

**Ektópiás neuronok és szinaptikus reorganizáció
morfológiai vizsgálata temporális lebeny epilepsziás
betegek gyrus dentatusában és az agykéreg alatti
fehérállományában**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Sóki Noémi

Pécsi Tudományegyetem

Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium



Klinikai Idegtudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Komoly Sámuel, egyetemi tanár

Programvezető: Dr. Ábrahám Hajnalka, egyetemi docens

Témavezető: Dr. Ábrahám Hajnalka, egyetemi docens

PTE OGYDHT Pécs, 2024

Tartalomjegyzék

A szövegben és az ábrákon használt rövidítések	6
Összefoglalás.....	8
1 Bevezetés.....	10
1.1 Az epilepsziás roham és az epilepszia betegség.....	10
1.2 Az epilepszia szindrómák osztályozása	11
1.2.1 A temporális lebeny epilepszia	11
1.3 A hippocampus károsodásának lehetséges mechanizmusai.....	12
1.3.1 Elsődleges károsító sérülés.....	12
1.3.2 Lázgörcs	12
1.4 Szövetteni elváltozások temporális lebeny epilepsziában.....	13
1.4.1 Szövetteni elváltozások a hippocampusban	13
1.4.2 Szövetteni elváltozások a neokortexben	18
2 Célkitűzések	23
2.1 A parvalbumin immunreaktív ektópiás neuronok lokalizációja és axonális arborizációja a gyrus dentatusban.....	23
2.2 A kéreg alatti fehérállományban található ektópiás neuronok és szinapszisok vizsgálata	23
Az emberi gyrus dentatus parvalbumin immunreaktív sejtjeinek és axonjainak vizsgálata	24
3 Anyag és módszerek.....	24
3.1 A vizsgált betegek klinikai adatai	24
3.2 A vizsgált minták szövetteni feldolgozása	25
3.2.1 Parvalbumin és NeuN immunhisztokémia.....	25
3.3 Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok	26
3.4 Kvantifikáció.....	27
3.4.1 Normál pozíciójú és ektópiás neuronok számának meghatározása	27
3.4.2 Axonsarjadzás mértékének meghatározása	27
3.4.3 Axonterminálisok eloszlásának vizsgálata immunelektronmikroszkópos preparátumokban.....	28
3.5 Az eredményekhez való személyes hozzájárulás.....	29
4 Eredmények.....	30
4.1 Parvalbumin immunreaktivitás a kontroll gyrus dentatusban	30
4.2 Parvalbumin immunreaktivitás különböző etiológiájú TLE betegekben.....	33

4.3	Az ektópiás parvalbumin immunreaktív sejtek és a parvalbumin immunreaktív axonok sarjadzása	36
4.4	Korreláció a parvalbumin immunreaktív sejtek, az axonsarjadzás és a betegek klinikai adatai között	39
4.5	Szinapszisok a gyrus dentatus szemcsesejtrétegében és a molekuláris rétegben.....	42
5	Megbeszélés és következtetések	46
5.1	Epilepsziás betegek hippocampusában található morfológiai elváltozások a parvalbumin immunreaktív sejtek és axonok tekintetében.....	46
5.1.1	A vizsgálatunk limitációi	46
5.1.2	Parvalbumin immunreaktív axonok sarjadzása, az ektópiás parvalbumin immunreaktív idegsejtek jelenléte és a betegek klinikai adatai	49
5.1.3	Az ektópiás parvalbumin immunreaktív sejtek és axonok eredete	50
5.1.4	Lehetséges funkcionális következmények	52
	Fehérállományi szinapszisok vizsgálata emberi mintákban.....	54
6	Anyag és módszerek.....	54
6.1	A vizsgált betegek klinikai adatai	54
6.2	A vizsgált kontrollok klinikai adatai	55
6.3	A vizsgált fehérállományi minták szövettani feldolgozása.....	56
6.4	Szinaptofizin immunhisztokémia	57
6.5	NeuN immunhisztokémia.....	57
6.6	A fehérállományi szinapszisok transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálata...	58
6.7	Kvantifikáció	59
6.7.1	Neuronok számának meghatározása	59
6.7.2	A szinaptofizin optikai denzitása	59
6.8	A betegek neuropszichológiai vizsgálata	60
6.9	Statisztikai elemzés	61
6.10	Az eredményekhez való személyes hozzájárulás.....	61
7	Eredmények.....	62
7.1	Szinaptofizin immunreaktivitás a fehérállományban.....	63
7.2	A szinaptofizin immunreaktivitás kvantifikációja a fehérállományban.....	65
7.3	A neuronszám és a szinaptofizin immunreaktivitás optikai denzitása közötti összefüggés a neokortex alatti fehérállományban	67
7.4	A szövettani eredmények összefüggése a TLE betegek klinikai és kognitív adataival	68
8	Megbeszélés és következtetések	75
8.1	Technikai megfontolások és a vizsgálatunk korlátai.....	75
8.2	Neuronok és szinapszisok a fehérállományban.....	77

9	Eredmények összefoglalása.....	81
9.1	Az epilepsziás betegek gyrus dentatusában talált eredmények összefoglalása.....	81
9.2	Az epilepsziás betegek neokortex alatti fehérállományában talált eredmények összefoglalása	81
10	Irodalomjegyzék.....	83
11	Publikációs lista.....	93
11.1	Értekezéssel kapcsolatos közlemények	93
11.2	Az értekezés alapját nem képező közlemények	93
11.3	Az értekezés alapját képező konferencia prezentációk	93
11.4	Egyéb prezentációk	95
12	Köszönetnyilvánítás	96

A szövegben és az ábrákon használt rövidítések

AD – Alzheimer-kór

AED – anti-epileptic drug, epilepszia ellenes gyógyszer

AHE – amygdalo-hippocampectomia

ATLE – anterior temporális lobektómia

AVLT – Auditoros Verbális Tanulási Teszt

B – bal

CA – cornu Ammonis, Ammon-szarv

CA1 – az Ammon-szarv régiója

CA3 – az Ammon-szarv régiója

CA3c – az Ammon-szarv régiója

CB – calbindin

CP – cortical plate, kortikális lemez

DAB – diaminobenzidin

EEG – elektroencefalográfia

F – férfi

FCD – focal cortical dysplasia, fokális kortikális diszplázia

FSE – febrile status epilepticus, lázgörcs okozta status epilepticus

GD – gyrus dentatus

GM – grey matter, szürkeállomány

HS – hippocampus sclerosis

ILAE – International League Against Epilepsy, Nemzetközi Epilepsziaellenes Liga

IPI – initial precipitating injury, elsődleges károsító sérülés

IZ – intermedier zóna

J – jobb

KOKI – Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

MCD – malformation of cortical development, kéregfejlődési rendellenesség

MRI – magnetic resonance imaging, mágneses rezonancia képalkotás

MTS – mesialis temporális sclerosis

MZ – marginális zóna

N – nő

NeuN – neuronális nukleáris antigén

NeuN+ – NeuN immunreaktív

PB – phosphat buffer, foszfát puffer

PFA – paraformaldehid

PTE – Pécsi Tudományegyetem

PTE ÁOK KK – Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Klinikai Központ

PV – parvalbumin

PV+ – parvalbumin immunreaktív

ROCF – Rey-Osterrieth Complex Figure teszt, Rey-Komplex Figura teszt

SD – standard deviáció

SP – subplate

SVZ – szubventrikuláris zóna

SYN – szinaptofizin

SYN+ – szinaptofizin immunreaktív

TB – Tris buffer, Tris-puffer

TEM – transzmissziós elektronmikroszkóp

TLE – temporális lebeny epilepszia

VZ – ventrikuláris zóna

WM – white matter, fehérállomány

Összefoglalás

Jelen tanulmányunkban két témát dolgoztunk fel. Mindkét kutatásban különböző etiológiájú, terápiareszisztens temporális lebeny epilepsziás (TLE) betegek műtéti rezekált szöveteiben vizsgáltuk az ektópiás neuronokat, és a szinaptikus kapcsolatokat.

A kutatásunk első felében a TLE betegek gyrus dentatusában (GD) lévő parvalbumin immunreaktív (PV+) sejteket és axonokat vizsgáltuk. Az MRI eredmények alapján öt betegcsoportot és egy kontrollcsoportot alakítottunk ki. A hippocampus sclerosisos (HS) betegek csoportjában a hilaris PV+ sejtek számának szignifikáns csökkenését láttuk, valamint nagyszámú ektópiás PV+ neuron volt kimutatható a GD molekuláris rétegében. Az ektópiás / normális pozíciójú sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt HS-ban, mint más TLE csoportokban. HS-ban a PV+ axonok sarjadzása gyakran volt látható a molekuláris rétegben, valamint a sarjadzás mértéke szignifikánsan magasabb volt HS-ban, mint a többi csoportban. A PV+ axonok sarjadzását gyakrabban figyeltük meg olyan betegeknél, akiknek gyermekkorukban lázgörcsük volt. Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk az axonsarjadzás mértéke és az ektópiás / normális pozíciójú PV+ sejtek aránya között. Az elektronmikroszkópos vizsgálat kimutatta, hogy a sarjadzó PV+ axonok a szemcsesejtek proximális és disztális dendritjein, valamint dendrittüskéin végződnek. Eredményeink arra utalnak, hogy a PV+ neuronok célstruktúrái megváltoznak HS-ban, ami hozzájárul a TLE-ban ismert szinaptikus átrendeződés (remodelling) jelenségéhez.

Vizsgálataink másik részében a fehérállományban található idegsejtekkel foglalkoztunk. Korábbi saját, valamint mások tanulmányai szignifikánsan magasabb neuronszámot mutattak ki a neokortex alatti fehérállományban (WM) TLE betegekben, mint a kontrollokban. Jelen munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon a WM neuronjai részét képezik-e a neuronális hálózatnak. Ezért a szinapszisok eloszlását és denzitását a TLE betegek neokortex alatti szövetében tanulmányoztuk. Kontrollként nem epilepsziás betegek temporális lebenyének neokortex alatti WM-át használtuk. A szinapszisokat és a neuronokat immunhisztokémiai módszerrel tettük láthatóvá szinaptofizin (SYN) és neuronális nukleáris antigén (NeuN) elleni antitestek felhasználásával. A preszinaptikus terminálisokban található SYN jelenlétét elektronmikroszkóppal igazoltuk. A SYN denzitás a TLE betegek WM-ában szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollokban, valamint szignifikáns pozitív összefüggést találtunk a SYN denzitás és a WM neuronok sűrűsége között. A betegek kognitív tesztjeinek eredményeit és a klinikai adataikat összehasonlítottuk a neuronok sűrűségével és a szinapszisok denzitásával. A neuronsűrűség és a SYN denzitás szignifikánsan korrelált a TLE betegek

verbális memóriájának pontszámaival. A kedvező posztoperatív kimenetelű TLE betegek rezekátumaiban magasabb neuronsűrűséget és SYN denzitást figyeltünk meg, bár a posztoperatív kimenetel nem korrelált szignifikánsan a szövettani adatokkal. Eredményeink arra utalnak, hogy a TLE betegek WM neuronjai nagyszámú szinaptikus bemenetet kapnak, valamint, hogy a WM neuronok az epilepsziás neuronhálózat részei lehetnek és feltehetően felelősek a rohamok kialakulásáért és fenntartásáért.

1 Bevezetés

1.1 *Az epilepsziás roham és az epilepszia betegség*

Epilepsziás rohamról akkor beszélünk, ha egy neuron populáció kóros, szinkronizált kisülése történik, melynek következtében szubjektív, vagy akár objektív klinikai jelenségek észlelhetők. Epilepszia, vagy epilepszia betegség akkor áll fenn, ha a betegnél ismétlődő, spontán (nem provokált) epilepsziás rohamok jelentkeznek.

A teljes lakosság 0,5-1%-a szenved epilepszia betegségben epidemiológiai becslések szerint (Janszky és Komoly, 2012). Ezzel a prevalenciával számolva ma Magyarországon 50-60 ezer különböző korú epilepsziás ember él. További 5%-nak van élete során legalább egyszer akut vagy alkalmi (provokált) epilepsziás rohama (Janszky és Komoly, 2012). Ez utóbbit több faktor kiválthatja, Magyarországon a felnőtt lakosság körében a leggyakoribb kiváltó ok az alkoholemegvonás, míg gyerekeknél a későbbiekben részletesebben ismertetett lázgörcs.

Az epilepszia diagnózisát megerősítheti a pozitív elektroencefalográfiás (EEG) lelet, de a negatív lelet nem zárja ki a betegség fennállását, azaz az EEG eredménye csak irányadó. Ha a rutin vizsgálat (hiperventillációs és fény stimulációs vizsgálat) nem vezet eredményre, az epileptiform potenciálok megjelenésének valószínűségét növeli az alvásmegvonás után készített EEG, valamint a 24 órás EEG. További lehetőség a videó-EEG monitorozás, mely az epilepsziás roham differenciáldiagnózisában a legfontosabb vizsgálat. A képalkotó modalitások közül a legfontosabb az agyi mágneses rezonancia képalkotó (magnetic resonance imaging; MRI) vizsgálat, melynek elvégzése minden felnőttkorban induló epilepszia esetén kötelező (Janszky és Komoly, 2012).

Az epilepsziás rohamokat két nagy csoportra oszthatjuk: a parciális és generalizált rohamokra. A parciális rohamokat fokális indulású rohamoknak is nevezik, mivel egy adott kéregterületről indulnak ki. Természetesen ezekben az esetekben is előfordulhat, hogy a roham másodlagosan generalizálódik. A generalizált rohamok esetén a roham kiindulása nem lokalizálható (Janszky és Komoly, 2012).

A parciális rohamokat szimplex és komplex parciális csoportokra oszthatjuk az alapján, hogy tudati változást okoznak-e (komplex) vagy sem (szimplex). A szimplex parciális rohamok közé tartoznak a klónusos rohamok, a szomatoszenzoros rohamok és az epilepsziás aurák. Az utóbbiak leggyakrabban temporális lebeny epilepsziában (TLE) fordulnak elő (Janszky és Komoly, 2012).

1.2 *Az epilepszia szindrómák osztályozása*

Az epilepszia szindrómák klasszifikációja az elmúlt évtizedekben több változáson ment keresztül. A Nemzetközi Epilepsziaellenes Ligának (International League Against Epilepsy, ILAE) 1989-ben készült el a klinikai gyakorlatban máig használatos klasszikus besorolása, majd 2010-ben és 2017-ben az új epilepsziakutatási eredmények miatt új elnevezéseket javasoltak (Hollódy, 2019). A korábbi osztályozások azon alapultak, hogy melyik lebenyből indul ki a roham. Mivel az új besorolás szerint az epilepszia hálózati megbetegedésnek tekintendő, neokortikális, thalamokortikális, limbikus és agytörzsi epilepsziákról beszélhetünk (Hollódy, 2019).

Munkánk során a klinikusokkal folytatott szoros együttműködés miatt az általuk a mai napig használt ILAE 1989-es klasszifikáció elnevezéseit használtuk. Továbbá a vizsgált betegek neurológiai vizsgálatait és a műtéteiket, valamint munkánk nagy része korábbi években zajlottak, az adott években éppen érvényben levő legújabb beosztások eltérőek lennének egymástól, ezért is a régebbi felosztást és terminológiát részesítettük előnyben. Az aktuális beosztásból annyit emelnénk ki, hogy a TLE jelenleg az epilepszia sebészeti szindrómák közé van sorolva (Hollódy, 2019).

1.2.1 *A temporális lebeny epilepszia*

A TLE a leggyakoribb a fokális epilepszia fajta, a felnőttkori gyógyszer-rezisztens epilepsziák 60-70%-a és leggyakrabban 5 és 18 éves kor között kezdődik (Halász, 1997; Janszky és mtsai, 2004; Janszky és Komoly, 2012).

Az epileptogén régió elhelyezkedése alapján a TLE-t a klinikai gyakorlatban mesialis és laterális formára osztjuk fel, az utóbbit neokortikálisnak is hívja az irodalom (French és mtsai, 1993; Ebner, 1994). A mesialis temporális sclerosist (MTS) a temporális kéreg mediális (mesialis) struktúráinak, a jelentős mértékű sejtpusztulás következtében kialakuló zsugorodása és „hegesedése” okozza. A legnagyobb sejtpusztulás a hippocampusra jellemző, ami HS-ban jelenik meg, melyről később részletesebben lesz szó. Itt csak megjegyezzük, hogy a felnőttkori gyógyszer-rezisztens TLE háttérében a HS a leggyakoribb hisztopatológiai rendellenesség (Cavanagh és Meyer, 1956; Bruton, 1988; de Lanerolle és mtsai, 2003; Blümcke és mtsai, 2012; Blümcke és mtsai, 2022).

A TLE háttérében nem csak HS, hanem intrakraniális daganat, súlyos koponya trauma vagy stroke utáni állapot és agykérgi fejlődési rendellenesség (diszgenézis) is állhat (Janszky és Komoly, 2012). A TLE háttérében álló patológia pontos meghatározására a mesiotemporális struktúrákra centrált MRI alkalmas. EEG-n rendszerint temporális tüskefókusz látható.

A TLE tünettanában a korábban említett aurák előfordulhatnak izoláltan, de követheti őket komplex parciális roham is, a másodlagosan generalizált tonusos-clonusos rohamok ritkák. Emellett fontos interictális tünet a memóriazavar, mely a hippocampus károsodásával állhat összefüggésben.

1.3 A hippocampus károsodásának lehetséges mechanizmusai

1.3.1 Elsődleges károsító sérülés

Az úgynevezett elsődleges károsító sérülés (initial precipitating injury, IPI) olyan nem-specifikus noxák közös elnevezése, melyek csecsemő- vagy kisgyermekkorban érik a beteget. Ilyen lehet például a születéskori vagy gyermekkori fejtrauma, a meningitis, az encephalitis vagy a lázgörcs, mely a leggyakoribb. A kezdeti károsodást követően szinaptikus reorganizáció indul el a hippocampusban, mely egy idő után a HS kialakulásához vezet (Maher és McLachlan, 1995).

1.3.2 Lázgörcs

A lázgörcs során olyan elektromos aktivitás keletkezik az agyban, melyek generalizált, egész testre kiterjedő rángásokat okoznak. Ez a rohamfajta leggyakrabban fél és öt éves kor közötti gyermekekben fordul elő 38°C feletti láz esetén. A lázgörcs a gyermekek 2%-5%-ában jelenik meg (Patterson és mtsai, 2013).

