpus callosumban fordultak elő. Ezen kérgi területeken a kéreg mélyebb rétegeiben (VI-IV.) is láttunk myelinizált, hosszú axonokat (3. ábra C-E). Továbbá, nagyszámú MBP-immunreaktív axont figyeltünk meg a cingulumban és kisebb számban az alveusban is (3. ábra D).

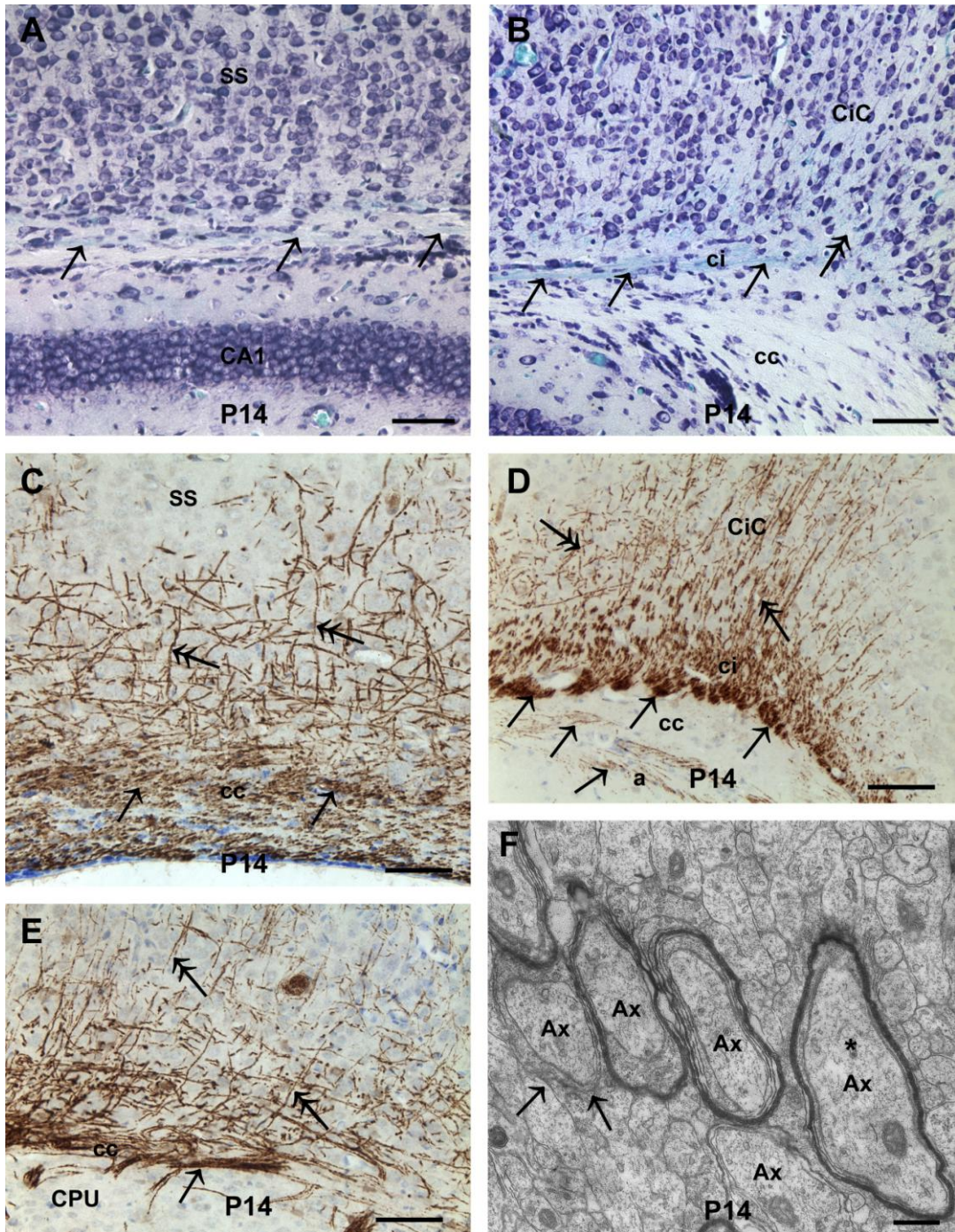
Elektronmikroszkóppal a corpus callosumban láttunk közepesen sötét és sötét OLG sejteket. Ebben a korban már a fiatal, nagy és világos OLG sejtek száma a korábbi életkorokhoz képest jóval kevesebb volt. Az axonok körül néhány myelin lamellából álló myelinhüvely volt látható (3. ábra F).

Myelinizáció a születés utáni 21. napon

LFB festéssel a corpus callosum teljes medio-laterális keresztmetszeti részén láttunk myelinfestődést (4. ábra A, B). Nem figyeltünk meg szignifikáns myelinizációs különbséget a corpus callosum septális és a hippocampus más síkjai között. A kéregrészek közül csak a cinguláris kéreg mélyebb részeiben észleltünk festődést.

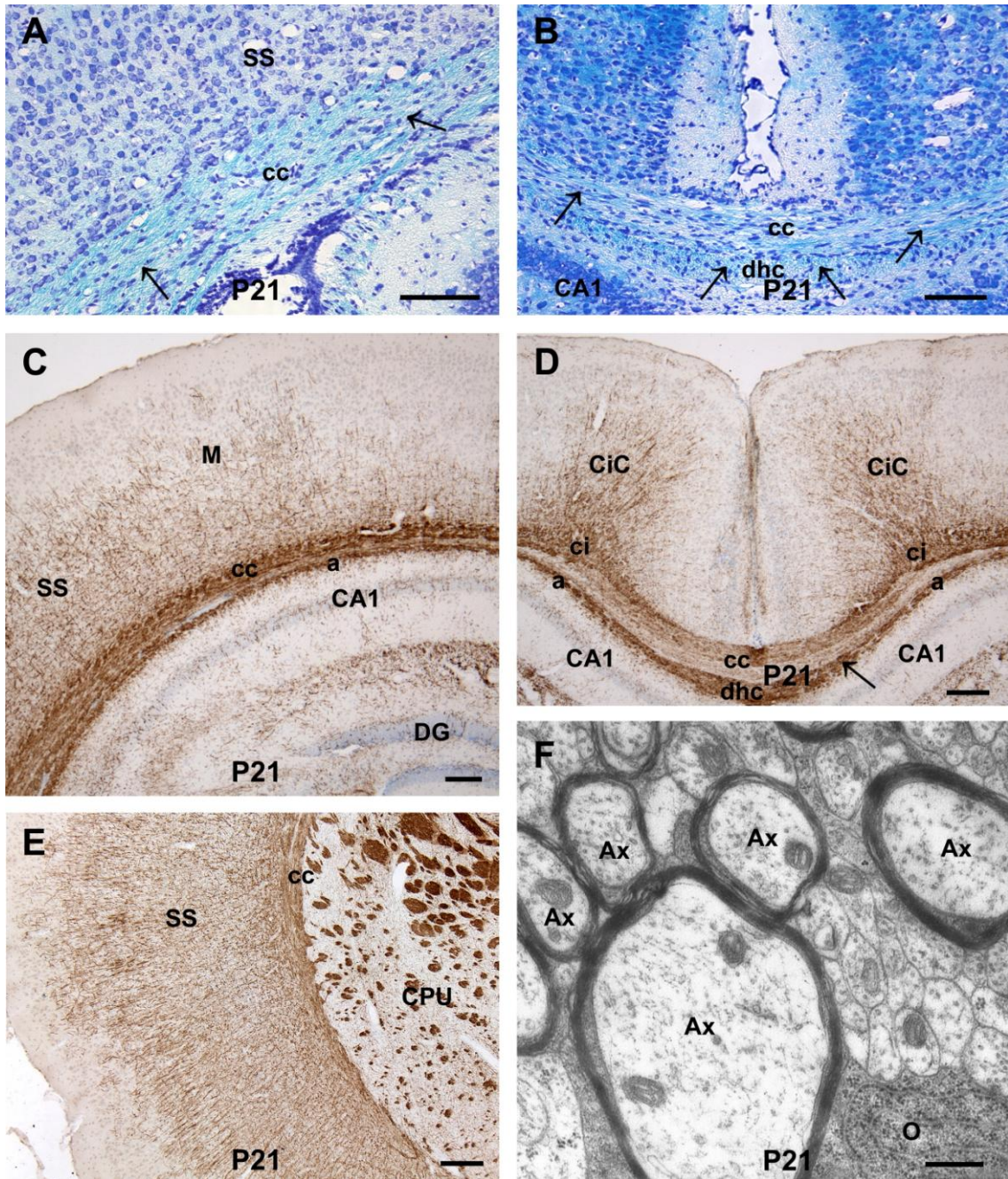
MBP-immunhisztokémiával, hasonlóan az LFB festéshez, a teljes corpus callosum myelinizált, mind a septum, mind a hippocampus síkjaiban (4. ábra C-E). A hippocampus síkjában számos myelinizált axonköteget láttunk a cingulumban, alveusban és a commissura hippocampiban (4. ábra D). A kötegek mellett nagy számban láttunk MBP-immunreaktív axonokat a cinguláris kéreg II-VI. rétegében és a fronto-parietális érzőkéregben (4. ábra C-E).

Elektronmikroszkóppal a közepes denzitású és az érett OLG sejtek mellett számos, kevés lemezzel rendelkező, kompakt myelinizált axont is láttunk (4. ábra F). Kisebb számban előfordultak még csupán 1-2 lamellával, nem kompaktálódott myelinborítással rendelkező axonok is a kis átmérőjű, myelinizálatlan axonok mellett.



3. ábra

Myelinizáció 14 napos korban (P14) a corpus callosumban (CC, A,C,E és F), valamint a cinguláris kéregben (B és D). A: LFB festéssel kékre festődött myelinizált axonok (nyilak) az érzőkéreg (SS) alatti corpus callosumban (CC). B: Myelinizált axonok (nyilak) a cingulumban (ci) és a cinguláris kéreg (CiC) mélyebb rétegeiben (kétfejű nyilak) LFB festéssel. C: MBP-immunreaktív axonok az érzőkéreg (SS) alatt a corpus callosumban (CC, nyilak) és az V-VI. kérgi rétegben (kétfejű nyilak). D: MBP-immunreaktív axonok (nyilak) a cingulumban (ci), corpus callosumban (CC), valamint az alveusban (a), az Ammon-szarv CA1 régiójához közel. A kétfejű nyilak a cinguláris cortexben (CiC) MBP-pozitív axonokat jelölnek. E: A corpus callosum (CC) septális síkjában erős MBP-immunreaktivitás figyelhető meg (nyilak). Az érzőkéreg (SS) mélyebb rétegeiben, számos myelinizált axon (kétfejű nyilak) látható. F: A 14 napos egér corpus callosumból készített elektronmikroszkópos felvételen az axonok (Ax) körül elhelyezkedő myelinüvely morfológiájában nagy különbségek figyelhetők meg. A legtöbb axon körül a myelin nem teljesen kompaktálódott, más axon körül már igen (csillag). A képen látható még egy axon, amely csak OLG sejtnyúlvánnyal van körülvéve (nyilak). A skála A-E képen 100 μ m, valamint az F képen 500 nm.



4. ábra

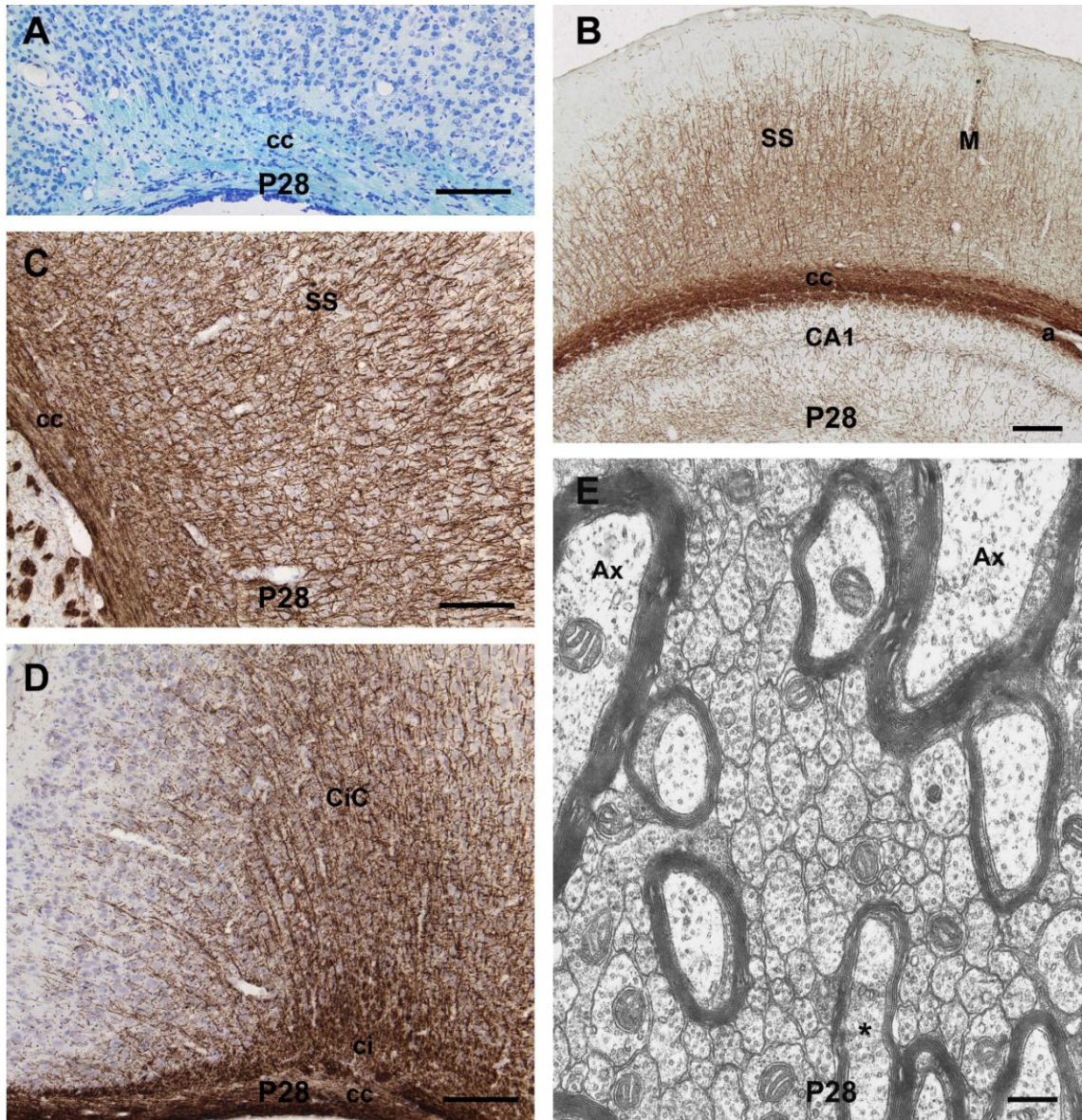
Myelinizáció 21 napos egér (P21) corpus callosumában (CC). A: Számos intenzív LFB festődést mutató myelinizált axon (nyilak) az érzőkéreg (SS) alatt a corpus callosumban (CC). B: Myelinizáció a corpus callosumban (CC) és a commissura hippocampalis dorsalis-ban (dhc) LFB festéssel. C: MBP-immunreaktív axonok a corpus callosumban (CC), az érző (SS), valamint motoros (M) kéregben. A neocortikális pozitivitás mellett további myelinizált axonok figyelhetők meg a hippocampus CA1 régiójában, a gyrus dentatus egyes rétegeiben (DG), valamint az alveusban (a). D: MBP-immunreaktív axonok a corpus callosumban (CC), cingulumban (ci), alveusban (a) és a commissura hippocampalis dorsalis-ban (dhc). Ezen struktúrák mellett nagy számban láthatók myelinizált axonok a cinguláris kéregben (CiC). E: Septális síkban jelentős immunreaktivitás látható az érzőkéregben (SS), a corpus callosumban (CC) és a putamen-nucleus caudatusban (CPU). F: Elektronmikroszkópos felvételen egy OLG sejt citoplazmája (O) szoros kontaktusban van az általa myelinizált nagyméretű axonnal (Ax). Emellett nagyméretű myelinizált axonok, valamint kisebb nem myelinizált axonok is láthatóak. A skála A-E képen 100 µm, F képen 500 nm.

Myelinizáció a születés utáni 28. napon

LFB festéssel erős, homogén festődést láttunk a corpus callosumban (5. ábra A), és nem volt különbség a myelinizációban a corpus callosum medio-laterális, valamint rostro-caudális részei között.

MBP-immunhisztokémiával a teljes corpus callosumban, cingulumban és a fimbria fornicisban erős myelinizációt figyeltünk meg (5. ábra B-D). Hasonlóan a 21. napon megfigyeltekhez, a corpus callosumban látható myelinizált axonok elkülöníthetőek voltak a cingulumban láthatóktól (5. ábra D). Az erősebb MBP-immunreaktivitás miatt azonban a denzitásbeli különbség a corpus callosum, cingulum és a commissura hippocampi között nem olyan jelentős, mint a 21. napon.

Elektronmikroszkóppal már számos, a felnőtt állatokra jellemző, kompaktálódott lemezekkel rendelkező myelinizált axont láttunk a corpus callosumban (5. ábra E). Ultrastrukturális jellemzőik alapján a legtöbb OLG sejtet már érettnak tekinthettük ebben a korban.



5. ábra

Myelinizáció 28 napos egér (P28) corpus callosumában (CC). A: LFB festéssel a corpus callosum (CC) erősen myelinizált. B: MBP-immunreaktív axonok a corpus callosumban (CC), alveusban (a), az érző (SS), valamint a motoros (M) kéregben és a hippocampusban. C: Septális síkban jelentős MBP-immunreaktív axon figyelhető meg a corpus callosumban (CC) és az érzőkéregben (SS). D: A corpus callosumban (CC), a cingulumban (ci) és a cinguláris cortexben (CiC) a felnőtt egerekre jellemző, nagyszámú MBP-immunreaktív axon látható. E: Az elektronmikroszkópos felvételen a legtöbb axont (Ax) már kompaktálódott, számos lamellával rendelkező, myelinhüvely veszi körül, viszont a képen látható egy kevesebb lamellával rendelkező, nem teljesen kompaktálódott myelinhüvelyű axon (csillag) is. A skála A-D képen 100 µm, E képen 200 nm.

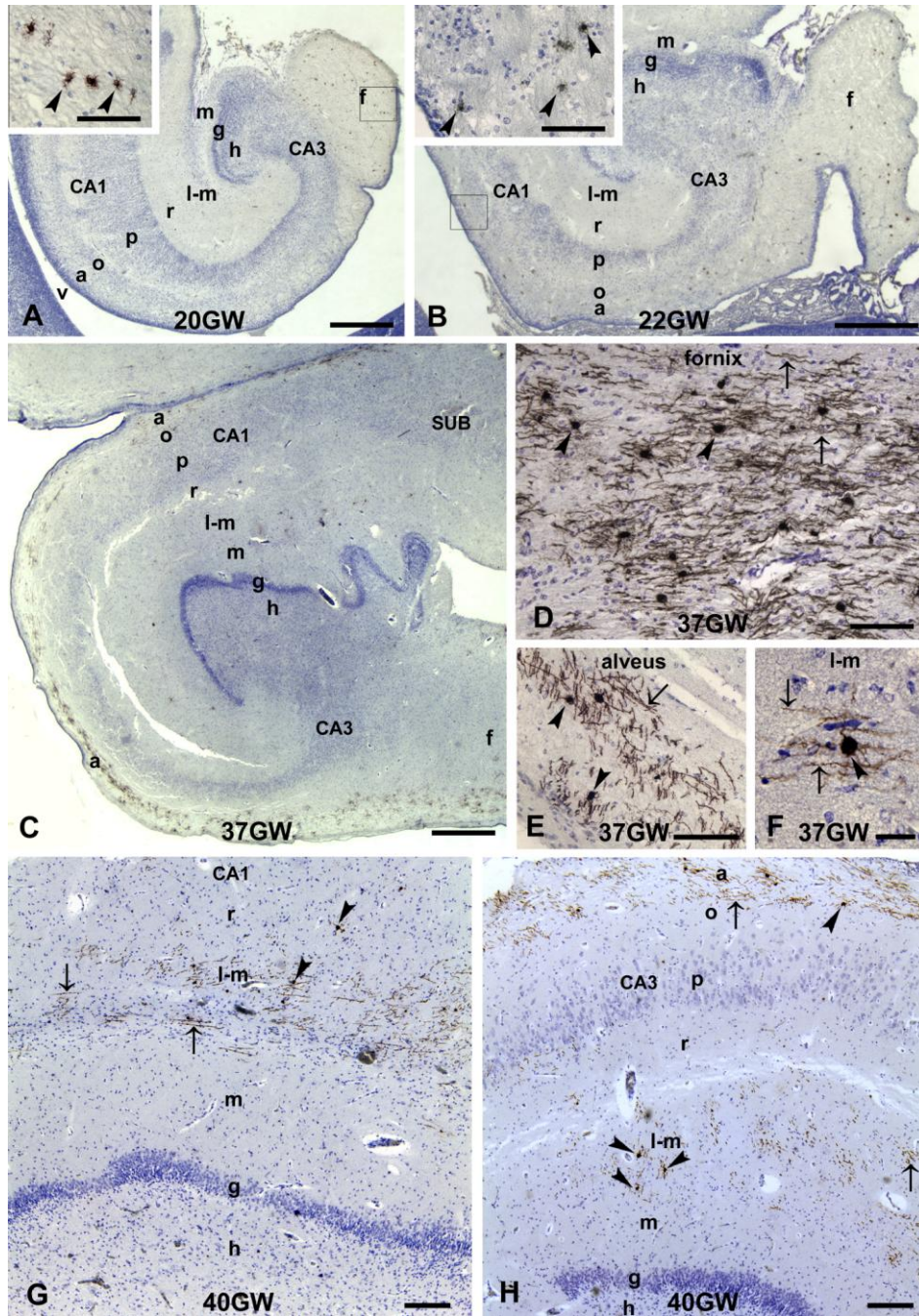
2. Myelinizáció az emberi hippocampusban

Myelinizáció magzati korban

A hippocampuson belül az Ammon-szarv CA1-3 régióit, azok egyes rétegeit (strata oriens, pyramidale, radiatum és lacunosum-moleculare), valamint a gyrus dentatus szemcsesejt rétegét és hilusát már a 14-15. terhességi héten el lehet különíteni egymástól (Arnold és Trojanowski, 1996), azonban ebben a korban myelinizált axonokat még nem találtunk. Az első MBP-immunfestett OLG sejtet a 20. héten láttuk a fimbria fornicisban (6. ábra A). Ezek a korán megjelenő OLG sejtek nagyméretűek, számos rövid sejtnyúlvánnyal rendelkeznek, mely tulajdonságok alapján valószínűleg a korábban kísérletes állatmodellben leírt közepesen sötét OLG sejteknek felelnek meg (Mori és Leblond, 1970). Emellett az OLG sejtek megjelentek az alveusban is a 20-22. hetekben (6. ábra B). Számuk a CA3 régióban nagyobb volt, mint a CA1-ben, aminek a valószínű oka az, hogy a CA3 régió piramissejtjei előbb keletkeznek, mint a CA1 neuronok (Bayer, 1980). Az oriens rétegben csak elvétve volt néhány OLG sejt a 22. héten. Az ezt követő hetekben az OLG sejtek száma emelkedett az alveusban és a stratum oriensben, valamint néhány MBP-immunreaktív OLG sejt megjelent a CA1 régió lacunosum-moleculare rétegében is.

Myelinizáció a születés körüli időszakban

Néhány héttel születés előtt (37. héten) az MBP-immunreaktív OLG sejtek száma nagyobb volt a fimbria fornicisban, alveusban és a stratum oriensben (6. ábra C), mint a magzati korban. A legtöbb OLG sejt a fimbria fornicisban volt látható, ennél kevesebb volt a CA1 régió alveusában és stratum oriensében, illetve a legkevesebb sejtet a CA3 régió alveusában, valamint a stratum oriensében láttunk. Az MBP-immunfestett OLG sejtek körül kevés, rövid és vékony myelinizált axont is megfigyeltünk, ami alapján a myelinizáció kezdetét a 37. hétre tehetjük a hippocampus fenti rétegeiben (6. ábra D, E). Az alveusban a myelinizált axonok száma egyre csökken a CA1 régió és a subiculum felé haladva. Emellett, 37 hetes korban a CA1 régió stratum lacunosum-moleculare-ban is volt néhány OLG sejt, környezetükben pedig néhány rövid, vékony myelinizált axon (6. ábra F).



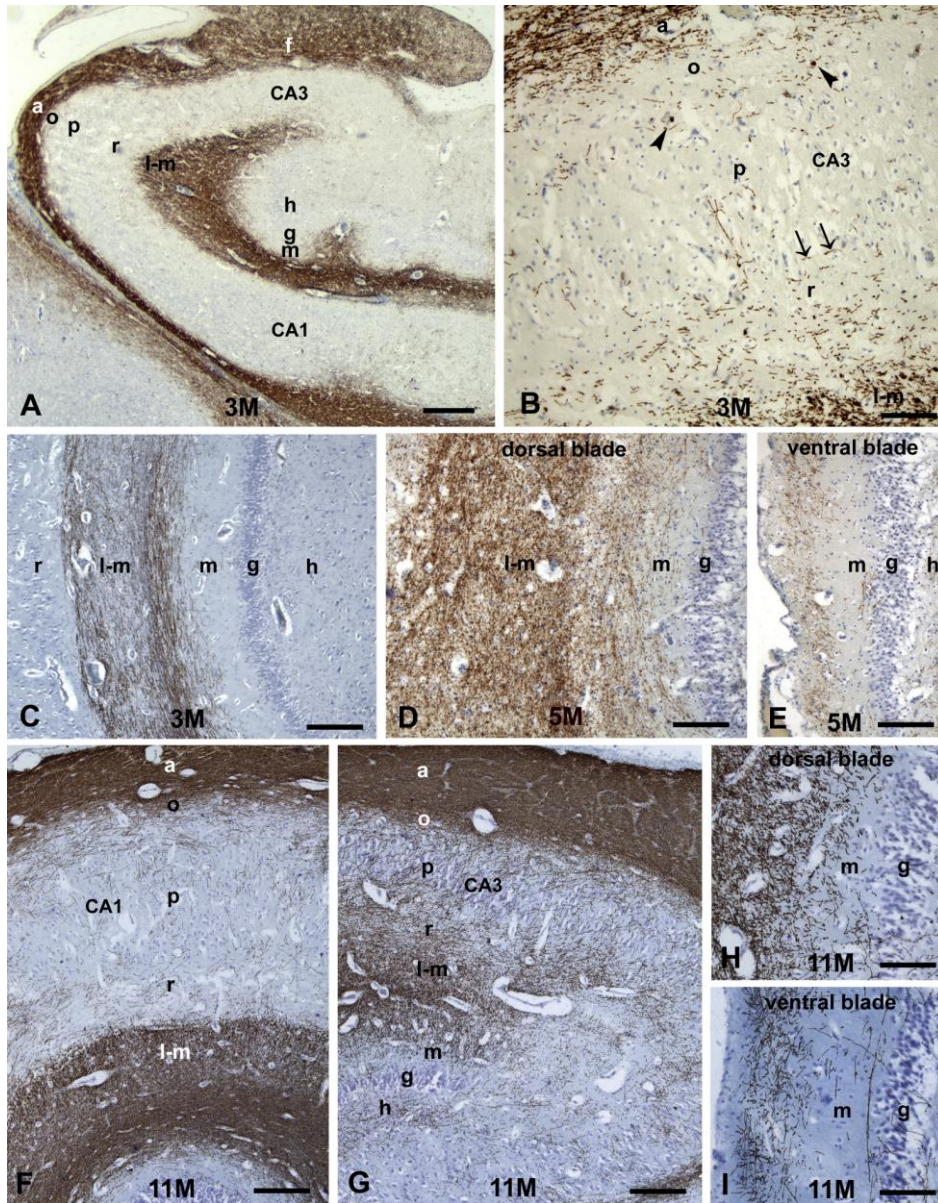
6. ábra

MBP-immunreaktivitás a születés előtti és a születés körüli hippocampusban. A: Terhesség utáni 20. héten (20GW) csak a fimbria fornixban (f) látható egy-egy OLG sejt. A betét a fimbria fornixis bekeretezett részének a nagyobb nagyítású képe, ahol néhány OLG sejt látható (nyílhegyek). B: A 22. héten (22GW) a fimbria fornix (f) mellett megjelennek az első OLG sejtek az alveusban (a) is. Az alveusban (a) az OLG sejtek (nyílhegyek) jól láthatóak a bekeretezett rész nagyobb nagyítású képén. C: A 37. héten (GW37) az OLG sejtek jelen vannak a fimbria fornixban (f), az alveus (a) teljes hosszában és a CA1 régió stratum lacunosum-moleculare-ban (l-m). D: MBP-immunreaktív OLG sejtek (nyílhegyek) és myelinizált axonok (nyilak) a fimbria fornixban, a 37. héten (GW37). E: Immunpozitív OLG sejtek, valamint rövid myelinizált axonok láthatóak az alveusban, a 37. héten (GW37). F: Egy OLG sejt (nyílhegy) és néhány, rövid myelinizált axon (nyilak) a stratum lacunosum-moleculare-ban (l-m) egy 37. hétre született újszülöttnél. G: MBP-immunreaktív OLG sejtek (nyílhegyek) és myelinizált axonok (nyilak) a CA1 régióban, a stratum lacunosum-moleculare-ban (l-m) 40 hetes újszülöttnél (40GW). H: A CA3 régió lacunosum-moleculare rétegében (l-m) kevesebb OLG sejt (nyílhegyek) és rövidebb myelinizált axon (nyilak) látható, mint a CA1 régióban (G). MBP-immunreaktív OLG sejtek (nyílhegyek) és myelinizált axonok (nyilak) az alveusban (a) is jelen vannak. A skála A, B képen 500 µm, C képen 250 µm, 100 µm a D-F képen, G, H képen 50 µm.