Lá zgörcs vonatkozásában következő típusokat különböztetjük meg. Az egyszerű lázgörcs magas láz mellett, generalizált formában zajlik, kevesebb, mint 10 percig tart, spontán oldódik és aznap nem ismétlődik meg (Liptai, 2019). Ez a típus 1-2%-os rizikóval jár a későbbi epilepszia betegség kifejlődésére vonatkozóan (Hollódy, 2016). A másik típus a komplikált lázgörcs, mely alacsony láz vagy hőemelkedés mellett, több mint 10 percig tart és egy 24 órás periódusban több, mint egy roham zajlik le. Ez a típus idősebb életkorban, 7 éves kor után jelentkezhet, és fokális indulásra utaló támpontot adhat. A később kialakuló epilepszia rizikója itt jóval magasabb, 10-15% (Hollódy, 2016).

Az első lázgörcs után az ismétlődés 30%-ban fordul elő az arra hajlamos gyermekekben, leginkább magas lázat okozó gyerekkori betegségek, fertőzések során (Hollódy, 2016). A legsúlyosabb formája a lázgörcs okozta status epilepticus (febrile status epilepticus, FSE), mely több mint 30 percig tart és magas rizikót jelent epilepszia betegség kialakulására (French és mtsai, 2012).

A lázgörcs, rendszerint a komplikált lázgörcs, feltehetően szerepet játszik egy későbbi életkorban jelentkező mesialis TLE kifejlődésében. A mesialis TLE betegek 50-75%-ának szerepel gyermekkori lázgörcs az anamnézisében (Bóné, 2015), bár a pontos összefüggés még nem tisztázott (French és Kuzniecky, 2014; Wieser és mtsai, 2004). Azokat az eseteket, ahol a HS okozta TLE-t lázgörcs előzte meg, az epilepszia kezdete szerint három különböző korcsoportra lehet osztani. Ez alapján a három életkori csúcs 5,5 (gyermekkori), 15,3 (serdülőkori) és 26,7 (felnőttkori) év volt (Janszky és mtsai, 2004).

Auer és mtsai. (2008) egészséges felnőttekben vizsgálták a hippocampus elváltozásait 15 évvel az egyszerű lázgörcs lezajlása után. A kétoldali hippocampus átlagos térfogata kisebb volt azokban a felnőttekben, akiknek az anamnézisében egyszerű lázgörcs szerepelt, azokhoz képest, akiknél nem fordult elő lázgörcs (Auer és mtsai, 2008). Az egyszerű lázgörcs okozta hippocampalis abnormalitások férfiakban kifejezettebbek voltak. Bár az egyszerű lázgörcs nem nevezhető benignus eseménynek, mint ahogyan azt korábban gondolták, Auer és mtsai. (2008) eredményei arra utalnak, hogy a lázgörcs okozta hippocampus rendellenességek nem szükségszerűen epileptogének. Shinnar és mtsai. (2012) leírták, hogy a FSE esetében a gyermekeknél fennáll a hippocampus akut sérülésének kockázata. A korábban FSE-t átélt gyermekek 11,5%-ának hippocampusában MRI vizsgálattal kórosan megnövekedett T2 jelet mutattak ki a roham után 72 órán belül (Shinnar és mtsai, 2012). Az FSE-t átélt gyermekek csoportjában a hippocampális abnormalitás sokkal gyakoribb volt (10,5%), mint az FSE-t át nem élt gyermekeknél (2,1%). Egy másik tanulmányban az FSE-t átélt gyermekek 9,7%-ában találták az akut szakaszban a hippocampus térfogatnövekedését, valamint hippocampális T2 hiperintenzitást találtak, mely a Sommer-szektorban volt a legerősebb (Lewis és mtsai, 2014). Egy évvel később, 14 olyan gyermeknél, akinél az FSE után akut hippocampális sérülés jelei látszóttak, 10-ben a HS radiológiai jeleit, 12 betegnél pedig csökkent hippocampus térfogatot találtak.

1.4 Szöveti elváltozások temporális lebeny epilepsziában

1.4.1 Szöveti elváltozások a hippocampusban

1.4.1.1 A hippocampus anatómiája

Makroszkóposan a hippocampus három fő része a temporális lebeny csúcsa felé néző fej, a középső része a test, valamint a fark. A hippocampus mediális oldalán fut a fimbria fornicis, mely a farknál a fornixba megy át. Ebben a hippocampusból kimenő és bemenő rostok futnak. Egy nagyobb egységet jelölő elnevezés, a formatio hippocampalis magában foglalja a

szomszédos subiculumot, presubiculumot, parasubiculumot és az entorhinális kérget is, melyek közös makroszópos elnevezése a parahippocampalis gyrus. A hippocampus makroszkópos és egyben mikroszkópos felépítését két fő sejtréteg alkotja, melyből mediálisabban a GD, laterálisabban pedig az Ammon-szarv (cornu Ammonis, CA) van. A GD-tól az entorhinális kéregig található agykérgi területek az archikortex részei, mely mikroszkóposan eltér a neokortex hatrétegű szerkezetétől. A GD, az Ammon-szarv és a többi archikortikális kéregterület szoros anatómiai és funkcionális egységet alkot. Ennek megértéséhez mikroszkóposan is ismernünk kell a GD és az Ammon-szarv felépítését és működését.

Emberben a GD 90%-át szorosan egymás mellett elhelyezkedő, serkentő szemcsesejtek alkotják, melynek száma 11-20 millió között van (Simic és mtsai, 1997). Kis, kerek sejttestjeik a szemcsesejt rétegben (stratum granulosum) helyezkednek el, dendritjeik erre a sejtrétegre merőlegesen futnak a GD molekuláris rétegében (stratum moleculare). Axonjaikat moharostoknak hívjuk, axon-végződéseik a moha-terminálisok. A GD további megkülönböztetett része a hilus, melyben szintén serkentő jellegű sejtek, a mohasejtek találhatóak. Sejttestüket és proximális dendritjeiket komplex tüskék borítják, innen ered az elnevezésük. A GD-ban a serkentő sejteken kívül található még gátló interneuronok is (Freund és Buzsáki, 1996).

Az Ammon-szarv sejtjeinek 90%-a serkentő piramisesejt, 10%-a elszórtan elhelyezkedő interneuron (Freund és Buzsáki, 1996; West és Gundersen, 1990; Simic és mtsai, 1997). Az Ammon-szarvat a piramisesejtek morfológiája és kapcsolatrendszereik alapján három régióra osztjuk fel: a subiculummal szomszédos terület a CA1, a GD hilusa mellett a CA3 helyezkedik el, míg a köztes terület a CA2. A piramisesejtek sejttestjei az Ammon-szarv piramisesejt-rétegében (stratum pyramidale) találhatóak, apikális dendritjeik a stratum radiatum felé haladnak, majd a stratum lacunosum-moleculareban elágaznak. A bazális dendritek elágazódásai a stratum oriensben vannak, valamint a piramisesejtek axonjai is ebbe az irányba lépnek ki.

A hippocampus kapcsolatrendszerének tekintetében beszélhetünk a GD és az Ammon-szarv belső kapcsolatairól, valamint az afferens és efferens kapcsolatokról. A hippocampus afferens kapcsolatait feloszthatjuk kérgi és kéreg alatti csoportokra. A formatio hippocampalis valamennyi multiszenzoros asszociációs területtől kap kérgi bemenetet, mely nagyrészt az entorhinális kérgen keresztül éri el a hippocampust. Az archikortexben egyirányú kapcsolatok dominálnak, szemben a neokortexben megfigyelt reciprok kapcsolatokkal. A hippocampus belső, három szinapsziszból álló, ún. triszinaptikus kapcsolatának eredő sejtjei az entorhinális kéreg II. és III. rétegében található piramisesejtek. Ezen sejtek axonjai alkotják a perforáns

pályát, mely a subiculumon és a fissura hippocampin keresztülhaladva jut el a GD szemcsesejtjeihez. A perforáns pálya a GD molekuláris rétegében, a szemcsesejtek dendritjein végződik. A szemcsesejtek axonjai, a korábban említett moharostok, mohaterminálisaikkal a mohasejteket és a CA3 piramissejtek apikális és bazális dendritjeit innerválják. A CA3 piramissejtek axonkollaterálisai (Schaffer-kollaterálisok) a CA1-hez futnak, ahol az ott található piramissejtek apikális dendritjein végződnek. A CA1 piramissejtjeinek axonjai rendezett kötegekben futnak vissza az entorhinális kéreg felé, az V. rétegbe, valamint a subiculumhoz. A hippocampus nagyszámú kéreg alatti agyterülettel létesít afferens és efferens kapcsolatot, mint például a septum, a hypothalamus, a corpus mamillare, a locus coeruleus, a formatio reticularis és az amygdala.

1.4.1.2 A hippocampus sclerosis szövettana

Az epilepsziás betegek agyában található elváltozásokat összefoglalóan epilepsziás reorganizációnak nevezik, mely nem csak sejtszövet pusztulását, hanem az intra- és extracelluláris biokémiai, fiziológiai és strukturális jellegzetességeket is jelzi. Ezek a jelenségek az életben maradó sejteket érintik, megváltoztatva az adott agyi régiókat, vagy akár az egész idegrendszernek a működését (Ben-Ari, 1987; Represa és mtsai, 1995; Sloviter, 1999; Ben-Ari, 2001). TLE esetén a hippocampus és a temporális lebenyi struktúrák sejtszintű és neuronhálózat szintű átalakulásai állhatnak az epilepsziás rohamok hátterében. Sejtszintű elváltozások például a sejtpusztulás, sejtosztódás, sejt vándorlás, morfológiai torzulások, gliózis, neurokémiai markertartalom megváltozása, míg az axonok pusztulása, sarjadzása és a sejtek közötti kapcsolatok megváltozása neuronális hálózatszintű változásokat hoznak létre.

Ismert, hogy HS-sal járó TLE esetén a hippocampusban egyes sejtszöveteknél sejtpusztulás figyelhető meg (Babb és mtsai, 1989). Ennek következtében a temporális kéreg mediális (mesialis) struktúráinak a jelentős mértékű zsugorodása és sclerosisa jön létre. A legnagyobb sejtpusztulás a hippocampusra jellemző. Sommer 1880-ban leírta a HS-ban előforduló piramissejt pusztulást a subiculumban, a CA1- (Sommer-szektor) és CA3c-régiókban (end-folium sclerosis). A CA2- és a CA3a, b-régiók ún. rezisztens régiók, ahol a piramissejtek nagymértékben túlélnek (Margerison és Corsellis, 1966). Az epilepsziás hippocampusban a gátlósejtek többsége megmarad, bár a calretinin- és szomatosztatin-tartalmú gátló sejtszövetek a rohamok hatására szintén elpusztulnak mind állatkísérletes modellben (de Lanerolle és mtsai, 1989; Maglóczy és Freund, 1993), mind emberben (Maglóczy és mtsai, 2000). A hilaris interneuronok számbeli csökkenésének egy részét ezeknek a sejteknek a

pusztulása okozza. A hiláris mohasejtek HS-ban a piramissejtekhez hasonló mértékben pusztulnak (Blümcke és mtsai, 1999; Seress és mtsai, 2009). A GD-ban található PV+ gátlósejtek száma is lecsökken epilepsziás betegekben, míg a megmaradt PV+ sejtek sűrű axonfonadékot hoznak létre a megmaradt principális sejtek sejttestje és axon-incipális szegmentuma körül (Zhu és mtsai, 1997; Wittner és mtsai, 2001). A CA1 és a CA3c régiók piramissejtjeinek és egyes interneuronok nagyarányú pusztulását az asztrogliák számbeli növekedése kíséri (gliózis), amely alapján a hippocampusban található morfológiai elváltozásokat Margerison és Corsellis (1966) HS-nak nevezték el.

Epilepsziában a sejtpusztulás mellett egyes sejtek osztódását is megfigyelték a hippocampusban. A gliasejtek (pl. astrocyta és microglia sejtek) osztódása mellett egyes szerzők fokozott szemcsesejtképződésről számoltak be melynek forrása feltehetően a szemcsesejtréteg alatt elhelyezkedő kis számú progenitor sejt (Thom és mtsai, 2005; Parent és mtsai, 1997). Bár a képződött sejtek nem pótolják az elpusztultakat, valószínűleg részt vesznek a GD hiperaktív működésében epilepsziában (Parent, 2002; Scharfman, 2004). Fontos megemlíteni, hogy Fahrner és mtsai. (2007) nem találtak több osztódó sejtet HS-hoz társuló TLE-ban.

Epilepsziás mintákban megfigyeltek egy, a szemcsesejteket érintő jelenséget, a diszperziót, mely a szemcsesejtek rendellenes elhelyezkedését jelenti a szemcsesejtréteg feletti molekuláris rétegben (Houser, 1990). Ez a jelenség a sclerotikus hippocampusban gyakori. Egyes feltételezések szerint a szemcsesejtek rendellenes elhelyezkedése (diszperziója) fejlődési rendellenesség, ami kiváltja az epilepsziás rohamokat, ennek ellenére sok TLE beteg hippocampusában nem találtak szemcsesejt diszperziót (Houser, 1990).

A kalcium-kötő fehérjéket tartalmazó interneuronokat érintő morfológiai változások HS-ban széleskörűek. Ismert a calbindin (CB) tartalmú interneuronok kontroll mintákban megfigyelhetőtől eltérő megjelenése a GD hilusában (Maglóczy és Freund, 2005). A szemcsesejtek morfológiai jellegzetessége, hogy TLE-ban, függetlenül a betegség etiológiájától (tumor, kérgi malformáció, HS) csökken bennük a CB kalcium-kötő fehérje expressziója (Maglóczy és mtsai, 1997; Ábrahám és mtsai, 2011). Ezen kívül megfigyelték a PV+ interneuronok számának csökkenését a CA3c és a hilus területén (Zhu és mtsai, 1997), valamint a calretinin tartalmú interneuronok számának a csökkenését is (Tóth és mtsai, 2010).

További morfológiai jelenség az axonsarjadzás, melynek következtében az érintett területen szinaptikus reorganizáció történik, a hippocampus külső és belső kapcsolatrendszere megváltozik (de Lanerolle és mtsai, 1989; Houser és mtsai, 1990; Represa és mtsai, 1990; Sutula és mtsai, 1992; Franck és mtsai, 1995; Mathern és mtsai, 1995; Babb, 1999; Lehmann

és mtsai, 2000). A szemcsesejt axonok sarjadzásának eredményeként a moharostok nemcsak a hilus és a CA3 neuronjain végződnek, hanem a szemcsesejtek dendritjein (Houser és mtsai, 1990; Cavazos és mtsai, 1991; Mathern és mtsai 1994; Franck és mtsai, 1995). A CA1 régió piramissejtjeinek axonsarjadzása fokozza a serkentést a szomszédos sejteken (Lehmann és mtsai, 2000). A subicularis axonok, és a supramamilláris pálya sarjadzása miatt nő a hippocampus excitabilitása (Borhegyi és Leranth, 1997; Lehmann és mtsai, 2000; Maglóczky és mtsai, 2000). Ezen felül a gátló neuronok szinaptikus reorganizációja is fontos. A CB-tartalmú axo-dendritikus gátló sejtek axonsarjadzása a gátló neuronok gátlásán keresztül fokozza a serkentést (Wittner és mtsai, 2002). Emellett HS esetén több PV+ axo-axonikus gátlósejt terminálisa látható a szemcsesejtek axon-iniciális szegmentumán, mint kontrollban (Wittner és mtsai, 2001).

1.4.1.3 A hippocampus sclerosis szövettani csoportosítása

Blümcke és mtsai. (2013) az ILAE munkacsoportjaként a HS-t három csoportba sorolják a szövettani jellegzetességeik alapján. A HS ILAE I-es típusban súlyos neuronpusztulás és reaktív gliózis látható a CA1 régióban és a hilusban (Blümcke a hilusra a CA4 elnevezést használja). Ezzel szemben a HS ILAE II-es típusban csak a CA1 régióban, a HS ILAE III-as típusban pedig csak a hilusban láthatók az elváltozások. Voltak TLE betegek, akiknek az eltávolított hippocampusában sem neuronszám csökkenés, sem reaktív gliózis nem volt megfigyelhető (no-HS csoport).

A HS ILAE I-es típusú elváltozással kapcsolatosan kimutatták, hogy gyakran fordul elő olyan betegek esetén, akiknél az anamnézisben 5 éves kor előtti IPI szerepel (Blümcke és mtsai, 2013). Ezekben az esetekben a korai betegségkezdés és a kedvező műtét utáni kimenetel is megfigyelhető (Blümcke és mtsai, 2013).

1.4.1.4 A hippocampus sclerosis kezelése

Az epilepsziás betegeknek csak 70-75%-a válik rohammentessé a megfelelő antiepileptikum hatására, a betegek 25-30%-a azonban több antiepileptikum kombinációjával történő kezeléskor sem válik rohammentessé. Ezeket az eseteket gyógyszer-rezisztens epilepsziának nevezzük. Ilyen esetben a rohamokért legtöbbször egy körülhatárolható agyi elváltozás (például HS, diszplázia vagy tumor) a felelős, mely műtétilag eltávolítható. Gyógyszer rezisztencia esetében a műtéti kezelés az esetek 30-40%-ában szünteti meg a rohamokat (Janszky és Komoly, 2012).

A felnőttkori gyógyszer-rezisztens epilepsziák 60-70%-a TLE (Janszky és mtsai, 2001). A műtéti kezelés a TLE esetében a legeredményesebb: amennyiben az epilepsziáért felelős agyi terület (epilepsziás fókusz) körülhatárolható és nem érint olyan területet, melynek eltávolítása hiánytünetet okoz (eloquens terület), akkor a műtéti eltávolítása után a betegek 60-90%-a válik rohammentessé (Janszky és Komoly, 2012).

Több műtéti módszer is választható a TLE kezelésére, leggyakrabban az amygdalo-hippocampectomia (AHE) és az anterior temporális lobektómia (ATLE). A két műtéti módszer kimenetelének összehasonlítására Bate és mtsai. (2007) készítettek egy tanulmányt. 114 beteget vizsgáltak meg egy évvel a műtétjük után, és azt találták, hogy a betegek 40%-a vált teljesen rohammentessé. A jó műtéti kimenetel (teljesen rohammentes és majdnem rohammentes állapot) ATLE esetén szignifikánsan gyakrabban fordult elő (66%), mint azoknál, akiknél AHE történt (44%) (Bate és mtsai, 2007).

A Pécsi Epilepszia Centrumban is készült egy tanulmány epilepsziasebészeti beavatkozásokon átesett betegek posztoperatív eredményeinek felmérésére. 72 rezekciós beavatkozást végeztek, melynek következtében a betegek 76%-a vált tartósan rohammentessé. A betegek csoportjainak foglalkoztatottsági adatait is vizsgálták. A rohammentes betegek 67%-át, míg a nem rohammenteseknek mindössze a 19%-át foglalkoztatták (Lőrincz és mtsai, 2019).

Látjuk, hogy a különböző munkacsoportok eredményei eltérhetnek a műtét utáni rohammentességet illetően. Az, hogy a betegek rohammentessé válnak a műtét után vagy sem, több tényezőtől függ, melyek a következők: 1. MRI-vel igazolt HS, 2. anamnézisben másodlagosan generalizálódó konvulzív roham, 3. pszichiátriai komorbiditás, 4. tanulási nehézségek, 5. extratemporálisan végzett idegsebészeti műtét, 6. késői életkorban megjelenő epilepszia betegség, 7. több antiepileptikum használata (Bell és mtsai, 2017). Az epilepszia műtéten átesett betegek posztoperatív osztályozására többek között Jerome Engel javasolt egy rendszert, mely az „Engel Epilepsy Surgery Outcome Scale” elnevezést kapta (Durnford és mtsai, 2011), és amelyet munkánk során mi is használtunk.

1.4.2 Szöveti elváltozások a neokortexben

1.4.2.1 Neuronok a kéreg alatti fehérállományban

Ismert, hogy a kéreg alatti WM-ban egészséges emberben is alacsony számban idegsejtek találhatóak (Mrzljak és mtsai, 1988; Chun és Shatz, 1989; Kostovic és Rakic, 1990). Bár a szubkörtikálisan és a WM mélyebb részein elhelyezkedő un. interstitialis neuronok szerepe felnőttekben még nem tisztázott, jelenlétük kapcsolatba hozható számos neurológiai és pszichiátriai betegséggel, többek között skizofréniával, Alzheimer-kórral és epilepsziával is

(Hardiman és mtsai, 1988; Kowall és Beal, 1988; Akbarian és mtsai, 1993; Emery és mtsai, 1997; Kasper és mtsai, 1999; Tao és mtsai, 1999; Thom és mtsai, 2001; Van de Nes és mtsai, 2002; Kirkpatrick és mtsai, 1999, 2003; Eastwood és Harrison, 2005; Liu és mtsai, 2014). TLE-ban nagyszámú WM neuron található a temporális neo- és archikortexben (Emery és mtsai, 1997; Kasper és mtsai, 1999; Thom és mtsai, 2001; Liu és mtsai, 2014; Richter és mtsai, 2016). Egyelőre nem eldöntött a kérdés, hogy a WM neuronok emelkedett száma hozzájárul-e az epilepsziás roham kialakulásához vagy fenntartásához, és az sem ismert, hogy milyen szinaptikus kapcsolatokkal rendelkeznek.

A WM neuronok láthatóvá tétele a sejtekben expresszált fehérjék kimutatása alapján lehetséges. A NeuN valamennyi idegsejtben expresszálódik, ezért általános neuronális biomarkerként használható és a NeuN immunhisztokémiát széles körben alkalmazzák a neuronok azonosítására szövettenyészetben és metszeteken. A NeuN-immunreaktivitás (NeuN+) érett neuronokon figyelhető meg (Mullen és mtsai, 1992; Wolf és mtsai, 1996; Sarnat és mtsai, 1998; Gusel'nikova és mtsai, 2015).

1.4.2.1.1 Az agykéreg fejlődése és a subplate

A WM neuronok jelenlétének megértéséhez ismernünk kell az agykéreg fejlődésének egyes fázisait, mivel a WM neuronok egy része eredetük szerint lehet a fejlődés során átmenetileg jelenlévő subplate (SP) sejtpopuláció maradványa, másik részük vándorlásban megakadt idegsejt (Mrzljak és mtsai, 1988; Chun és Shatz, 1989; Kostovic és Rakic, 1990; Richter és mtsai, 2016). Az agykéreg fejlődésének fő jellemzője, hogy a posztmitotikus neuronok, melyekből a kéreg principális neuronjai, a serkentő piramissejtek alakulnak ki, az agykamrát határoló proliferatív régióból, a ventrikuláris zónából (VZ) származnak, és onnan vándorolnak a neuroepitheliális gliasejtek radiális irányú citoplazmatikus nyúlványai mentén a későbbi agykérgi rétegekbe (Förster és mtsai, 2002). A VZ felett később megjelenik egy szekunder proliferatív zóna, a szubventrikuláris zóna (SVZ), melyben folytatódik a sejtproliferáció egészen a 40. gesztációs hét végéig (Zecevic és mtsai, 2005). A legkorábbi kérgi neuronok rövid vándorlás után kialakítanak egy laza, horizontális hálózatot, a preplate-et. A később keletkező neuronok radiális irányba haladva, egy sejtekkel sűrűn elfoglalt struktúrát, a kortikális lemezt (cortical plate, CP) hoznak létre, melyből a II-VI. neokortikális sejtrétegek fognak kialakulni. A CP-t alkotó neuronok a preplate-et két részre osztják; a CP felett a marginális zóna (MZ), alatta a SP alakul ki. A SP alatt helyezkedik el az intermedier zóna (IZ), ahol a neuronok radiális irányú migrációja mellett a glianyúlványokra merőlegesen tangenciális migráció is zajlik. A gátló interneuronok a ventrális telencephalon gangliondombjából származnak és tangenciális

migrációval érik el a CP-t (Parnavelas, 2000; Jossin és mtsai, 2003). A migráció eredményeképpen alakul ki a kéregre jellemző réteges szerkezet. A radiális vándorlás során a korábban keletkezett neuronok a mélyebb rétegeket fogják képezni, míg a később keletkezett neuronok átvándorolnak a korai rétegeken és szuperficiálisabban foglalnak helyet (inside-outside irányultság). Ezt a rendezett neuronális migrációt egy extracelluláris mátrix fehérje, a reelin irányítja, melyet egy korán kialakuló neurontípus, a Cajal-Retzius sejt termel (D'Arcangelo és mtsai, 1995, 1997; Ogawa és mtsai, 1995; Förster és mtsai, 2002). A Cajal-Retzius sejtek a MZ-ban, a későbbi agykéreg I. rétegében foglalnak helyet (Spreatico és mtsai, 1999). Reelin hiányában a kéreg normál inside-outside irányultsága megfordul (D'Arcangelo és mtsai, 1995;). Különböző genetikai mutációk miatt a reelin jelátvitel sérülhet, így a nagyagykéreg citoarchitektúrájának különböző fokú rendezetlensége, következésképpen súlyos fejlődési rendellenességek alakulhatnak ki, mint például a lissencephalia (Jossin és mtsai, 2003; Miyata és mtsai, 2004; Lossi és mtsai, 2019).

A SP először egy sejtszegény zóna a CP és az IZ között, majd a 34. gesztációs hétig folyamatosan vastagodik és a benne elhelyezkedő neuronok átmeneti célsejtjei a thalamusból jövő axonoknak, amíg a CP-ben nem alakulnak ki a végső sejtrétegek. A SP sejtek is küldenek axonokat a CP-be, a leendő IV. kortikális réteg neuronjaihoz, ezen kívül magába a SP-be és vissza a thalamusba (Kanold, 2009; Kostovic és mtsai, 2015). Ezáltal a SP neuronok a kéreg első funkcionális hálózatát alkotják. A 24. és a 34. gesztációs hét között az afferensek a SP-ből fokozatosan áthelyeződnek a CP-be, majd az SP sejtek fokozatosan eltűnnek programozott sejthalál által (Chun és mtsai, 1987). A SP túlélő neuronjai felnőttkorban a WM interstitialis neuronjai lesznek, melyek megtalálhatók az általunk vizsgált szubkortikális WM-ban is (Chun és Shatz, 1989; Kostovic és Rakic, 1990; Judaš és mtsai, 2010). Fontos különbséget tenni az interstitialis neuronok korán keletkező komponensei és a később megjelenő sejtek között. A korai sejtek valószínűleg a SP átmeneti feladataiban vesznek részt, a később megjelenő sejtek nem a fejlődésben fontosak, hanem a felnőtt WM megfelelő működéséhez járulnak hozzá (Suárez-Solá és mtsai, 2009). A SP sejtek morfológiai karakterizálása során serkentő és gátló neuronokat is azonosítottak (Kostovic és Rakic, 1980; Mrzljak és mtsai, 1988).

Összefoglalva a SP a korai szinaptogenezis és a thalamokortikális, valamint más kortikális afferensek átmeneti szinaptikus interakcióinak a helye. Az átmeneti SP korán kialakuló kapcsolatrendszere egyidőben van jelen a permanens kérgi neuronális körökkel. A SP egy része még a korai posztnatális időszakban is megmarad, amikor a rövid kortikokortikális kapcsolatok fejlődnek. A SP jelentőségére utal, hogy részt vehet különböző migrációs rendellenességek

patogenezisében, mint pl. epilepsziát okozó agyi fejlődési rendellenességek (pl. microdysgenesis, heterotópiák) kialakulásában (Kostovic és mtsai, 2015).

1.4.2.2 Szinapszisok a kéreg alatti fehérállományban

A WM neuronok funkcionális szerepét igazolja, hogy Alix és mtsai (2011) kimutatták, hogy az excitátoros neurotranszmitter, a glutamát szinaptikus felszabadulása mélyen a WM-ban is jelen van, ami a WM-ban elhelyezkedő szinapszisok szerepét támasztja alá különböző központi idegrendszeri betegségek hátterében, mint például sclerosis multiplexben, AD-ban és skizofréniában is (Alix és mtsai, 2011).

További kutatást igényel, hogy mi a pontos élettani szerepe WM-ban végbemenő szinaptikus jelátvitelnek, mivel a WM szinapszisok működésének részletes megismerése új utakat nyithat az említett betegségek terápiájában (Alix és mtsai, 2011).

A szinapszisok morfológiai módszerekkel történő láthatóvá tétele és mennyiségi meghatározása egy, a szinapszisokban ubiquiter módon előforduló molekula, a szinaptofizin (SYN) immunfestésével lehetséges (Alder és mtsai, 1992). A SYN egy 38 kDa-os szinaptikus vezikuláris glikoprotein, amely négy transzmembrán doménből áll, így „major synaptic vesicle protein p38” néven is ismert. Jelen van az agyi és gerincvelői neuronok preszinaptikus terminálisában (Wiedenmann és mtsai, 1985; Rehm és mtsai, 1986; Thomas és mtsai, 1988).

1.4.2.3 Fokális kortikális diszplázia és a kettős patológia fogalma

A gyógyszer-rezisztens fokális epilepszia szindrómák leggyakoribb oka gyermekkorban a fokális kortikális diszplázia (focal cortical dysplasia, FCD), melyben fénymikroszkópos vizsgálattal a hatrétegű neokortex szerkezeti rendellenességei láthatók (Blümcke és mtsai, 2017). A FCD-k altípusai a kéregfejlődési rendellenességek 70,6%-át teszik ki (Blümcke és mtsai, 2017). A FCD I-es altípusban a neokortex sejtrétegei rendezetlenséget mutatnak radiálisan (Ia), tangenciálisan (Ib) vagy mindkét irányban (Ic). A második altípus (FCD II) a leggyakoribb, melyben a sejtrétegek rendezetlensége mellett disz morf neuronok önmagukban (IIa), vagy ballon sejtekkel együtt (IIb) láthatók. A FCD III-as altípusban az FCD HS-sal (IIIa), tumorról (IIIb), vaszkuláris malformációval (IIIc) vagy egyéb, korai életkorban szerzett epileptogén lézióval (IIId; pl. trauma, ischaemia, encephalitis) együtt jelenik meg (Blümcke és mtsai, 2011). A FCD-s betegeknél az epilepszia korábbi életkorban jelentkezik, mint azoknál a betegeknél, akiknél más elváltozás áll a rohamok hátterében (Blümcke és mtsai, 2017).

Kettős (duális) patológiáról akkor beszélünk, amikor a HS mellett egyéb elváltozás is jelen van a beteg agykérgében, mely lehet kéregfejlődési rendellenesség, tumor vaszkuláris

malformáció vagy hegesedés (Blümcke és Spreafico, 2012). A korábban részletezett FCD IIIa alcsoportjában a kéregfejlődési rendellenesség mellett HS is jelen van (Blümcke és mtsai, 2011; 2017).

2 Célkitűzések

Munkánk során morfológiai vizsgálatokat végeztünk farmakoterápia-rezisztens TLE betegek műtétielt eltávolított mintáin. Ennek során ektópiás sejteket, és azok szinaptikus kapcsolatait vizsgáltuk a GD-ban és a neokortex alatti fehérállományban.

2.1 *A parvalbumin immunreaktív ektópiás neuronok lokalizációja és axonális arborizációja a gyrus dentatusban*

A GD-ban a PV+ neuronok elhelyezkedését, axonjainak lefutását és kapcsolatait vizsgáltuk. A vizsgálatba különböző etiológiájú TLE betegeket vontunk be a HS mellett, melyek a következők voltak: kéregfejlődési rendellenességgel (malformation of cortical development, MCD) rendelkező betegek, kettős patológiájú TLE betegek (akiknél az MCD együtt fordult elő a HS-sal), valamint tumor asszociált epilepsziás esetek. A betegek GD-t tartalmazó, műtét során eltávolított mintáin PV immunhisztokémiát végeztünk. A megfestett metszeteket fénymikroszkóppal és transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) tanulmányoztuk. Szövetani eredményeink, a TLE etiológiája és a betegek klinikai adatai között összefüggéseket kerestünk.

2.2 *A kéreg alatti fehérállományban található ektópiás neuronok és szinapszisok vizsgálata*

Laboratóriumunkban korábban kimutattuk, hogy a kéreg alatti WM-ban nagyszámú idegsejt van jelen, melynek területegységre eső száma magasabb TLE-ban, mint nem epilepsziás kontrollokban (Richter és mtsai, 2016).

Célunk annak a feltételezésnek a megtámogatása volt, miszerint a WM neuronok funkcionálisan aktívak, és szerepük van a TLE során zajló folyamatokban.

A vizsgálat során a temporális lebeny kéreg alatti WM-ában a szinapszisokat, egy, a preszinaptikus terminálisban jelenlévő fehérje, a SYN immunhisztokémiai módszerrel történő detektálásával tettük láthatóvá. A megfestett metszeteket fénymikroszkóppal és TEM-mel tanulmányoztuk, és számítógépes programmal meghatároztuk a WM agyterületen található szinapszisok denzitását.

Végül a neuronok számát és a szinapszisok denzitását a betegek klinikai adataival, valamint kognitív teljesítményével is összevetettük.

Az emberi gyrus dentatus parvalbumin immunreaktív sejtjeinek és axonjainak vizsgálata

3 Anyag és módszerek

3.1 *A vizsgált betegek klinikai adatai*

A műtéti rezekátumok (n=35) gyógyszer-rezisztens TLE betegekből származtak. Huszonegy beteg esetében a TLE patológiai háttere MRI-vel igazolt HS volt, 7 betegnél MCD okozta az epilepsziát, 4 esetben a HS együtt járt a MCD-vel. Három betegnél az MRI vizsgálat eredménye negatív volt, további 4 betegnél a TLE hátterében tumor állt. Kontrollként intrakraniális agytumorról diagnosztizált, nem epilepsziás betegek (n=4) hippocampusát használtuk, akiknél a hippocampus a tumor biztonságos rezekciója miatt lett eltávolítva, de a tumorsejtek a hippocampust nem involválták. A vizsgálataink során használt epilepsziás és nem epilepsziás kontroll minták a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Klinikai Központ (PTE ÁOK KK) Neurológiai Klinikáján diagnosztizált és az Idegsebészeti Klinikán műtött betegekből származtak. A vizsgálatba bevont epilepsziás betegek demográfiai és klinikai adatait az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: A vizsgált TLE betegek demográfiai és klinikai adatai

TLE betegcsoportok	HS	HS+MCD	MCD	MR-negatív	TU
Betegek száma	21	4	7	4	4
Kor (év)	41,3 ± 9,01	33,3 ± 7,49	29,6 ± 8,72	42,4 ± 11,38	27,25 ± 9,3
Nem	F: 10, N: 11	F: 3, N: 1	F: 2, N: 5	F: 1, N: 3	F: 3, N: 1
Betegség kezdete (év)	10,7 ± 6,73	9,3 ± 3,49	14,1 ± 10,23	22,5 ± 13,51	21,25 ± 6,96
Betegség időtartama (év)	30,7 ± 12,58	24 ± 7,18	15,4 ± 7,03	20,2 ± 3,03	7,02 ± 4,99
Rohamfrekvencia	3,3 ± 1,86	4,9 ± 1,19	6,2 ± 2,03	5,4 ± 2,56	6,7 ± 5,29
Fókusz oldalisága	B: 10, J: 11	B: 2, J: 2	B: 2, J: 5	B: 4, J: 3	B: 0, J: 4
Lázgörcs	6	2	0	0	0

Rövidítések és szimbólumok: B, bal; F, férfi; HS, hippocampus sclerosis; HS+MCD, együttesen előforduló hippocampus sclerosis és kéregfejlődési rendellenesség; J, jobb; MCD, kéregfejlődési rendellenesség; MR-negatív, az MR nem mutatott semmilyen morfológiai eltérést a temporális archi- és neokortexben; N, nő; TU, tumor indukált epilepszia.

Az epilepsziás betegeknél alkalmazott műtéti eljárás általános érzéstelenítést és standard temporális kraniotómiát követő ATLE volt, melynek során a mediális temporális struktúrák (amygdala, hippocampus, parahippocampalis gyirus) is eltávolításra kerültek. A kontroll csoportban a tumor méretétől és pontos helyzetétől függően eltérő műtéti technikákat alkalmaztak. A tumor recidíva kivédése érdekében az eltávolított agyszövet szélének a tumor határától 2-3 cm-es távolságra kell lennie, így a hippocampus is eltávolításra került. A hippocampalis szövet rezekciója szigorúan terápiás célból történt, az eltávolított rezekátumokat fixálóban (4%-os paraformaldehid; PFA) azonnal rutin patológiai és speciális szövettani vizsgálatokra küldték tovább a PTE ÁOK Patológiai Intézetébe. Az intakt peritumoralis szövetben, beleértve az eltávolított hippocampust, a szövettani vizsgálatok nem mutattak ki szövetelváltozást vagy tumor infiltrációt. Laboratóriumunkban Ki-67 immunhisztokémiával mi is megvizsgáltuk a hippocampus mintákat, mellyel kizártuk a hippocampusok tumorsejtek általi infiltrációját. Ezeket az épnek tartott hippocampusokat használtuk kontrollként.

A neurológiai és a radiológiai vizsgálatok, valamint az operációk is a Helsinki Nyilatkozat rendelkezései szerint történtek. A betegek írásos beleegyezésüket adták a vizsgálatokhoz és a PTE etikai bizottsága engedélyezte a munkánkat.