Az MBP-immunfestett axonok denzitása a korábbihoz képest a 39-41. héten a fimbria fornicisban és az alveusban egyaránt emelkedett. Ebben az életkorban több OLG sejtet láttunk az Ammon-szarv CA1 régiójának lacunosum-moleculare rétegében, mint korábban, és megjelentek az első OLG sejtek a CA3 régió lacunosum-moleculare rétegében is (6. ábra G, H). A myelinizált axonok sűrűsége nagyobb volt a CA1 régió lacunosum-moleculare rétegében, mint korábban, viszont a CA3 régió lacunosum-moleculare rétegében még csak kevés, rövid és vékony myelinizált axont láttunk. A fenti eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a perforáns pálya myelinizációja ebben az életkorban már megkezdődött.

Myelinizáció a születés után

Az életkor előrehaladtával a myelinizáció egyre nagyobb mértékű az alveusban, a stratum oriensben és a stratum lacunosum-moleculare-ban. A CA1-3 régió piramissejt rétegeiben viszont csak a 3. hónapban jelennek meg az első OLG sejtek és néhány, rövid, vékony myelinizált axon (7. ábra A-C). Megjelentek az első OLG sejtek és néhány myelinizált axon a CA3 régió mellett a CA1 régió radiatum rétegében is. Továbbá, a gyrus dentatus hilusában, valamint a molekuláris rétegben is láttunk OLG sejteket, és az első myelinizált axonokat is megfigyeltük. A molekuláris rétegben viszont az OLG sejtek és a myelinizált axonok a réteg külső egyharmadára korlátozódtak (7. ábra C). A gyrus dentatus, ezen belül a molekuláris réteg két nagy részre osztható a CA3 régió piramissejt rétegéhez viszonyítva. Frontális metszeten a CA3 régió piramissejt rétege feletti területet dorsalis vagy szuprapiramidális (felső) karnak (blade-nek), míg a réteg alatti területet ventrális vagy infrapiramidális (alsó) karnak (blade-nek) nevezzük. A gyrus dentatus felső karának molekuláris rétegében jelentősen több myelinizált axont láttunk, mint az alsó, ventrális részen.



7. ábra

MBP-immunreaktivitás a hippocampusban a születés utáni első hónapokban. A: A születés utáni 3. hónapban (3M) a fimbria fornixisban (f), alveusban (a), a stratum lacunosum-moleculare-ban (l-m) és a gyrus dentatus molekuláris (m) rétegének külső egyharmadában erős MBP-immunreaktivitást látható. B: A CA3 régió nagyobb nagyítású képen jól látszik az erős MBP-jelölődés az alveusban (a) és a lacunosum-moleculare (l-m) rétegben, miközben néhány OLG sejt (nyílhegyek) és myelinizált axon (nyilak) is jelen van az oriens (o), piramisisejt (p) és a radiatum (r) rétegekben. C: A 3. hónapban (3M), az Ammon-szarv lacunosum-moleculare (l-m) rétegében és a gyrus dentatus molekuláris (m) rétegének külső egyharmadában figyelhető meg MBP-jelölődés. D: Születés után 5 hónappal (5M) erős MBP-immunreaktivitást látható a lacunosum-moleculare (l-m) rétegben, míg a gyrus dentatus dorsalis karjának molekuláris (m) rétegének külső egyharmadában a jelölődés kisebb mértékű. E: A gyrus dentatus ventrális karjának molekuláris (m) rétegében kevesebb MBP-immunreaktív axon látható, mint a dorsalis karban (D). F: 11 hónapos korban (11M) erős MBP-immunreaktivitás észlelhető az alveusban (a), a CA1 régió oriens (o), lacunosum-moleculare (l-m) rétegében, míg csak közepesen erős jelölődés látható a CA1 régió piramisisejt (p) és radiatum (r) rétegében. G: A 11 hónapos korban (11M), a CA3 régió alveusának (a), oriens (o) és lacunosum-moleculare (l-m) rétegeinek erős MBP-immunreaktivitása mellett, közepesen erős jelölődés figyelhető meg a CA3 régió piramisisejt (p) és radiatum (r) rétegeiben. A gyrus dentatusban a molekuláris (m) réteg külső kétharmadában figyelhető meg jelölődés, valamint kismértékben a hilusban (h) is. H és I: Az MBP-immunreaktivitás nagyobb a gyrus dentatus dorsalis karjának molekuláris rétegének külső kétharmadában, mint a ventrális kar molekuláris rétegének külső kétharmadában. A skála A képen 500 μ m, B képen 100 μ m, 200 μ m a C-E, G, H, I képen, 300 μ m az F képen.

Az 5. hónapra a fent említett összes rétegben tovább emelkedett a myelinizált axonok száma. A stratum radiatumban és az Ammon-szarv piramisajt rétegeiben nagyobb számban láttunk myelinizált axonokat a CA3-ban, mint a CA1-ben. A hilusban az OLG sejtek száma és a myelinizált axonok sűrűsége magasabb volt, mint 3 hónapos korban. A gyrus dentatus felső karjának molekuláris rétegében több myelinizált axont figyeltünk meg, mint a ventrális részben, és több, a külső egyharmadra korlátozódo myelinizált axont láttunk, mint születés után (7. ábra D, E).

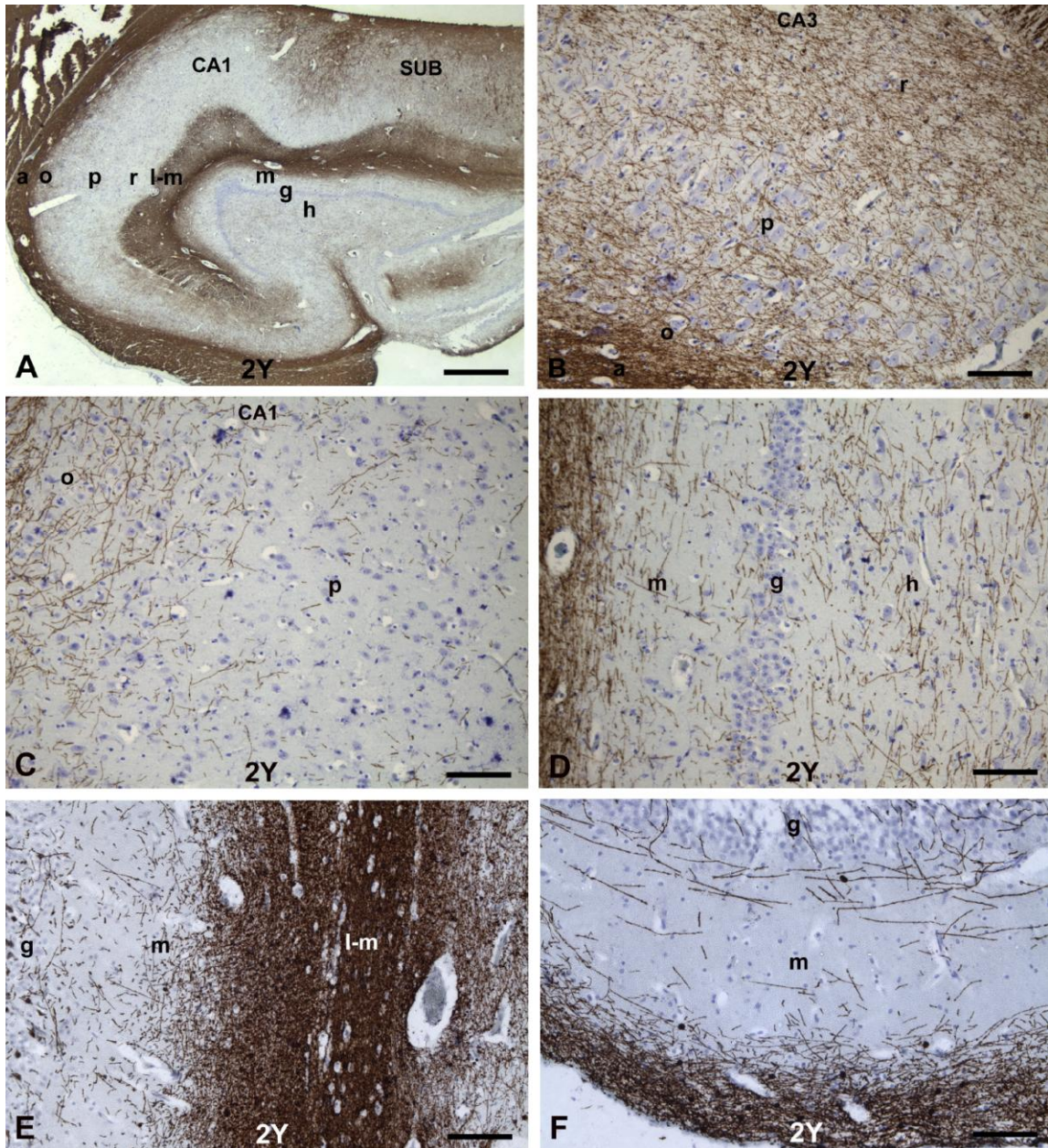
Egy éves kor körül a myelinizáció mértéke a hippocampusban elérte a felnőttre jellemző szintet az alveusban (7. ábra F, G) és a fimbria fornicisban, míg más rétegek, mint pl. a gyrus dentatus molekuláris rétege, még mindig kevésbé myelinizáltak. A korábban megfigyelt különbség a CA3 és a CA1 régió myelindenzitása között továbbra is megfigyelhető volt a stratum radiatumban és az Ammon-szarv piramisajt rétegeiben. A fenti rétegekben több myelinizált axont láttunk a CA3 régióban, mint a CA1-ben (7. ábra F, G). A lacunosum-moleculare rétegben viszont a különbség fordított, ugyanis a CA1 régióban nagyobb volt a myelinizált axonok denzitása, mint a CA3-ban (7. ábra F, G). Hasonlóan a 3 hónapos korban láttottakhoz, nagyobb mértékű myelinizációt láttunk a gyrus dentatus molekuláris rétegének dorsalis részén, mint a ventrális részén. Emellett további különbség, hogy a molekuláris réteg külső egyharmadában több myelinizált axon volt, mint a középső egyharmadban. A molekuláris réteg belső egyharmadában a szemcsesejtréteg közvetlen szomszédságában megjelentek az első myelinizált axonok (7. ábra H, I). Mivel az itt elhelyezkedő asszociációs pályák, melyet a hilus mohasejtjeinek axonjai alkotnak, nem myelinizáltak, a fenti megfigyelés a supramammilláris pálya kezdődő myelinizációjára utal.

A második életévben a myelinizáció a fimbria fornicis és az alveus mellett a stratum lacunosum-moleculare-ban is eléri a felnőttre jellemző mértéket (8. ábra A, E). A stratum radiatumban és a piramisajt rétegekben viszont még mindig nagyobb immunreaktivitást láttunk a CA3 régióban (8. ábra B), mint a CA1-ben (8. ábra C). A gyrus dentatus molekuláris rétegében az OLG sejtek és a myelinizált axonok száma tovább emelkedett ugyan, de a külső-belső, ventrális-dorsalis különbségek még mindig jelen voltak (8. ábra D-F).

A 3. életévben (9. ábra A-F) az alveus, a stratum oriens, a fimbria fornicis és a teljes lacunosum-moleculare réteg (9. ábra A, B) myelinizációja a felnőttre jellemző mértéket mutatta. A többi rétegekben mind az Ammon-szarv, mind a gyrus dentatus rétegeiben az MBP-immunreaktivitás nagyobb volt, mint a 2. életévben.

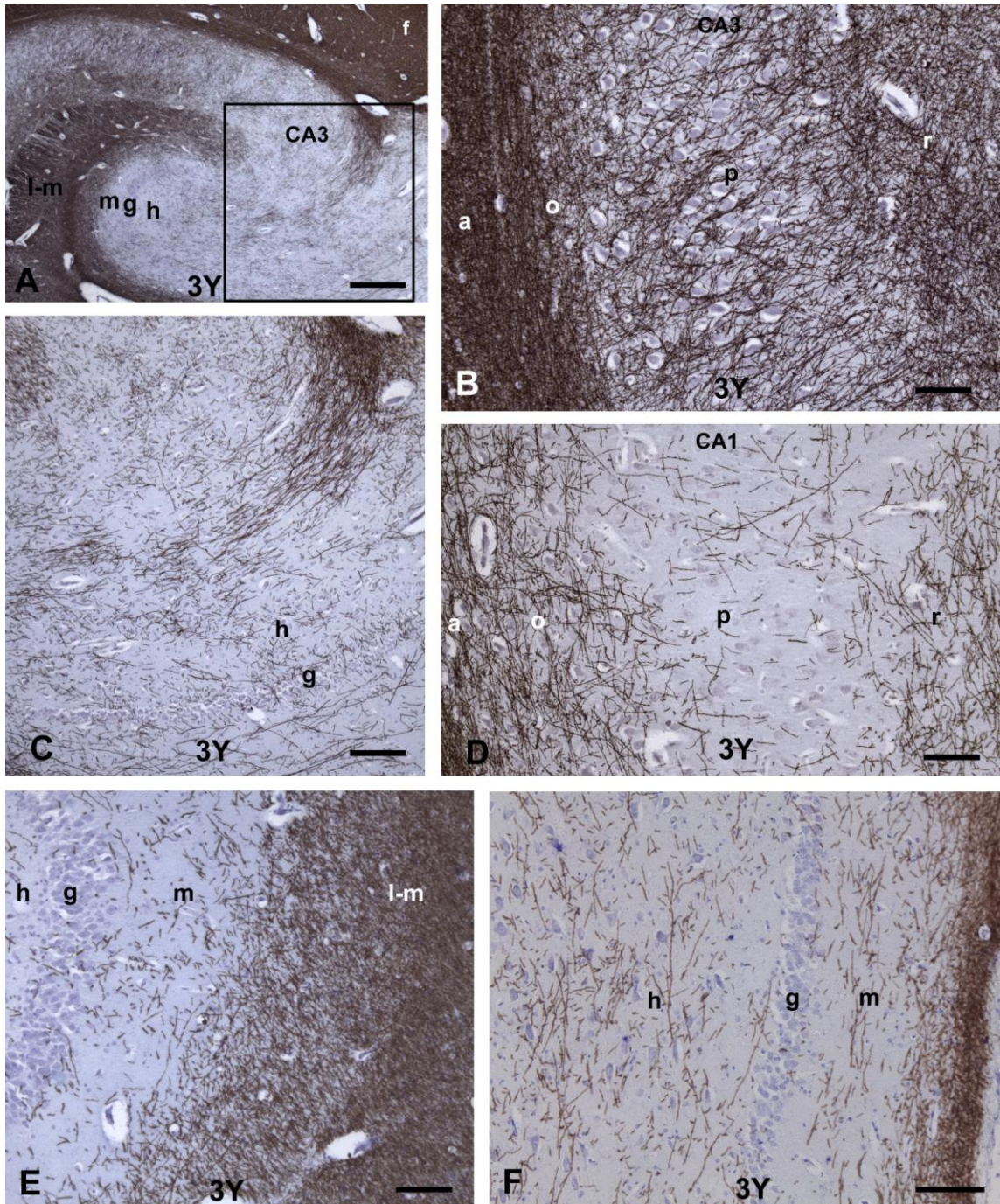
A 8. életévben a CA3 régió stratum radiatum és a teljes Ammon szarv stratum oriense a felnőttre jellemző myelinizációt mutatott. Ezzel szemben a CA1 régió stratum radiatumában és az Ammon-szarv piramissejt rétegeiben kisebb myelindenzitást figyeltünk meg, mint felnőttekben. Ehhez hasonlóan a gyrus dentatus hilusa sem érte el az MBP-immunreaktivitás felnőttre jellemző mértékét, viszont a molekuláris réteg külső kétharmada már a felnőttre jellemző erős, myelinizált axondenzitással rendelkezett, és nem volt különbség a molekuláris réteg dorsalis és ventrális részének myelinizációja között sem.

Tizenegy éves korban (10. ábra A-C) minden régióban a felnőttre jellemző MBP-immunreaktivitást láttunk, kivéve a gyrus dentatus hilusát (10. ábra C), melyben az MBP-immunreaktivitás még mindig nem érte el a felnőttben megfigyelhető mértéket (10. ábra D). Ez alapján arra következtethetünk, hogy a hilusban a myelinizáció a korai serdülőkor után is zajlik még.



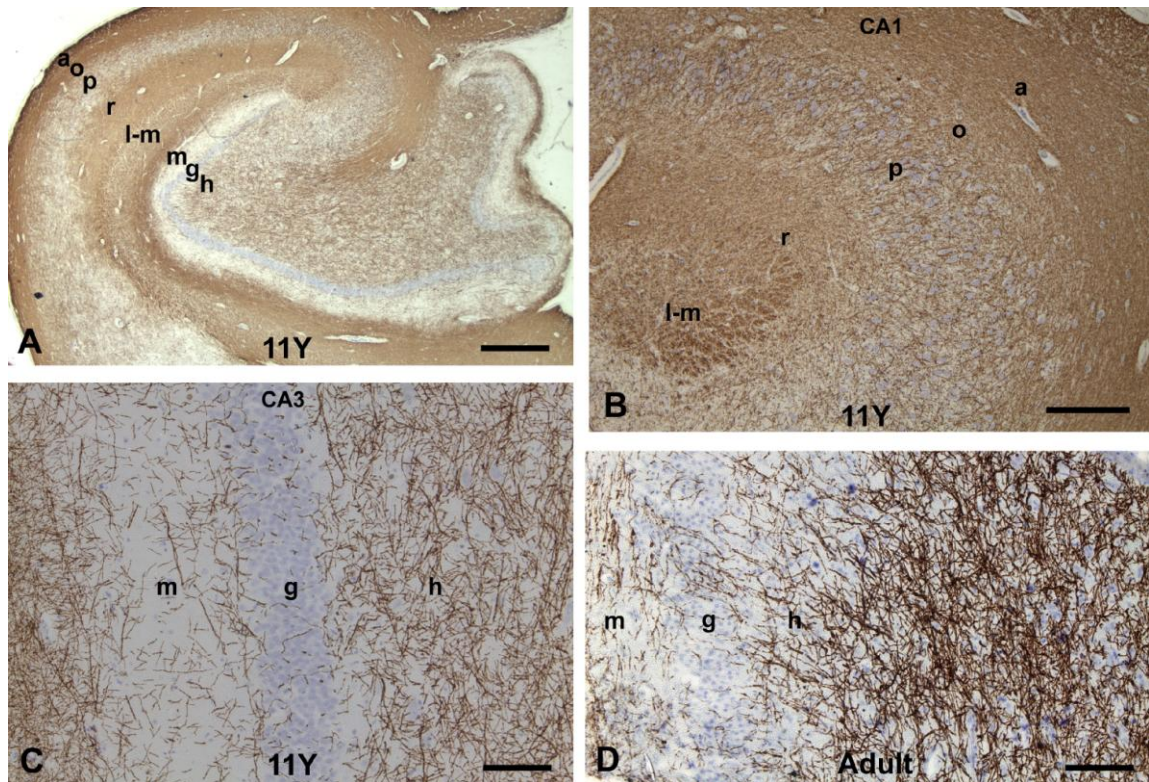
8. ábra

MBP-immunreaktivitás a hippocampusban 2 éves (2Y) korban. A: Erős MBP-immunreaktivitást látunk az alveusban (a), az Ammon-szarv lacunosum-moleculare (l-m) rétegben és a gyrus dentatus molekuláris (m) rétegének külső felében. Az oriens (o), piramisisejt (p) és radiatum (r) rétegekben közepesen erős jelölődés figyelhető meg. B: A CA3 régió nagyobb nagyítású képe. C: Az MBP-immunreaktivitás közepesen erős a CA1 régió oriens (o) rétegében, és gyenge a piramisisejt (p) rétegben. D: A hilusban (h) közepesen erős myelinizált axon denzitást látunk. E és F: Az MBP-immunreaktív axonok a gyrus dentatus dorsalis karjának molekuláris (m) rétegének külső felére korlátozódnak (E), ezzel szemben a ventrális kar molekuláris (m) rétegében a myelinizált axonok csak a réteg külső egyharmadában vannak jelen (F). A skála 1000 µm az A képen, B-F képen 100 µm.



9. ábra

MBP-immunreaktivitás a hippocampusban 3 éves (3Y) korban. A: Az Ammon-szarv rétegei erős MBP-immunreaktivitást mutatnak, míg a gyrus dentatus rétegeiben, főleg a hilusban (h), a myelinizált axonok denzitása jelentősen kisebb, mint felnőttekben. B: A nagy nagyítású képen erős MBP-immunreaktív myelin denzitás látszik a CA3 régió rétegeiben. C: Az (A) képen keretbe foglalt terület nagy nagyítású képe a gyrus dentatus hilusában (h) lazán elhelyezkedő myelinizált axonokat mutat. D: A CA1 régió piramissejtrétegében (p) a myelinizált axonok denzitása jelentősen kisebb, mint a CA3 régióban (B). E, F: Erős MBP-immunreaktivitás látható a gyrus dentatus dorsalis karjának molekuláris (m) rétegének külső kétharmadában (E), míg a ventrális karban a molekuláris réteg külső egyharmadában látunk jelentős pozitivitást (F). A skála 500 μm az A képen, 250 μm a C képen, 100 μm a B és a D-F képen.



10. ábra

MBP-immunreaktivitás a hippocampusban 11 éves (11Y) korban (A-C) és egy 53 éves felnőtt hilusában (D). A: A teljes hippocampusban felnőttre jellemző myelin denzitást látunk 11 éves korban. B: A CA1 régió nagy nagyítású képe. C, D: 11 éves korban, a hilusban (h) a myelinizált axonok már sűrű hálózatot alkotnak (C), felnőttkorban ennél több myelinizált axon van (D), ami arra utal, hogy a hilus myelinizációja még nem teljes a 11. életévben. A skála 1500 μm az A képen, 500 μm a B képen, 250 μm a C, D képen.

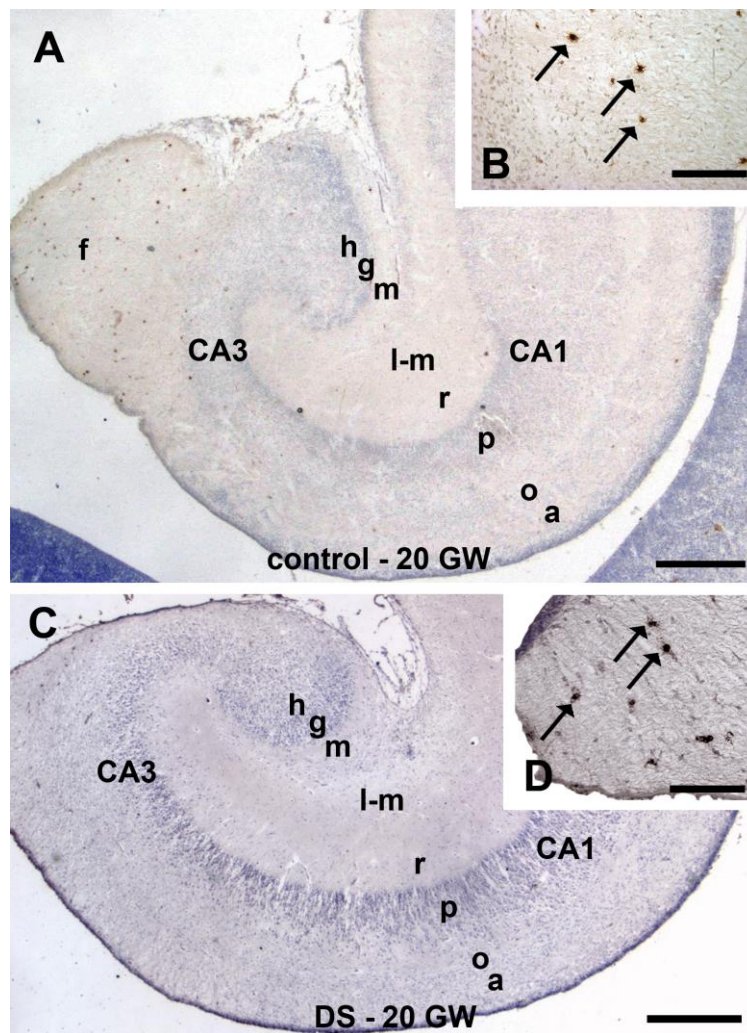
3. Myelinizáció vizsgálata emberi hippocampusban Down-szindrómában

Myelinizáció magzati korban

A kontroll esetekhez hasonlóan a Down-szindrómás magzatokban is elkülöníthetőek voltak a hippocampus egyes rétegei a 14-15. hetekben, de nem láttunk MBP-immunreaktív OLG sejteket vagy axonokat. Down-szindrómásokban az első MBP-immunreaktív OLG sejtek a 20. terhességi héten jelentek meg a fimbria fornicisban, hasonlóképpen, mint a kontrollokban (11. ábra A, B). Ezek a korai megjelenésű OLG sejtek nagy sejttesttel és számos, rövid nyúlvánnyal rendelkeztek, mely tulajdonságaik alapján myelint képző, közepesen sötét OLG sejtek közé tartozhatnak (Mori és Leblond, 1970). Szemben a kontrollokkal, a 20-22. hetes Down-szindrómás esetekben nem láttunk MBP-immunpozitív OLG sejteket az alveusban, az Ammon-szarv CA3 régiójában és a CA1-ben sem.

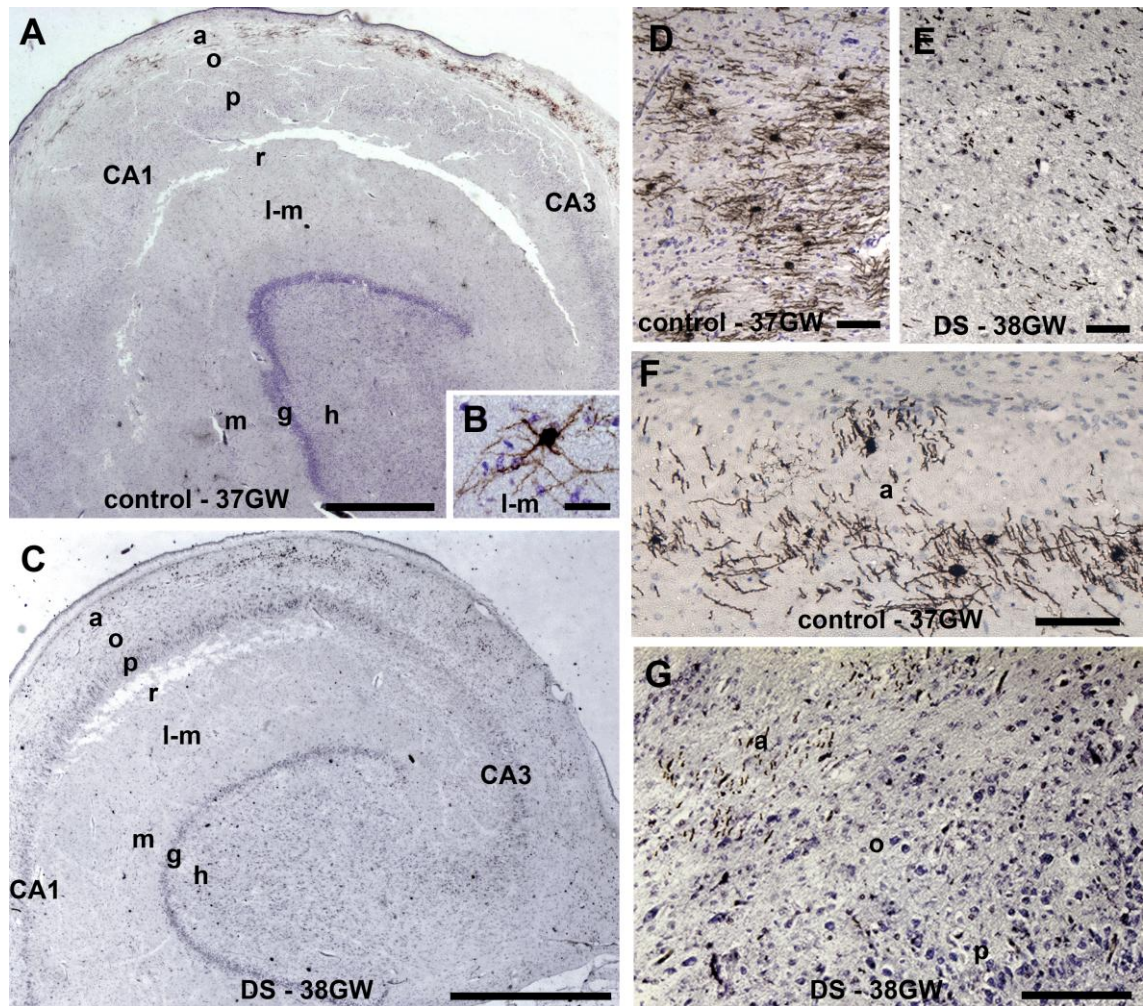
Myelinizáció a 37. terhességi héten

Down-szindrómásokban néhány héttel a születés előtt az MBP-immunpozitív OLG sejtek száma emelkedett a fimbria fornicisban és az alveusban (12. ábra C) a magzati korban látottakhoz képest. OLG sejteket a fimbria fornicisban láttunk legnagyobb számban, kevesebbet figyeltünk meg az alveusban. Az OLG sejtek mellett az első MBP-immunreaktív axonok is megjelentek mindkét fent említett területen (12. ábra E, G). Úgy a fimbria fornicisban, mint az alveusban kisebb számban és rövidebb szakaszon láttunk myelinizált axonokat Down-szindrómás esetekben, mint kontrollban (12. ábra D-G). OLG sejteket láttunk továbbá az Ammon-szarv CA1-3 régiójának oriens rétegében, ahol szintén kevesebb és rövidebb MBP-immunreaktív axont figyeltünk meg Down-szindrómában, mint kontrollban. A myelinizált axonok, és az OLG sejtek száma folyamatosan csökkent az alveusban, valamint a stratum oriensben az Ammon-szarv CA3 régiója felől a subiculum felé haladva (12. ábra A, C). Kontrollban a stratum lacunosum-moleculare-ban egy-egy MBP-pozitív OLG sejtet és myelinizált axont is lehetett látni, ezzel szemben a Down-szindrómában mindez nem volt megfigyelhető (12. ábra B).



11. ábra

MBP-immunreaktív OLG sejtek 20 hetes (20GW) kontroll, valamint Down-szindrómás (DS) magzat hippocampusában. A: MBP-immunreaktív OLG sejtek a fimbria fornícisban (f). B: A fimbria fornícis nagy nagyítású képe. A nyilak az MBP-immunreaktív OLG sejtekre mutatnak. C: Down-szindrómás (DS) magzat hippocampus. D: A fimbria fornícis nagy nagyítású képén néhány MBP-immunreaktív OLG sejt látható (nyilak). A skála 100 μ m a B, D képen, A, C képen 500 μ m.



12. ábra

MBP-immunreaktivitás 37 hetes (37GW) kontroll (A, B, D, F) és 38 hetes (38GW) Down-szindrómás (DS, C, E, G) újszülött hippocampusában. A: MBP-immunreaktív OLG sejtek és myelinizált axonok az Ammon-szarv alveusában (a), oriens (o) és lacunosum-moleculare rétegében. B: A stratum lacunosum-moleculare (l-m) nagyobb nagyítású képe, ahol egy MBP-immunreaktív OLG sejt látszik. C: A 38 hetes Down-szindrómás újszülöttben csak az alveusban (a) látható néhány néhány myelinizált axon. D-E: A fimbria fornixban több, hosszabb myelinizált axont látunk kontroll esetben (D), mint a Down-szindrómában (E). F-G: Míg a Down-szindrómás esetben (G) rövid, vékony myelinizált axonok láthatók az alveusban, kontroll esetekben (F), már vastkosabb, hosszabb myelinizált axonok figyelhetők meg. A skála 750 μ m az A, C, 50 μ m a D, E, 100 μ m az E, F, 25 μ m a B képen.

Myelinizáció a születés utáni 1-3. hónapban

A terhesség alatti genetikai vizsgálatok eredményessége miatt az elmúlt 10 évben egyre csökkent a megszületett Down-szindrómások száma, és általában a születés körüli halálozás jelentős csökkenése miatt igen korlátozott számban rendelkezünk ilyen korú, szövettani vizsgálatra alkalmas mintával. Emiatt a 2 hónapos Down-szindrómás esetünket 1 és 3 hónapos kontroll esetekkel hasonlítottuk össze.

Mind a 2 hónapos Down-szindrómás, mind az 1 hónapos kontroll esetben az MBP-immunpozitív OLG sejtek és a myelinizált axonok száma emelkedett a korábbi időpontokhoz képest a fimbria fornicisban, az alveusban, valamint az oriens rétegben (13. ábra A, B). Az OLG sejtek morfológiáját tekintve nem láttunk különbséget a két csoport között. Ugyanakkor Down-szindrómában a myelinizáció mértéke elmarad a kontrollhoz képest (13. ábra).

A CA1 régió mellett a CA3-ban is láttunk a stratum lacunosum-moleculare-ban myelinizált axonokat mindkét csoportban. Down-szindrómás esetekben mindkét régióban kevesebb és rövidebb MBP-immunreaktív axont figyeltünk meg, mint kontrollban. Mindkét csoportban megjelentek az első MBP-immunreaktív OLG sejtek a gyrus dentatus stratum moleculare-ban (13. ábra C, D). Kontroll esetekben a CA3 régió piramissejt rétegében is voltak myelinizált axonok, szemben a Down-szindrómások azonos rétegével (13. ábra E, F).

A születés utáni 3. hónapban az MBP-immunreaktivitás tovább emelkedett a korábbi időpontokhoz képest az Ammon-szarv egyes rétegeiben, valamint a fimbria fornicisban és az alveusban. Emellett megjelentek az első MBP-immunreaktív myelinizált axonok a gyrus dentatus hilusában. A molekuláris rétegben a myelinizált axonok a réteg külső egyharmadára korlátozódtak, és a gyrus dentatus dorsalis karjában több myelinizált axont láttunk, mint a ventrális karban.

Myelinizáció a születés utáni 5-6. hónapban

Mindkét csoportban homogén myelinfestődést láttunk a fimbria fornicisban és az alveusban (14. ábra A, B).

Kontrollban a 3 hónapos korhoz képest tovább növekedett az MBP-immunreaktivitás a fent említett egyes rétegekben. Továbbá, hasonlóan a 3 hónapos korban megfigyeltekhez több MBP-immunreaktív axont láttunk a gyrus dentatus stratum moleculare dorsalis karjában, mint a ventrálisban, és számottevően több myelinizált axon volt a réteg külső egyharmadában, mint a középső harmadban.

Down-szindrómásokban megjelentek az első myelinizált axonok a hilus és a CA1-3 régió piramisisejt rétegeiben (14. ábra D, F, H). Kevesebb és rövidebb MBP-immunreaktív myelinizált axont figyeltünk meg az Ammon-szarv piramisisejt rétegének teljes hosszában a stratum radiatumban és a gyrus dentatus hilusában, mint kontrollban (14. ábra C-H). Down-szindrómásokban a gyrus dentatus stratum moleculare dorsalis karjában több myelinizált axont láttunk, mint a ventrális karban, hasonlóan a kontrollhoz. Úgy a Down-szindrómás esetekben, mint a kontrollban, a stratum moleculare külső egyharmadában számottevően nagyobb volt az MBP-immunreaktivitás, mint a középső harmadban (14. ábra G, H).

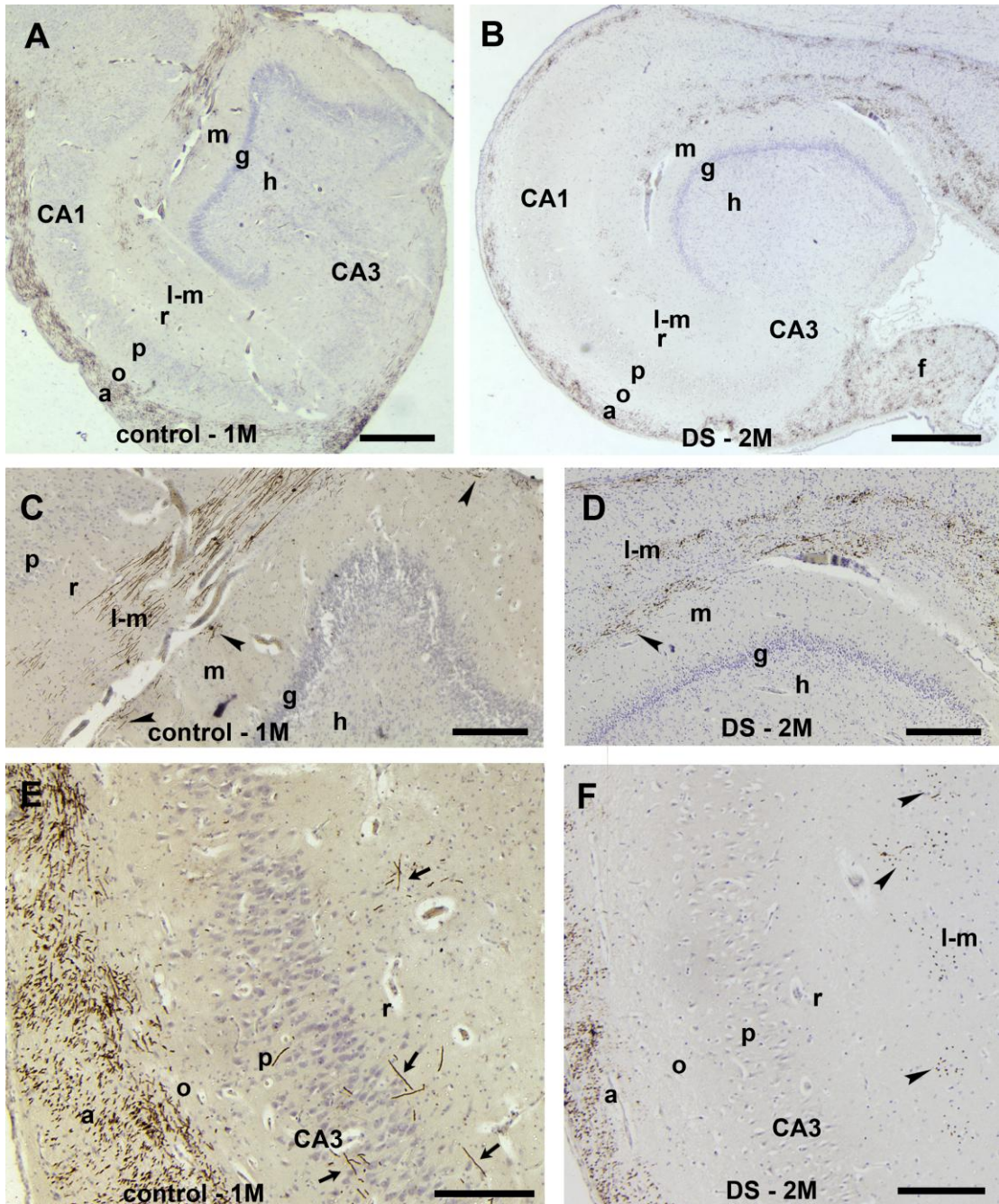
MBP-immunfestéssel erős, homogén festődést láttunk az alveusban, a CA1-3 régió stratum lacunosum-moleculare-ban, és nem volt észlelhető különbség a két csoport festődése között.

Myelinizáció a születés utáni 8-11. hónapban

Ebben az életkorban az MBP-immunreaktivitása mindkét csoportban erős, homogén festődést mutatott a fimbria fornicisban és az alveusban (15. ábra A, B). A hippocampus rétegei mindkét csoportban kevésbé myelinizáltak. Mindkét csoportban hasonló immunreaktivitást figyeltünk meg a stratum lacunosum-moleculare-ban (15. ábra A, B). Ehhez képest mindkét csoportban kevesebb myelinizált axont láttunk a CA1-3 régió stratum oriensében. Hasonló különbséget láttunk a gyrus dentatus stratum moleculare-ban, mint korábban, tehát a réteg külső egyharmadában és dorsalis karjában több myelinizált axon volt, mint a középső harmadban és a ventrális karban.

Az Ammon-szarv radiatum és piramisisejt rétegében mindkét csoportban több myelinizált axont láttunk a CA3 régióban, mint a CA1-ben, viszont Down-szindrómásokban a myelinizáció mindkét régióban kisebb mértékű volt a kontrollhoz képest (15. ábra A, B).

A myelinizációban meglévő különbség jól látszik a hilusban, ahol kevesebb MBP-immunreaktív axont figyeltünk meg Down-szindrómásokban, mint kontrollban.



13. ábra

MBP-immunreaktív OLG sejtek 1 hónapos (1M) kontroll és 2 hónapos (2M) Down-szindrómás (DS) gyermek hippocampusában. A: Az 1 hónapos kontroll gyermek hippocampusában számos MBP-immunreaktív axon látható az alveusban (a) és a stratum oriensben (o), kevesebb az Ammon-szarnv lacunosum-moleculare rétegében. B: Ezzel szemben, a 2 hónapos Down-szindrómás gyermekben kevesebb myelinizált axon van az Ammon-szarnv alveusában (a), oriens (o), lacunosum-moleculare rétegeiben és a fimbria fornicisban (f), mint a kontrollban. C: 1 hónapos kontrollban számos myelinizált axon észlelhető a CA1 régió lacunosum-moleculare (l-m) rétegében. Az MBP-immunreaktív axonok (nyílhegyek) a gyrus dentatus stratum moleculare-ban (m) is láthatók. D: 2 hónapos Down-szindrómás gyermekben látható néhány, rövid, MBP-immunreaktív axon a stratum lacunosum-moleculare-ban (l-m). Megjelennek az első MBP-immunreaktív axonok gyrus dentatus molekuláris (m, nyílhegy) rétegében. E: Kontrollban az Ammon-szarnv CA3 régiójának alveusában (a) számottevő MBP-immunreaktív axon látható, míg csak kevés van jelen (nyílak) a piramisajt (p) és a radiatum (r) rétegekben. F: 2 hónapos Down-szindrómás gyermekben jelentősen kevesebb myelinizált axon látható a CA3 régió alveusában (a), mint az 1 hónapos kontrollban (E), és csak kevés, nagyon rövid, MBP-immunreaktív axon (nyílhegyek) látható a CA3 régió lacunosum-moleculare (l-m) rétegében. A skála 500 μ m az A, B, 200 μ m a C-F képen.

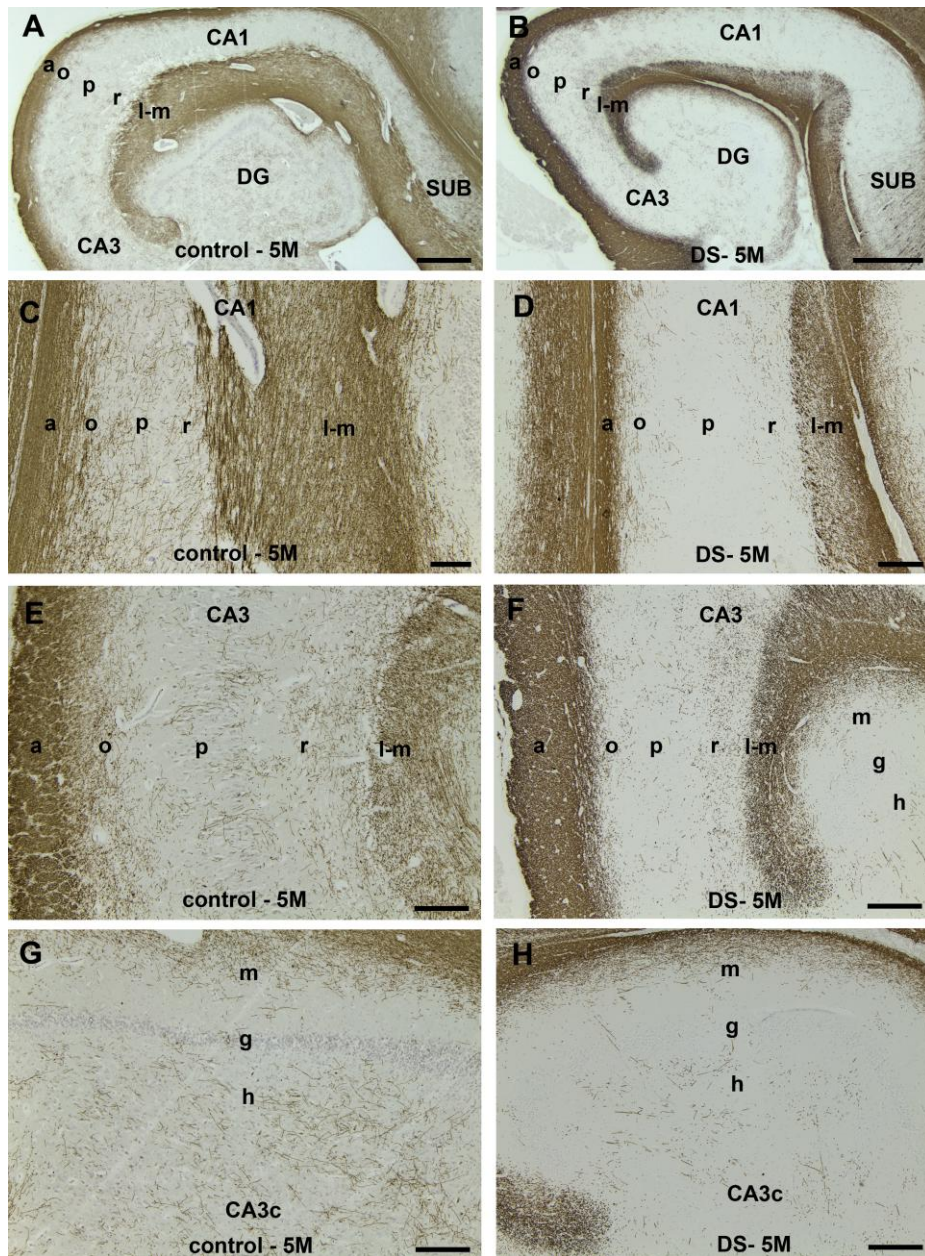
Myelinizáció a 2. életévben

A fimbria fornicis és az alveus mellett a CA1-3 régió oriens rétege is a felnőttre jellemző homogén MBP-immunfestődést mutatott (15. ábra C, D). Ezért a két csoport myelinizációja között nem láttunk különbséget a fenti rétegekben. Kontroll csoportban felnőtthez hasonlóan erős myelinizációt figyeltünk meg az Ammon-szarv stratum lacunosum-moleculare-ban (15. ábra C). Ezzel szemben Down-szindrómásokban kevesebb myelinizált axon volt, mint a kontrollban (15. ábra D).

Kontroll esetekben erősebb myelinizációt láttunk, mint Down-szindrómában az Ammon-szarv radiatum és piramisajt rétegének teljes hosszában (15. ábra C, D), valamint a hilusban és a stratum moleculare-ban.

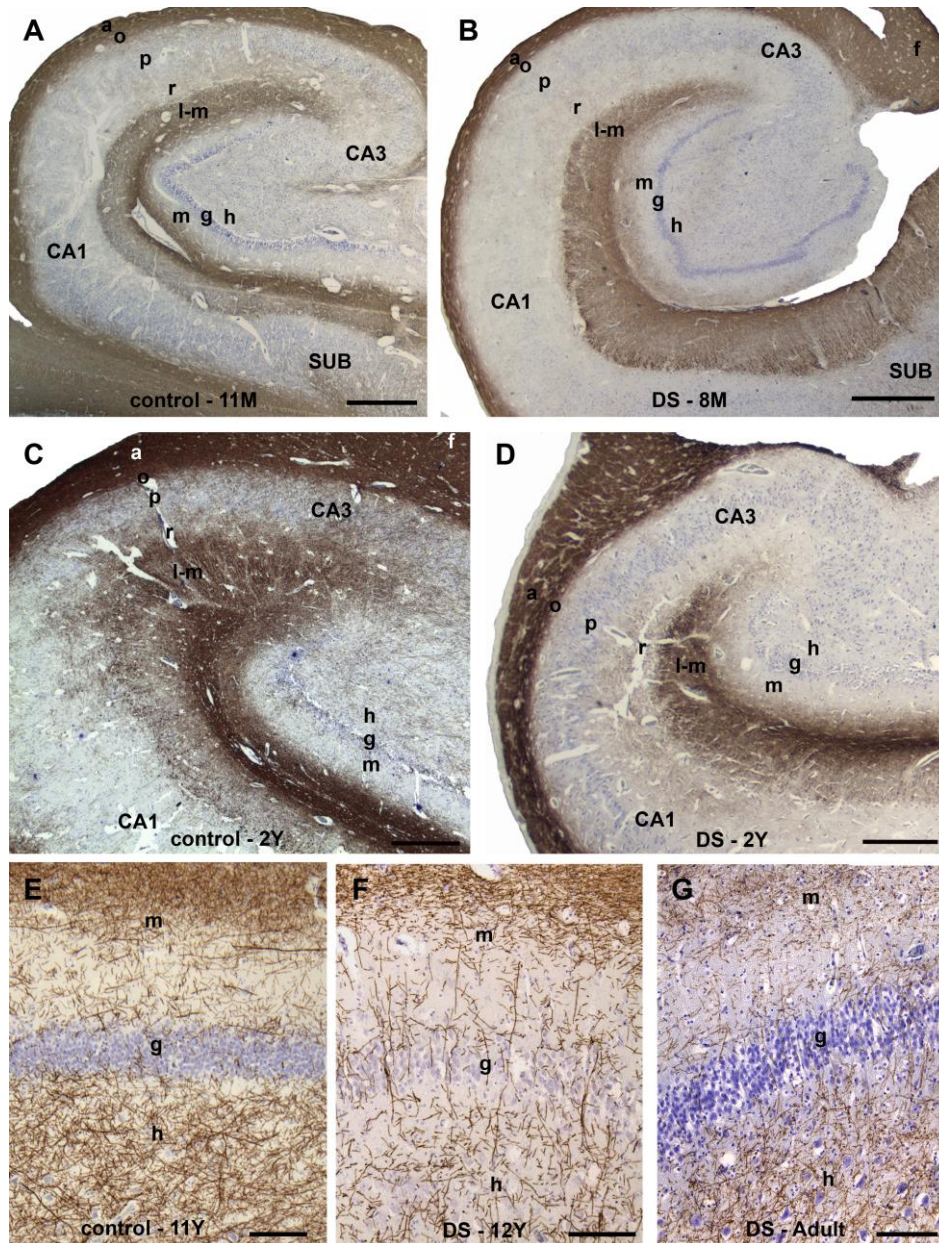
Myelinizáció a 11-12. életévben

Ebben a korban az Ammon-szarv egyes rétegei, valamint a gyrus dentatus rétegei elérik a felnőttre jellemző, homogén MBP-immunpozitivitást mindkét csoportban. Ez alól csak a hilus kivétel, ahol még mindkét csoportban kevesebb myelinizált axont láttunk, mint felnőttben (15. ábra E, F). Továbbá, a hilusban kisebb volt az MBP immunreaktivitás a Down-szindrómás esetekben, mint a kontrollban (15. ábra E, F). A két csoport közötti fent leírt különbség felnőttkorban is megmaradt (15. ábra E-G). Ezzel szemben a hippocampus többi rétegében nem figyeltünk meg különbséget a két csoport myelinizációja között.



14. ábra

MBP-immunreaktivitás 5 hónapos (5M) kontroll és Down-szindrómás (DS) gyermek hippocampusában. A-B: Mindkét csoportban intenzív MBP-immunreaktivitást látunk az Ammon-szarv alveusában (a) és lacunosum-moleculare (l-m) rétegében, valamint kevésbé intenzív a jelölődés a hippocampus más rétegeiben. C: Kontrollban a CA1 régió alveusában (a) és a stratum lacunosum-moleculare-ban (l-m) megfigyelhető intenzív jelölődés mellett számottevő MBP-immunreaktív axon látható a CA1 régió oriens (o), piramisisejt (p), radiatum (r) rétegeiben. D: A CA1 régió alveusában (a) és lacunosum-moleculare rétegében hasonlóan intenzív jelölődés figyelhető meg, mint kontrollban (C), viszont az oriens (o), piramisisejt (p) és radiatum (r) rétegekben lényegesen kevesebb MBP-immunreaktív axon van az 5 hónapos Down-szindrómás gyermekben, mint a kontrollban. E: Kontrollban az Ammon-szarv CA3 régió oriens (o), radiatum (r) és piramisisejt (p) rétegei számottevő myelinizált axont tartalmaznak. A CA3 régió alveusában (a) és lacunosum-moleculare (l-m) rétegében intenzív a myelinizáció, hasonlóan a CA1 régió azonos rétegeihez. F: A Down-szindrómás gyermekben azonos mértékű MBP-immunreaktivitás látható a CA3 régió alveusában (a) és lacunosum-moleculare rétegében, mint kontrollban. Ezzel szemben jelentősen kevesebb MBP-immunreaktív axon figyelhető meg a CA3 régió oriens (o), piramisisejt (p) és radiatum (r) rétegeiben, mint a kontrollban. G: A stratum moleculare (m) külső egyharmadában intenzív az MBP-immunreaktivitás, a hilusban (h) pedig egy laza hálózatot alkotnak a jelölt axonok. H: Down-szindrómásban hasonló jelölődés figyelhető meg a moleculare (m) rétegben, mint kontrollban, viszont csak kevés, rövid myelinizált axon látható a hilusban (h). A skála 1 mm az A, B, 200 μ m a C-H képen.