3.2 A vizsgált minták szövettani feldolgoása

A rezekátumok a műtéti eltávolítást követően azonnal foszfát pufferrel (0,1M phosphate buffer; PB, pH=7,4) pufferelt 4%-os PFA oldatba kerültek és egy órán belül a PTE ÁOK Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumba lettek szállítva, ahol a szövetblokkokat további 12 órán át fixáltuk szobahőmérsékleten, 4%-os PFA-ban, folyamatos rázás mellett. Ezt követően 10 mm-es blokkokat vágunk a hippocampus septo-temporális tengelyére merőlegesen, majd vibratómmal 80 µm-es metszeteket készítettünk, melyeken immunhisztokémiát végeztünk.

3.2.1 Parvalbumin és NeuN immunhisztokémia

A 80 µm-es metszeteket 3x10 percig Tris-pufferben (TB, pH=7,4) mostuk, majd 30 percig 1%-os hidrogén-peroxid oldattal előkezeltük. Ezután a metszetek 3x10 percig történő mosása következett pH=7,4-os TB-ben. Ezt követően 1 órán át inkubáltuk 1%-os normál lószérum (Vectastain Elite ABC Kit) 5 ml TB-ben oldott oldatában (pH=7,4), mely 0,4% TritonX-100-at (Sigma-Aldrich, Magyarország) is tartalmazott a szérum penetrációjának növelése

érdekében. Majd a metszetek egy részét primer monoklonális egér anti-PV antitesttel (1:5000, Swant, Bellizona, Svájc) inkubáltuk 72 órán át 4 °C-on, másik részét pedig primer monoklonális egér anti-NeuN antitesttel (1:500, Millipore, Bellarica, MA) inkubáltuk szobahőmérsékleten, 1 éjszakán át. Másnap újabb 3x10 perces pH=7,4-os TB-ben való mosás következett, majd biotinilált szekunder anti-egér antitesttel szobahőmérsékleten 4 órán át inkubáltuk. Ezt követően ismét 3x10 perc pH=7,4-os TB-ben való mosás következett, majd a kötődött antitesteket avidin-biotin peroxidáz rendszer (Vectastain ABC Elite Kit, Vector, Burlingame, CA) segítségével tettük láthatóvá. Ennek során először az avidin-biotin-peroxidáz komplexet adtuk a metszetekhez 2 órára. Végül egy újabb 3x10 perces pH=7,4-os TB-ben való mosást követte az előhívás. Előhívás során a peroxidáz-reakciót alkalmaztuk (Vector DAB Peroxidase Substrate Kit), kromogénként a 3,3'-diaminobenzidint (DAB) használtuk. A metszeteket zselatinnal kezelt üveg tárgylemezre húztuk fel, a száradást követően emelkedő koncentrációjú alkoholsorban dehidráltuk, majd a derítést xilol oldatban végeztük. Utolsó lépésként DePeX-el (Fluka, Svájc) fedtük a metszeteket. Az anti-PV antitesttel jelölt metszetek egy részét a dehidrálás előtt krezil-ibolyával háttérfestettük. A vizsgálathoz negatív kontrollként használt metszetekkel hasonlóképpen jártunk el, azonban ezekben az esetekben a primer antitestet kihagytuk.

3.3 *Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok*

A fentiek szerint fixált szövetblokkokból 80 µm-es metszeteket készítettünk vibratóm segítségével, melynek egyik részén a lapos beágyazás (flat embedding) előtt immunhisztokémiát végeztünk PV elleni antitesttel. Az immunhisztokémiai eljárást az elektronmikroszkópos vizsgálathoz egy már korábban leírt módszer szerint végeztük (Ábrahám és mtsai, 2004), melyet röviden ismertetünk. Az úsztatott metszeteken 15% -os, majd 30% -os szacharóz PB-ben hígított oldatával krioprotekciót végeztünk, majd a mintákat háromszor folyékony nitrogén fölé helyeztük, hogy a fagyasztás-olvasztás eljárás az antitest szövetbe történő penetrációját fokozza. Ezt a metszetek 3x10 perces mosása követte pH=7,4-os TB-ben, majd indirekt immunreakciót végeztünk primer monoklonális egér anti-PV antitest (1:5000, Swant, Bellizona, Svájc) alkalmazásával (a Triton-X-100 kihagyásával). A kötőhelyeket biotinilált szekunder antitesttel és az avidin-biotin peroxidáz detektáló rendszerrel (Vector, Burlingame, CA) tettük láthatóvá. A kromogén a DAB volt. Ezután a metszetek utófixálása következett. Először 2,5%-os glutáraldehid oldatban (PB-ben) 2 órát, majd 1%-os ozmium-tetroxid oldatban (PB-ben) szobahőmérsékleten 1 órát voltak a metszetek. Ezt követően a

metszeteket PB-ben mostuk, majd növekvő koncentrációjú etil-alkohollal dehidráltuk őket. A 70 %-os alkohol 1 % uranil-acetátot is tartalmazott a kontraszt fokozása végett. Az abszolút alkohollal történő inkubálást követően a metszetek lapos beágyazása (flat-embedding) következett. A metszeteket Durcupan műgyanta (Sigma-Aldrich, Budapest) és propilén-dioxid (Sigma-Aldrich, Budapest) keverékét tartalmazó alumínium fóliából készített csónakokba helyeztük, és egy éjszakán át szobahőmérsékleten hagytuk. Másnap a metszeteket tárgylemezre helyeztük, műanyag fedőlemezzel lefedtük és 48 órán át 56 °C-on inkubáltuk. Ugyanezt a beágyazásos módszert alkalmaztuk azokon a metszeteken, melyeken előzőleg nem végeztünk immunhisztokémiát.

Ezután a vizsgálni kívánt területet, mely a GD molekuláris- és szemcsesejtrétegét tartalmazta, fénymikroszkópos kontroll mellett kivágtuk és Durcupannal töltött zselatin kapszulába ágyasztuk. Ezekből a műgyantába ágyazott blokkból ultramikrotóm (Leica Ultracut, Németország) segítségével ultravékony metszeteket készítettünk, melyeket parlodion hártával fedett egy-lyukú gridre (single-slot grid) helyeztünk (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). A standard módszernek megfelelően ezt a metszetek kontrasztosítása követte uranil-acetáttal és ólom-citráttal. A metszeteket Jeol 1200 EX-II és JEM-1400Flash TEM-mel vizsgáltuk.

3.4 Kvantifikáció

3.4.1 Normál pozíciójú és ektópiás neuronok számának meghatározása

A metszetekben látható normál pozíciójú (a szemcsesejtrétegben és a hilusban levő), valamint az ektópiás (molekuláris rétegben levő és fissura hippocampi mentén elhelyezkedő) PV+ neuronok számát külön-külön határoztuk meg a GD-okról készült digitális felvételeken. A normál pozíciójú és az ektópiás PV+ neuronok számát a szemcsesejtréteg mm-ben mért hosszához viszonyítva határoztuk meg az iTEM program (Olympus) kép analízáló eszközeivel. Ezután minden betegben meghatároztuk az ektópiás és a normál helyzetű PV+ sejtek arányát. Meghatároztuk ezen adatok átlagait \pm standard deviációt (SD) minden vizsgált betegcsoportban és a kontroll csoportban.

3.4.2 Axonsarjadzás mértékének meghatározása

Az axonsarjadzás mértékét szintén fénymikroszkópos metszeteken határoztuk meg. 10X-es nagyítást használva digitális felvételeket készítettünk a teljes GD-ról. A felvételeken a szemcsesejtréteg teljes hosszát, valamint azon szakasz hosszát, ahol a sarjadzó PV+

axonokterminálisok a GD molekuláris rétegében is láthatók voltak, az iTEM program (Olympus) képanalizáló eszközeivel határoztuk meg. A molekuláris rétegben látott PV+ terminálisokat akkor tekintettük sarjadzó axonoknak, ha azok a szemcsesejtréteg felett legalább 50 µm-rel voltak láthatók. A sarjadzó PV+ axonterminálisokkal lefedett szemcsesejtréteg hosszát a teljes szemcsesejtréteg hosszához arányosítva százalékban határoztuk meg betegenként, majd meghatároztuk az adatok átlagait \pm SD-t minden vizsgált csoportban.

A kvantifikációhoz minden olyan immunfestett metszetet felhasználtunk, melyek tartalmazták a teljes szemcsesejtréteget. Az ilyen metszetek száma betegenként 3 és 9 között mozgott. A GD molekuláris rétegében megfigyelt PV+ axonsarjadzás mértékét és az ektópiás, valamint a normál pozíciójú PV+ sejtek számát a különböző etiológiájú TLE betegekben és a kontrollokban Student t-teszttel hasonlítottuk össze. Spearman korrelációs analízist alkalmaztunk a PV+ axonsarjadzás mértéke, az ektópiás, valamint a normál pozíciójú PV+ sejtek száma és a betegek klinikai adatai közötti összefüggések kereséséhez. A statisztikai szignifikancia szintet $p \leq 0,05$ -nél határoztuk meg.

3.4.3 Axonterminálisok eloszlásának vizsgálata immunelektronmikroszkópos preparátumokban

A fénymikroszkópos metszetek kiértékelése mellett az ultravékony elektronmikroszkópos metszetek kvantifikációját is elvégeztük. A metszeteken a GD szemcsesejtjeinek periszomatikus beidegzését vizsgáltuk TEM-mel a nem epilepsziás kontrollokban, valamint a HS és a tumor indukált epilepsziás csoportokban. A szimmetrikus szinapszis / szemcsesejt szóma arányt határoztuk meg a GD szemcsesejtrétegében. Ugyanabból a GD-ból származó két-három egymást követő ultravékony metszeten vizsgáltuk a szemcsesejtek sejttestjeit, 40-50 szemcsesejtet egy sorban.

Négy HS-os TLE beteg immunelektronmikroszkópos preparátumait használtuk a PV+ axonterminálisok kvantifikációjához. Meghatároztuk a PV+ axonterminálisok (n=56) eloszlását a különböző célstruktúrákon a GD azon területein, ahol fénymikroszkóppal sarjadzás volt látható. Azoknak a PV+ axonterminálisoknak a számát határoztuk meg, melyek a szemcsesejt sejttestével, dendritjével vagy dendrittüskéjével alkottak szinapszist. Az immunelektronmikroszkópos preparátumokon csak a PV+ axonterminálisokat számoltuk meg. Meghatároztuk a PV+ axonterminálisok által alkotott axo-szomatikus, axo-dendritikus és a szemcsesejt dendrittüskéjével alkotott szinapszisok százalékos arányát.

3.5 Az eredményekhez való személyes hozzájárulás

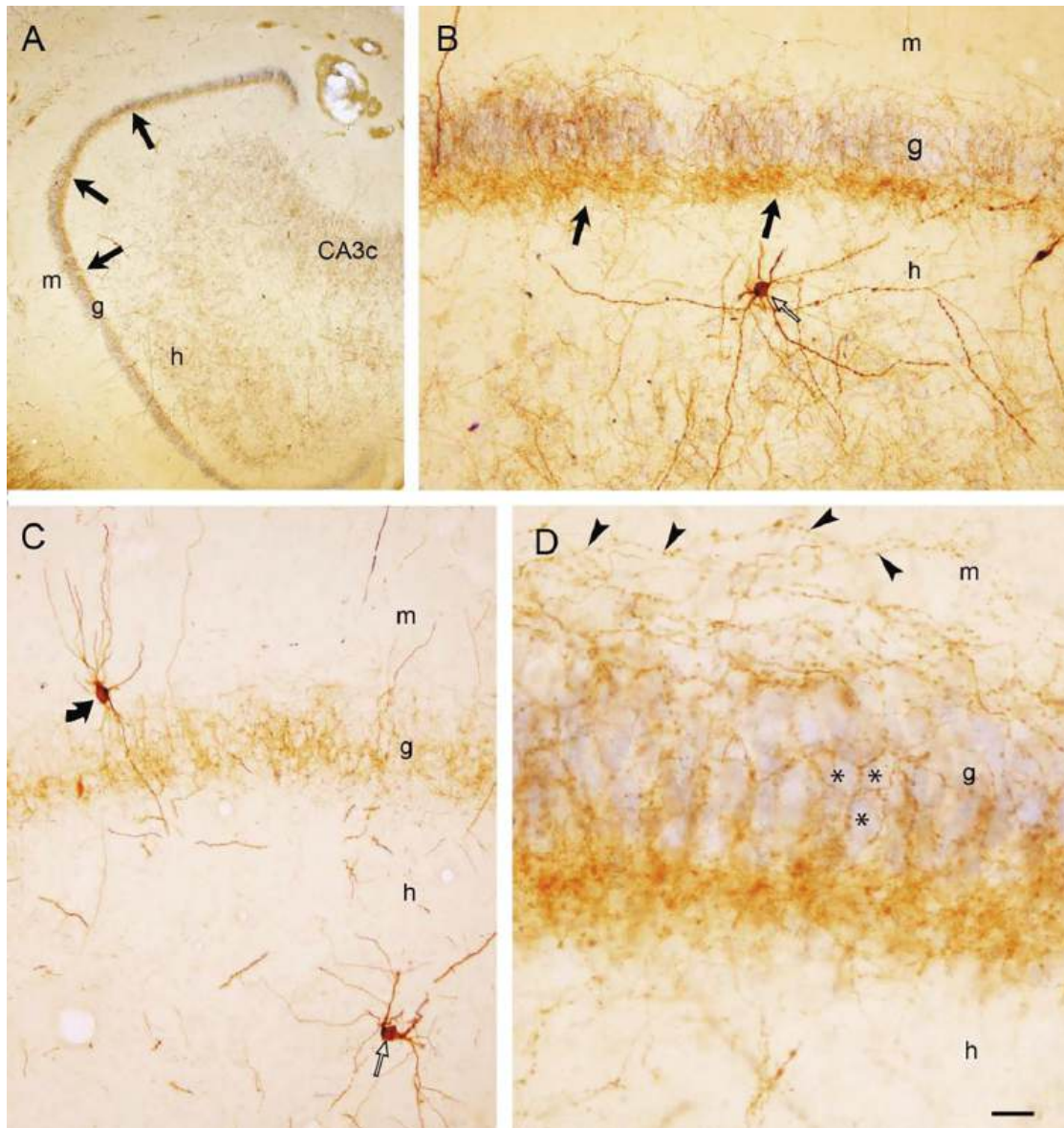
A minták fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai festésében, valamint a fénymikroszkópos metszetek analízisében, és a számszerű adatok értékelésében részt vettem, de ezeket nagyrészt kollégáim végezték.

A fénymikroszkópos számszerű adatok betegek adataival való összehasonlításhoz a betegek adatainak begyűjtését és előkészítését én végeztem. A statisztikai elemzéseket, valamint az ábrák készítését részben én végeztem.

4 Eredmények

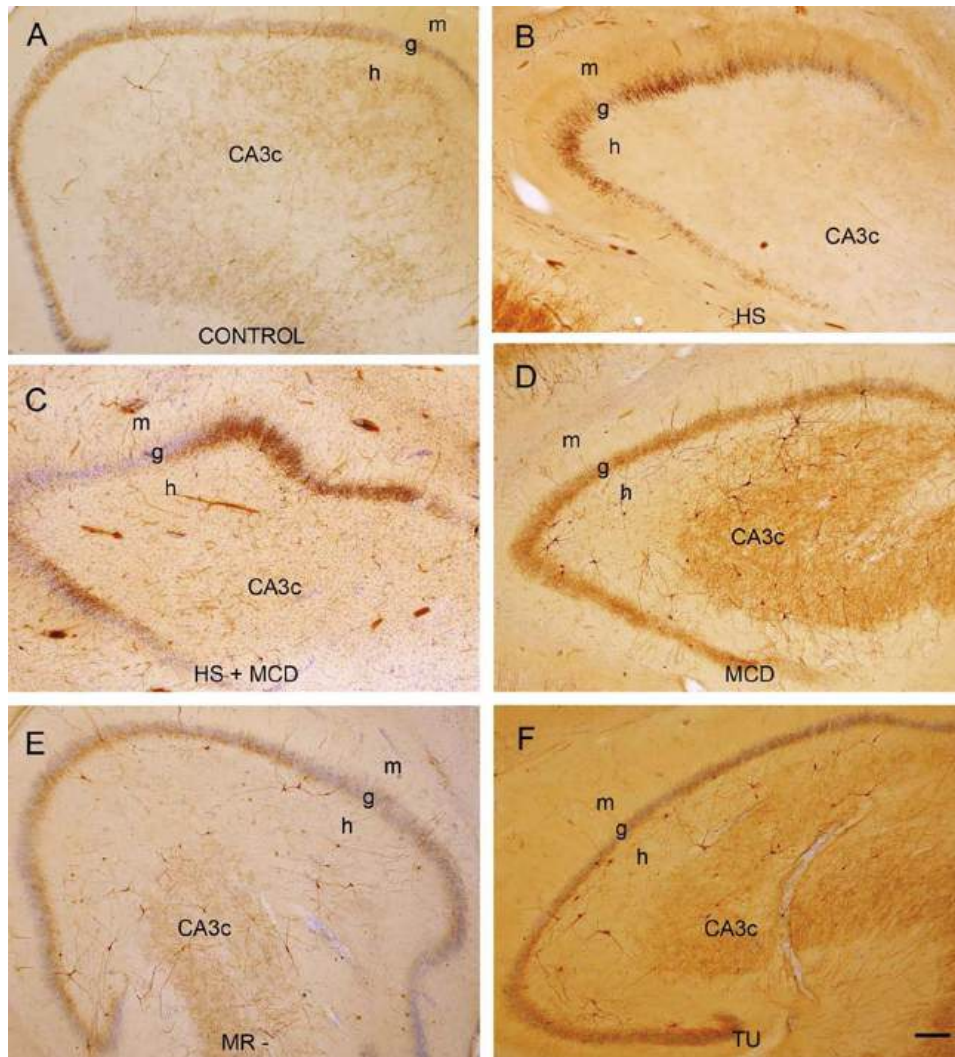
4.1 *Parvalbumin immunreaktivitás a kontroll gyrus dentatusban*

Megfigyeléseink a kontroll minták GD-ában megegyeznek a korábban leírtakkal. A nagy PV+ kosársejtek száma az emberi GD-ban viszonylag alacsony a kísérleti állatokban (például patkányokban) megfigyelthez képest (Seress és mtsai, 1993). Az axo-szomatikus GABA-erg sejtek csoportjába tartozó nagy PV+ neuronok a hilusban, a szemcsesejtréteg alatti subgranuláris zónában és a GD szemcsesejtrétegében találhatóak. Bár a sejtszám alacsony, a PV+ axonterminálisok kiterjedt hálózatot képeztek a szemcsesejtek szomája körül. A PV+ axonok sűrűsége nagyobb volt a szemcsesejtréteg hilushoz közelebbi, belső felében, mint a réteg külső felében (1. és 2.A ábrák). Néhány axon ága kinyúlhat a szemcsesejtréteg külső felébe, de kontrollokban a PV+ axonok ágai a GD molekuláris rétegében ritkán fordulnak elő. Bár elvélve, de a PV+ sejtek sejttestje megtalálható volt a molekuláris réteg szemcsesejtekhez közel eső részén (1.C ábra).