15. ábra

MBP-immunreaktív OLG sejtek és axonok 11 hónapos (11M, A), 2 éves (2Y, C), 11 éves (11Y, E) és felnőtt (G) kontrollban, valamint 8 hónapos (8M, B), 2 éves (2Y, D) és 12 éves (12Y, F) Down-szindrómás gyermek hippocampusában. A: 11 hónapos kontrollban intenzív MBP-immunreaktivitás látható az Ammon-szárv alveusában (a), stratum lacunosum-moleculare-ban (l-m) és a gyrus dentatus molekuláris rétegének külső egyharmadában. Az Ammon-szárv más rétegeiben és a hilusban (h) közepesen erős hálózatot alkotnak a myelinizált axonok. B: Összehasonlítva a kontrollal, a myelinizáció hasonlóan erős a 8 hónapos Down-szindrómás gyermekben az alveusban (a) és a lacunosum-moleculare (l-m) rétegben, viszont gyengébb az Ammon-szárv oriens (o), piramissejt (p), radiatum (r) rétegeiben, valamint a gyrus dentatus stratum moleculare-ban és hilusában (h). C: A 2 éves kontrollban az MBP-immunreaktivitás eléri a felnőttre jellemző mértéket az Ammon-szárv alveusában (a), a lacunosum-moleculare (l-m) rétegében és a gyrus dentatus stratum moleculare-ban (m). A hilusban (h) viszont kevesebb myelinizált axon látható, mint felnőttben. D: A 2 éves Down-szindrómás gyermekben az Ammon-szárvban és a gyrus dentatus minden rétegében kevesebb myelinizált axon figyelhető meg, mint kontrollban, kivéve az alveust (a) és a lacunosum-moleculare réteget (l-m), melyekben az immunreaktivitás eléri a felnőttre jellemző mértéket. E: 11 éves korban a myelinizált axonok sűrű hálózatot alkotnak a gyrus dentatus hilusában (h) és a molekuláris rétegében (m). F: A 12 éves Down-szindrómás gyermekben kevesebb myelinizált axon látható a gyrus dentatus hilusában (h) és molekuláris (m) rétegében, mint a 11 éves kontrollban. G: A felnőtt Down-szindrómásban, az MBP-immunreaktivitás kisebb mértékű a hilusban (h), mint a 11 éves kontrollban. A skála 1 mm az A, B, 500 µm a C, D, 100 µm az E-G képen.

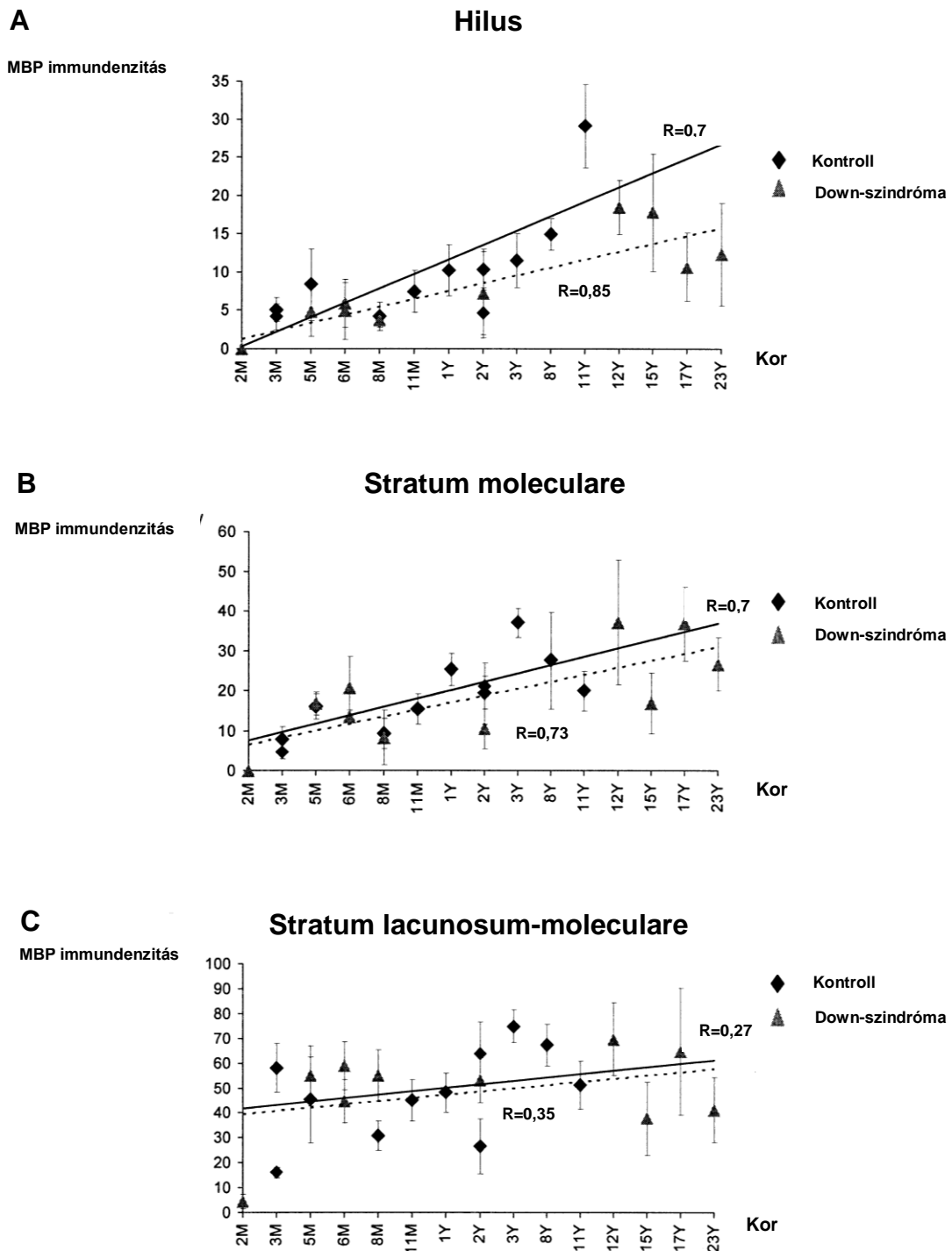
Az MBP-immunreakció denzitása

Annak érdekében, hogy a különböző életkorokban mennyiségileg is meghatározzuk a myelinizáció mértékét, a hippocampus egyes rétegeiben megmértük az MBP-immunpozitív axonok denzitását a CA1-CA3 régió stratum lacunosum-moleculare-ban és a gyrus dentatus molekuláris rétegében. Mindkét rétegben a perforáns pálya axonjai futnak, ami a hippocampus egyik legfontosabb, az entorhinális kéreg felől érkező bemenete. A fent említett két réteg mellett megmértük a hilusban is az MBP denzitását az egyes korcsoportokban, ahol egyes subcortikális struktúrákból, mint pl. a septum, locus coeruleus, raphe-magvak felől érkező axonok végződnek (Amaral és Lavenex, 2007). A perforáns pálya és a hilusban futó afferens axonok myelinizáltak.

A hilusban megmért MBP-immunreaktív axonok denzitása korrelált az életkorral Down-szindrómásokban ($R=0,85$) és kontrollban ($R=0,7$) egyaránt (16. ábra A). Az MBP-immunreaktivitás intenzitását a stratum moleculare-ban mérve a fejlődés során egészen fiatal felnőttkorig (23 év) a denzitás erőssége és az életkor között pozitív korrelációt figyeltünk meg Down-szindrómásokban ($R=0,73$) és kontrollban ($R=0,7$) is (16. ábra B). Ezzel szemben csupán gyenge korrelációt mutatott a stratum lacunosum-moleculare denzitása az életkorral kontrollban ($R=0,27$) és Down-szindrómásokban ($R=0,35$) egyaránt (16. ábra C).

A mérések során a kontroll esetekhez képest alacsonyabb volt az MBP-immunreaktív axonok denzitása Down-szindrómásokban a CA1-CA3 régió lacunosum-moleculare-ban, valamint a gyrus dentatus molekuláris rétegében és hilusában. A fenti rétegekben az MBP-immunreakció denzitása mindkét csoportban hasonló értékeket mutatott születés körül, viszont a következő életkorokban a különbség már látható, és egyre nagyobb volt.

A két csoport denzitásbeli különbségét az idő függvényében a grafikonban feltüntetett trendvonal jellemzi (16. ábra). A CA1-CA3 régió lacunosum-moleculare rétegében kapott denzitásértékek nagyon nagy szórást mutattak az eltérő időpontokban, és a trendvonal meredeksége sem különbözött nagymértékben a két csoport között. A stratum moleculare-ban már kisebb volt a denzitásadatok szórása a különböző időpontokban, és a trendvonal meredeksége is jobban elmarad a Down-szindrómásoknál a kontrollhoz képest, mint a CA1-CA3 régió lacunosum-moleculare rétegében. A két csoport közötti legnagyobb különbséget a trendvonal meredekségében a hilusban láttuk (16. ábra A).



16. ábra

MBP-immunreaktivitás denzitometriai eredményei a gyrus dentatus hilusában (A), molekuláris (B) rétegében és az Ammon-szarv lacunosum-moleculare (C) rétegében. A: Az MBP-immunreaktivitás a hilusban korrelációt mutat az életkorról, azonban Down-szindrómásban az MBP-immundenzitás növekedése mérsékeltebb, mint a kontrollban. B: A gyrus dentatus molekuláris rétegében az MBP-immundenzitás a korrall növekszik mind kontroll, mind Down-szindrómás egyénekben. Az emelkedés mértéke azonban elmarad Down-szindrómában a kontrollokéban megfigyelhetőhöz képest. C: Az Ammon-szarv lacunosum-moleculare rétegében csak laza korreláció figyelhető meg az életkor és az MBP-immunreaktivitás emelkedése között. Emiatt a két csoport közti különbség sem olyan jelentős, mint a gyrus dentatus molekuláris rétegében (B), vagy hilusában (A). Az x-tengely jelenti a vizsgált életkort, az y-tengely, pedig az MBP-immunreaktivitás mértékét jelöli. fekete - kontroll esetek, szürke - Down-kóros esetek, egyenes vonal – kontroll esetek trendvonala, szaggatott vonal – Down-kóros esetek trendvonala. A bárok a standard deviációt jelölik.

4. Myelinizáció vizsgálata hipofízis adenilát cikláz aktivátor polipeptid (PACAP) deficiens egerekben

A PACAP-deficiens egerekben történt vizsgálatokhoz egy külön kontrollcsoportot használtunk annak érdekében, hogy egymásnak megfelelő korú állatokat hasonlítsunk össze.

Myelinizáció a születés utáni 3. napon

MBP-immunreaktív OLG sejteket mindkét csoportban a corpus callosumban (17. ábra A-B) és kisebb számban a fimbria fornicisban is láttunk. Az OLG sejtek világosbarnára festődtek, ami arra enged következtetni, hogy ezek a sejtek még nem termelnek nagy mennyiségben MBP-t. Mindkét csoportban a corpus callosum teljes cranio-caudális és medio-laterális kiterjedésében jelen voltak az MBP-immunreaktív OLG sejtek. Emellett a corpus callosum valamennyi vizsgált cranio-caudális síkjában a PACAP-deficiens egerekben több MBP-immunreaktív OLG sejt volt a corpus callosum capsula interna melletti, ventro-laterális részeiben, mint a sulcus sagittalis alatti, dorso-mediális részeiben. A corpus callosum teljes, cranio-caudális kiterjedésében megszámlált, MBP-t expresszáló OLG sejtek összesített átlaga hasonló volt a vad típusú egerekben (16.7 ± 2.48 / metszet) és a PACAP-deficiens állatokban (17.3 ± 2.95 / metszet). Az OLG sejtek számolását elvégeztük három kiemelt síkban is. A síkokat cranio-caudális elhelyezkedésük alapján osztottuk fel septum alatti (továbbiakban septalis sík), a hippocampus teste feletti (továbbiakban hippocampalis sík) és a középagy szintjén (továbbiakban középagyi sík) elhelyezkedő metszetekre. Septalis síkban több OLG sejtet láttunk a vad típusú egerekben (20.1 ± 1.12 / metszet), mint a PACAP-deficiens állatokban (13.6 ± 1.85 / metszet). Ezzel szemben a hippocampalis (PACAP-deficiens: $20,8 \pm 1,87$ / metszet, vad típus: $15,8 \pm 0,2$ / metszet) és a középagyi (PACAP-deficiens: $17,5 \pm 2,23$ / metszet, vad típus: $14,2 \pm 1,25$ / metszet) síkokban a PACAP-deficiens állatokban láttunk több OLG sejtet.

Az agykéreg régióiban, capsula internában, mamillothalamikus pályában, laterális- és mediális thalamusban, putamenben, septumban, pedunculus cerebriben és a hippocampus egyes régióiban nem voltak OLG sejtek.

Myelinizáció a születés utáni 5. napon

Az 5. napon már főként sötétbarna sejtek voltak jelen a corpus callosumban, ami az OLG sejtek nagyobb MBP tartalmára utal. Emellett a corpus callosum minden síkjában több OLG sejtet láttunk a vad típusú egerekben (átlag: $71,4 \pm 15,21$ / metszet), mint a PACAP-deficiens állatokban (átlag: $50,1 \pm 20,60$ / metszet). Továbbá, ebben a korban a fimbria fornicisban is láttunk OLG sejteket (17. ábra C, D).

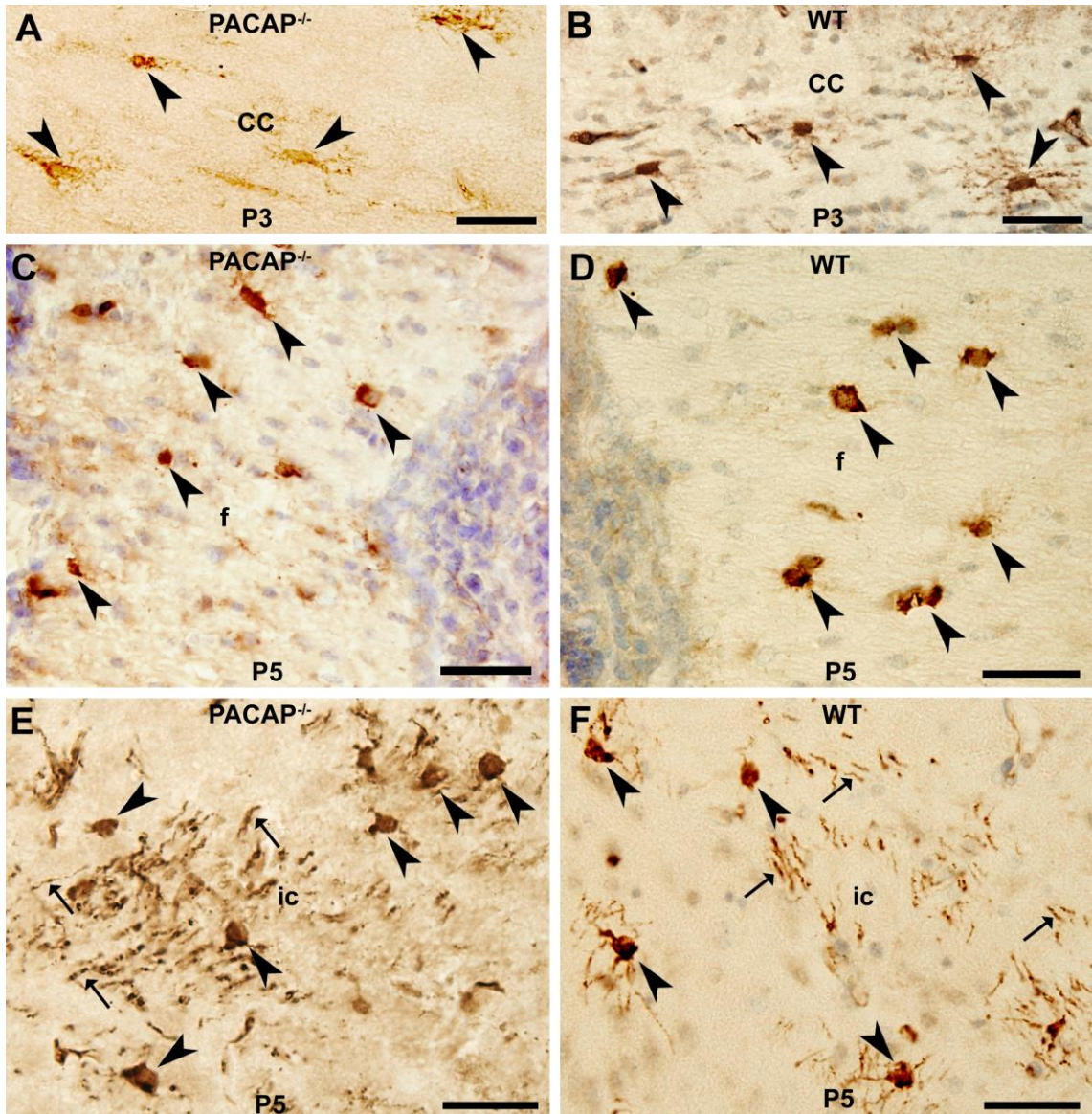
MBP-immunreaktív OLG sejteket és myelinizált axonokat láttunk a capsula interna (17. ábra E, F), valamint a mamillothalamikus pályában. Ezekben a régiókban több myelinizált axon volt jelen a PACAP-deficiens egerekben, mint a vad típusban. A vad egerekben csak MBP-immunreaktív OLG sejteket láttunk a pedunculus cerebriben, ezzel szemben PACAP-deficiens állatokban az OLG sejtek mellett már megjelentek az első myelinizált axonok is. Az agykéregben és a hippocampusban nem láttunk OLG sejteket és myelinizált axonokat sem.

Myelinizáció a születés utáni 8. napon

Megjelentek az első myelinizált axonok a corpus callosum ventro-laterális részén (18. ábra A-D), de a vad típusú egerekhez képest nagyobb volt az MBP-immunreaktív axonok sűrűsége a PACAP-deficiens egerekben.

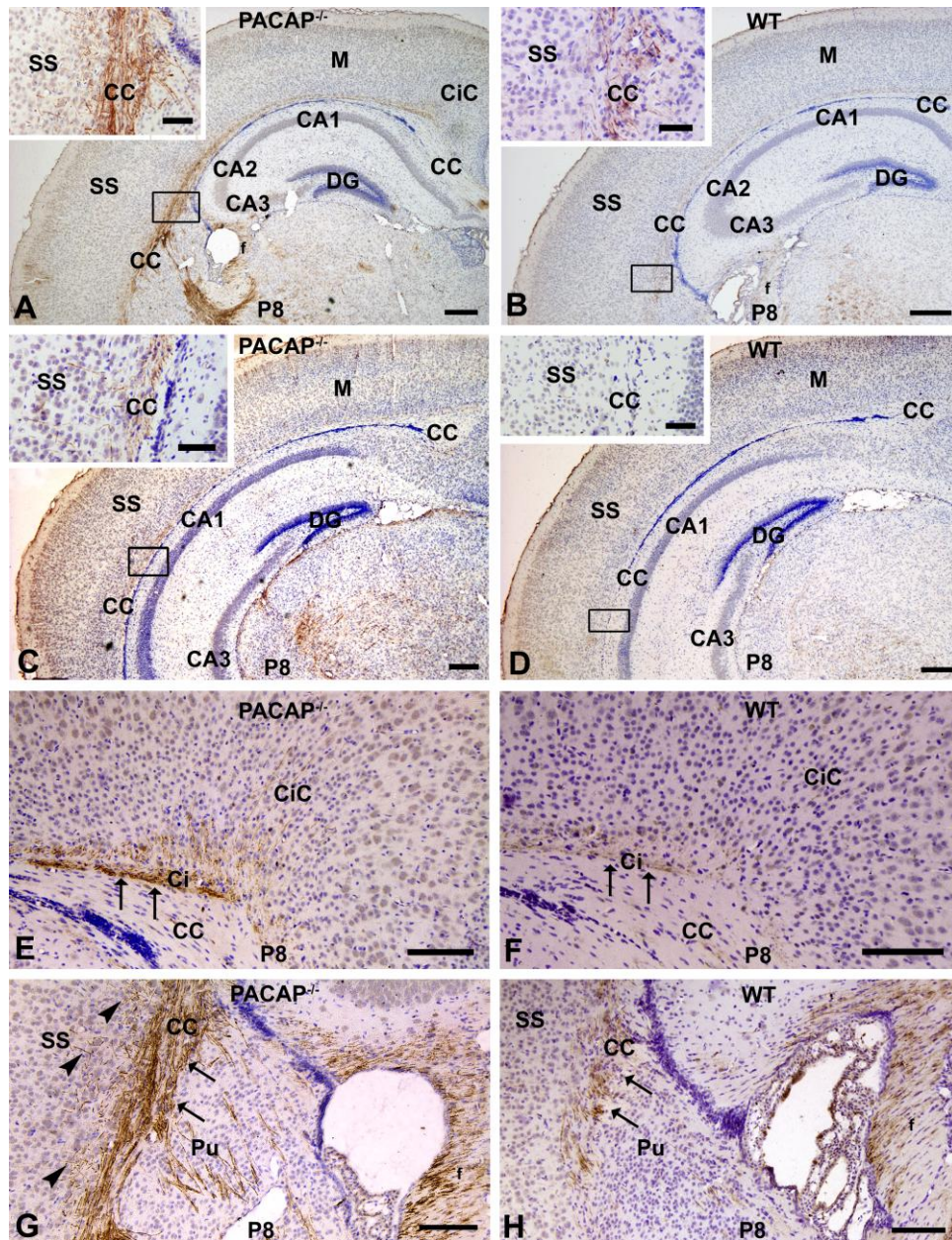
PACAP-deficiens egerekben az agykérgi régiók közül az első myelinizált axonok a cinguláris kéreg V-VI. (18. ábra E, F) és a szomatoszenzoros kéreg VI. (18. ábra G, H) rétegében jelentek meg. Emellett már erős myelinizációt láttunk PACAP-deficiens egerekben a corpus callosumban (18. ábra A, C) és a cingulumban (18. ábra E). Ezzel szemben a vad típusú állatokban a corpus callosum ventro-laterális része (18. ábra B, D), valamint a cingulum (18. ábra F) myelinizációja gyengébb volt a PACAP-deficiens egerekben találtaknál.

A fimbria fornicisban erősebb volt a myelinizáció a PACAP-deficiens egerekben, mint a vad típusú állatokban (18. ábra G, H). Nem láttunk MBP-immunreaktív axonokat és OLG sejteket a hippocampusban egyik csoportban sem.



17. ábra

MBP-immunreaktivitás a corpus callosumban (CC, A, B), a fimbria fornixban (C, D) és a capsula internában (ic, E, F) PACAP-deficiens (PACAP^{-/-}, A, C, E), illetve vad-típusú (WT, B, D, F), 3 (P3, A, B) és 5 (P5, C, F) napos egérben. A-B: MBP-immunreaktív OLG sejtek (nyílhegyek) a corpus callosumban (CC) PACAP-deficiens (A) és vad-típusú (B) állatban. C-D: MBP-immunreaktív OLG sejtek 5 napos korban a fimbria fornixban (nyílhegyek) PACAP-deficiens (C), illetve vad-típusú egérben (D). E-F: Több MBP-immunreaktív OLG sejt látható 5 napos PACAP-deficiens egér capsula internájában, mint vad-típusú egérben. A skála 25 μm.



18. ábra

MBP-immunreaktivitás 8 napos (P8) PACAP-deficiens (PACAP^{-/-}) és vad-típusú (WT) egérben. A: MBP-immunreaktív axonok a fimbria fornixban (f) és a corpus callosumban (CC) PACAP-deficiens egérben. A betét az (A) kép bekeretezett területének nagyobb nagyítású képe. B: Vad-típusban (WT) kevesebb MBP-immunreaktív axon látható a corpus callosumban (CC) és a fimbria fornixban (f), mint a PACAP-deficiens állatban (A). A betét a (B) kép bekeretezett részének nagyobb nagyítású képe. C-D: A myelinizált axonok denzitása mindkét csoportban kisebb a corpus callosum (CC) caudális részén (C, D), mint a rostrálison (A, B). A betétek a (C) és a (D) képeken bekeretezett területek nagyobb nagyítású képei, melyeken jól látszik a különbség a corpus callosum (CC) myelinizáltságában a PACAP-deficiens és a vad-típus (WT) között. E-F: A PACAP-deficiens állatban (E) a myelinizált axonok az V-VI. rétegben láthatók a cinguláris kéregben (CiC). Ezzel szemben vad típusban (F), csak az VI. rétegben figyelhető meg MBP-immunreaktív axon. Továbbá a PACAP-deficiens egérben (E) több MBP-immunreaktív axont látunk a cingulumban (Ci, nyilak), mint vad-típusban (F). A corpus callosum (CC) dorso-mediális része egyik csoportban sem mutat MBP-immunreaktivitást. G-H: Szemben a corpus callosum (CC) mediális részével, ahol nem figyelhető meg jelölődés (E, F), a laterális részén mindkét csoportban látunk MBP-immunreaktív axonokat (nyilak), habár a vad-típusú egérben (H) kevesebbet. PACAP-deficiens egérben (G) erősebb a myelinizáció a fimbria fornixban (f) és a putamenben (Pu), mint a vad-típusban (H). Ezenfelül a PACAP-deficiens egérben (G) az érzőkéreg VI. rétegében (SS) láthatók MBP-immunreaktív axonok (nyílhegyek), míg a vad-típusban nem. A skála 200 µm az A-D képen, 50 µm a betétekben, az E-H képen 100 µm.

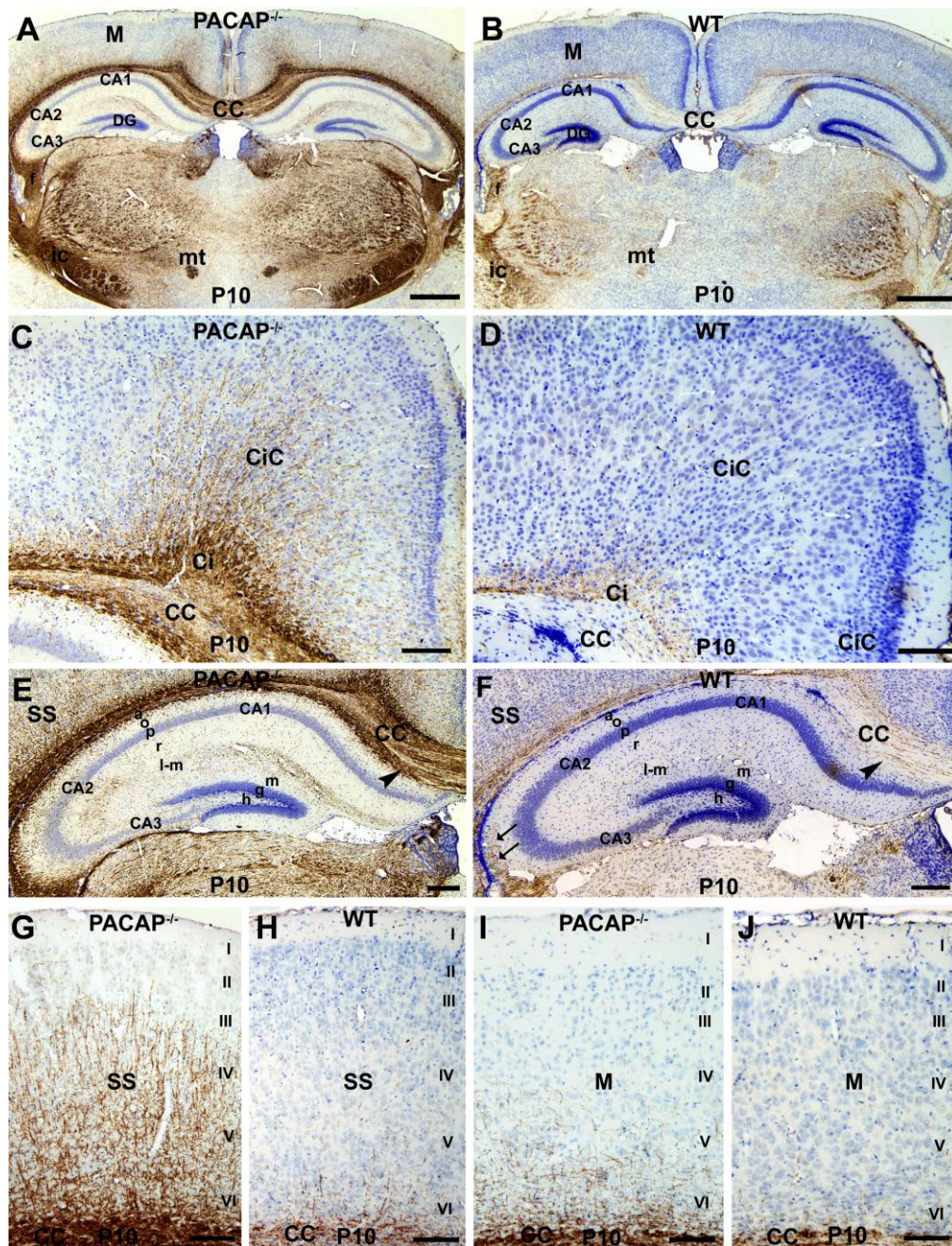
Myelinizáció a születés utáni 10. napon

A corpus callosumban (19. ábra A-F) nagy számban láttunk myelinizált axonokat a PACAP-deficiens állatokban. Továbbá, erősebb myelinizációt figyeltünk meg a capsula internában és a mamillothalamikus pályában is a PACAP-deficiens egereknél, mint a vad típusban (19. ábra A, B).

Tíz napos korban már számos agykérgi régióban láttunk myelinizált axonokat. Hasonlóan, mint a korábbi fejezetben, a cinguláris kéregben találtuk a legerősebb myelinizációt (19. ábra C, D), mivel a myelinizált axonok a többi kéregterülettel szemben ezen a területen értek el felületesebb rétegeket. A vad típusban (19. ábra D) a myelinizált axonok csak az VI. idegsejt rétegig érnek a cinguláris kéregben, szemben a PACAP-deficiens egerekkel (19. ábra C), melyekben az axonok már a kéreg III-IV. rétegében is myelinizáltak. A vad típusú egerek érzőkéregében, az V-VI. idegsejt rétegben (19. ábra H) láttunk myelinizációt, a PACAP-deficiens egerekben viszont már a III-IV. réteg (19. ábra G) is tartalmazott myelinizált axonokat. A motoros kéregben mindkét csoportban az V-VI. rétegben észleltünk myelinizációt, bár több myelinizált axon volt a PACAP-deficiens egerekben, mint a vad típusban (19. ábra I, J). Ehhez hasonlóan PACAP-deficiens egerekben az összes fent említett kérgi területen és az entorhinális kéregben is több axont láttunk, mint a vad típusban.

A PACAP-deficiens egerek fimbria fornicisában (18. ábra A) erős, de még nem a felnőttre jellemző mértékű myelinizációt láttunk, míg a vad típusban (18. ábra B) csak gyenge immunreakciót észleltünk. A PACAP-deficiens (19. ábra E) egerekben erőteljes myelinizációt észleltünk a hippocampus lacunosum-moleculare rétegében és az alveusban, valamint gyengét a stratum oriensben, a CA3 régió piramisajt és radiatum rétegeiben. Vad típusban (19. ábra F) csak az alveus tartalmazott néhány myelinizált axont. Egyik csoportban sem láttunk myelinizált axont a gyrus dentatus rétegeiben (19. ábra E-F).

PACAP-deficiens egerekben erős volt a myelinizált axonok denzitása a pedunculus cerebriben, szemben a vad típusban, melyben csak néhány axont észleltünk.



19. ábra

MBP-immunreaktivitás 10 napos (P10) PACAP-deficiens (PACAP^{-/-}) és vad-típusú (WT) egérben. A-B: A PACAP-deficiens (A) egérben a corpus callosumban (CC), a fimbria fornixban (f), a capsula internában (ic), az Ammon-szarvban (CA1, CA2, CA3), a gyrus dentatus rétegeiben, a mamillothalamikus pályában (mt) és az agykéreg különböző részeiben egyértelműen nagyobb a myelinizált axonok denzitása, mint a vad-típusú állatban (B). C-D: Vad-típusú egérben megjelennek az első myelinizált axonok a corpus callosum (CC) mediális részén, a cinguláris kéregben (CiC) és a cingulumban (Ci), szemben a PACAP-deficiens egérrel (C), ahol már mindhárom régióban erős denzitás figyelhető meg. E-F: A PACAP-deficiens (E) egérben gyenge MBP-immunreaktivitás észlelhető az Ammon-szarv lacunosum-moleculare (l-m), radiatum és piramisajt rétegeiben, közepes az alveusban (a) és erős a fimbria fornixban (f). Ezzel szemben vad-típusú (F) állatban a fimbria fornixban (f), valamint a fimbria fornix és alveus határán (nyílak) közepes az MBP-immunreaktivitás. Más területen nincs MBP-pozitivitás. Továbbá kisebb MBP-immunreaktivitás figyelhető meg vad-típusban (F) a corpus callosum (CC) mediális részén (nyílhegyek), mint PACAP-deficiens egérben. G-H: PACAP-deficiens egérben (G) a myelinizált axonok elérik az érzőkéreg (SS) III-IV. rétegét, míg vad-típusban (H) csupán a V-VI. rétegig érnek. I-J: A motoros (M) kéregben mindkét csoportban a V-VI. rétegig érnek a myelinizált axonok, de PACAP-deficiens egérben (I) több axon látható, mint vad-típusban (J). A skála: A, B képen 500 µm, C, D képen 100 µm, 200 µm az E, F, 100 µm a G-H képen.

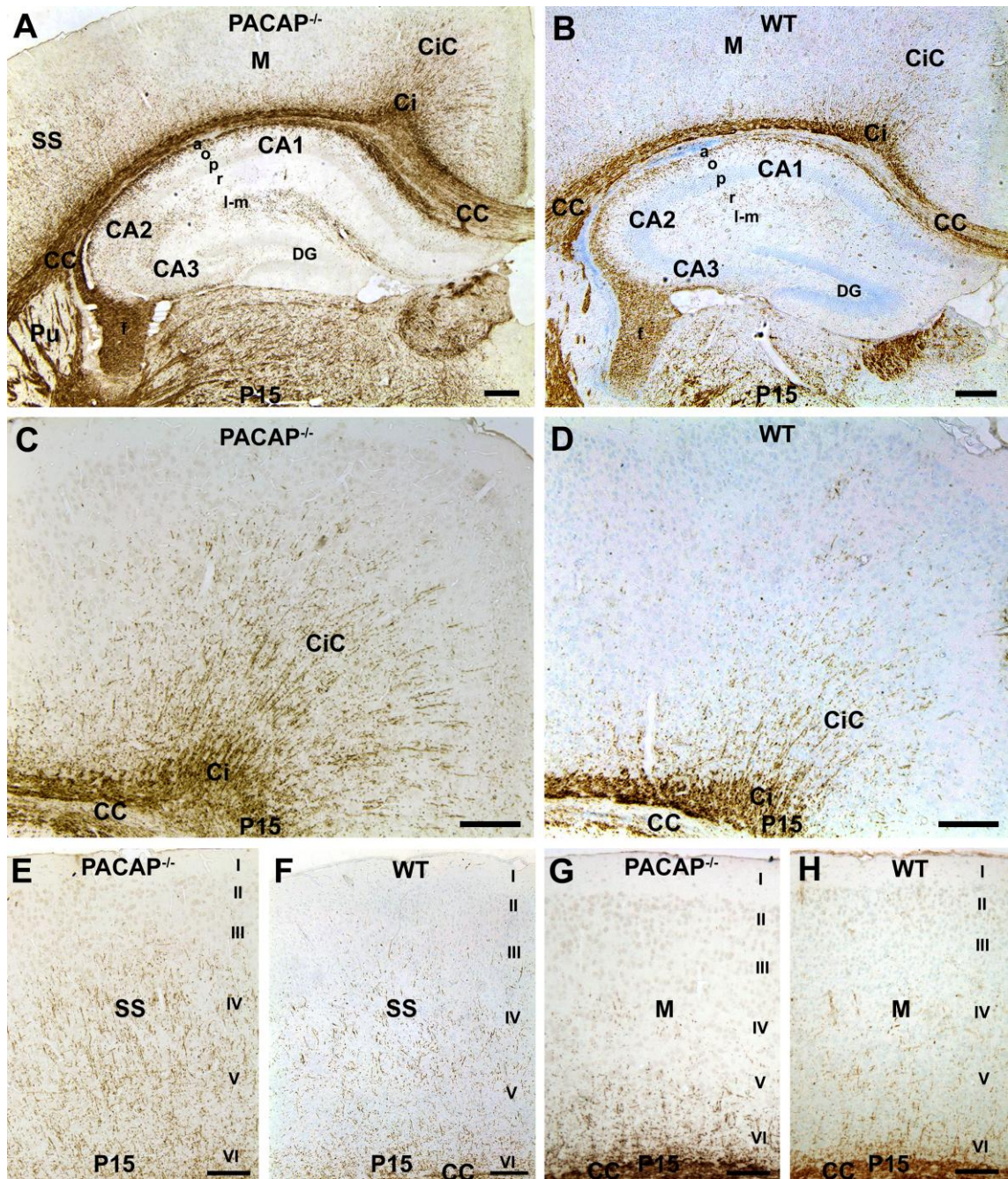
Myelinizáció a születés utáni 15. napon

A teljes corpus callosum (20. ábra A, B) mind a PACAP-deficiens, mind a vad-típusú csoportban myelinizált, de a vad típusú egerekben kevesebb MBP-immunpozitív axont láttunk. Míg a corpus callosum ventro-laterális részén nagyszámú myelinizált axont figyeltünk meg, a dorso-mediális részen ennél kevesebb MBP-immunreaktív axont észleltünk mindkét csoportban (20. ábra A, B).

A kérgi régiókban PACAP-deficiens és vad-típusú egerekben egyaránt sok myelinizált axon található ebben az időpontban, különösen a cingulumban (20. ábra C, D), a cinguláris (20. ábra C, D), az érző (20. ábra E, F), a motoros (20. ábra G, H) és az entorhinális kéregben. Minden fenti régióban nagyobb volt az MBP-immunreaktív axonok denzitása a PACAP-deficiens egerekben, mint a vad típusban. Emellett PACAP-deficiens egerekben a myelinizált axonok felületesebb idegsejt réteig érnek, mint a vad típusban. PACAP-deficiens egerek cinguláris kérgében (20. ábra C) az MBP-immunreaktív axonok elérik a III. idegsejt réteget, míg a vad típusban a III-IV. réteig érnek, és számuk jóval kevesebb (20. ábra D). A PACAP-deficiens egerekben és a vad-típusban is az érzőkéregben a myelinizált axonok a III-IV. idegsejt rétegben megtalálhatóak (20. ábra E-F), de a vad típusban számuk alacsonyabb. Továbbá, a motoros kéregben PACAP-deficiens egerekben és a vad-típusban (20. ábra G-H) a IV-V. idegsejt rétegben is láttunk myelinizált axonokat, de vad típusban kevesebbet (20. ábra H).

A fimbria fornicisban (20. ábra A-B) és az alveusban erős, a felnőttre jellemző MBP-immunfestést láttunk a PACAP-deficiens állatokban, a vad típusban viszont közepes erősségű immunreakciót figyeltünk meg. A PACAP-deficiens egerekben (20. ábra A) számos MBP-immunreaktív axon volt a CA3 régió stratum lacunosum-moleculare-ban, a stratum radiatumban, valamint a piramissejt rétegben, és közepes MBP-immundenzitást láttunk a CA1 régió stratum oriensében. A vad típusban kevés axon volt megfigyelhető a CA1 régió stratum radiatumban, a piramissejt rétegben és gyrus dentatus egyes rétegeiben (20. ábra B).

Vad típusban a pedunculus cerebri és a capsula interna myelinizációja közepesen erős denzitást mutatott, PACAP-deficiens egerekben a felnőttre jellemző mértéket figyeltünk meg.



20. ábra

MBP-immunreaktivitás 15 napos (P15) PACAP-deficiens (PACAP^{-/-}) és vad-típusú (WT) egérben. A-B: A vad-típusú (B) állatban az Ammon-szarv lacunosum-moleculare (l-m) rétegében és az alveusban (a) megjelenik az MBP-immunreaktivitás, de az immunreaktivitás denzitása még mindig elmarad a PACAP-deficiens (A) egérben látottakhoz képest, ahogyan a fimbria fornixban (f) és a corpus callosumban (CC) is. C-D: A cingulumban (Ci) a myelinizált axonok denzitása a vad-típusú (D) egérben kisebb, mint az azonos korú PACAP-deficiensben (C). Ezzel szemben a cinguláris kéregben (CiC) a myelinizált axonok felületesebb kortikális rétegekben is megtalálhatók, és az agykéreg szignifikánsan több axont tartalmaz a PACAP-deficiens (C) állatban, mint a vad-típusú (D) egérben. E-F: Az érzőkéregben (SS) a myelinizált axonok mindkét csoportban a III-IV. idegsejtrétegben láthatók, viszont a PACAP-deficiens (E) csoportban több axon van, mint vad-típusban (F). G-H: A motoros kéregben (M) a myelinizált axonok mindkét csoportban elérik a IV-VI. idegsejt réteget, viszont a vad-típusban (G) kevesebb MBP-immunreaktív axon van, mint a PACAP-deficiens egérben (H). A skála: 200 μ m az A, B, 100 μ m a C-H képen.

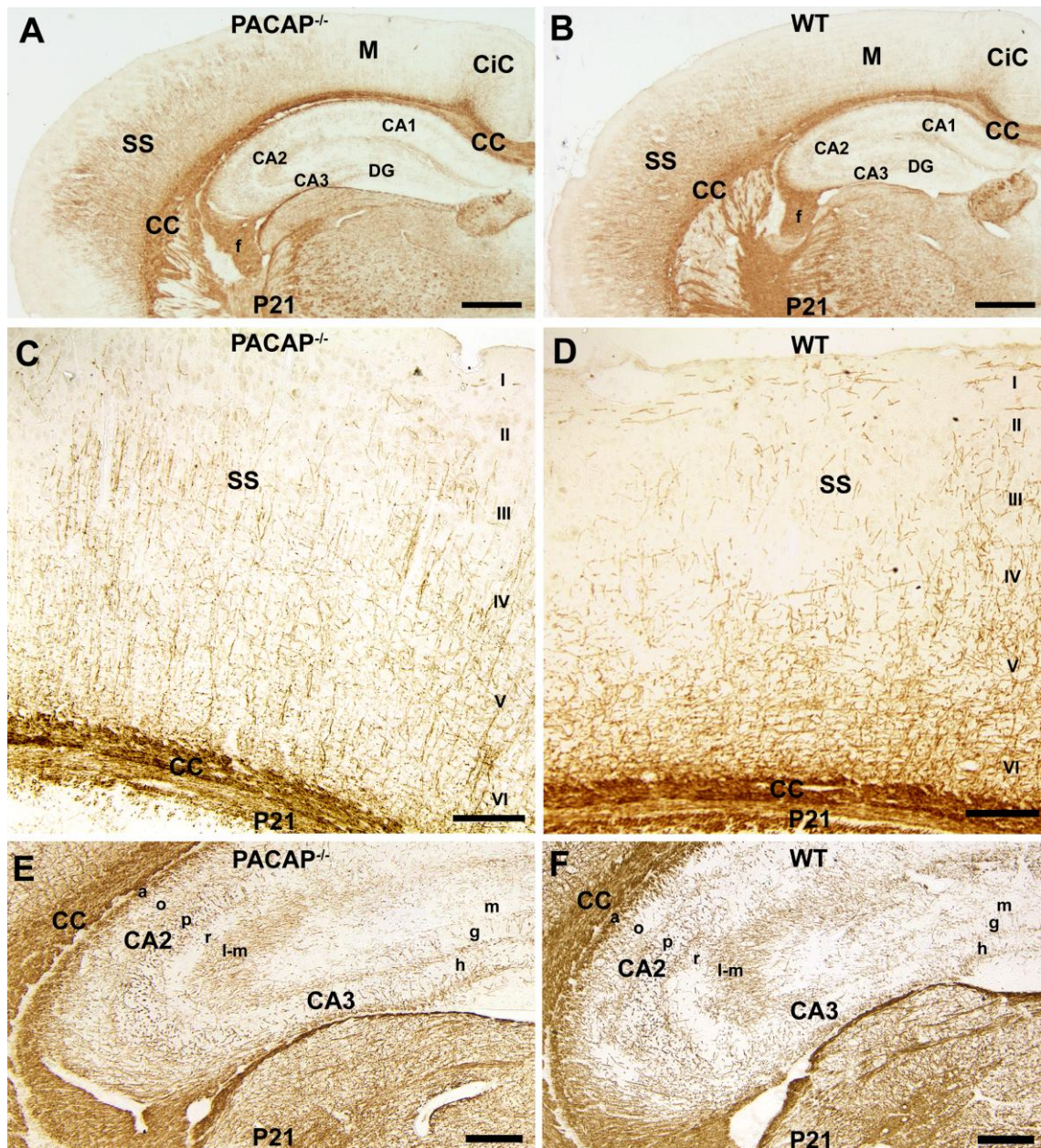
Myelinizáció a születés utáni 21. napon

PACAP-deficiens egerekben a myelinizáció a felnőttre jellemző mértékű volt a teljes corpus callosumban (21. ábra A). A corpus callosum ventro-laterális részén már a felnőttre jellemző mértékű myelinizációt láttunk a vad típusú egerekben is, a dorso-mediális részén viszont kevesebb MBP-immunreaktív axont figyeltünk meg vad típusban, mint PACAP-deficiens állatokban (21. ábra A, B). Továbbá, a mamillothalamikus pályában felnőttre jellemző mértékű myelinizációt láttunk mindkét csoportban.

A PACAP-deficiens egerekben több MBP-immunpozitív axon volt a kérgi rétegekben, mint a vad típusban, de az immunfestett axonok azonos idegsejt rétegekben voltak megtalálhatóak. A cinguláris cortexben a II-VI., az érzőkéregben a II-VI. (21. ábra C-D), a motoros kéregben a III-VI. idegsejt rétegben voltak láthatóak az MBP-immunfestett axonok. PACAP-deficiens egerekben nagyszámú myelinizált axont láttunk az entorhinális kéregben, szemben a vad típussal, ahol kevesebb axont figyeltünk meg ezen a kéregterületen.

A hippocampusban, mind az Ammon-szarv, mind a gyrus dentatus egyes rétegeiben több MBP-immunreaktív axont figyeltünk meg a PACAP-deficiens egerekben, mint a vad típusban, de a különbség nem volt olyan jelentős, mint a korábbi időpontokban (21. ábra E-F). Mindkét csoportban csak kevés myelinizált axont láttunk a gyrus dentatus molekuláris rétegében.

A pendunculus cerebriben és a capsula internában már a felnőttre jellemző mértékű myelinizációt láttunk mindkét csoportban.



21. ábra

MBP-immunreaktivitás 21 napos (P21) PACAP-deficiens (PACAP^{-/-}) és vad-típusú (WT) egérben. A-B: A kis nagyítású képen a corpus callosum (CC), fimbria fornix (f), putamen (Pu) és a különböző kérgi régiók MBP-immunreaktivitása látszik. A corpus callosum (CC) dorso-mediális részén gyengébb MBP-immunreaktivitás látható a vad-típusú (B) állatban, mint a PACAP-deficiens (A) egérben. C-D: A corpus callosum (CC) érzőkéreg (SS) alatti ventro-laterális részén mindkét csoportban hasonlóan erős, a felnőtt állatokra jellemző MBP-festődés figyelhető meg. Az érzőkéregben (SS) a myelinizált axonok mindkét csoportban eléri a II-III. réteget, viszont a vad-típusú (D) csoportban kisebb a myelinizált axonok denzitása, mint a PACAP-deficiens (C) egérben. E-F: Mindkét csoportban felnőtt állatokra jellemző, erős MBP-festődés látható a fimbria fornixban (f), alveusban (a) és a corpus callosum (CC) ventro-laterális részén. A hippocampusban mindkét csoportban már myelinizált az oriens (o), a piramisisejt réteg (p), a stratum radiatum (r), a molekuláris (m) és a granuláris (g) rétegek, valamint a hilus (h). A hippocampus rétegeinek MBP-immunreaktivitása intenzívebb a PACAP-deficiens egérben (E), mint vad-típusban (F). A skála: A-B képen 500 μ m, C-D képen 100 μ m, E,F képen 200 μ m.

Myelinizáció a születés utáni 28. napon

A corpus callosum mindkét csoportban teljesen myelinizált, kivéve a vad típusban, ahol még a corpus callosum dorso-mediális része kevésbé myelinizált, mint a PACAP-deficiens állatokban (22. ábra A, B).

Habár a myelinizált axonok száma kevesebb volt a vad típusban, mint a PACAP-deficiens állatokban, a myelinizált axonok mindkét csoportban ugyanaddig az idegsejt rétegig érnek a cinguláris, motoros és az érzőkéregben, ami megegyezik a születés utáni 21. napon megfigyelttel. Az entorhinális kéregben viszont mindkét csoportban nagyobb volt a myelinizált axonok száma, mint a 21. napon. Továbbá, a fenti rétegben kevesebb MBP-immunreaktív axont láttunk a vad típusban, mint a PACAP-deficiens csoportban.

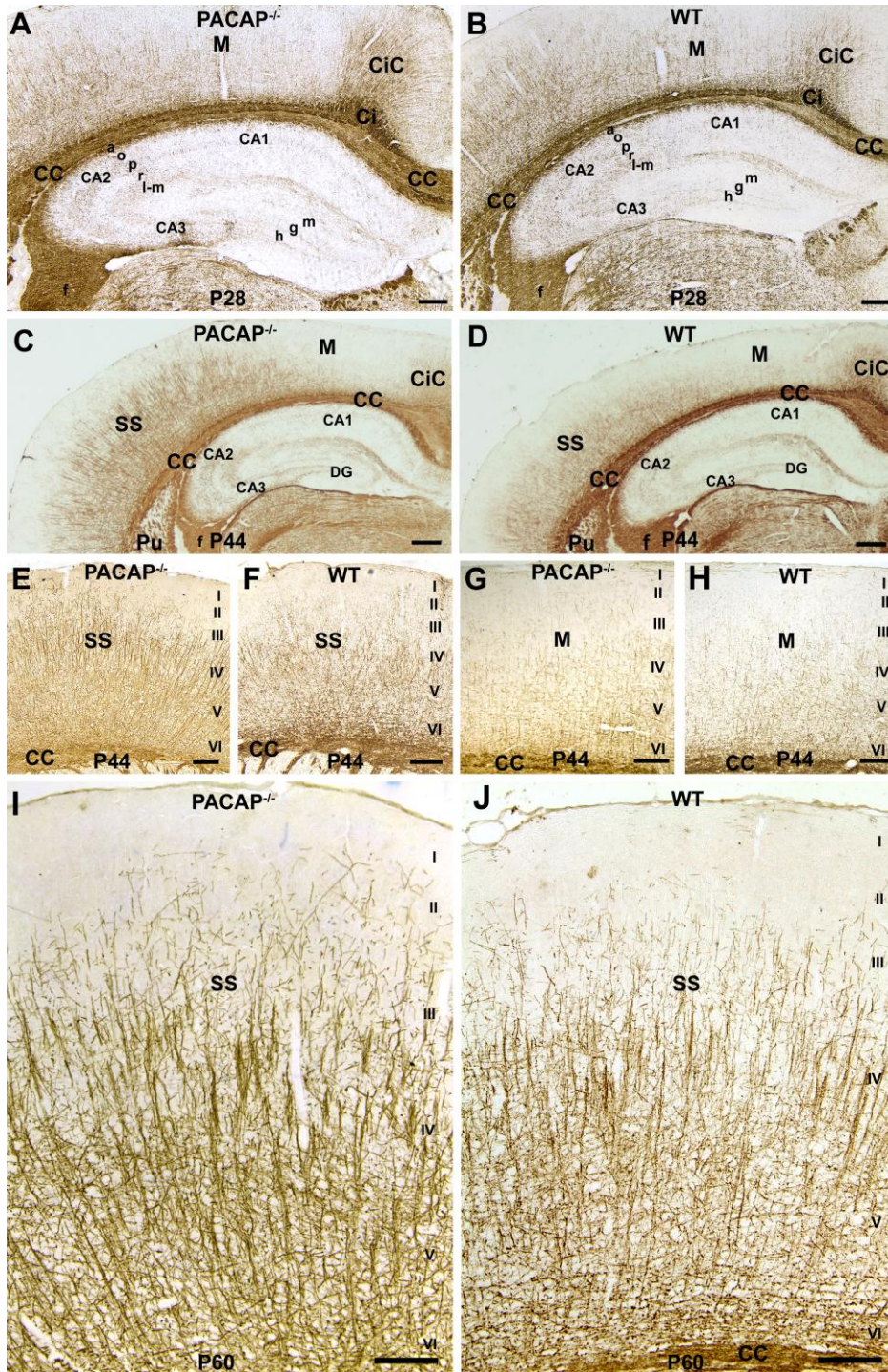
Ezen felül a gyrus dentatus hilusának és az Ammon-szarv lacunosum-moleculare rétegnek az MBP-immunreaktivitása hasonló volt a két csoportban (22. ábra A, B).

Myelinizáció a születés utáni 44. napon

A corpus callosum hasonlóan myelinizált a PACAP-deficiens és a vad-típusú csoportban, mint a 28 napon (22. ábra C, D).

Az MBP-immunreaktív axonok sűrűsége is hasonló, mint a 28. napon, kivéve a motoros kérget, ahol már a felnőttre jellemző denzitást láttunk mindkét csoportban (22. ábra G,H). Több myelinizált axont figyeltünk meg PACAP-deficiens egerekben a cinguláris, entorhinális és az érzőkéregben (22. ábra E, F), mint a vad típusban.

Nem láttunk számottevő különbséget a hippocampus legtöbb rétegének a myelinizációja között, kivéve a strata orientis és radiatumot, ahol több myelinizált axont figyeltünk meg a PACAP-deficiens egerekben, mint a vad típusban.



22. ábra

MBP-immunreaktivitás 28 (P28, A, B), 44 (P44, C-H), valamint 60 (P60, I, J) napos PACAP-deficiens (PACAP^{-/-}) és vad-típusú (WT) egérben. A-B: 28 napos korban a cinguláris kéreg (CiC), az érzőkéreg (SS) és a corpus callosum (CC) dorso-mediális részén még mindig kevesebb myelinizált axon látható a vad-típusú (B) egérben, mint a PACAP-deficiens állatban (A). Felöttre jellemző, erős MBP-immunreaktivitást látunk a motoros kéregben és a hippocampus egyes rétegeiben. C, D: MBP-immunreaktivitás 44 napos korban az érző- (SS), motoros- (M), cinguláris (CiC) kéregben, a corpus callosumban (CC), a fimbria fornicisban (f), a hippocampusban, a putamenben (Pu) vad-típusú (D) egérben és PACAP-deficiens (C) állatban. E-F: Az érzőkéregben (SS) több MBP-immunreaktív axon látható a PACAP-deficiens (E) egérben, mint a vad-típusban (F). G-H: Mindkét csoportban felnőttre jellemző MBP-immunreaktivitást látunk a motoros kéregben (M). I-J: 60 napos állatban már csak a érzőkéregben (SS) van észrevehető különbség, mivel a PACAP-deficiens (I) egérben sűrűbb myelinizált axonhálózat látható, mint a vad-típusú (J) egérben. A skála: 200 μ m az A, B, E-H, 300 μ m a C, D, 100 μ m az I, J képen.

Myelinizáció a születés utáni 60. napon

Mindkét csoportban a felnőttre jellemző mértékű myelinizációt láttunk minden megvizsgált területen. Nem volt különbség a MBP-immunreakció denzitásában sem a két csoportban. Ez alól csak az érzőkéreg kivétel (22. ábra I, J), ahol a vad típusú egerekben még mindig kevesebb myelinizált axont láttunk, mint a PACAP-deficiens állatokban.