1. ábra: PV+ sejtek és axonok nem epilepsiás kontrollok gyrus dentatusában.

Az **A** és **B** képeken a nyilak a subgranuláris lokalizációban levő PV+ axonterminálisokra mutatnak, melyek jellemzően a kontrollok GD-ában fordulnak elő. Az üres nyilak a hilusban található PV+ sejteket jelzik a **B** és **C** képeken. A **C** képen PV+ sejt látható a molekuláris rétegében, amely elvétve kontroll mintában is megfigyelhető (íves nyíl). A **D** képen a csillagok PV+ axonterminálisokkal körülvevett szemcsesejteket jeleznek. A nyílhegyek a szemcsesejtréteggel párhuzamosan futó axonokat jelzik. **Rövidítések:** m, molekuláris réteg; g, szemcsesejtréteg; h, a gyrus dentatus hilusa; CA3c, Ammon-szarv régiója; GD, gyrus dentatus. Lépték = 250 μ m az **A** képen, 50 μ m a **B** és a **C** képen, 25 μ m a **D** képen.



2. ábra: Különböző etiológiájú TLE betegek és nem epilepsziás kontroll (A) gyrus dentatusáról készült digitális felvételek PV-immunfestett metszeteken.

HS-os betegben (B) a szemcsesejtréteg PV+-itásának egyenetlensége látható, valamint PV+ neuronok és axonok hiánya figyelhető meg a hilusban és a CA3c régióban. A MCD-vel járó HS-os beteg metszetében (C) a PV+ axonterminálisok egyenetlen megjelenése és a PV+ neuronok hiánya látható. A MCD indukált TLE betegben (D), valamint az MR-negatív csoportba tartozó TLE betegnél (E) kontrollszerű PV+-ítás figyelhető meg. Tumor indukált TLE esetén (F) – ahol a tumor a hippocampust nem involválta – a GD-ban a PV+-ítás szintén kontrollszerű megjelenése látható. **Rövidítések:** CA3c, Ammon-szarv régiója; g, szemcsesejtréteg; h, a gyrus dentatus hilusa; HS, hippocampus sclerosis; HS+MCD, együttesen előforduló hippocampus sclerosis és kéregfejlődési rendellenesség; MCD, kéregfejlődési rendellenesség; m, molekuláris réteg; MR-negatív, az MR nem mutatott semmilyen morfológiai eltérést a temporális archi- és neokortexben; TU, tumor indukált epilepszia. Lépték = 250 μ m az A-F képeken.

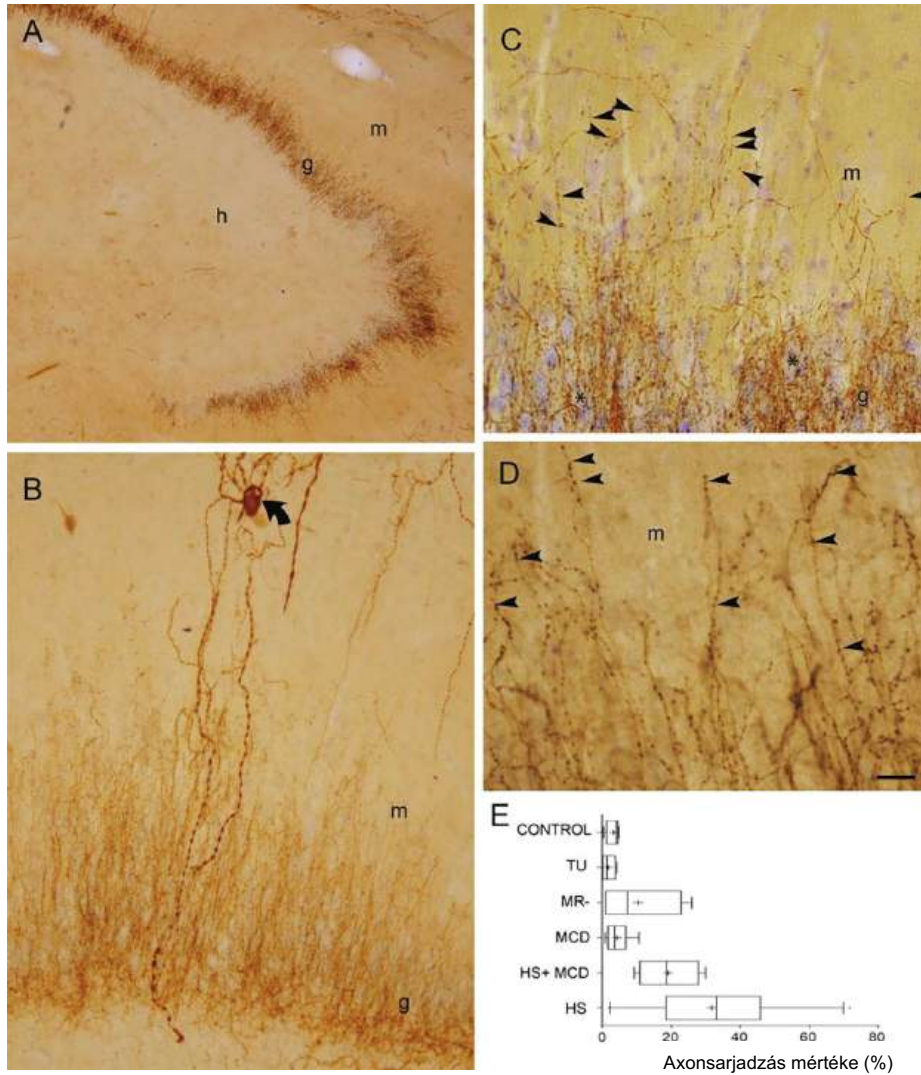
4.2 *Parvalbumin immunreaktivitás különböző etiológiájú TLE betegekben*

A kontroll, nem epilepsziás GD-ban PV⁺-ítás hasonló volt ahhoz, amit azon TLE-ban szenvedő betegek GD-ában láttunk, akiknél a betegség háttérében MCD vagy tumor állt, illetve akiknél az MRI eredmény negatív volt (2.A és 2.D – F ábra). A HS-os TLE betegek GD-ában a PV⁺-ítás csökkenését figyeltük meg, amely összhangban van a korábban leírtakkal (Wittner és mtsai, 2001; Arellano és mtsai, 2004; Andrioli és mtsai, 2007). PV⁺ sejtek szinte teljesen eltűntek a subgranuláris pozícióból és a GD hilusából (2.B ábra). HS-ban a PV⁺ axonterminálisok által adott mintázat a kontrollhoz képest kevésbé volt homogén (2.A ábra). A szemcsesejtréteg egyes részei nem tartalmaztak PV⁺ axonokat, míg más részeken erős PV⁺-ítás látszott (2.B ábra). A PV⁺ axonok ehhez hasonló mintázatát lehetett látni azoknál a betegeknél, akiknél a HS az MCD-vel együtt volt jelen (2.C ábra). A kontrollban találtakhoz képest a PV⁺ axonok denzitása TLE betegek esetén a szemcsesejtréteg belső és külső részén nem különbözött, mivel a szemcsesejtréteg nem csak a belső, hilushoz közelebb eső része, hanem a réteg teljes szélességében tartalmazta a PV⁺ axonterminálisokat (2.B és C ábra). Gyakran láttuk, hogy a PV⁺ axonok a szemcsesejtrétegre merőlegesen futottak, mélyen behatolva a GD molekuláris rétegbe és annak belső felét elfoglalva (3.A – D ábra).

A GD molekuláris rétegében levő kiterjedt PV⁺ axonok sarjadzását illetően megfigyeltük, hogy a szemcsesejtréteg szignifikánsan ($p < 0,01$) nagyobb részét fedik le sarjadzó PV⁺ axonok a HS-os és a kettős patológiájú (HS és MCD együttes előfordulása) TLE betegekben, mint kontroll vagy a tumor indukált epilepsziás csoportban (3.E ábra). A sarjadzás kiterjedését a HS-os betegek és a kettős patológiájú betegek között összehasonlítva, HS-ban magasabb értéket kaptunk, de a különbség nem volt szignifikáns. Viszont szignifikánsan ($p < 0,01$) nagyobb a PV⁺ axonsarjadzás kiterjedésének mértéke a HS-os betegek csoportjában, mint az MCD csoportban és az MR-negatív esetekben (3.E ábra). Bár a sarjadzás kiterjedése nagyobb volt a kettős patológiájú csoportban, mint abban a csoportban, amelyben csak MCD okozta a patológiát, vagy ahol a betegek MRI eredménye negatív volt, a tumor indukált epilepsziás betegek csoportjában a PV⁺ axonsarjadzás kiterjedése nem különbözött szignifikánsan a nem epilepsziás kontrollban talált sarjadzástól (3.E ábra).

Mivel a betegek száma az MCD, az MR-negatív és a tumor indukált epilepsziás csoportokban alacsony volt, az egyes csoportokban levő betegek eredményeit külön is elemeztük. A HS-os betegek csoportjában levő 21 beteg közül csak két beteg esetében volt gyengébb az axonsarjadzás, mint az MR-negatív csoportban mért átlag. Az MCD csoporttal

összehasonlítva csak egy HS-os betegnél figyeltünk meg gyengébb axonsarjadzást, mint az MCD okozta TLE betegek csoportjában mért átlag. Az MR-negatív, az MCD és a tumor indukált epilepsziás csoportokban nem volt olyan beteg, akinél erősebb sarjadzás lett volna megfigyelhető, mint a HS-os csoport axonsarjadzásának átlaga. Ezek az adatok egyértelműen jelzik a HS és a GD molekuláris rétegében található PV⁺ axonok jelenléte közötti összefüggést.



3. ábra: A GD-ban látható PV+ axonsarjadzás és annak mértéke a molekuláris rétegben különböző etiológiájú TLE betegekben és nem epilepsziás kontrollokban.

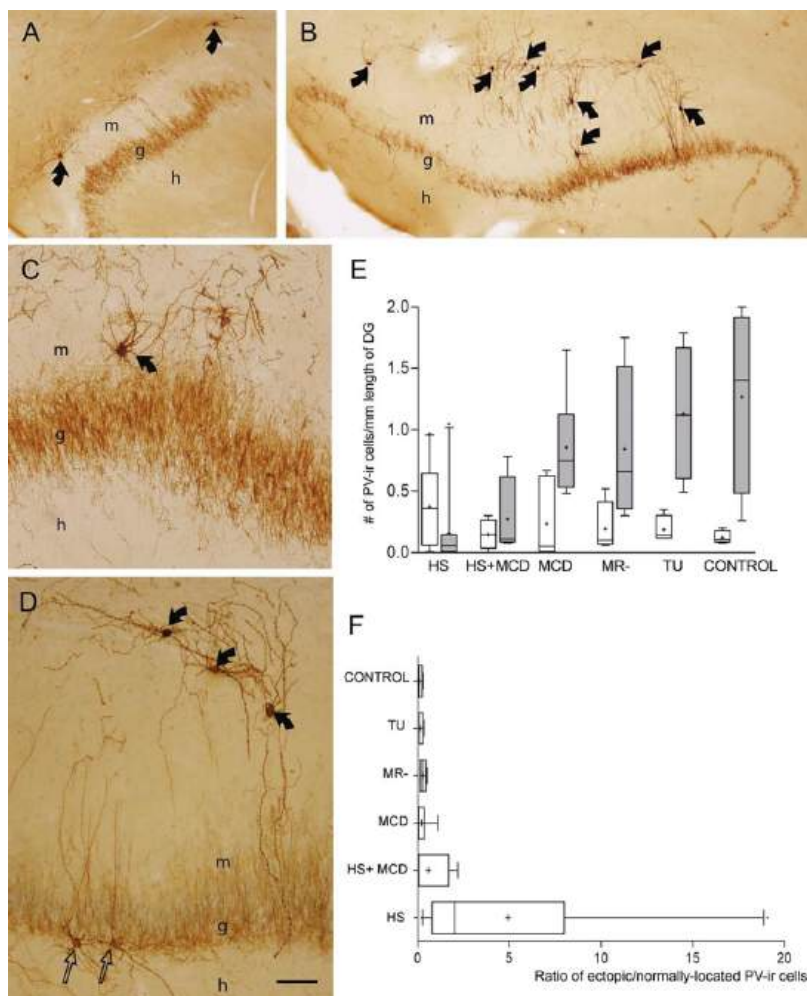
(A) PV+ axonsarjadzás a szemcsesejtrétegben (g) és molekuláris rétegben (m). (B) Ektópiás PV+ neuron (nyíl) és a szemcsesejtrétegre (g) merőlegesen futó sarjadzó PV+ axonok a molekuláris rétegben (m). (C, D) A molekuláris rétegben (m) található PV+ axonterminálisok nagy nagyítással. A C képen a csillagok a PV+ axonterminálisokkal körbevett szemcsesejtek szómáját jelzik. (E) A PV+ axonsarjadzás mértéke a molekuláris rétegben különböző etiológiájú TLE-ban és nem epilepsziás kontrollokban. A bajuszok az 5-ös és 95-ös percentilis értékeket mutatják. **Rövidítések:** g, szemcsesejtréteg; h, hilus; HS, hippocampus sclerosis; HS+MCD, kéregfejlődési rendellenességgel járó hippocampus sclerosis; m, molekuláris réteg; MCD, kéregfejlődési rendellenesség; MR-, MR-negatív; TU, tumor indukált epilepszia. Lépték = 150 μ m az A képen, 30 μ m a B képen, 20 μ m a C képen és 15 μ m a D képen.

4.3 *Az ektópiás parvalbumin immunreaktív sejtek és a parvalbumin immunreaktív axonok sarjadzása*

HS-ban a normál pozíciójú PV+ sejtek nagyszámú csökkenését láttuk a subgranuláris zónában és a hilusban, és számos ektópiás PV+ sejt volt a GD molekuláris rétegében és a fissura hippocampi mentén (4.A-D ábra). Megfigyeléseink hasonlóak ahhoz, amit korábbi TLE betegekkel készült tanulmányokban közöltek (Wittner és mtsai, 2001; Arellano és mtsai, 2004; Andrioli és mtsai, 2007). A TLE betegek különböző csoportjában a normál pozíciójú (szemcsesetrétegben és a hilusban lévő) és az ektópiás (a molekuláris rétegben és a fissura mentén lévő) PV+ sejtek számát is elemeztük. A MCD, az MR-negatív és a tumor indukált epilepsziás esetekben a PV+ sejtek száma a normális hilaris és subgranuláris lokalizációban nem csökkent szignifikánsan a nem epilepsziás kontrollokhoz képest (4.E ábra). HS és kettős patológia esetén nagy sejtszámcsökkenés figyelhető meg a normál pozíciójú sejtek esetén. A normál elhelyezkedésű PV+ sejtek számát tekintve szignifikáns ($p < 0,05$) különbség van a kontroll és a HS-os csoport, valamint a kettős patológiával rendelkező betegek csoportja között (4.E ábra). A normál pozíciójú PV+ sejtek számának csökkenésével párhuzamosan az ektópiás PV+ sejtek számának szignifikáns növekedését figyeltük meg ($p < 0,05$) a HS-os betegek csoportjában a kontrollhoz képest (4.E ábra). Más etiológiájú TLE csoportban nem találtunk ektópiás PV+ sejtszám növekedést a kontrollhoz képest. Ebből következik, hogy a normál pozíciójú PV+ sejtek számának szignifikáns csökkenése, és az ektópiásan elhelyezkedő sejtek számának növekedése a HS jellemzője (4.E ábra). Az ektópiás / normál pozíciójú sejtek arányát különböző etiológiájú TLE betegekben meghatározva azt találtuk, hogy ez az arányszám a HS-os csoportokban szignifikánsan magasabb ($p < 0,01$), mint más etiológiájú csoportokban (4.F ábra).

Az egyes betegek eredményeit elemezve azt találtuk, hogy a 21 HS-os beteg közül csak egyben volt alacsonyabb az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek arányát kifejező szám, mint ugyanezeknek az adatoknak az átlaga az MCD, az MR-negatív vagy a tumor indukált epilepsziás csoportokban.

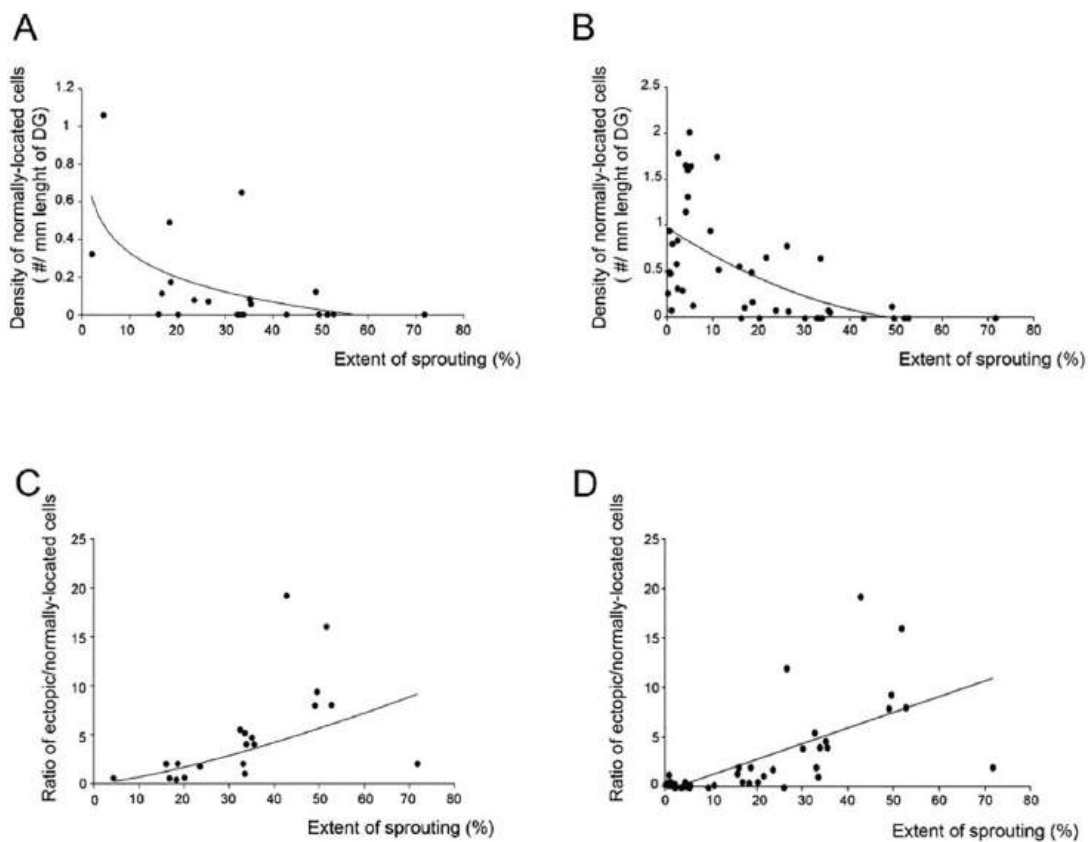
Ezen kívül egyetlen beteg sem volt az MR-negatív, az MCD vagy a tumor indukált epilepsziás csoportban, akiknél nagyobb lett volna az ektópiás / normál pozíciójú PV+ neuronok aránya, mint a HS-os betegek csoportjában mért átlag.