Myelinizáció vizsgálata LFB festéssel

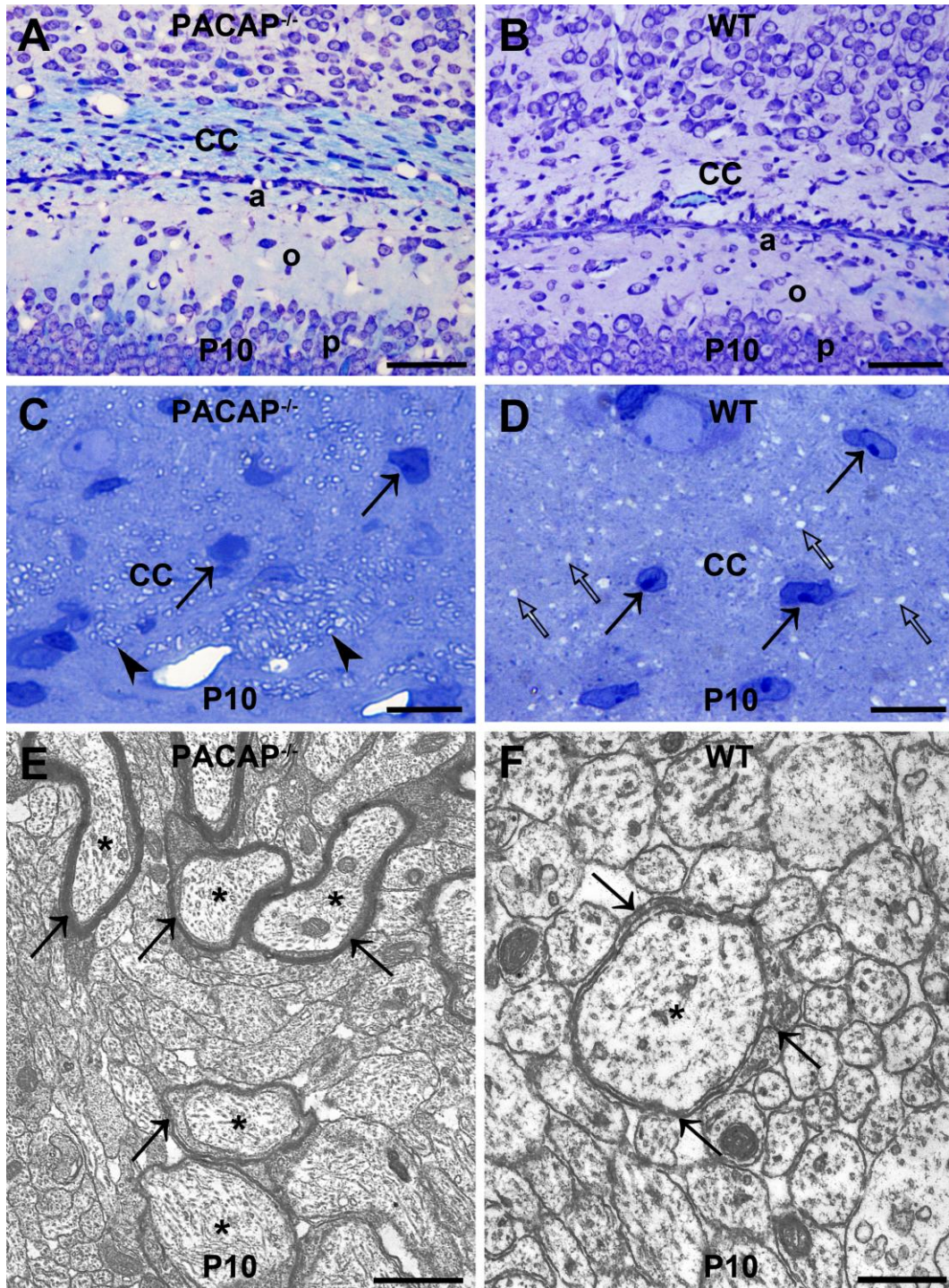
MBP-immunhisztokémia segítségével, azonos életkorban, a PACAP-deficiens csoportban intenzívebb reakciót láttunk a vad-típusú csoportnál. A fenti eredmény azt jelenti, hogy azonos életkorokat vizsgálva, a PACAP-deficiens csoportban mennyiségileg több MBP található, mint a vad-típusban. Annak érdekében, hogy igazoljuk azt, hogy azonos életkorokban, nem csupán az MBP mennyisége nagyobb a PACAP-deficiens állatokban, mint a vad-típusban, hanem több myelin is található bennük, LFB festést is végeztünk a születés utáni 10, illetve 15 napos korban, amikor a két csoport közötti különbség a legintenzívebb volt a corpus callosumban

A corpus callosumban, mind a születés utáni 10 (23. ábra A, B), mind a 15 napos egerekben intenzívebb myelin festődést láttunk a PACAP-deficiens egerekben, mint vad-típusban.

Myelinizáció vizsgálata elektronmikroszkóp segítségével

A PACAP-deficiens és vad-típusú állatok közötti myelinizációs különbségek további igazolására 10 napos állatokat dolgoztunk fel elektronmikroszkópos vizsgálatokra. A corpus callosum félvékony metszetein nem láttunk myelinizált axonokat a vad-típusú állatokban, szemben a PACAP-deficiens állatokkal, ahol számos, vékony, myelinizált axont figyeltünk meg (23. ábra C, D).

Hasonlóan a korábbi fejezetben találtakkal, 10 napos vad-típusú egerek corpus callosumában, a döntően nem myelinizált axonok mellett, néhány axont körülvevett az OLG sejtek nyúlványa, mely a myelinizáció egyik korai elektronmikroszkópos jele (23. ábra F). A OLG nyúlvánnyal körülvevett axonok átmérője nagyobb volt a nem myelinizált axonokénál. Ezzel szemben a PACAP-deficiens egerekben számos, nagy átmérővel rendelkező, myelinizált axon volt a kisebb, nem myelinizált axonok közt (23. ábra E).



23. ábra

Luxol Fast Blue- (LFB, A, B), toluidin-kék festéssel (félvékony metszetek, C, D), valamint elektronmikroszkópos (E, F) módszerrel kimutatott myelinizáció 10 napos (P10) egér corpus callosumában (CC) PACAP-deficiens és vad-típusú (WT) állatban. A: LFB festéssel erőteljes reakciót látunk a PACAP-deficiens egér corpus callosumában (CC). Nincs észlelhető festődés az Ammon-szarvban az alveusban (a), a stratum oriensben (o) és a kéregben. B: Vad-típusban nem figyelhető meg myelin festődés a corpus callosumban (CC), az alveusban (a), stratum oriensben (o) és a kéregben. C: PACAP-deficiens egérben jól látszanak a toluidin-kék festéssel a myelinizált axonok (nyílhegyek) és OLG sejtek (nyilak) a corpus callosumban (CC). D: Vad-típusú állat corpus callosumában (CC) az axonok nem myelinizáltak (üres nyilak). A nyilak az OLG sejteket jelölik. E: Elektronmikroszkóp segítségével számos myelinizált axon (csillagok) látható a PACAP-deficiens egér corpus callosumában (CC). A nyilak a myelinhüvelyt jelölik. F: Vad-típusú egér corpus callosumában (CC), számos myelinborítással nem rendelkező axon mellett, látható egy axon (csillag), melyet egy OLG sejt nyúlványa (nyilak) vesz körül. A skála 50 μ m az A, B, 10 μ m az C, D, 1 μ m az E, 400 nm az F képen.

AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

1. Myelinizáció vizsgálata C57BL/6-os törzsbe tartozó egérben

Vizsgálataink során a myelinizáció összehasonlító vizsgálatára egy hagyományos myelinfestést, az LFB festést (Klüver és Barrera, 1953), a myelin és OLG sejtek kimutatását lehetővé tevő MBP-immunhisztokémiát és az elektronmikroszkópos feldolgozást választottuk.

Kimutattuk, hogy a születés utáni fejlődés során az MBP-immunhisztokémiával kapott fénymikroszkópos eredmények jól korrelálnak az elektronmikroszkópban látható eredményekkel. MBP-immunfestéssel az OLG sejtek és nyúlványaik már néhány nappal a myelinhüvely kialakítása előtt immunreaktívak. Korábbi tanulmányokban leírták, hogy az éretlen OLG sejtek nagyobb átmérővel rendelkeznek, mint az érettek (Mori és Leblond, 1970, Sturrock, 1980). Mivel a születés utáni 3-10. napon az OLG sejtek átmérője nagyobb volt, mint a későbbi időpontokban, eredményeink egyeznek a korábbi eredményekkel. A sejtek mérete alapján a 12-13,3 μm átlagos átmérővel rendelkező MBP-immunreaktív OLG sejtek az elektronmikroszkóppal megfigyelhető, úgynevezett *intermedier* sejteknek felelnek meg (Mori és Leblond, 1970).

A fenti szerzők feltételezik, hogy ezek az *intermedier* OLG sejtek már képesek myelinhüvelyt képezni az axonok körül. Eredményeink alapján mi is egyetértünk ezzel a feltételezéssel, hiszen ezek a sejtek már aktívan termelik az MBP-t, valamint valószínűleg más myelin fehérjéket is. Az OLG sejtek nyúlványrendszere az érésük során egyre kiterjedtebbé válik, amit MBP-immunhisztokémiával is megfigyeltünk. Amikor egy OLG sejt nyúlványa elér egy axont és körülveszi egy vékony myelinhüvellyel, az egyes axonok láthatóvá válnak MBP-immunhisztokémiával. Az ilyen axonok megjelenése MBP-immunfestett metszeteken szorosán korrelál a myelinizáció azon kezdeti jeleivel, melyket elektronmikroszkópban láttunk. Ilyen kezdeti jel volt például, ahogy az OLG sejt néhány myelin lamellával lazán körülveszi az axont. Következésképpen elmondhatjuk, hogy mivel az MBP-immunhisztokémia képes láthatóvá tenni olyan axonokat, melyek csupán 2-3 myelin lamellával borítottak, a módszer igen érzékeny és megfelelő eszköze a korai myelinizáció tanulmányozásának.

Az érzékeny MBP-immunhisztokémiával szemben LFB festéssel csak akkor láttunk myelin festődést, amikor már nagyobb számú myelinizált axon számos lamellával rendelkezett egy adott területen. Következésképpen, más tanulmányokkal

összhangban mi is azt találtuk, hogy az LFB festés később jelzi a myelin megjelenését, mint az MBP-immunfestés (Hasegawa és mtsai, 1992).

Mindhárom módszerrel különbség mutatkozott egyes agyi területek myelinizációja között. A corpus callosumban az első OLG sejtek és myelinizált axonok az érzőkéreg alatt jelentek meg, melyet a cingulum myelinizációja követett. Eredményeink összhangban vannak az emberi idegrendszer myelinizációjára felállított, Kinney és munkatársai (1988) közleményében megfogalmazott általános szabályokkal is, miszerint az érzőpályák a motoros pályák előtt myelinizálódnak, mely utóbbiak megelőzik az asszociációs pályák myelinizációját. Emellett megfigyeltük azt is, hogy a limbikus rendszer asszociációs pályái (fimbria fornicis, cingulum) korábban myelinizálódnak, mint a neocortex asszociációs pályái.

A struktúra érése és a myelinizáció folyamata közötti összefüggés megfigyelhető a neocortexben, ahol a myelinizáció kialakulása követi a radiális glia mentén vándorló sejtek *inside-out* vándorlási, majd érési mintázatát. A neocortexben ugyanis az V-VI. rétegben hamarabb differenciálódnak a neuronok, mint a felületesebb rétegekben (Rakic, 1978), és a myelinizáció folyamata is hasonló mintázatot követ.

Érdekes módon, az első MBP-immunreaktív OLG sejtek, következésképpen az első myelinizált axonok is az érzőkéreg alatti corpus callosumban jelentek meg, és csak nagyon kevés volt a kéreg VI. rétegében. Továbbá, egyik myelinizált axon sem volt az idegsejtek közvetlen közelében a myelinizáció kezdetén, és a többi kérgi rétegekben sem figyeltünk meg MBP-immunreaktivitást. Ezen megfigyeléseink alapján arra következtetünk, hogy egy axon azon szakasza, mely legelőször myelinizálódik, valahol az axon kezdeti és terminális része között lehet.

Korábbi tanulmányokban leírták, hogy egy OLG sejt szelektíven csak azokat az axonokat myelinizálja, melyek 0,2 μm -nél nagyobb átmérővel rendelkeznek (Moore és mtsai, 1976). Mi is azt találtuk, hogy azon axonok, melyek fizikai kontaktusba kerültek az OLG sejtek nyúlványaival, 0,5-0,8 μm -es átmérővel rendelkeztek. A kisebb átmérőjű axonok nem kerültek kapcsolatba az OLG sejt nyúlványával. Sturrock (1975, 1980) tanulmányaival összhangban mi is azt figyeltük meg, hogy a myelinizált axonok átmérője nagyobb volt, mint a nem myelinizáltaké, és az első myelin lemez létrejötte után az axon átmérője nagy ütemben növekedni kezdett. Ezen megfigyelés alapján valószínűsíthető, hogy az OLG sejtek és a myelin képes stimulálni a neuronok fejlődését, érését és növekedését. A PLP-, vagy a 2',3'-ciklikus nukleotid foszfodiészteráz-mutáns egerekben axonális duzzanatok (*spheroids*) és degenerált

axonokat figyeltek meg. Ez a fentiek mellett szintén arra utal, hogy a myelin felépítésében fontos fehérjék elengedhetetlenek az axon túléléséhez és növekedéséhez (Edgar és mtsai, 2004, Griffiths és mtsai, 1998, Lappe-Siefke és mtsai, 2003).

A fénymikroszkópos MBP-immunhisztokémiát, valamint az elektronmikroszkópos módszert összehasonlítva arra a következtetésre jutottunk, hogy mindkét módszer önmagában, vagy kombinációban is megfelelő és érzékeny módszer a myelinizáció folyamatának vizsgálatára mind állati, mind emberi mintákon. Mindkét módszer pontosan leírja az első OLG sejtek, valamint myelinizált axonok megjelenését a központi idegrendszerben születés előtt és után is. Módszereink kiválóan alkalmasak lehetnek más kísérletes állatmodellben is, melyben tanulmányozni lehet a myelinizáció, demyelinizáció, remyelinizáció folyamatát, valamint esetleg gyógyszerként alkalmazható kémiai anyagok hatását a fenti folyamatokra.

2. Myelinizáció vizsgálata PACAP-deficiens egérben

Vizsgálataink során az OLG sejteket, valamint a myelin kimutatását célzó MBP-immunhisztokémiát alkalmaztuk különböző fejlődési stádiumokban, melynek segítségével markáns jelölődési különbséget láttunk a PACAP-deficiens állatok és a vad-típusú egerek közt. A PACAP-deficiens egerekben jelentősen korábban kezdődött a myelinizáció folyamata az egyes régiókban, mint a vad-típusban, valamint az azonos korú egerek azonos agyi régióiban számottevően nagyobb MBP-immunreaktivitást figyeltünk meg a PACAP-deficiens egerekben.

Az immunhisztokémia önmagában viszont csak az MBP jelenlétéről ad információt, ezért abban az életkorban, amikor már MBP-immunhisztokémiával is számottevő myelinizált axont, valamint jelentős különbséget láttunk a két csoport myelinizációja között, más, szintén a myelin kimutatását célzó módszert is alkalmaztunk. LFB festéssel, mely sav-bázis reakció segítségével egyes lipoproteinekhez kötődik a myelinben, szintén erősebb myelinizációt láttunk a PACAP-deficiens egerekben, mint vad-típusban, hasonlóan az MBP-immunhisztokémiával leírt eredményünkhöz. A fenti különbséget félvékony metszeteken elvégzett toluidin-kék festés, valamint az elektronmikroszkópia is megerősítette. Bizonyítottuk tehát, hogy az endogén PACAP nem csupán az MBP mennyiségét csökkenti a myelinben, hanem gátolja a myelinizációt a normális agyfejlődés során.

A PACAP-deficiens egerek életképesek, viszont testméretük kisebb a vad típusúakénál, és 3 hetes korig 50%-os a halálozási arányuk (Hashimoto és mtsai, 2001). Rosszabbul teljesítenek motoros funkciót leíró viselkedési teszteken. Emellett megfigyeltek különféle viselkedési és fájdalomérzés-zavarokat is (Sándor és mtsai, 2010). Az idegsejtek morfológiáját, illetve elrendeződését illetően nem találtunk jelentős eltéréseket a PACAP-deficiens egerek idegrendszerében, amint már korábban is leírták (Ogawa és mtsai, 2005). Ezért a PACAP-deficiens egerekben megfigyelt motoros és viselkedési eltérések valószínűleg nem a csökkent idegsejtosztódás és abnormális idegsejtvándorlás következménye hanem egy szerotoninmetabolit, az 5-hydroxi-indolecetsav alacsonyabb szintje a striatumban és a kéregben (Hashimoto és mtsai, 2001).

A legelső MBP-immunreaktív OLG sejteket mindkét csoportban a születés utáni 3. napon láttuk, hasonlóan a korábbi fejezetben leírtakhoz. A születés utáni 5. napon a PACAP-deficiens állatok corpus callosumában kevesebb OLG sejtet figyeltünk meg, mint a vad-típusú egerekben, ami összhangban van egy korábbi, *in vitro* tanulmányban leírtakkal a PACAP OLG sejtekre kifejtett proliferatív hatását illetően (Lee és mtsai, 2001). A különbség a két csoport között viszont nem volt egyértelmű minden régióban. Ennek az oka valószínűleg a VIP VAPC1, illetve a VPAC2 receptorokon keresztüli gátló hatása az OLG progenitor sejtekre (Lelievre és mtsai, 2006).

Az első myelinizált axonok a capsula internában és a mamillothalamikus pályában jelentek meg mindkét csoportban, habár a vad-típusú állatokban kevesebb és rövidebb myelinizált axont figyeltünk meg, mint PACAP-deficiens egerekben. A myelinizáció mindkét csoportban követte a vad-típusú egerekben látott myelinizációs mintázatot, tehát a szenzoros idegpályák a motoros pályák előtt myelinizálódtak, és a legkésőbb myelinizálódó pályák az asszociációs pályák voltak, mely mintázatot már korábban más szerzők is leírták (Kinney és mtsai, 1994). A corpus callosumban, már korábban is megfigyelt (Looney és Elberger, 1986), rostro-caudális myelinizációt láttunk mindkét csoportban. Az agykéregben a myelinizáció folyamata mindkét csoportban követte az idegsejtek, már ismert, *inside-out* fejlődési mintázatát (Rakic 1978), miszerint először a VI. réteg idegsejtjeinek axonja myelinizálódik, melyeket rendre követtek a felületesebb rétegek. Továbbá nem láttunk különbséget a myelinizált axonok elhelyezkedésében a két csoport között. Ezen megfigyeléseink arra utalnak, hogy a PACAP-deficiens egerekben a myelinizált afferens és efferens pályák, valamint az egyes agyterületeket összekötő kapcsolatok a normálisnak megfelelően fejlődnek.

Eredményeink, hasonlóképpen mint Lee és munkatársai (2001) korábbi *in vitro* eredményei, arra mutatnak, hogy a PACAP *in vivo* is gátolja az OLG sejtek érését, következésképpen a myelinizáció kezdete és befejezésének ideje is kitolódik a polipeptid hatására. Kimutattuk, hogy PACAP-deficiens egerekben minden vizsgált régióban hamarabb kezdődik a myelinizáció, mint a hasonló korú vad-típusú állatokban, tehát a normális fejlődés során a PACAP gátló hatást fejt ki a myelinizációra. A corpus callosum vastagabb volt a PACAP-deficiens egerekben, mint a vad-típusban. Ismert, hogy a myelinizált axonok vastagabbak a nem myelinizált axonoknál. A myelinizáció kezdete előtt a corpus callosum vékony axonokat tartalmaz, mely átmérők viszont folyamatosan nőnek a myelinizált axonokban (Moore és mtsai, 1976, Sturrock 1975, 1980). A PACAP-deficiens egerekben tapasztalt, a vad-típusnál gyorsabb myelinizáció intenzívebb növekedésre készíteti az axonokat, mely vastagabb corpus callosumot eredményez. A két csoport közti, a corpus callosum vastagságában megfigyelhető különbség viszont eltűnik felnőtt állatokban.

Ismert, hogy a myelinhüvely egyes fehérjekomponensei gátolják a központi idegrendszerben a sérült axonok regenerációját (Bandtlow és mtsai, 1990, Schwab és Caroni, 1988). Ezért az axonok növekedésének és a neuronok közti szinaptikus kapcsolatok kiépülésének a myelinizáció előtt kell megtörténnie. Ismert, hogy a PACAP elősegíti az axonális és dendritikus növekedést, valamint a dendritfa fejlődését (Deutsch és Sun, 1992, Falluel-Morell és mtsai, 2005, Gonzalez és mtsai 1997). Logikus, hogy a PACAP fehérjének a myelinizáció kezdetét is késleltetnie kell ahhoz, hogy a fenti hatásait érvényesíteni tudja. A fentiekből az is következik, hogy a PACAP hiánya csökkenti az idegrendszer plaszticitását. Ezen csökkent plaszticitás a normális körülmények között nem okoz jelentősebb, az életet veszélyeztető problémát, ugyanis nem figyelhetők meg jelentős, az idegsejt morfológiáját, elrendeződését érintő, eltérések, és az állatok általános viselkedése sem szenved számottevő zavart. Különböző stresszállapotokban viszont a PACAP hiánya súlyos problémákat okoz. Például PACAP hiányában a kisagy szemcse-sejtjei sokkal érzékenyebbek az oxidatív károsodások iránt (Vaudry és mtsai, 2005), valamint a fokális agykérgi iszkémia által előidézett károsodás is kiterjedtebb (Ohtaki és mtsai, 2008). Továbbá a PACAP-deficiens egerekben zajló gyors myelinizáció -csökkentve az idegrendszer plaszticitását- lecsökkenti azt az időintervallumot, amely a fiatal állatok axonális kapcsolatainak átalakulásához szükséges a fejlődés során.

3. Myelinizáció az emberi hippocampusban

Eredményeink azt mutatják, hogy az emberi hippocampus myelinizációja előbb kezdődik, mint azt korábban leírták és a születés után is hosszan tartó folyamat. Emellett követi a hippocampus afferens, efferens pályáinak érését. Az első OLG sejteket és myelinizált axonokat a terhesség félidejében (20. hét) figyeltük meg a fimbria fornicisban. A fornix afferens és efferens axon kötegeket tartalmaz, melyek a hippocampust kötik össze a hypothalamikus és a bazális előagyi magvakkal. A fenti két agyi régió a legkorábban kifejlődő agyi struktúrákhoz tartozik, mivel már a 10. terhességi héten láthatóak (Bayer és Altmann, 2005), és valószínű, hogy axonjaik a legelső axonok, melyek elérik a hippocampust. Az ugyancsak a fornixban futó kolinerg axonok, melyek a septum magvaiból erednek és beidegzik a hippocampust, már a 11. terhességi héten azonosíthatóak (Kostović, 1986).

Korai myelinizációt figyeltünk meg az alveusban, ahova subcortikális afferensek futnak, a septum, locus coeruleus, raphe-magvak és az elülső thalamikus magvak felől (Amaral és Lavenex, 2007). Korábban már rágcsálókban megfigyelték a locus coeruleus-, a raphe-, valamint az elülső thalamikus magvak korai differenciációját és fejlődését, mely arra utal, hogy -hasonlóan a septum magvaihoz- a fenti agyi régiók, valamint kapcsolataik emberben is korán érnek (Bayer és Altmann, 1995). Továbbá, a korán fejlődő septalis afferensek és az amygdala bazális magjának axonjai az Ammon-szarv stratum oriensében végződnek, ahol a myelinizáció már az utolsó trimeszterben megkezdődik. A fenti agyi régiók axonjai nem csak a stratum oriensbe futnak, hanem a stratum radiatumba is (Amaral és Lavenex, 2007). Érdekes módon a stratum radiatum myelinizációja relatíve későn, a 3. születés utáni hónapban mutat kifejezett myelinizációt, mely alapján arra következtetünk, hogy egy axon myelinizációját a célsejtek fejlettségi szintje is befolyásolhatja. Az apikális és bazális dendritek nem egyformán fejlődnek emberben sem. A bazális dendritek, melyek a stratum oriensben vannak, fejlettsége jóval megelőzi a stratum radiatumban található apikális dendritekét az agykéregben és a hippocampusban egyaránt (Purpura, 1975, Seress, 2001).

Az Ammon-szarv lacunosum-moleculare rétegében már születés előtt megjelentek az első MBP-immunreaktív OLG sejtek, valamint axonok. Továbbá, az MBP-immunreaktív OLG sejtek és myelinizált axonok korábban jelentek meg a CA1 régió stratum lacunosum-moleculare-ban, mint a CA3 régió hasonló rétegében, és egészen 2 éves korig a CA1 régió stratum lacunosum-moleculare erősebb MBP-immunfestést mutatott. Ezen megfigyelésünk ellentmondásban áll azzal a ténnyel, hogy

a CA3 régió piramis sejtei a CA1 régió sejtjeinél korábban képződnek és érnek rágcásalókban és főemlősökben (Bayer és Altmann, 1974, Rakic és Nowakowski, 1981). A stratum lacunosum-moleculare legtöbb afferens axonja az entorhinális kéreg idegsejtjeiből ered, viszont kisebb számban a thalamus reuniens magja felől is érkező afferens axonok a CA1 régióba (Herkenham, 1978, Wouterlood és mtsai, 1990). Patkányban a thalamus reuniens magja már korán differenciálódik (Bayer és Altmann, 1995), ezért valószínű, hogy az innen származó axonok korán megjelennek a CA1 régió stratum lacunosum-moleculare-ban. A fentiek alapján arra következtetünk, hogy a stratum lacunosum-moleculare-ban a myelinizált axonok a thalamus reuniens magjából származó axonok, míg az entorhinális afferensek csak később myelinizálódnak.

A perforáns pálya, amellett, hogy az Ammon-szarv lacunosum-moleculare rétegében végződik, a szemcsesejtek dendritjein levő tüskéken is alakít ki szinapszisokat, melyek a gyrus dentatus stratum moleculare külső 2/3-ában találhatóak. Szemben az Ammon-szarv stratum lacunosum-moleculare korai myelinizációjával, a gyrus dentatus stratum moleculare-ban csak később jelennek meg az első myelinizált axonok. Korábbi tanulmányok alapján ismert, hogy a gyrus dentatus szemcsesejtei jelentősen később képződnek, mint az Ammon-szarv piramis sejtei (Seress és mtsai, 2001). Az Ammon-szarv ventrikuláris zónájában, ahol az Ammon-szarv sejtei keletkeznek a terhesség végén már nincsenek osztódó idegsejtek, viszont a gyrus dentatus szemcsesejtei még születés után is osztódnak és vándorolnak a hilus felől a szemcsesejt rétegbe (Seress és mtsai, 2001). Következésképpen a szemcsesejtek érése a perinatális időszakon túl is zajlik még. Golgi-impregnációval kimutatták, hogy a szemcsesejtek dendritikus érése döntően születés után zajlik, és jelentős különbségek láthatók a szemcsesejt réteg stratum moleculare felőli oldalán található, korábban érő sejtek és a szemcsesejt réteg hilus felőli oldalán található, később érő sejtek morfológiája között (Seress, 1992). Calbindin immunhisztokémiával a szemcsesejtek neurokémiaja hasonló fejlődési mintázatot mutat (Ábrahám és mtsai, 2009). A gyrus dentatuson belül különbség van, mert a dorsalis (a CA3 régió feletti szemcsesejtréteg) karban hamarabb jelennek meg a calbindin immunreaktív szemcsesejtek, mint a ventrális karban (alsó kar, amely a CA3 régió alá fut, Ábrahám és mtsai, 2009). A két kar közötti különbséget MBP-immunhisztokémiával is megfigyeltük. Ezen megfigyelésünk megerősíti azon feltételezésünket, miszerint az afferens axonok myelinizációja függ a célsejtek érettségi állapotától. Patkányban végzett kísérletek alapján leírták, hogy a perforáns pálya axonjai és az axonterminálisok már azelőtt jelen

vannak a molekuláris rétegben, mielőtt a szemcsesejtekkel szinapszist képezhetnének. Míg a szemcsesejtek dendritfája ki nem fejlődik, a perforáns pálya axonjai szinaptikus kapcsolatba kerülnek a reelin-termelő Cajal-Retzius sejtekkel, mely sejtek feladata a neuronok irányítása a fejlődés alatt (Ceranik és mtsai, 2000). Nincs közvetlen adatunk ugyan a Cajal-Retzius sejtekkel képzett ideiglenes szinapszisok funkcióját illetően, viszont ezek valószínűleg funkcionális kapcsolatok, mivel a neocortexben a Cajal-Retzius sejtek, melyek serkentő és gátló bemenetet is kapnak, a korai agykérgi hálózatok részét képezik (Radnikow és mtsai, 2002). Ez azt jelentheti, hogy a szinaptikus aktivitás önmagában nem elégséges a myelinizáció elindításához, hanem a szinapszisnak a megfelelő célsejttel kell létrejönnie.

A szemcsesejtek axonjai, melyek részben a hilusban és a CA3 régió stratum lucidumában végződnek, nem myelinizáltak. Továbbá, a hilusban található mohasejtek és a gátló interneuronok axonjai sem myelinizáltak. A hilusban levő myelinizált axonok a hippocampus fornixon keresztül belépő afferenseiből (septum, locus coeruleus, raphe-magvak) származnak (Amaral és Lavenex, 2007), és MBP-immunhisztokémiával laza, hálózatot alkotnak. Annak ellenére, hogy a fenti rétegek idegsejtjei korán differenciálódnak és érnek (Bayer és Altmann, 1995), az első myelinizált axonok csak viszonylag későn, születés után jelennek meg. A septum és a hippocampus közötti reciprok kapcsolat fontos szerepet játszik a hippocampus működésében. Kolinerg és GABAerg típusú septális afferens axonok is érkeznek a hippocampusba a mediális septumból (Amaral és Lavenex, 2007). Amíg a GABAerg axonok főként a gátló típusú idegsejteken végződnek és a hippocampus pacemaker aktivitásáért felelősek (Gulyás és mtsai, 1991), a kolinerg axonok egyaránt végződnek a gátló és a serkentő idegsejteken. Korábbi fény- és elektronmikroszkópos tanulmányokban leírták, hogy rágcsálókban a GABAerg axonok nagy átmérővel rendelkező, myelinizált axonok, a kolinerg axonok azonban vékonyak és nem myelinizáltak (Gärtner és mtsai, 2001a, b). A fentiek miatt a hilusban látott myelinizáció -a locus coeruleus és a raphe-magvak felől érkező afferensek mellett- a septo-hippocampalis pálya GABAerg komponenséről is szolgáltat információt. Bármely idegpályának -így a septo-hippocampalis pályának is- a felnőttre jellemző vezetési sebességének az eléréséhez megfelelő myelinizáció szükséges. A septo-hippocampalis pálya valószínűleg már születés előtt eléri a hilus rétegét, a myelinizáció viszont csak a születés utáni 3. hónapban jelenik meg, ezért több hónapos késés van az axonok megjelenése, a szinapszisok kialakítása, és a myelinizáció kezdete között.

A hilusban található mohasejteken, érésük során, összetett szinaptikus tüskék fejlődnek, melyek révén a szemcsesejtekkel szinaptizálnak. A szemcsesejtek fejlődése befolyásolja a célsejt fejlődésének ütemét is, ezért a szemcsesejtek és a mohasejtek fejlődése kölcsönös folyamat (Seress és Mrzljak, 1992, Ábrahám és mtsai, 2009). Ezért a mohasejtek elnyújtott érése is felelős lehet a hilus és a szemcsesejtek késői éréséért. A myelinizáció késői kezdete és folyamata a hilusban és a molekuláris rétegben arra utal, hogy a myelinizáció nem kizárólag az axon és a hozzá tartozó idegsejt fejlettségi állapotától függ, hanem fontos szerepet tölthet be az adott axon által beidegzett célsejt fejlettségi állapota is. A hilusban megfigyelhető késői myelinizáció, tekintve a septalis GABAerg afferentáció funkcionális jelentőségét, megmagyarázhatja a hippocampus-függő memória késő-óvodás, kora iskolás korra történő megjelenését.

Ismert, hogy az OLG sejtek és a myelin gátolja a neuronok axonjának növekedését és regenerációját (Bandtlow és mtsai, 1990, Schwab és Caroni, 1988). Éppen ezért a myelinizáció késői megjelenése a gyrus dentatusban, főleg a hilusban, időt biztosít a megfelelő szinaptikus kapcsolatok kiépüléséhez, ha szükséges, átépüléséhez a gyrus dentatus egyes idegsejtjei, valamint a sejtek és az afferens axonok között.

A felnőttre jellemző MBP-immunreakció, ami különböző időpontokban volt megfigyelhető Ammon-szarv egyes rétegeiben és a gyrus dentatusban, valószínűleg nem jelenti még a myelinizáció folyamatának a végét. Az MBP-immunfestés intenzitása fénymikroszkóposan elér egy maximális értéket, annak ellenére, hogy a myelin vastagsága tovább növekedhet. Ezért valószínű, hogy a myelinizáció tovább tart a hippocampusban a felnőttre jellemző MBP-immunfestés elérését követően. Ezt erősítik meg MRI tanulmányok is, melyekben leírták, hogy a hippocampus térfogata egészen felnőttkorig folyamatosan nő, aminek oka legfőképpen a myelinizáció lehet (Giedd és mtsai, 1996, Suzuki és mtsai, 2005).

4. Myelinizáció az emberi hippocampusban Down-szindrómában

Eredményeink arra utalnak, hogy az emberi hippocampus myelinizációja a kontrollhoz képest elmarad a Down-szindrómában szenvedőkben. Annak ellenére, hogy az OLG sejtek mindkét csoportban azonos időben jelentek meg, később a hippocampus minden rétegében kisebb mértékű myelinizációt figyeltünk meg Down-szindrómásokban, mint a kontrollban, ami legjelentősebb a születés utáni időszakban volt. Ennek ellenére az egyes rétegek mindkét csoportban hasonló myelinizációs

mintázatot követtek, ami arra enged következtetni, hogy Down-szindrómásokban a hippocampus afferens pályáinak a fejlődése követi a már korábban általunk és más szerzők által (Arnold és Trojanowski, 1996) is leírt mintázatot.

A Down-szindrómában szenvedők hippocampusának mérete

Minden életkorban kisebb volt a hippocampus Down-szindrómásokban, mint kontrollban. A legszembetűnőbb különbség a gyrus dentatusban, azon belül is a szemcsesejtrétegben volt. Korábbi tanulmányokban már leírták a teljes agy és a hippocampus mérsékelten kisebb méretét Down-szindrómában szenvedőknél (Golden és Hyman, 1994, Pearlson és mtsai, 1998, Raz és mtsai, 1995). Contestabile és mtsai (2010) adatai szerint a különbség oka a szemcsesejtek csökkent mértékű osztódása. Emellett a kérgi neuronokhoz hasonlóan, a hippocampalis sejtek csökkent axonális, illetve dendritikus fejlődése is szerepet játszhat a Down-szindrómában megfigyelt kisebb méretű hippocampus kialakulásában (Kaufmann és Moser, 2000, Purpura 1975). A Down-szindrómában megfigyelt csökkent myelin képzés, a fenti jelenségek mellett, a hippocampus méretének további csökkenéséhez vezethet.

A hippocampus myelinizációja Down-szindrómában

A hippocampus legnagyobb belső pályái közül a szemcsesejtek axonjai, a moharostok, nem myelinizáltak. A legelső OLG sejtek, a kontrollhoz hasonlóan Down-szindrómásokban is, a terhesség félidejében, 20 hetes korban jelentek meg a fimbria fornicisban. Mivel a fimbria fornicisban afferens és efferens axonok futnak, melyek összekötik a hippocampust a septum-, az agytörzs- és a hypothalamus magvaival, az itt megfigyelhető myelinizáció utal az összekötött régió neuronjainak myelinizációjára. Ezért elmondhatjuk, hogy a fent említett régiók myelinizációjának a kezdete nem tér el a hasonló korú kontrolltól.

A továbbiakban, a myelinizált axonok a hippocampus egyes régióiban és rétegeiben való megjelenésének sorrendje hasonló a kontrollban megfigyeltkéhez, melyet részletesen az előző fejezetben tárgyaltunk. A két csoportban megfigyelt hasonló myelinizációs ütem alapján arra következtetünk, hogy a hippocampus egyes afferens és efferens pályái Down-szindrómásokban hasonlóképpen fejlődnek.

Annak ellenére, hogy a myelinizáció üteme hasonló volt a két csoportban, az OLG sejtek és a myelinizált axonok száma egyértelműen kevesebb volt Down-szindrómásokban, mint kontrollban. A fentihez hasonló különbségeket már más

myelinfestési eljárásokkal (pl. Klüver-Barrera módszer) is megfigyeltek a fejlődő agykéreg szürke- és fehérállományában, a corpus callosumban, a putamenben, valamint a nucleus caudatusban (Wisniewski és Schmidt-Sidor, 1989). Továbbá immunhisztokémiával, a felnőtt Down-szindrómában elhunyt emberi mintákban is azt találták, hogy az egyes myelin specifikus fehérjék, mint pl. az MBP, vagy a 2'-3'-ciklikus nukleotid-3'-foszfodiészteráz (CNP-áz) expressziója számos kérgi és kéreg alatti struktúrában is alacsonyabb volt, mint kontrollban (Banik és mtsai, 1975, Palminiello és mtsai, 2008, Vlkolinský és mtsai, 2001). Emellett kimutattak csökkent CNP-áz enzimaktivitást is (Palo és Savolainen, 1973). A fenti fehérjék fontosságát, melyeket mutáns egereken vizsgáltak, korábbi fejezetekben részletesen leírtuk. Mivel az idegsejt axonjának végső érése akkor lesz teljes, amikor az megfelelő vastagságú kompaktálódott myelinhüvellyel borított, a myelin specifikus fehérjék csökkent szintje által okozott myelinizációs zavar szerepet játszhat a Down-szindróma patogenezisében.

Fénymikroszkópban az MBP-immunfestésnek van egy maximális értéke, amikor a festődés már teljesen homogén. Ezt az értéket felnőttre jellemző immunreaktivitásnak neveztük, habár ez az immunreaktivitás nem jelenti szükségképpen a myelinizáció érési folyamatának a befejeződését. Amikor egy adott rétegben már mindkét csoport myelinizációt jelző MBP-immunreaktivitása elérte a felnőttre jellemző homogén intenzitást nem láttunk intenzitásbeli különbséget a két csoport között. Ez alól csak a hilus kivétel, ahol Down-szindrómásokban minden életkorban kisebb volt az MBP-immunreakció intenzitása, mint a kontrollban.

Myelinizáció a gyrus dentatus hilusában

A hilusban található myelinizált axonok, melyek a septumból, a locus coeruleus, és a raphe-magvakból eredő afferens axonok (Amaral és Lavenex, 2007), laza hálózatot alkotnak. Down-szindrómában szenvedőknél számos agyterületen, mint pl. a frontális, temporális, occipitális és parietális kéregben is megfigyeltek csökkent idegsejtszámot (Larsen és mtsai, 2008, Ross és mtsai, 1984, Wisniewski 1990, Wisniewski és mtsai, 1984), mely alapján feltételezhető, hogy a septum verum mediális magjában is kevesebb idegsejt, ezáltal kevesebb, a hilushoz futó axon található a kontrollnál. A septo-hippocampalis pálya csökkent számú axonja Down-szindrómásokban felelős lehet a myelinizáció hilusban látott elmaradásáért. Mint az előző fejezetben írtuk, a hippocampushoz futó septális afferensek fontos szerepet töltenek be a hippocampus

normális funkciójának kialakításában. A septo-hippocampalis pálya axonjainak csökkent száma és/vagy a septalis GABAerg neuronok axonjainak csökkent myelinizáltsága lehet az egyik oka a Down-szindrómásokban megfigyelhető mentális retardációnak. Nem tudjuk viszont, hogy Down-szindrómában elsődlegesen a myelin képzése szenved-e zavart, vagy a csökkent myelinizáció hátterében a kevesebb septális afferens axon áll.

A myelinborítás biztosítja a nagyméretű axonok megfelelő ingerületvezetési sebességét, tehát ha a myelinizáció az egyedfejlődés során túl későn jelenik meg, vagy elmarad a normálistól, az idegrendszer funkciója zavart szenved. Az információ tárolásában, a tanulás és memória folyamatában a hippocampusnak kiemelt jelentősége van. Kétoldali hippocampus-károsodás esetén a memóriaképzés erősen gátolt. Ha tehát a születéstől kezdve csökkent a tanulási képesség, például részben az ehhez szükséges septo-hippocampalis pálya fejlődésének zavara miatt, akkor a születés után jelentős mértékben gátoltak a tanulási folyamatok. Mindez szerepet játszhat a Down-szindrómában megfigyelhető mentális retardáció kialakulásában.

LEGFONTOSABB EREDMÉNYEINK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Myelinizáció vizsgálata C57BL/6-os törzsbe tartozó kontroll egérben.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy az MBP-immunhisztokémia, valamint az elektronmikroszkópia külön-külön, vagy kombinálva alkalmas és érzékeny módszer az OLG sejtek, valamint a myelinizáció folyamatának a vizsgálatára egérben. Ezzel szemben a rutin patológiai diagnosztikában demyelinizáció vizsgálatára használt Klüver-Barrera myelinfestés (Luxol Fast Blue) kevésbé érzékeny módszer, mivel jelentős mennyiségű myelinizált axon szükséges a pozitív festési reakcióhoz. Az MBP immunhisztokémiával kimutatott myelinizáció a kéregben egérben is követi az emberben megfigyelt sorrendet: a kérgi területek közül a szenzoros pálya a motoros pályák előtt myelinizálódott, megelőzve az asszociációs pályákat (Kinney és mtsai, 1988). Emellett a limbikus rendszer asszociációs pályái, például a cingulum és a fimbria fornicis, előbb myelinizálódtak, mint az agykéreg hasonló pályái. A myelinizált axonok megjelenése az agykéregben megfelel az egyes rétegek idegsejteinek érési sorrendjének, amely az *inside-out* fejlődési mintázatot követi.

2. Myelinizáció vizsgálata hipofízis adenilát cikláz aktivátor polipeptid (PACAP) deficiens egerekben

Megállapítottuk, hogy a PACAP-deficiens egerekben minden vizsgált régióban hamarabb kezdődik a myelinizáció, mint a hasonló korú vad-típusú állatokban. Továbbá, vékonyabb, rövidebb myelinizált axonokat és kisebb myelindenzitást láttunk a vad-típusú állatokban, mint a hasonló korú PACAP-deficiens egerekben. Az érzőpályák a motoros pályáknál korábban myelinizálódtak, és legkésőbb az asszociációs pályák voltak myelinizáltak. Ez arra utal, hogy a PACAP-deficiens egerekben a myelinizált afferens és efferens pályák, valamint az egyes agyterületeket összekötő kapcsolatok a normális fejlődésnek megfelelő mintázatot követnek. Eredményeink és korábbi *in vitro* vizsgálatok alapján valószínű, hogy az endogén PACAP-nak gátló hatása van a myelinizáció folyamatára, az OLG sejtek érésének a késleltetése által.

3. Myelinizáció az emberi hippocampusban

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a hippocampus egyes rétegeinek myelinizációja követi a hippocampus afferens és efferens pályáinak a fejlődését. Az első oligodendroglia sejtek a terhesség félidejében voltak jelen a fimbria fornícisban és az alveusban, ezután sorrendben a következő rétegek myelinizálódtak: stratum lacunosum-moleculare, stratum oriens, stratum radiatum, stratum moleculare, stratum pyramidale és hilus. Feltételezzük, hogy egy axon myelinizációjának a kezdete nem csak az axon és a hozzá tartozó sejt érettségi állapotától függ, hanem a célsejt fejlettségi szintje is befolyásolja. Az egészen felnőttkorig elhúzódó myelinizáció lehet az egyik magyarázat a hippocampus hosszan tartó funkcionális érésére.

4. Myelinizáció az emberi hippocampusban Down-szindrómában

Eredményeink arra utalnak, hogy az emberi hippocampus myelinizációja a kontrollhoz képest elmarad a Down-szindrómában szenvedőkben. Annak ellenére, hogy az MBP-pozitív axonok megjelenése kontrollhoz hasonló sorrendet követett, a hippocampus egyes rétegeiben kisebb mértékű myelinizációt figyeltünk meg Down-szindrómásokban, mint a kontrollban. Az, hogy az egyes rétegek mindkét csoportban hasonló myelinizációs mintázatot követtek, arra enged következtetni, hogy Down-szindrómásokban a hippocampus afferens és efferens pályáinak a fejlődése nem szenvedett jelentős károsodást (Arnold és Trojanowski, 1996). Eredményeink arra utalnak, hogy a Down-szindrómában megfigyelhető mentális retardáció kialakulásában fontos szerepet tölthet be a hippocampus rétegeiben megfigyelt, a kontrollhoz képest kisebb mértékű myelinizáció.

IRODALOMJEGYZÉK

- Ábrahám 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. 27:115-127.
- Acsády L, Kamondi A, Sík A, Freund T, Buzsáki G. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 1998. 18:3386-3403.
- Acsády L, Katona I, Martinez-Guijarro FJ, Buzsáki G, Freund TF. Unusual target selectivity of perisomatic inhibitory cells in the hilar region of the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 2000. 20:6907-6919.
- Agrawal HC, Clark HB, Agrawal D, Seil FJ, Quarles RH. Identification of antibodies in anti-CNS and anti-PNS myelin sera by immunoblot, characterization by immunohistochemistry, and their effect in this culture. *Brain. Res.* 1984. 307:191-200.
- Allais A, Burel D, Isaac ER, Gray SL, Basille M, Ravni A, Sherwood NM, Vaudry H, Gonzalez BJ. Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Eur. J. Neurosci.* 2007. 25:2604-2618.
- Amaral DG, Lavenex P. Hippocampus Neuroanatomy. In: Andersen P, Moris R, Amaral DG, Bliss T, O'Keefe J (Eds.). *The Hippocampus Book*. 2007. Oxford University Press, New York, pp. 34-114.
- Amaral DG, Witter M. The three dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience.* 1989. 31:571-591.
- Amaral DG, Witter M. Hippocampal formation. In G. Paxinos (Ed), *The Rat Nervous System*. Academic Press. San Diego, 1995, pp. 443-492.
- Aquirre GK, Detre JA, Alsop DC, D'Esposito M. The parahippocampus subserves topographical learning in man. *Cereb. Cortex.* 1996. 6:823-829.
- Arimura A. Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous system. *Jpn. J. Physiol.* 1998. 48:301-331.
- Armstrong BD, Abad C, Chhith S, Cheung-Lau G, Hajji OE, Nobuta H, Waschek JA. Impaired nerve regeneration and enhanced neuroinflammatory response in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Neurosci.* 2008. 151:63-73.
- Arnold SE, Trojanowski JQ. Human fetal hippocampal development: I. Cytoarchitecture, myeloarchitecture, and neuronal morphological features. *J. Comp. Neurol.* 1996. 301:343-364.
- Bandtlow C, Zachleder T, Schwab ME. Oligodendrocyte arrest neurite growth by contact inhibition. *J. Neurosci.* 1990. 10:3837-3848.
- Banik NL, Davison AN, Palo J, Savolainen H. Biochemical studies on myelin isolated from the brains of patients with Down-syndrome. *Brain.* 1975, 98:213-218.
- Bar-Peled O, Israeli M, Ben-Hur H, Hoskins I, Groner Y, Biegon A. Developmental pattern of muscarinic receptors in normal and Down's syndrome fetal brain -- an autoradiographic study. *Neurosci. Lett.* 1991. 133:154-158.

- Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 2001. 81: 871-927.
- Bayer SA. The development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with ³H-thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.* 1980. 190: 87-114.
- Bayer SA, Altmann J. Hippocampal development in the rat: cytogenesis and morphogenesis examined with autoradiography and low level X-irradiation. *J. Comp. Neurol.* 1974. 158:55-79.
- Bayer SA, Altmann J. Neurogenesis and neuronal migration. In Paxinos G. (Ed.) *The Rat Nervous System*. 2nd ed. 1995. Academic Press. San Diego, CA, pp. 1041-1078.
- Bayer SA, Altmann J. The human brain during the second trimester. In: Bayer SA, Altmann J. (Eds.) Volume 3 of the series of *Atlas of the Human Central Nervous System Development*. 2005. CRC Press. Boca Raton. FL.
- Becker LE, Armstrong DL, Chan F. Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Ann. Neurol.* 1986. 20:520-526.
- Bodhireddy SR, Lyman WD, Rashbaum WK, Weidenheim KM. Immunohistochemical detection of myelin basic protein is a sensitive marker of myelination in second trimester human fetal spinal cord. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1994. 53:144-149.
- Bohbot VD, Kálina M, Stepankova K, Spackova N, Petrides M, Nadel L. Spatial memory deficits in patients with lesions to the right hippocampus and to the right parahippocampal cortex. *Neuropsychologia.* 1998. 36:1217-1238.
- Bolhuis JJ, Stewart CA, Forest EM. Retrograde amnesia and memory reactivation in rats with ibotenate lesions to the hippocampus or subiculum. *Q. J. Exp. Psychol.* 1994. 47:129-150.
- Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta. Neuropathol.* 2010. 119:37-53.
- Brinkmann BG, Agarwal A, Sereda MW, Garratt AN, Müller T, Wende H, Stassart RM, Nawaz S, Humml C, Velanac V, Radyushkin K, Goebbels S, Fischer TM, Franklin RJ, Lai C, Ehrenreich H, Birchmeier C, Schwab MH, Nave KA. Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron.* 2008. 59:581-595.
- Brooksbank BW, Walker D, Balázs R, Jørgensen OS. Neuronal maturation in the fetal brain in Down's syndrome. *Early. Hum. Dev.* 1989. 18:237-246.
- Bugga L, Gadiant RA, Kwan K, Stewart CL, Patterson PH. Analysis of neuronal and glial phenotypes in brains of mice deficient in leukemia inhibitory factor. *J. Neurobiol.* 1998. 36:509-524.
- Buzsáki G. Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain. Res.* 1986. 398:242-252.
- Charles P, Tait S, Faivre-Sarrailh C, Barbin G, Gunn-Moore F, Denisenko-Nehrbass N, Guennoc AM, Girault JA, Brophy PJ, Lubetzki C. Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglial junction. *Curr. Biol.* 2002. 12:217-220.
- Ceranik K, Zhao S, Frotscher M. Development of the entorhino-hippocampal projection: guidance by Cajal-Retzius cell axons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000. 911:43-54.
- Chicurel ME, Harris KM. 3 dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 1992. 325:169-182.

- Chobrak JJ, Buzsáki G. High-frequency oscillations in the output networks of the hippocampal-entorhinal axis of the freely behaving rat. *J. Neurosci.* 1996. 16:3056-3066.
- Coman I, Barbin G, Charles P, Zalc B, Lubetzki C. Axonal signals in central nervous system myelination, demyelination, and remyelination. *J. Neurol. Sci.* 2005. 233:67-71.
- Contestabile A, Benfenati F, Gasparini L. Communication breaks-Down: from neurodevelopment defects to cognitive disabilities in Down syndrome. *Progr. Neurobiol.* 2010. 91: 1-22.
- Corkin S. What's new with the amnesic patient H.M.? *Nat. Rev. Neurosci.* 2002. 3:153-160.
- de Haan M, Mishkin M, Baldeweg T, Vargha-Khadem F. Human memory development and its dysfunction after early hippocampal injury. 2006. *Trends. in Neurosci.* 29:374-381.
- Demerens C, Stankoff B, Logak M, Anglade P, Allinquant B, Couraud F, Zalc B, Lubetzki C. Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. 93:9887-9892.
- Deoni SCL, Mercure E, Blasi A, Gasston D, Thomson A, Jhonson M, Williams SCR, Murphy DGM. Mapping infant brain myelination with Magnetic Resonance Imaging. *J. Neurosci.* 2011. 31:784-791.
- Deutsch PJ, Sun Y. The 38-amino acid form of pituitary adenylate-cyclase activating polipeptide stimulates dual signaling cascades in PC12 cells and promotes neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 1992. 267:5108-5113.
- Dicicco-Bloom E, Deutsch PJ, Maltzmann J, Zhang J, Pintar JE, Zheng J, Friedman WF, Zhou X, Zaremba T. Autocrine expression and ontogenetic functions of the PACAP ligand/receptor system during sympathetic development. *Dev. Biol.* 2000. 219:197-213.
- Edgar JM, McLaughlin M, Yool D, Zhang SC, Fowler JH, Montague P, Barrie JA, McCulloch MC, Duncan ID, Garbern J, Nave KA, Griffiths IR. Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *J. Cell. Biol.* 2004, 166-121-131.
- Eichenbaum H, Stewart C, Morris RGM. Hippocampal representation in place learning. *J. Neurosci.* 1990. 10:3531-3542.
- Elder GA, Friedrich VL Jr, Lazzarrini LA. Schwann cells and oligodendrocytes read distinct signals in establishing myelin sheath thickness. *J. Neurosci. Res.* 2001. 65:493-499.
- Engidawork E, Lubec G. Molecular changes in fetal Down syndrome brain. 2003. *J. Neurochem.* 84:895-904.
- Epstein CJ. Epilogue: toward the twenty-first century with Down syndrome—a personal view of how far we have come and how far we can reasonably expect to go. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1995. 393-241-246.
- Fanarraga ML, Griffiths IR, Zhao M, Dunean ID. Oligodendrocytes are not inherently programmed to myelinate a specific size of axons. *J. Comp. Neurol.* 1998. 399:94-100.
- Falluel-Morel A, Vaudry D, Aubert N, Galas L, Benard M, Basille M, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents the effects of ceramides on migration, neurite outgrowth, and cytoskeleton remodelling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. 102:2637-2642.

- Flórez J, del Arco C, González A, Pascual J, Pazos A. Autoradiographic studies of neurotransmitter receptors in the brain of newborn infants with Down syndrome. *Am. J. Med. Genet. Suppl.* 1990. 7:301-305.
- Foster RE, Connors BW, Waxman SG. Rat optic nerve: electrophysiological, pharmacological and anatomical studies during development. *Brain. Res.* 1982. 255:371-386.
- Freund TF, Antal M. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature.* 1988. 336: 170-173.
- Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the Hippocampus. *Hippocampus.* 1996. 6:1- 470.
- Friede RL. Control of myelin formation by axon caliber (with a model of the control mechanism). *J. Comp.* 1972. *Neurol.* 144:233-252.
- Gärtner U, Härtig W, Brauer K, Brückner G, Arendt T. Electron microscopic evidence for different myelination of rat septohippocampal fibres. *Neuroreport.* 2001a, 12:17-20.
- Gärtner U, Härtig W, Brauer K, Brückner G, Arendt T. Immunofluorescence and immunoelectron microscopic evidence for differences in myelination of GABAergic and cholinergic septohippocampal fibres. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2001b. 19:347-352.
- Giedd JN, Vaituzis AC, Hamburger SD, Lange N, Rajapakse JC, Kaysen D, Vauss YC, Rapoport JL. Quantitative MRI of the temporal lobe, amygdale and hippocampus in normal human development: ages: 4-18 years. *J. Comp. Neurol.* 1996. 366:223-230.
- Golden JA, Hyman BT. Development of the superior temporal neocortex is anomalous in trisomy 21. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1994. 53:513-520.
- Gonzalez BJ, Basille M, Vaudry D, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neurosci.* 1997. 78:419-430.
- Guidi S, Bonasoni P, Ceccarelli C, Santini D, Gualtieri F, Ciani E, Bartesaghi R. Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome. *Brain Pathol.* 2008. 18:180-197.
- Gulyás AI, Görös TJ, Freund TF. Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by GABAergic septal afferents. 1990. *Neuroscience.* 37: 31-44.
- Gulyás AI, Seress L, Tóth K, Acsády L, Antal M, Freund TF. Septal GABAergic neurons innervate inhibitory interneurons in the hippocampus of the macaque monkey. *Neuroscience.* 1991. 40:381-390.
- Gyllensten L, Malmfors T. Myelination of the optic nerve, its dependence on visual function: a quantitative investigation in mice. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 2009. 11:255-256.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA. Axonal swellings and degeneration in mice lacking a major proteolipid of myelin. *Science.* 1998. 280:1610-1613.
- Hardy R, Reynolds R. Neuron-oligodendroglial interactions during central nervous system development. *J. Neurosci. Res.* 1993. 36:121-126.