4. ábra: Fénymikroszkópos felvételek ektópiás PV+ neuronokról a GD molekuláris rétegében és a fissura hippocampi mentén. A diagramok a normál lokalizációjú és ektópiás PV+ neuronok területegységre eső számát, valamint az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek arányát mutatják be különböző etiológiájú TLE csoportokban és nem epilepsziás kontroll csoportban.

(A, B) Kis nagyítású felvételek a molekuláris rétegben (m) és a fissura hippocampi mentén elhelyezkedő ektópiás PV+ neuronokról (nyíl) HS-os betegekben. A hilusból (h) hiányoznak a PV+ neuronok. (C) Ektópiás PV+ neuron (nyíl) a molekuláris rétegben (m) HS-ban. A szemcsesejtrétegben (g) láthatók a sarjadzó axonok. (D) Ektópiás (nyíl) és normál lokalizációjú (üres nyíl) PV+ neuronok HS-ban. (E) Normál lokalizációjú (fehér oszlop) és ektópiás (szürke oszlop) PV+ neuronok területegységre eső száma különböző etiológiájú TLE csoportokban és a nem epilepsziás kontrollban. (F) Ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya különböző etiológiájú TLE csoportokban és a nem epilepsziás kontrollban. A dobozdiagramokon a bajszok az 5-ös és 95-ös percentilis értékeket mutatják. Lépték = 200 μ m az A és B képeken, 50 μ m a C és D képeken.

A korrelációs analízis szignifikáns negatív összefüggést tárt fel a PV+ axonsarjadzás mértéke és a normál pozíciójú hiláris és subgranuláris PV+ sejtek területegységre eső számának csökkenése között a HS-os csoportban ($p < 0,05$), valamint az egész TLE kohorszban ($p < 0,01$; 5.A és B ábra). Szignifikáns pozitív összefüggést találtunk az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya és a PV+ axonsarjadzás mértéke között a HS-os betegek csoportjában ($p < 0,01$), valamint a vizsgált TLE betegek teljes populációjában ($p < 0,01$; 5.C és D ábra). Az ektópiás PV+ sejtek száma és a PV+ axonsarjadzás mértéke között nem volt statisztikailag szignifikáns összefüggés.



5. ábra: PV+ axonsarjadzás mértéke és a normál pozíciójú PV+ sejtek területegységre eső száma, valamint a PV+ axonsarjadzás mértéke és az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya közötti összefüggés.

(A és B) A PV+ axonsarjadzás mértéke és a normál pozíciójú PV+ sejtek területegységre eső száma közötti szignifikáns negatív összefüggés HS-ban (A) és a teljes TLE betegpopulációban (B). A C és D grafikonokon ábrázoltuk a PV+ axonsarjadzás mértéke és az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya közötti szignifikáns pozitív összefüggést HS-ban (C) és a teljes TLE betegpopulációban (D).

4.4 Korreláció a parvalbumin immunreaktív sejtek, az axonsarjadzás és a betegek klinikai adatai között

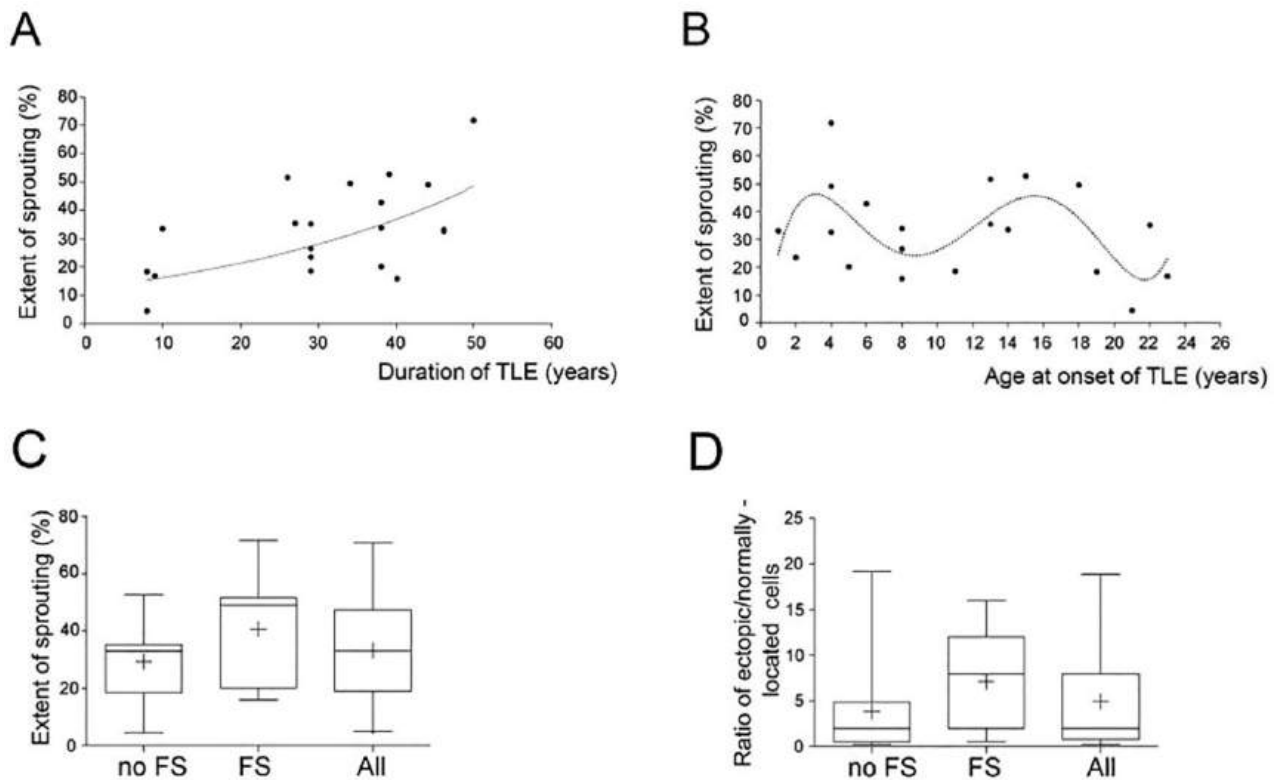
Összefüggést kerestünk a PV+ axonsarjadzás mértéke és a betegek klinikai adatai között, mint az epilepszia fennállása, a rohamok gyakorisága, valamint a betegek életkora a TLE kezdetekor. A teljes vizsgált TLE betegpopulációban nem találtunk szignifikáns összefüggést a paraméterek között. A HS-os csoportban szignifikáns ($p < 0,05$) pozitív összefüggést találtunk a betegség időtartama és a PV+ axonsarjadzás mértéke között. Minél hosszabb ideje állt fenn a TLE (a betegség kezdete és a műtét között eltelt idő), annál erősebb volt a PV+ axonok sarjadzása (6.A ábra). Szignifikáns negatív korrelációt ($p < 0,05$) találtunk a HS-os csoportban a betegség fennállásának ideje és a normál pozíciójú PV+ sejtek denzitása között (nem ábrázoltuk). Ez azt jelzi, hogy a PV+-itás csökkenése a GD-ban függ az epilepszia fennállásának hosszától. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a betegség fennállásának ideje és az ektópiás PV+ sejtek denzitása között.

A HS-os csoport férfi és női betegeinél az axonsarjadzás mértékét vizsgálva, nem volt statisztikailag jelentős különbség a nemek között. Bár némileg erősebb axonsarjadzás volt látható nőknél ($34,43 \pm 12,72$), mint férfiak esetében ($29,33 \pm 11,63$), a különbség nem volt szignifikáns ($p=0,51$). Hasonlóképpen, az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek arányát tekintve sem volt szignifikáns ($p=0,8$) a nemek közötti különbség, mivel férfiakban a sejtek aránya $2,84 \pm 1,61$, nőkben pedig $3,21 \pm 2,69$ volt. Összehasonlítva az axonsarjadzás mértékét a bal és jobb oldali HS esetén, nem volt jelentős különbség a két oldal között. Azoknál a betegeknél, akiknél a jobb oldalon volt a HS, bár erősebb volt a sarjadzás ($33,66 \pm 13,38$), mint a bal oldali HS-os betegeknél ($29,68 \pm 13,01$), de a különbség nem volt szignifikáns ($p=0,6$). A HS oldaliságát és az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek arányát elemezve nem találtunk szignifikáns különbséget ($p=0,4$) a bal ($2,43 \pm 1,39$) és a jobb ($3,55 \pm 2,69$) oldali hippocampus között.

Elemézve a PV+ axonsarjadzást és az epilepszia kezdetét (beteg életkora az első epilepsziás roham jelentkezésekor), érdekes jelenség volt látható a HS-os betegek csoportjában. A PV+ axonsarjadzás jelentős volt azoknál, akiknél az epilepszia gyermekkorban (4-8 éves kor között) vagy serdülőkorban (13-15 éves kor között) kezdődött (6.B ábra). Ezen kívül az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya is lényegesen magasabb volt azokban a HS-os betegeknél, akiknek az epilepszia gyermekkorban (4-8 éves kor között) vagy serdülőkorban (13-15 éves

kor között) kezdődött, összehasonlítva azokkal, akiknél a TLE kezdete a fentiektől eltérő életkorban volt. A különbség nem volt statisztikailag szignifikáns (nem ábráztuk).

Mivel a gyermek- és serülőkori TLE kialakulása a korábban gyermekkori lázgörcsöt átélt betegek körében volt megfigyelhető (Janszky és mta, 2004), tovább vizsgáltuk azt, hogy van-e összefüggés a PV+ axonsarjadzás és a gyermekkori lázgörcs, mint anamnesztikus adat megléte között. A lázgörcsöt átélt betegekben nagyobb volt a sarjadzás mértéke, mint azoknál, akiknél gyermekkorban nem volt lázgörcs, bár a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns (6.C ábra). Ezen kívül a gyermekkori lázgörcsöt átélt TLE betegekben az ektópiás PV+ sejtek száma és az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya magasabb volt, mint azokban, akiknél nem alakult ki lázgörcs gyermekkorban, bár a különbség itt sem volt szignifikáns (6.D ábra). A statisztikai szignifikancia hiányát a gyermekkori lázgörcsöt átélt betegek viszonylag alacsony esetszáma okozhatja.



6. ábra: A HS-os betegek szövettani eredményei és klinikai adatai közötti összefüggések.

Az **A** grafikon a PV+ axonsarjadzás mértéke és a TLE fennállásának időtartama közötti összefüggést ($p < 0,05$) mutatja. A **B** grafikon a PV+ axonsarjadzás mértékét és a betegek életkorát ábrázolja az epilepszia kezdetekor. A **C** diagram mutatja, hogy a GD-ban a PV+ axonsarjadzás mértéke magasabb volt azoknál, akiknél gyermekkori lázgörcs szerepelt az anamnézisben (FS), azokhoz a betegekhez képest, akiknél nem fordult elő (no FS), bár a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. A **D** diagram mutatja, hogy a GD-ban az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya magasabb volt azoknál, akiknél gyermekkori lázgörcs szerepelt az anamnézisben (FS) azokhoz a betegekhez képest, akiknél nem fordult elő (no FS), bár a különbség itt sem volt szignifikáns. (**C**, **D**) A dobozdiagramokon a bajuszok az 5-ös és 95-ös percentilis értékeket mutatják.

4.5 Szinapszisok a gyrus dentatus szemcsesejtrétegében és a molekuláris rétegben

Mivel a különböző etiológiájú TLE betegek csoportjaiban különbségeket figyeltünk meg a PV+ axonsarjadzásban, három betegcsoportban megvizsgáltuk az axo-szomatikus szinapszisok arányának változását:

1. a HS-os csoportban,
2. a tumor indukált epilepsziás betegek csoportjában, és
3. a nem epilepsziás kontrollokban.

A tumor indukált epilepsziában a szemcsesejtek szimmetrikus (gátló) szinapszis / szóma arányszáma hasonló volt a kontrollban találtakhoz (2. táblázat). A kontroll csoporttal és a tumor indukált epilepsziá betegek csoportjával összehasonlítva a HS-os csoportban kisebb volt a szimmetrikus axo-szomatikus szinapszis / szemcsesejt aránya (2. táblázat). Ezek alapján kizárhatjuk, hogy a sarjadzó axonok a HS-ban a szemcsesejteken nagyobb számú periszomatikus gátló szinapszis kialakításáért lennének felelősek.

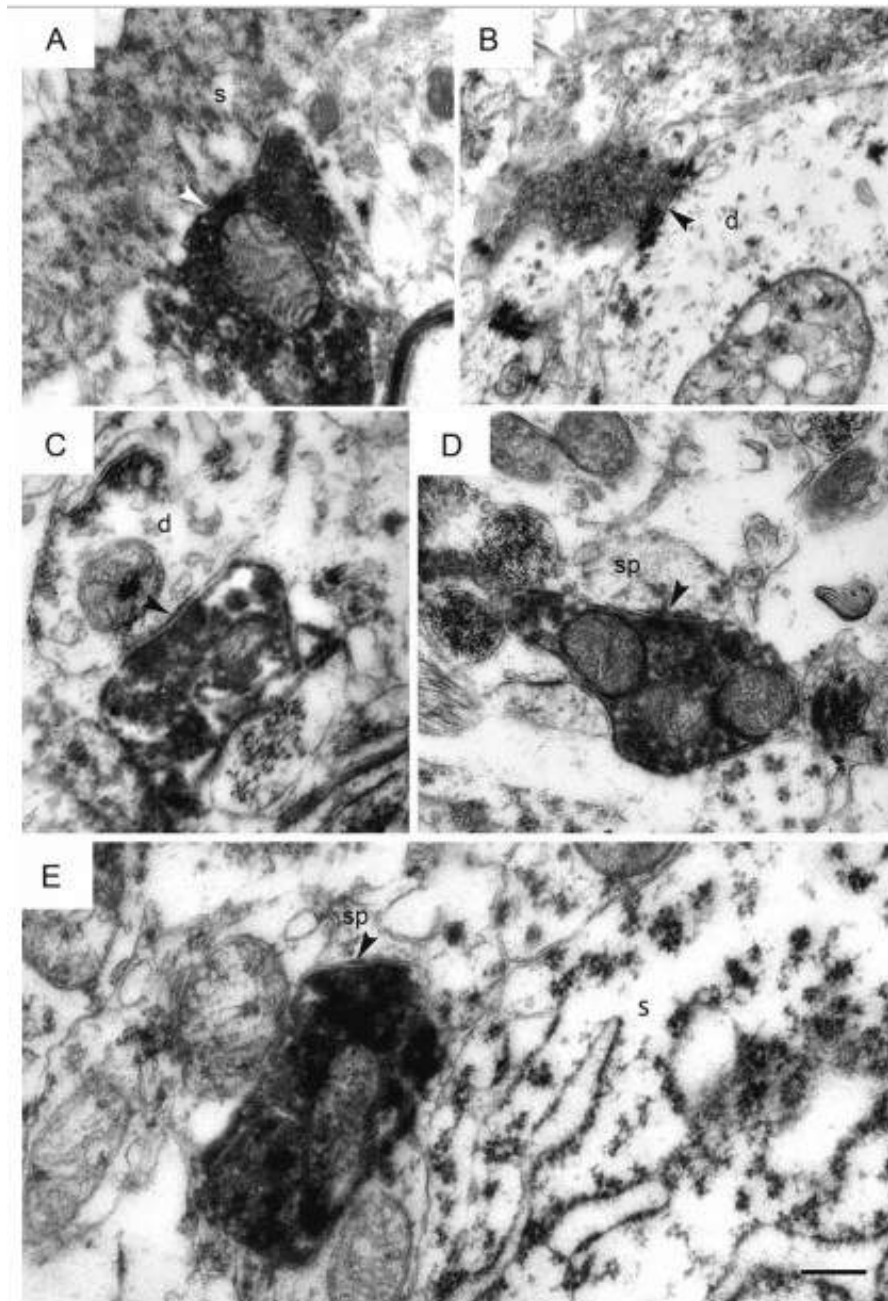
2. táblázat: A szemcsesejteken levő szimmetrikus szinapszis / szóma szám TLE betegek és nem epilepsziás kontrollok gyrus dentatusában

	Nem epilepsziás kontroll	HS	Tumor indukált TLE
Szemcsesejt szómák száma	168	150	154
Szimmetrikus szinapszisok száma / szóma	0,406 ± 0,05	0,33 ± 0,07	0,409 ± 0,04

Egy korábbi tanulmány szerint erős glutamát-dekarboxiláz immunreaktivitás található a TLE betegek GD molekuláris rétegének belső egyharmadában. Ez alapján feltételezték, hogy az interneuronok - beleértve a kosársejteket - sarjadzó axonjai a szemcsesejtek dendritjein hoznak létre terminálisokat (Mathern és mtsai, 1995). A fent említett megfigyeléseink alátámasztják Mathern és mtsai. (1995) által leírtakat, és a PV+ sarjadzó axonok posztzinaptikus célpontjának részleges megváltozását jelzik. A szemcsesejtrétegben immunelektronmikroszkópos vizsgálattal szimmetrikus szinapszisokat figyeltünk meg,

melyeket PV+ axonterminálisok képeztek a szemcsesejtek szómáján (7.A ábra). Ezen felül a PV+ axonterminálisok gyakran alkottak szimmetrikus szinapszisokat proximális és kis átmérőjű disztális dendriteken és dendrittüskéken (7.B-D ábra). Ritkán a PV+ axonterminális a szemcsesejt szómájának a közelében volt látható: a szinaptikus kapcsolatot nem a szómán, hanem a mellette levő dendriten vagy tüskén alakította ki (7.E ábra).

A PV+ axonterminálisok eloszlásának vizsgálata során nyert eredményeink a különböző célstruktúrákon azt mutatták, hogy a GD azon területein, ahol látható volt a PV+ axonok sarjadzása, a PV+ axonterminálisok által létrehozott periszomatikus szinapszisok aránya szignifikánsan alacsonyabb volt ($p < 0,01$), mint az axo-dendritikus szinapszisoké. Ezen kívül a PV+ axonterminálisok szignifikánsan ($p < 0,01$) több szinapszist képeztek a dendrittüskén, mint a szemcsesejtek szómáján (3. táblázat). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a GD azon területén, ahol a fénymikroszkópos vizsgálat során PV+ axonsarjadzást láttunk, a PV+ axonterminálisok célstruktúrájának változása volt megfigyelhető.



7. ábra: Elektronmikroszkópos felvételek a szemcsesejtrétegben és a molekuláris rétegben levő PV+ axonterminálisokról HS-os betegek GD-ában.

(A) Fehér nyílhegy mutatja a PV+ axonterminális által létrehozott szinapszist a szemcsesejtrétegben található sejttesten (s). A GD molekuláris rétegében PV+ axonterminálisok szinapszisokat alkotnak (fekete nyílhegyek) nagy átmérőjű proximális dendritekkel (d a B képen), kis átmérőjű disztális dendritekkel (d a C képen), valamint dendrittüskékkel (sp a D képen). (E) Egy dendrittüskével (sp) szinaptikus kapcsolatot (fekete nyílhegy) alkotó axonterminális a szemcsesejt szómája (s) mellett. **Rövidítések:** s, szóma / sejttest; d, dendrit; sp, dendrittüske. Lépték = 200 nm az A, C és E képeken, 300 nm a D képen és 400 nm a B képen.

3. táblázat: Az axonsarjadzás területén megfigyelt PV+ axonterminálisok eloszlása különböző célstruktúrákon HS-os betegek gyrus dentatusában

Posztszinaptikus struktúra	Szóma	Dendrit	Tüske
PV+ szinapszisok százalékos aránya	15,9 ± 5,56	46,3 ± 4,26	41,2 ± 1,1

5 Megbeszélés és következtetések

Vizsgálataink során az agykéreg szövettani elváltozásait tanulmányoztuk az antiepileptikumokra nem reagáló, farmakoterápia-rezisztens TLE betegek műtéti rezekátumain. A PV+ sejtek tanulmányozását a betegekből műtétileg eltávolított hippocampusok GD-ában végeztük.

5.1 *Epilepsziás betegek hippocampusában található morfológiai elváltozások a parvalbumin immunreaktív sejtek és axonok tekintetében*

Munkánk fő megállapítása, hogy a GD molekuláris rétegében látott PV+ neuronok axonjainak a GD molekuláris rétegében megfigyelhető sarjadzása és a HS, valamint a PV+ idegsejtek GD-on belüli lokalizációjának változása között összefüggés mutatható ki. Ezen kívül a PV+ axonterminálisok célstruktúrájának változását figyeltük meg a GD azon területein, ahol a PV+ axonok megfigyelhetők voltak. Noha PV+ axonsarjadzást azoknak a TLE betegeknek a GD-ában is láttunk, akiknél az epilepszia nem járt HS-sal, megfigyeléseink alapján kijelenthetjük, hogy a PV+ neuronok axonjainak sarjadzása HS-ban szignifikánsan erősebb volt, mint más etiológiájú TLE betegcsoportokban vagy a kontroll csoportban. Ezen felül szignifikánsan több ektópiás PV+ idegsejtet találtunk a GD molekuláris rétegében és a fissura hippocampi mentén HS-ban, mint a kontroll csoportban. Az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek arányát tekintve szignifikánsan nagyobb arányszámot kaptunk a HS-os betegek esetében, mint más etiológiájú TLE csoportban és a kontroll csoportban. Ezen kívül szignifikáns pozitív korrelációt figyeltünk meg a PV+ axonok sarjadzásának mértéke és az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya között.

5.1.1 *A vizsgálatunk limitációi*

Jelen munkában vizsgált TLE betegek epilepsziájának hátterében álló etiológiát a hippocampus idegsebészeti eltávolítását megelőző MRI vizsgálat során határozták meg. Az epilepsziás betegek legnagyobb csoportjára a HS volt jellemző. Korábbi publikációk szerint a TLE leggyakoribb oka a HS és az esetek 48-75%-ában mutatható ki (Lehericy és mtsai, 1997; Blümcke és mtsai, 2002; Blümcke, 2009; Howe és mtsai, 2010). Ritkábban fordul elő, hogy a TLE MCD-hez kapcsolódik (13-45%), míg az esetek egy kisebb részében a HS és az MCD együttesen fordul elő (Salanova és mtsai, 2004; Blümcke, 2009; Tassi és mtsai, 2009; Blümcke és mtsai, 2011). A kettős patológia alacsonyabb gyakoriságának megfelelően kevesebb

mintával rendelkezünk a HS + MCD csoportot tekintve. Ezen kívül viszonylag alacsony számban voltak mintáink olyan TLE betegekből, akiknél az MRI felvételen nem volt látható elváltozás (MR-negatív csoport). Az irodalmi adatok szerint az epilepsziás esetek 5-8%-ában figyelhető meg MR-negativitás (Tassi és mtsai, 2009; Blümcke és mtsai, 2017). Az általunk vizsgált HS + MCD, az MCD és az MR-negatív betegcsoportok viszonylag alacsony esetszáma – melyet eredményeink értékelésénél figyelembe kellett venni – megfelel az MR-rel meghatározható, különböző etiológiájú TLE csoportok prevalenciájának.

Bár az intrakraniális tumor a TLE második leggyakoribb oka (Blümcke, 2009; Tassi és mtsai, 2009), viszonylag alacsony számú minta állt rendelkezésünkre tumor indukált epilepsziás mintákból. Ugyanis csak azoknak a TLE betegeknél a szövetmintáit használtuk fel, akiknél a hippocampus, vagy annak egy része eltávolításra került, de a tumor nem érintette a hippocampust. Ez viszonylag ritkán fordult elő, ami magyarázza a tumor indukált TLE esetek alacsony számát. Hasonlóképpen, a kontrollcsoportunk elemszáma is alacsony volt, mivel olyan betegek alkották, akiknek intrakraniális tumoruk mellett nem alakult ki epilepsziájuk. A nem epilepsziás kontroll csoportba olyan betegek tartoztak, akiknek hippocampusa eltávolításra került, de a daganatsejtek a struktúrát nem infiltrálták. Ki kell hangsúlyozni, hogy a hippocampus eltávolítása ebben az esetben, valamint a tumor indukált TLE csoportban is a komplett és radikális tumorrezekció miatt szigorúan terápiás céllal történt.

A különböző TLE csoportok ismert prevalenciájának megfelelően, szignifikánsan több HS-os esetünk volt egyéb etiológiájú TLE csoportokkal összehasonlítva. Az egyes betegeknél megfigyelt PV+ axonok sarjadzásának mértéke és az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya azt jelzi, hogy a HS-os betegek csoportjában talált erősebb PV+ axonsarjadzás és az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek magasabb aránya azonban nem a HS-os csoportba tartozó betegek magasabb száma miatt van. Mindez arra utal, hogy a fenti morfológiai jelenségek a HS jellemzői. Bár a vizsgált metszetek száma betegenként 3 és 9 között volt, a hippocampus zsugrodása következtében általában alacsonyabb metszetszámmal rendelkezünk HS esetén. Ezzel szemben több metszet állt rendelkezésünkre az MCD és MR-negatív esetekben, ami azt jelzi, hogy a gyengébb PV+ axonsarjadzás és az alacsonyabb ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejszám arány oka ezekben a csoportokban nem a vizsgálható metszetek alacsony száma. Ezért, az egyes TLE csoportokban látott különböző, és esetenként alacsony betegszám ellenére feltételezzük, hogy a PV+ axonsarjadzás és az ektópiás PV+ neuronok jelenléte a GD molekuláris rétegében a HS jellemzői.

A nem epilepsziás kontroll hippocampus-szövet viszonylag korlátozott elérhetősége miatt sok tanulmány szerzői balesetben elhunyt személyek hippocampusait használták (Wittner és

mtsai, 2001; Arellano és mtsai, 2004; Andrioli és mtsai, 2007). Míg azok a hippocampusok egészséges emberek ép mintáinak tekinthetők, az autopszia miatt általában elkerülhetetlenül több órás postmortem késéssel kell számolni. A korábbi tapasztalatunknak megfelelően, a késői fixálás csökkenti a PV+-itás intenzitását (Ábrahám és mtsai, 2007). Ezért mi, agytumoros, nem epilepsziás betegek műtétielt eltávolított szöveteit használtuk kontrollként, melyek, hasonlóan a TLE-s mintákhoz, a rezekciót követően azonnal fixálva lettek. Ez a fixálási protokoll lehetővé tette a PV+-itás megfelelő megőrzését és a szövettani eredmények összehasonlíthatóságát a különböző etiológiájú betegcsoportokban. Számos tanulmányban használtak kontrollként tumor indukált TLE betegekből származó mintákat (Blümcke és mtsai, 1999, Blümcke és mtsai, 2000, Selke és mtsai, 2006). Jelen munka során a PV+ axonsarjadzást és az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek arányát tekintve nem láttunk figyelemre méltó különbséget a nem epilepsziás tumoros betegek és a tumor indukált TLE betegek csoportjai között. Ez alapján mindkét csoportot lehetne kontrollként használni. Egy, a szemcsesejtek CB immunreaktivitásáról szóló, laboratóriumunkban korábban végzett vizsgálat szerint azonban a tumor indukált TLE csoportban a hippocampus nem tekinthető kontroll szövetnek (Ábrahám és mtsai, 2011).

A TLE diagnózisa és a műtét között eltelt hosszú idő egyben a betegek hosszú időn át tartó farmakológiai kezelését is jelenti. Feltételezhetjük, hogy az epilepszia kezelésére adott gyógyszerek (anti-epileptic drug, AED) befolyásolhatják a PV+ axonsarjadzást és az ektópiás idegsejtek előfordulását. A lakozamid vizsgálatok kimutatták, hogy gátolja a moharostok sarjadzását a TLE kaininsav-modelljében (Wang és mtsai, 2018), míg egy másik, széles körben használt AED, a gabapentin blokkolta a szinaptogenezist és a neokortikális traumát követő aberráns excitátoros áramkörök kialakulását (Takahashi és mtsai, 2018).

Bár a fenobarbitálról, a valproátról, a topiramátról és a lamotiginről kimutatták, hogy csökkentik az agyi eredetű neurotróf faktor (brain-derived neurotrophic factor) és a neurotrofin-3 mRNS képződését patkányban, a moharostok sarjadzását nem észlelték (Shi és mtsai, 2010). A TLE pilokarpin-modelljében a karbamezepin gyors beadása gátolja a PV-immunreaktivitás csökkenését (Chakir és mtsai, 2006), míg a vigabatrin korai beadása a PV+ sejtek számának növekedését okozta a hippocampus fejlődése során (Levav-Rabkin és mtsai, 2010).

A fent említett adatok alapján feltételezhetjük, hogy a TLE hosszabb fennállása, következésképpen a hosszabb ideig tartó gyógyszeres kezelés segítene a PV+ sejtek megőrzésében és csökkentené az axonok, legalábbis a szemcsesejtek axonjainak sarjadzását. Ez ellentmond az eredményeinknek, nevezetesen a TLE fennállásának időtartama és a normál lokalizációjú PV+ sejtek számának csökkenése között megfigyelt pozitív szignifikáns

korrelációnak. Hasonlóan, a TLE időtartama és a PV+ axonok sarjadzásának mértéke között megfigyelt szignifikáns pozitív korreláció arra utal, hogy hosszan tartó gyógyszeres kezelés nem gátolja az axonsarjadzást. Azonban nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét sem, hogy bizonyos AED-k hosszan tartó adása éppen kiváltja a PV+ axonok sarjadzását. Figyelembe kell azt is vennünk, hogy a TLE diagnózisa és a műtét között eltelt hosszú idő alatt (akár évtizedek) a betegek számos különböző AED-t kaptak. Bár a gyógyszer-rezisztencia nyilvánvaló, ha a második antikonvulzív szer sem képes a betegnél roham-kontrollt elérni, sok beteg anamnézisében több mint kettő AED kipróbálása szerepel. Különösen igaz ez a HS-os csoportra, ahol a betegek műtét előtt szedett gyógyszerlistáján gyakran 8-10 különböző antiepileptikum szerepel. Ezért a TLE betegeknek adott különböző hatásmechanizmusú AED-k nagy száma miatt a gyógyszerek PV+ axonsarjadzásra kifejtett hatása nem vizsgálható.

5.1.2 Parvalbumin immunreaktív axonok sarjadzása, az ektópiás parvalbumin immunreaktív idegsejtek jelenléte és a betegek klinikai adatai

A PV+ kosársejtek és az axo-axonikus sejtek morfológiai változásait az epilepszia számos állatmodelljében tanulmányozták (Best és mtsai, 1993; Suzukawa és mtsai, 1999; André és mtsai, 2001; Sun és mtsai, 2007; Huusko és mtsai, 2015; Botterill és mtsai, 2017; Cameron és mtsai, 2019). Azokban a munkákban, ahol PV+ neuronok jelentős pusztulását írták le, sem a PV+ axonsarjadzásról, sem az ektópiás PV+ sejtekről nem számoltak be. A PV+ kosársejtek és az axo-axonikus sejtek pusztulása emberi HS-sal járó TLE-ban ismert (Sloviter és mtsai, 1991; Wittner és mtsai, 2001; Arellano és mtsai, 2004; Andrioli és mtsai, 2007). Emberi epilepsziás mintákban korábban a szemcsesejtek axon-iniciális szegmentumán végződő PV+ axonterminálisokat, valamint a GD molekuláris rétegében és a fissura hippocampi mentén elhelyezkedő ektópiás PV+ neuronokat figyeltek meg (Wittner és mtsai, 2001). Az emberi TLE-ban és az állatmodellekben megfigyelt patológiai elváltozások hasonlóságának ellenére (Dudek és mtsai, 2002; Seress és mtsai, 2009; Sperk és mtsai, 2009; Tang és Loke, 2010; Sloviter és Bumanglag, 2013; Buckmaster, 2014), az ektópiás PV+ sejtek jelenlétét és az általunk a molekuláris rétegben megfigyelt PV+ axonsarjadzást állatmodellekben nem írták le. Lehetséges magyarázat lehet, hogy míg az epilepszia az embereknél több évig, vagy akár évtizedig elhúzódik, a kísérleti állatokban létrehozott epilepsziás aktivitás viszonylag rövid ideig tart. A hosszan fennálló epilepszia a betegeknél a sejtek szintjén megfigyelhető olyan változásokat is indukálhat, amely különbözik attól, amit állatkísérletekben figyeltek meg. Ezt alátámasztja az általunk megfigyelt összefüggés az epilepszia időtartama és a PV+ axonok sarjadzása között.

A PV+ axonok sarjadzása gyakran azokban a HS-os betegekben fordult elő, akiknél a TLE gyermekkorban (4-8 év) vagy serdülőkorban (13–15 év) kezdődött. Egy korábbi tanulmány (Janszky és mtsai, 2004) kimutatta, hogy azoknál a HS-os betegek nagy százalékánál, akiknél gyermekkori lázgörcs szerepelt az anamnézisben, az epilepszia gyermekkorban (átlagosan 5,4 éves korban) vagy serdülőkorban (átlagosan 15,3 éves korban) kezdődött. Janszky és mtsai. (2004) által említett korcsoportok és a legutóbbi munkánk eredményeinek egybeesése jelzi, hogy a lázgörcsnek szerepe lehet a PV+ axonok sarjadzásában. Azt találtuk, hogy a lázgörcs tekintetében pozitív anamnézisű betegeknel erősebb volt az axonsarjadzás, mint azoknál a betegeknel, akiknél nem szerepelt lázgörcs az anamnézisben. Hasonlóképpen az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya magasabb volt azoknál a betegeknel, akik gyermekkorukban lázgörcsöt éltek át, azokhoz képest, akik nem, de a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns.

A lázgörcs és a TLE betegek GD-ának molekuláris rétegében megfigyelt szemcsesejt diszperzió közötti kapcsolat régóta ismert (Houser, 1990; Houser és mtsai, 1992). Feltételezhető, hogy a sarjadzó PV+ axonok ezeken a diszpergált szemcsesejteken végződnek. Meg kell jegyezni, hogy elektronmikroszkópos megfigyeléseink ennek ellentmondanak. Először is a HS-os csoportban a szemcsesejteken kialakuló axo-szomatikus szimmetrikus szinapszisok számában csökkenést láttunk, összehasonlítva a tumor indukált TLE csoporttal és a nem epilepsziás kontrollokkal. Ez ellentmond annak a felvetésnek, hogy az erős PV+ axonsarjadzás a normális elhelyezkedésű vagy diszpergált szemcsesejtek erősebb axo-szomatikus beidegzése miatt van. Továbbá, a GD molekuláris rétegében levő PV+ axonterminálisok ritkán voltak láthatók a diszpergált szemcsesejtek sejttestjein. Ezzel szemben a PV+ terminálisok gyakran a disztális dendriteken és dendrittüskéken voltak megfigyelhetők, ami a PV+ kosársejtek szinaptikus célpontjainak részleges megváltozására utalnak.