- Hasegawa M, Houdou S, Mito T, Takashima S, Asanuma K, Ohno T. Development of myelination in the human fetal and infant cerebrum: a myelin basic protein immunohistochemical study. *Brain Dev.* 1992. 14:1-6.
- Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A. Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polipeptid (PACAP). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. 98:13355-13360.
- Henze D, Wittner L, Buzsáki G. Single dentate gyrus granule cells monosynaptically drive hilar and CA3 neurons in vivo. In Abstracts of the 31st Annual Meeting of the Society for Neuroscience. 2001. Vol. 27. 537.
- Herkenham M. The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1978. 177:589-610.
- Hildebrand C, Reniahl S, Persson H, Bjartmar C. Myelinated nerve fiber in the CNS. *Prog Neurobiol.* 1993. 40:319-384.
- Hines H. Studies in the growth and differentiation of the telencephalon in man. The fissura hippocampi. 1922. *J. Comp. Neurol.* 34:73-170.
- Hu QD, Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T, Takeda Y, Chia W, Sankar N, Ng YK, Ling EA, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai H, Aster JC, Schachner M, Pallen CJ, Watanabe K, Xiao ZC. F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell.* 2003. 115:163-175.
- Humphrey T. The development of the human hippocampal fissure. 1967. *J. Anat.* 101:655-676.
- Insausti R, Amaral DG, Hippocampal formation, In Paxinos G. and Mai JK (Eds), *The Human Nervous system*, Elsevier, Academic Press, Amsterdam, 2004, pp. 872-906.
- Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, Lee PR, Kozlov SV, Stewart CL, Fields RD. Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron.* 2006. 49:823-832.
- Kaufmann WE, Moser HW. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb. Cortex.* 2000. 10:981-991.
- Kinney HC, Brody BA, Klomen AS, Gilles FH. Sequence of central nervous system myelination in human infancy. II. Pattern of myelination in autopsied infants. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1988. 47:217-234.
- Kiss J, Patel AJ, Baimbridge KG, Freund TF. Topographical localization of neurons containing parvalbumin and cholin acetyltransferase in the medial septum-diagonal band region of the rat. *Neuroscience.* 1990. 36:61-72.
- Klüver H, Barrera E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1953. 12:400-403.
- Koo BK, Blaser S, Harwood-Nash D, Becker LE, Murphy EG. Magnetic resonance imaging evaluation of delayed myelination in Down-syndrome: a case report and review of the literature. *J. Child. Neurol.* 1992. 7:417-421.
- Kostović I. Prenatal development of nucleus basalis complex and related fiber systems in man: a histochemical study. *Neuroscience.* 1986. 17:1047-1077.

- Kostović I, Petanjek Z, Judas M. Early areal differentiation of the human cerebral cortex: entorhinal area. *Hippocampus*. 1993. 3:447-458.
- Kostović I, Seress L, Mrzljak L, Judas M. Early onset of synapses formation in the human hippocampus: a correlation with Nissl-Golgi architectonics in 15- and 16,5-week-old fetuses. *Neuroscience*. 1989. 30:105-106.
- Köves K, Arimura A, Somogyvári-Vígh A, Vígh S, Miller J. Immunohistochemical demonstration of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, in the ovine hypothalamus. *Endocrinol*. 1990. 127:264-271.
- Kreiman G, Koch C, Fried I. Imagery neurons in the human brain. *Nature*. 2000. 408:357-361.
- Kuhlmann-Krieg S, Sommer I, Schachner M. Ultrastructural features of cultured oligodendrocytes expressing stage-specific cell-surface antigens. *Brain. Res*. 1988. 467:269-280.
- Kuperman AS, Volpert WA, Okamoto M. Release of adenine nucleotides from nerve axons. *Nature*. 1964. 204:1000-1001.
- Laburthe M, Couvineau A, Tan V. Class II G protein/coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides*. 2007. 28:1631-1639.
- Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE, Griffiths IR, Nave KA. Disruption of *Cnpl* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat. Genet*. 2003. 33:366-374.
- Larsen KB, Laursen H, Graem N, Samuelsen GB, Bogdanovic N, Pakkenberg B. Reduced cell number in the neocortical part of the human fetal brain in Down-syndrome. *Ann. Anat*. 2008. 190:421-427.
- Lee M, Lelievre V, Zhao P, Torres M, Rodriguez W, Byun JY, Doshi S, Ioffe Y, Gupta G, de los Monteros AE, de Vellis J, Waschek J. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates DNA synthesis but delays maturation of oligodendrocyte progenitors. *J. Neurosci*. 2001. 21:3849-3859.
- Lelievre V, Ghiani CA, Seksenyan A, Gressens P, de Vellis J, Waschek JA. Growth factor-dependent actions of PACAP on oligodendrocyte progenitor proliferation. *Regul. Pept*. 2006. 137:58- 66.
- Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron*. 1996. 17:607-615.
- Looney GA, Elberger AJ. Myelination of the corpus callosum in the cat: time course, topography, and functional implications. *J. Comp. Neurol*. 1986. 248:336-347.
- Ludwin SK. The pathobiology of the oligodendrocyte. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 1997. 56:111-124.
- Lu N, Diccio-Bloom E. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an autocrine inhibitor of mitosis in cultured cortical precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. 94:3357-3362.
- Maguire EA, Burgess N, Donett JG, Frackowiak RS, Frith CD, O'Keefe J. Knowing where and getting there: a human navigation network. *Science*. 1998. 280:921-924.

- Maire JC, Medilanski J, Straub RW. Release of adenosine, inosine, hypoxanthin from rabbit non-myelinated nerve fibers at rest and during activity. *J. Physiol.* 1984. 357:67-77.
- Marin-Padilla M. Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome. A Golgi study. *J. Comparative. Neurol.* 1976. 167:63-81.
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fisher TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA. Axonal neuregulin-1 regulates myelin thickness. *Science.* 2004. 304:700-703.
- Mignot C, Boespflug-Tanguy O, Gelot A, Dautigny A, Pham-Dinh D, Rodriguez D. Alexander disease: putative mechanism of an astrocytic encephalopathy. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2004. 61:369-385.
- Mishkin M, Murray EA. Stimulus recognition. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1994. 4:200-206.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. 164:567-574.
- Moore CL, Kalil R, Richards W. Development of myelination in optic tract of the cat. *J. Comp. Neurol.* 1976. 165:125-136.
- Morell P, Quarles RH, Norton WT. Formation structure and biochemistry of myelin. 1989. In: Siegal GJ, Agranoff BW, Albers LW, Molinoff PB. (Eds), *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspect.* 4th ed. Raven Press. New York, pp. 109-136.
- Mori S, Leblond C.P. Electron Microscopic Identification of three classes of oligodendrocytes and a preliminary study of their proliferative activity in the corpus callosum of young rats. *J.Comp. Neur.* 1970. 139: 1-30.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* 1982. 297:681-683.
- Morris RGM, Shenk F, Tweedie F, Jarrard LE. Ibotenate lesions of hippocampus and/or subiculum: dissociating components of allocentric spatial learning. *Eur. J. Neurosci.* 1990. 2:1016-1028.
- Mustafa T, Eiden LE. Secretin superfamily: PACAP, VIP and related peptides. In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology.* (Ed) Lajtha A. Springer. 2008. pp. 463-500.
- Nadel L. Down's syndrome: a genetic disorder in behavioral perspective. *Genes. Brain Behav.* 2003. 2:156-166.
- Nie DY, Zhou ZH, Ang BT, Teng FY, Xu G, Xiang T, Wang CY, Zeng L, Takeda Y, Xu TL, Ng YK, Faivre-Sarrailh C, Popko B, Ling EA, Schachner M, Watanabe K, Pallen CJ, Tang BL, Xiao ZC. Nogo A at CNS paranodes is a ligand of Caspr: possible regulation of K(+) channel localization. *EMBO. J.* 2003. 22:5666-5678.
- Nielsen HS, Hannibal J, Fahrenkrug J. Embryonic expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in sensory and autonomic ganglia and spinal cord of the rat. *J. Comp. Neurol.* 1998a. 394:403-415.
- Nielsen HS, Hannibal J, Fahrenkrug J. Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the postnatal and adult rat cerebellar cortex. *Neuroreport.* 1998b. 9:2639-2642.

- Ogawa T, Nakamachi T, Ohtaki h, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Watanabe J, Kikuyama S, Shioda S. Monoaminergic neuronal development is not affected in PACAP-gene-deficient mice. *Regul. Pept.* 2005. 126:103-108.
- Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Shioda S. Role of PACAP in ischemic neural death. *J. Neurosci.* 2008. 36:16-25.
- Omlin FX. Optic disc and optic nerve of the blind cape mole-rat (*Georychus capensis*): a proposal model for naturally occurring reactive gliosis. *Brain. Res. Bull.* 1997. 44:627-632.
- O'Keefe J, Dostrovski J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain. Res.* 1971. 34:171-175.
- O'Keefe J, Nadel L. *The hippocampus as a cognitive map.* Oxford, Calendron. 1978.
- Palminiello S, Kida E, Kaur K, Walus M, Wisniewski KE, Wierzba-Bobrowicz T, Rabe A, Albertini G, Golabek AA. Increased level of carbonic anhydrase II in the developing Down syndrome brain. *Brain. Res.* 2008. 1190:193-205.
- Palo J, Savolainen H. The proteins of human myelin in inborn errors of metabolism and in chromosomal anomalies. *Acta. Neuropathol.* 1973. 24:56-61.
- Park SK, Miller R, Krane I, Vartanian T. The erbB2 gene is required for the development of terminally differentiated spinal cord oligodendrocytes. *J. Cell. Biol.* 2001. 154:1245-1258.
- Parnavelas JG, Luder R, Pollard SG, Sullivan K, Liebermann AR. A quantitative and qualitative ultrastructural study of glial cells, in the developing visual cortex in of the rat. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1983. 301:55-84.
- Pearlson GD, Breiter SN, Aylward EH, Warren AC, Grygorcewicz M, Frangou S, Barta PE, Pulsifer MB. MRI brain changes in subjects with Down syndrome with and without dementia. *Dev. Med. Child. Neurol.* 1998. 40:326-334.
- Peters A. Observation on the connections between myelin sheath and glial cells in the optic nerve of young rats. *J. Anat.* 1964. 98:125-134.
- Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends. Cell. Biol.* 1993. 3:191-197.
- Piaton G, Gould RM, Lubetzki C. Axon-Oligodendrocyte interactions during developmental myelination, demyelination and repair. *J. Neurochem.* 2010. 114:1243-1260.
- Pinter JD, Eliez S, Schmitt JE, Capone GT, Reiss AL. Neuroanatomy of Down's syndrome: a high-resolution MRI study. *Am. J. Psychiatry.* 2001. 158:1659-1665.
- Prineas JW, Kwon EE, Sternberger NH, Lennon VA. The distribution of myelin associated glycoprotein and myelin basic protein in actively demyelinating multiple sclerosis lesions. *J. Neuroimmunol.* 1984. 6:251-264.
- Purpura DS. Normal and aberrant neuronal development in the cerebral cortex of human fetus and young infant. In: *Brain Mechanisms in Mental Retardation, UCLA Forum in Medical Sciences*, New York, Academic Press, 1975, pp. 141-169.
- Privat A, Jacque C, Bourre JM, Dupouey P, Baumann N. Absence of the major dense line in myelin of the mutant mouse „shiverer”. *Neurosci. Lett.* 1979. 12:107-112.

- Qi Y, Jamindar TM, Dawson G. Hypoxia alters iron homeostasis and induces ferritin synthesis in oligodendrocytes. *J. Neurochem.* 1995. 64: 2458-2464.
- Quirk GJ, Muller RU, Kubie JL, Ranck JB. The positional firing properties of medial entorhinal neurons: description and comparison with hippocampal place cells. *J. Neurosci.* 1992. 12:1945-1963.
- Radnikow G, Feldmeyer D, Lübke J. Axonal projection, input and output synapses, and synaptic physiology of Cajal-Retzius cells in the developing rat neocortex. *J. Neurosci.* 2002. 22:6908-6919.
- Rakic P. Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon. *Postgrad. Med. J.* 1978. 54:25-40
- Rakic P, Nowakowski RS. The time of origin of neurons in the hippocampal region of the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 196:99-128.
- Raz N, Torres IJ, Briggs SD, Spencer WD, Thompton AE, Loken WJ, Gunning FM, McQuain JD, Driesen NR, Acker JD. Selective neuroanatomic abnormalities in Down's syndrome and their cognitive correlates: evidence from MRI morphometry. *Neurology.* 1995. 45: 356-366.
- Readhead C, Hood L. The dysmyelinating mouse mutations shiverer (shi) and myelin deficient (shimld). *Behav. Genet.* 1990. 20:213.134.
- Rempel-Clower NL, Zola SM, Squire LR, Amaral DG. Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *J. Neurosci.* 1996. 16:5233-5255.
- Roach A, Takahashi N, Pravtcheva D, Ruddle F, Hood L. Chromosomal mapping of mouse myelin protein basic gene and structure and transcription of the partially deleted gene in shiverer mutant mice. *Cell.* 1985. 42:149-155.
- Rolls ET. A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus.* 1996. 6:601-620.
- Rolls ET, O'Mara SM. View-responsive neurons in the primate hippocampal complex. *Hippocampus.* 1995. 5:409-424.
- Rosenbaum RS, Priselac S, Köhler S, Black SE, Gao F, Nadel L, Moscovitch M. Remote spatial memory in an amnesic person with extensive bilateral hippocampal lesions. *Nat. Neurosci.* 2000. 3:1044-1048.
- Ross MH, Galaburda AM, Kemper TL. Down's syndrome: is there a decreased population of neurons? *Neurol.* 1984. 34:909-916.
- Roussel G, Noussbaum JL. Comparative localization of Wolfram W1 and myelin basic proteins in the rat brain during ontogenesis. *Histochem. J.* 1981. 13:1029-1047.
- Roy K, Murtie JC, El-Khodori BF, Edgar N, Sardi SP, Hooks BM, Benoit-Marand M, Chen C, Moore H, O'Donnell P, Brunner D, Corfas G. Loss of erbB signaling in oligodendrocytes alters myelin and dopaminergic function, a potential mechanism for neuropsychiatric disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. 104:8131-8136.
- Sándor K, Kormos V, Botz B, Imreh A, Böleskei K, Gaszner B, Markovics A, Szolcsányi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D, Helyes Z. Impaired nocifensive behaviours and mechanical hyperalgesia, but enhanced thermal allodynia in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice. *Neuropeptides.* 2010. 44:363-371.

- Schmidt-Sidor B, Wisniewski K, Shepard TH, Sersen EA. Brain growth in Down syndrome subjects 15-22 weeks of gestational age and birth to 60 months. *Clin. Neuropathol.* 1990. 9:181-190.
- Schwab ME, Caroni P. Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J. Neurosci.* 1988. 8:2381-2393.
- Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1957. 20:11-21.
- Seress L. Morphological variability and developmental aspects of monkey and human granule cells: differences between the rodent and primate dentate gyrus. In: Ribak CE, Gall CM, Mody I. (Eds) *The Dentate Gyrus and its Role in Seizures*, Epilepsy Research Supplement No. 7. Elsevier Science Publishers BV. Amsterdam. 1992. pp. 3-28.
- Seress L, Mrzljak L. Postnatal development of mossy cells in the human dentate gyrus: a light microscopic golgi study. 1992. *Hippocampus.* 2:127-141.
- Seress L. Morphological changes of the human hippocampal formation from midgestation to early childhood. In *Handbook of Developmental Cognitive Neuroscience*. Eds.: Nelson CA, Luciana M. , The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, 2001. pp.45-58.
- Seress L, Ábrahám H, Tornóczki T, Kosztolányi G. Cell formation in the human hippocampal formation from mid gestation to the late postnatal period. 2001. *Neuroscience.* 105:831-843.
- Seress L, Ábrahám H. Pre- and postnatal morphological development of the human hippocampal formation. In *Handbook of Developmental Cognitive Neuroscience*, 2nd edition, Eds: Nelson CA, Luciana M, The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, 2008, pp. 187-211.
- Sidman RL, Dickie MM, Appel SH. Mutant mice (quaking and jimpy) with deficient myelination in the central nervous system. *Science.* 1964. 144:309-311.
- Simons M, Trajkovic K. Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J. Cell. Sci.* 2006. 119:4381-4389.
- Squire LR, Zola SM. Structure and function of declarative and non-declarative memory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. 93:13515-13522.
- Sternberger NH, Itoyama Y, Kies MW, deF. Webster H. Immunocytochemical method to identify basic protein in myelin-forming oligodendrocytes of newborn rat CNS. *J. Neurocytol.* 1978a. 7:251-263.
- Sternberger NH, Itoyama Y, Kies MW. Myelin basic protein demonstrated immunocytochemically in oligodendroglia prior to myelin sheath formation. *Proc.Nat.Acad. Sci.USA.* 1978b. 75:2521-2524.
- Stevens B, Fields RD. Response of schwann cells to action potentials in development. *Science.* 2009. 287:2267-2271.
- Sturrock RR. A quantitative electron microscopic study of myelination in the anterior limb of the anterior commissure of the mouse brain. *J. Anat.* 1975. 119:67-75.
- Sturrock RR. Myelination of the mouse corpus callosum. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1980. 6: 415-420.
- Suetsugu M, Mehraein P. Spine distribution along the apical dendrites of the pyramidal neurons in Down's syndrome. A quantitative Golgi study. *Acta. Neuropathol.* 1980. 50:207-210.

- Sutherland RJ, Weisend MP, Mumby D, Astur RS, Hanlon FM, Koerner A, Thomas MJ, Wu Y, Moses SN, Cole C, Hamilton DA, Hoising JM. Retrograde amnesia after hippocampal damage: recent vs. remote memories in two tasks. *Hippocampus*. 2001. 11:27-42.
- Suzuki M, Hagino H, Nohara S, Zhou SY, Kawasaki Y, Takahashi T, Matsui M, Seto H, Ono T, Kurachi M. Male specific volume expansion of the human hippocampus during adolescence. *Cereb. Cortex*. 2005. 15:187-193.
- Takamaya S, Yamoto M, Hashimoto K, Itoh H. Immunohistochemical study on the developing optical nerves in human embryos and fetuses. *Brain. Dev.* 1991. 13:307-312.
- Takashima S, Ieshima A, Nakamura H, Becker LE. Dendrites, dementia and the Down syndrome. *Brain. Dev.* 1989. 11:131-133.
- Takashima S, Iida K, Mito T, Arima M. Dendritic and histochemical development and ageing in patients with Down's syndrome. *J. Intellect. Disabil. Res.* 1994. 38:265-273.
- Tatsuno I, Gottschall PE, Köves K, Arimura A. Demonstration of specific binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polipeptid (PACAP) in rat astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. 168:1027-1033.
- Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L, Salzer JL. Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron*. 2005. 47:681-694.
- Teng E, Squire LR. Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature*. 1999. 400:675-677.
- Tyrrell J, Cosgrave M, McCarron M, McPherson J, Calvert J, Kelly A, McLaughlin M, Gill M, Lawlor BA. Dementia in people with Down's syndrome. *Int. J. Geriatr. Psychiatr.* 2001. 16:1168-1174.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Fournier A, Vaudry H. Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. 96:9415-9420.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polipeptid and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 2000. 52:269-324.
- Vaudry D, Hamelink C, Damadzic R, Eskay RL, Gonzalez B, Eiden LE. Endogenous PACAP act as a stress response peptide to protect cerebellar neurons from ethanol or oxidative insult. *Peptides*. 2005. 26:2518-2524.
- Vlkolinský R, Cairns N, Fountoulakis M, Lubec G. Decreased brain levels of 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 2001. 22:547-553.
- Voyvodic JT. Target size regulates calibre and myelination of sympathetic axons. *Nature*. 1989. 342:430-433.
- Waschek JA. Multiple actions of pituitary adenylyl cyclase activating polipeptide in nercou system development and regeneration. *Dev. Neurosci.* 2002. 24:14-23.

- Waschek JA, Casillas RA, Nguyen TB, Diccico-Bloom EM, Carpenter EM, Rodriguez WI. Neural tube expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and receptor potential role in patterning and neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. 95:9602-9607.
- Webster HD, Shii H, Lassmann H. Immunocytochemical study of myelin associated glycoprotein (MAG), basic protein(BP), and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *Acta. Neuropathol.* 1985. 65:177-189.
- Weitzdoerfer R, Dierssen M, Fountoulakis M, Lubec G. Fetal life in Down syndrome starts with normal neuronal density but impaired dendritic spines and synaptosomal structure. *J. Neural. Transm.* 2001. Suppl. 59-70.
- Whishaw IQ, Cassel JC, Jarrard LE. Rats with fimbria-fornix lesions display a place response in a swimming pool: a dissociation between getting there and knowing where. *J. Neurosci.* 1995. 15:5779-5788.
- Wisniewski KE. Down syndrome children often have brain with maturation delay, retardation of growth, and cortical dysgenesis. *Am. J. Med. Genet. Suppl.* 1990. 7:274-281.
- Wisniewski KE, Kida E. Abnormal neurogenesis and synaptogenesis in Down syndrome. *Dev. Brain. Dysfunction.* 1994. 7:289-301.
- Wisniewski KE, Laure-Kamionowska M, Wisniewski HM. Evidence of arrest of neurogenesis and synaptogenesis in brains of patients with Down's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1984. 311:1187-1188.
- Wisniewski K, Schmidt-Sidor B. Postnatal delay of myelin formation in brains from Down syndrome infants and children. *Clin. Neuropathol.* 1989. 8:55-62.
- Wouterlood FG, Saldana E, Witter MP. Projections from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol.* 1990. 296:179-203.
- Zigman W, Silverman W, Wisniewski HM. Aging and Alzheimer's disease in Down syndrome: Clinical and pathological changes. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews.* 1996. 2:73-79.

AZ ÉRTEKEZÉSTERVEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Vincze A, Mázló M, Seress L, Komoly S, Ábrahám H. A correlative light and electron microscopic study of postnatal myelination in the murine corpus callosum. *Int. J. Dev. Neuroscience*. 2008. 26:575-584. IF: 1.869
2. Ábrahám H, Vincze A, Jewgenow I, Veszprémi B, Kravják A, Gömöri E, Seress L. Myelination in the human hippocampal formation from midgestation to adulthood. *Int. J. Dev. Neurosci*. 2010. 28:401-410. IF: 1.938
3. Ábrahám H, Vincze A, Veszprémi B, Kravják A, Gömöri E, Kovács GG, Seress L. Impaired myelination of the human hippocampal formation in Down-syndrome. 2011. (közlésre benyújtva)
4. Vincze A, Reglődi D, Helyes Zs, Hashimoto H, Shintai N, Ábrahám H. The role of endogenous PACAP on myelination in the rodent brain. Lessons from PACAP deficient mice. *Int. J. Dev. Neurosci*. 2011. (közlésre elfogadva) Doi: 10.1016/j.ijdevneu.2011.06.008, IF: 1.938 (2010-es)

AZ ÉRTEKEZÉSTERVEZET ALAPJÁT NEM KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

1. Kasza G, Kollár L, Róth E, Vincze A, Gömöri É. Histological examination of vascular lesions resulting from stent implantation in humans and in comparative experimental animal model. *Acta. Biologica. Hungarica*. 2011. (Közlésre elfogadva) IF: 0.793 (2010-es)
2. Vincze A, Kapás I, Molnár MJ, Kovacs GG. Clinicopathological variability in neurodegeneration with brain iron accumulation. *Ideggyógy. Sz.* 2010. 63:129-35.
3. Vincze A, Herbert B, Kovacs GG. Correlation of tauopathy and alpha-synucleinopathy with tissue lesioning in neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA). 2011. (előkészületben)

AZ ÉRTEKEZÉS TERVEZET TÉMÁJÁBAN KÉSZÜLT POSZTEREK:

1. Vincze A, Mária M, Seress L, Komoly S, Ábrahám H. Comparative study of myelination in the developing murine corpus callosum using immunohistochemistry, electron microscopy and conventional myelin staining. IBRO International Workshop, Debrecen, 2008. január 24-26. Abstract: *Ideggyógy. Sz.* 2008. 61(S1): 69. old.
2. Vincze A, Veszprémi B, Kravják A, Gömöri É, Seress L, Ábrahám H. Myelination in the developing human hippocampal formation. Magyar Idegtudományi társaság XII. konferenciája, Budapest, 2009. január 22-24. Abstract: *Front. Syst. Neurosci.* doi: 10.3389 / conf.neuro. 01.2009.04.081

3. Vincze A, Kravják A, Veszprémi B, Seress L, Ábrahám H. Myelination of the human hippocampal formation in Down-syndrome. IBRO International Workshop, Pécs, 2010. január 21-23. Abstract: Front. Neurosci. doi: 10.3389/conf.fnins.2010.10.00018
4. Vincze A, Reglódi D, Helyes Zs, Hashimoto H, Shintani N, Ábrahám H. Myelination in the pituitary adenylate cyclase activating polipeptid (PACAP) deficient mice. Magyar Idegtudományi Társaság XIII. konferenciája, Budapest, 2011. január 20-22. Abstract: Front. Syst. Neurosci. (megjelenés alatt)

AZ ÉRTEKEZÉS TERVEZET ALAPJÁT NEM KÉPEZŐ POSZTEREK:

1. Vincze A, Budka H, Kovács GG. Correlation of tauopathy and alpha-synucleinopathy with tissue lesioning in neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA). XVIIth International Congress of Neuropathology, Ausztria, Salzburg, 2010. szeptember 11-15. Brain. Pathology. 20(S1):45. old.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, dr. Ábrahám Hajnalka egyetemi docensnek, aki munkámat irányította, mindvégig figyelemmel kísérte és hasznos tanácsokkal látott el.

Köszönöm a PTE ÁOK Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium vezetőjének, dr. Seress László professzornak, hogy munkámat végezhettem a laboratóriumban és munkámban támogatott.

Köszönettel tartozom a PTE ÁOK Neurológiai klinika vezetőjének, dr. Komoly Sámuel professzornak, aki az Idegtudományok Doktori Iskola vezetőjeként lehetővé tette és támogatta doktori munkámat az Iskolában.

Szeretnék köszönetet mondani dr. Mázló Máriának, aki a PTE ÁOK Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium nyugalmazott vezetőjeként pályámon elindított.

Köszönöm dr. Herbert Budka és dr. Kovács Gábor professzornak, hogy lehetővé tették a Bécsi Orvostudományi Egyetem Neurológiai Intézetében megtalálható Down-szindrómás emberi metszetek felhasználását.

Köszönöm dr. Reglődi Dóra és dr. Helyes Zsuzsanna egyetemi docenseknek, hogy biztosították számomra, hogy a PACAP-deficiens egereket dolgozhassam.

Szeretnék köszönetet mondani Papp Emesének az immunhisztokémiában, dr. Lórándné Mishley Juditnak és Domján Gábornének az elektronmikroszkópos metszetek készítésében nyújtott segítségükért. Köszönöm Dolgos Bélának az elektronmikroszkóp használatának és dr. Ács Péternek a Luxol Fast Blue festés technikai háttérének elsajátításában nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek és közeli barátaimnak támogatásukat, és megértésüket.