5.1.3 Az ektópiás parvalbumin immunreaktív sejtek és axonok eredete

Korábbi tanulmányokkal összhangban (Sloviter és mtsai, 1991; Wittner és mtsai, 2001; Arellano és mtsai, 2004; Andrioli és mtsai, 2007), a HS-os betegekben mi is a hiláris PV+ neuronok számának csökkenését és nagyszámú ektópiás sejtet figyeltünk meg a GD molekuláris rétegében. Ezen kívül az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya korrelált az axonsarjadzás mértékével a HS-os csoportban, valamint a teljes betegpopulációban is. Ezeket a változásokat figyelembe kell venni, amikor a molekuláris rétegben levő PV+ axonok eredetéről beszélünk. Feltételezzük, hogy az ektópiás PV+ sejtek, legalábbis részben, a molekuláris rétegben megfigyelt sarjadzó axonok eredő sejtjei. Feltételezhető ugyan, hogy a

PV+ neuronok eltűnése és a PV+-itás csökkenése a sejttestben csak virtuális. Eszerint a TLE betegek normál elhelyezkedésű kosársejtjei szómájában a PV expressziója csökkenne, de az adott sejt axonjaiban a PV+-itás érintetlen maradhat (Wittner és mtsai, 2001). Ilyen esetben PV-negatív kosársejtek lennének a sarjadzó PV+ axonok eredő sejtjei. Megfigyeléseink azonban ellentmondanak annak a feltételezésnek, miszerint az epilepsziás aktivitás okozza a sejtekben a PV expresszió csökkenését. Ugyanis, ha feltételezzük, hogy a hiláris kosársejtekben a PV+-itás csökkenése az epilepsziás aktivitás miatt következik be, a PV+-itás erőteljes csökkenését minden etiológiájú TLE csoportban látnunk kellene, nem csak a HS-os és a HS+MCD csoportokban. Ugyanakkor a hasonló klinikai paraméterekkel – beleértve a rohamok gyakoriságát – rendelkező más etiológiai csoportba tartozó betegekben a PV+ sejtszám nem különbözött szignifikánsan a nem epilepsziás kontrollokban megfigyelt sejtszámtól, vagyis nem valószínű, hogy az epilepsziás aktivitás tehető felelőssé a hilusban megfigyelhető csökkent PV+ sejtszámért. Ezért úgy gondoljuk, hogy a GD molekuláris rétegében látható PV+ axonok eredő sejtjei nem lehetnek PV-negatív hilaris vagy subgranuláris kosársejtek. Ezzel szemben azt feltételezzük, hogy a sarjadzó PV+ axonok eredő sejtjei, legalábbis részben, az ektópiás PV+ sejtek.

A sarjadzó PV+ axonok eredetére vonatkozóan kérdés is felmerül, hogy ezek kommisszurális vagy asszociációs axonok-e? Az epilepszia egyik állatmodelljében, Christenson Wick és mtsai. (2017) kommisszurális PV+ interneuronok axonsarjadzását írták le hat hónappal a kainav-injekciót követően. Míg főemlős (majom) agyban a hippocampus kommisszurális kapcsolatai a presubiculumból (Amaral és mtsai, 1984) vagy a parahippocampalis gyrusból erednek (Demeter és mtsai, 1985), nagyon gyenge kapcsolat mutatható ki a hippocampus uncalis része és a GD között (Amaral és mtsai, 1984). Nagyon valószínű, hogy a hippocampus és a GD közti kommisszurális kapcsolat még a majomban talátnál is gyengébb az emberben (Amaral és Lavenex, 2007). Ez azt jelzi, hogy az általunk megfigyelt PV+ axonsarjadzás jellemzően nem az ellenoldali GD-ből származik, ami a molekuláris rétegben található ektópiás PV+ neuronok szerepét emeli ki a HS-ban megfigyelhető abnormális neuronális körök kialakulásában.

Rágcsálókban a PV+ sejtek prenatalisan a mediális gangliondombból származnak, majd tangenciális vándorlás során a neo- és archikortex marginális zónájába (a későbbi molekuláris rétegbe) kerülnek (Xu és mtsai, 2004; Butt és mtsai, 2005; Tricoire és mtsai, 2011; Taniguchi és mtsai, 2013). Mivel a szemcsesejtek nagy része posztnatalisan jön létre (Altman és Das, 1965; Altman, 1966; Bayer és Altman, 1974), a kosársejtek a végleges helyüket a hilusban már a szemcsesejtréteg kialakulása előtt elfoglalják. Emberben a szemcsesejtréteg kialakulása nagy

részben prenatálisan történik (Seress, 2001; Seress és mtsai, 2001; Seress és Ábrahám, 2008), ami miatt nehéz megjósolni azt a lehetséges fejlődési mechanizmust, amely a hippocampus fejlődése során érintett lehet, és amely a HS-os betegek GD-ában található nagyszámú ektópiás PV+ kosársejt megjelenését okozza.

5.1.4 *Lehetséges funkcionális következmények*

HS-ban a PV+ axonterminálisok célstruktúrájának változása a szemcsesejtek excitációjának változását eredményezheti. A szemcsesejtek dendritjein és dendrittüskéin jelenlevő PV+ axonterminálisok jelzik, hogy a posztszinaptikus struktúrák, melyeken normálisan serkentő szinaptikus terminálisok végződnek, most részben gátló neuronok axonterminálisai által fedettek. Ez a szemcsesejtek excitabilitásának csökkenését okozhatja. Azonban figyelembe kell venni, hogy a dendrittüskék száma változhat TLE-ban. A TLE állatmodelljében a dendrittüskék denzitásának mérsékelt növekedését találták a szemcsesejt dendritjének azon szakaszán, ahol sarjadzó moharostok innerválták őket (Suzuki és mtsai, 1997). Az emberi TLE-ban viszont a szemcsesejteken levő dendrittüskék számát tekintve az eredmények ellentmondásosak. Míg Scheibel és mtsai. (1974) a dendrittüskék eltűnését figyelték meg, mások a dendrittüskék sűrűségének növekedését találták a rekurrens moharost-kollaterálisokkal kapcsolódó szemcsesejteken (Isokawa, 1997). Továbbá, a diszpergált szemcsesejtek eltérő dendritfával és tüskedenzitással rendelkeznek a szemcsesejtrétegben jelenlevő idegsejtekhez képest (Freiman és mtsai, 2011). A fent leírt eredmények arra utalnak, hogy a rendelkezésre álló információk eltérőek és még nem elegendők ahhoz, hogy megbecsüljük a PV+ axonoksarjadzás funkcionális szerepét a szemcsesejtek excitabilitásában.

Az „alvó kosársejt” („dormant basket cell”) elmélet szerint az axo-szomatikus interneuronok „némák” és a hilusban levő mohasejtek sérülékenysége miatt kevesebb serkentő bemenetet kapnak (Sloviter, 1991). Míg ezt az elméletet állatmodellek alátámasztják (Bekenstein és Lothman, 1993; Sloviter, 1994; Sloviter és mtsai, 2003), emberben a mohasejtek nem tűntek sérülékenyebbeknek, mint az epilepsziás hippocampus más neuronjai (Seress és mtsai, 2009). Emberi TLE-ban a szemcsesejt sejttestjén végződő gátló axo-szomatikus terminálisok mennyiségében nem észleltek eltérést a kontrollhoz képest (Wittner és mtsai, 2001; Wittner és Maglóczky, 2017). Ez arra utal, hogy a korábban talált PV+-itás elvesztése, melyet jelen munkánk is megerősített, csak virtuális, és nem az idegsejtek elvesztését jelenti. Míg TLE-ban a szemcsesejtek sejttestjén megvalósuló gátló szinaptikus transzmisszió erőssége nem ismert, az a tény, hogy a szemcsesejtek hiláris interneuronokat is innerválnak (Acsády és mtsai, 1998),

jelzi, hogy a szemcsesejtek epilepsziás túlserkentése az interneuronokra is fokozott serkentést gyakorol, beleértve a PV+ sejteket is.

Feltételezve, hogy a sarjadzó PV+ axonok forrása, legalábbis részben, a GD molekuláris rétegében található ektópiás PV+ sejtek, figyelembe kell vennünk azt, hogy ezeknek a sejteknek az afferensei eltérnek a szemcsesejtrétegben található sejtektől. Mivel ezek a sejtek az entorhinális kéreg célzójában helyezkednek el, az ektópiás PV+ sejtek serkentése egyidejűleg történik a perforáns pálya által serkentett szemcsesejtekével. Ez azt jelenti, hogy az ektópiás PV+ sejtek által nyújtott gátlás korábban érkezik a szemcsesejtek dendritjeire és dendrittüskéire, minthogy a normál lokalizációjú interneuronok szinaptikus transzmissziója okozta membrán hiperpolarizáció megfigyelhető lenne a szemcsesejtek szómáján és axon-iniciális szegmentumain. Ha feltételezzük, hogy a normál lokalizációjú és az ektópiás PV+ sejtek élettani jellemzői hasonlóak, az ektópiás PV+ sejtek aktivitása fokozhatja a szemcsesejteken a normális lokalizációjú kosársejtek és axo-axonikus sejtek által okozott gátlást. Bár további vizsgálatokra van szükség az előbbi feltételezésnek az alátámasztására vagy elvetésére, adataink egyértelműen anatómiai különbséget mutatnak a különböző etiológiájú TLE betegek GD-ában levő belső neuronális köreikben.

Az axonsarjadzás és a célstruktúra megváltozása TLE-ban nem kizárólag csak a PV+ kosársejtekre jellemző. Az epilepszia álltamodelljeiben az Ammon-szarvban és a GD-ban a szomatosztatin-immunreaktív axonok reorganizációja, valamint feltételezhetően a szemcsesejtek dendritjeivel és dendrittüskéivel alkotott, a normáltól eltérő szinaptikus kapcsolatai szintén ismertek (Zhang és mtsai, 2009; Long és mtsai, 2011; Peng és mtsai, 2013; Houser, 2014; Botterill és mtsai, 2017), ugyanakkor a szinapszisok helyeinek pontos azonosítása nem történt meg.

Eredményeink szerint a PV+ neuronok axonjai az általuk normálisan elfoglalt területen túl, az axonális reorganizáció következtében, a GD molekuláris rétegében is megtalálhatók, valamint, hogy a sarjadzás következtében a PV+ axonok célpontjai is módosultak. Ezek a változások hozzájárulhatnak a GD-on belüli kóros neuronális kapcsolatok kialakulásához, ami az epilepsziás állapot kialakulását és fenntartását segítheti elő.

Fehérállományi szinapszisok vizsgálata emberi mintákban

6 Anvag és módszerek

6.1 *A vizsgált betegek klinikai adatai*

Munkánk során a farmakoterápia-rezisztens TLE betegek középső temporális gyrusának sebészeti úton eltávolított rezekátumait (n = 14) használtuk. A patológiai háttér 10 esetben MRI-vel igazolt HS volt, míg négy beteg esetében az MRI vizsgálat MCD-t igazolt. Továbbá a HS-os betegekben a neuropatológiai vizsgálat során az Ammon-szarvban és a GD hilusában a HS-ra jellemző neuronpusztulást láttunk. A vizsgálatba bevont epilepsziás betegek demográfiai és klinikai adatait a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: A TLE betegek demográfiai és klinikai adatai

Betegek	Kor (év)	Nem	Rohamkezdet (év)	Betegség-hossz (év)	Rohamfrekvencia (év)	MR-diagnózis	Érintett oldal	IPI
1	25	F	5	20	6-7/hó	HS	B	lázgörcs
2	29	F	14	15	4/hó	HS	J	lázgörcs
3	48	F	8	40	6-8/hó	HS	J	lázgörcs
4	51	N	22	29	1-4/hó	HS	B	-
5	40	F	11	29	1-2/hó	HS	B	-
6	27	N	19	8	2-4/hét	HS	J	-
7	50	F	4	46	1-2/hó	HS	J	-
8	48	N	4	44	6/hó	HS	B	lázgörcs
9	34	N	23	11	5-8/hó	HS	B	-
10	48	N	28	20	2-3/hét	HS	B	-
11	48	N	38	10	6-8/hó	MCD	B	-
12	33	N	4	29	6-10/hó	MCD	B	-
13	32	N	14	18	1-6/nap	MCD	J	-
14	19	F	7	12	2-3/nap	MCD	B	-

Rövidítések és szimbólumok: B, bal; F, férfi; HS, hippocampus sclerosis; IPI, initial precipitating injury, elsődleges károsító sérülés; J, jobb; MCD, kéregfejlődési rendellenesség; N, nő; -, nem ismert/nem szerepel az anamnézisben.

A betegek klinikai vizsgálatait (MRI és EEG) a PTE ÁOK KK Neurológiai Klinikáján folytatták, a műtétekre a PTE ÁOK KK Idegsebészeti Klinikán került sor. Az alkalmazott műtéti eljárás minden esetben általános érzéstelenítést és standard temporális kraniotómiát követő

anterior temporális lobektómia volt. A szürkeállományt (GM) és az alatta levő WM-t tartalmazó neokortikális szövetek rezekciója szigorúan terápiás célból történt, az eltávolított rezekátumokat rutin patológiai és speciális szövettani vizsgálatokra küldték tovább. A neurológiai, radiológiai vizsgálatok és az operációk is a Helsinki Nyilatkozat rendelkezései szerint történtek. A betegek írásos beleegyezésüket adták a vizsgálatokhoz és a Pécsi Tudományegyetem etikai bizottsága engedélyezte a munkánkat. A szövetminták a kivételt követően azonnal fixálóra (4% PFA) kerültek.

6.2 A vizsgált kontrollok klinikai adatai

Kontrollként nem epilepsziás betegek temporális lebenyének kéreg alatti WM-át használtuk. A kontrollok egyik része intrakraniális tumoros betegekből származott (n = 3), másik részük autopsziás minta volt (n = 3). Mivel a tumoros kontroll minták száma a statisztikai analízishez alacsony volt, ezért folyamodtunk autopsziás minták vizsgálatához is. A kontrollok demográfiai és klinikai adatait a 5. táblázat foglalja össze.

5. táblázat: A kontrollok demográfiai és klinikai adatai

Tumoros betegek	Kor(év)	Nem	Tumor helyzete az MRI-n	Tumor oldalisága	Szövettani diagnózis
1	39	F	Parahipp. gyrus, gyrus piriformis	J	Glioblastoma, WHO Grade IV
2	74	N	Temporalis polus, hipp., parahipp. gyrus	J	Astrocytoma, WHO Grade III
3	38	N	Fronto-insulo-temporalis kéreg, hipp., parahipp. gyrus	J	Glioblastoma, WHO Grade IV
Autopsziás betegek	Kor(év)	Nem		Vizsgált kéreg oldalisága	Halál oka
1	77	F		B	szívroham
2	60	N		J	légzésleállás
3	72	F		J	légzésleállás

Rövidítések és szimbólumok: B, bal; F, férfi; hipp, hippocampus, J, jobb; N, nő.

A temporális lebeny neokortexében elhelyezkedő gyorsan növő agytumorok miatt szükséges idegsebészeti műtétet (n = 3) szintén a PTE ÁOK KK Idegsebészeti Klinikán végezték.

A rezekciót szigorúan terápiás célból végezték, a temporális lobektómiára a tumor biztonságos és radikális eltávolítása miatt volt szükség. Így az operációk során ép kéregállományi szövetek is eltávolításra kerültek, mivel a recidíva kivédése érdekében az eltávolított agyszövet szélének a tumor határától 2-3 cm-es távolságra kell lennie. A szövetminták fixálása a kivételt követően azonnal elkezdődött. Az eltávolított tumor szövettani diagnózisát a PTE ÁOK Patológiai Intézetében állították fel. Az intakt temporális neokortexben a szövettani vizsgálatok nem mutattak ki peritumorális szövetváltozást vagy tumor

infiltrációt. A vizsgálatban használt peritumorális WM szöveteket Ki-67 immunhisztokémiával mi is vizsgáltuk laboratóriumunkban, mely vizsgálat szintén kizárta a peritumorális szövet tumorsejtek általi infiltrációját. Ezeket az épnék tartott, peritumorális kéregállományi részeket használtuk kontrollként. Minden beavatkozást, beleértve a műtétet is, a betegek megfelelő tájékoztatása és írásos beleegyezésük után végeztek el. A szövetminták feldolgozása és szövettani kiértékelése az intézményi szabályzat (PTE KK RIKEB/5342) szerint történt, és a vizsgálatot végzők a Helsinki Nyilatkozat előírásai szerint jártak el.

Az autopsziás mintákat a budapesti Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet (KOKI) Humán Agyszövet Laboratóriumából kaptuk. Az autopszia a tatabányai Szent Borbála Kórház Patológiai Osztályán történt. A KOKI munkatársai a szöveteket a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelő módon szerezték be és használták fel. Valamennyi eljárást a Regionális, Intézményi Tudományos Bizottság és Kutatás-Értékelési Bizottsága hagyta jóvá (ETT TUKEB 15032/2019/EKU). A kontroll személyek halála nem függött össze központi idegrendszeri betegséggel, valamint sem a klinikai adatok, sem a boncolás nem tárt fel neurológiai rendellenességeket. Az agyakat ($n = 3$) a halál után 2-4 órán belül távolították el. A fixálás a következőképpen történt: kanülöket helyeztek az arteria carotis internákba és az arteria vertebralisokba, majd az agyakat először 5 ml heparint tartalmazó fiziológiás sóoldattal (1,5 liter 30 perc alatt), majd fixáló oldattal perfundálták (4,5 liter 1,5-2 óra alatt), amely 4% PFA-t, 0,05% glutáraldehidet és 15% pikrinsavat tartalmazott PB-ben (pH 7,4). A perfúziót követően 0,5-1 cm vastag blokkokat vágta ki a Brodmann 21-es temporális kérgi régióból, és egy éjszakán át utófixálták Zamboni oldatban glutáraldehid nélkül (Maglóczky és mtsai, 1997; Tóth és mtsai, 2010). A fixálást követően a blokkokat 30%-os, PB-ben hígított szukróz oldatban krioprotektálták két napig, majd folyékony nitrogén fölött fagyasztották és -80 °C -on tárolták.

6.3 A vizsgált fehérállományi minták szövettani feldolgozása

A TLE és tumoros betegekből eltávolított temporális kéreg rezekátumok a műtéti eltávolítást követően azonnal PB-vel (0,1M, pH=7,4) pufferelt 4%-os PFA oldatba kerültek. Ez után a mintákat 1 órán belül laboratóriumunkba szállítottuk, ahol a szövetmintákat további 12 órán keresztül fixáltuk 4 °C -on, folyamatos rázás közben. Az autopsziás mintákat a fent leírt mélyhűtési eljárást követően tárolták. A szövetminták közvetlenül a felolvasztás után PB-vel (0,1M, pH=7,4) pufferelt 4%-os PFA oldatba kerültek, majd a blokkokat 12 órán át fixáltuk.

A neokortex alatti WM-t és a GM-t tartalmazó szövetblokkokat paraffinba ágyaztuk, azután 10 mikrométeres metszeteket készítettünk belőlük szánkamikrotóm segítségével, majd

zselatinnal bevont üveglemezekre rögzítettük. A TLE betegek sebészileg eltávolított szövetblokkjainak többi részéből paraffinos beágyazás nélkül 80 µm-es metszeteket készítettünk vibratómmal, és az úsztatott metszeteken végeztünk immunhisztokémiát.

6.4 *Szinaptofizin immunhisztokémia*

A kéreg alatti WM-ban jelen levő szinapszisok láthatóvá tétele céljából anti-SYN antitesttel immunhisztokémiát végeztünk a korábban leírtak szerint (Ábrahám és mtsai, 2001). A 10 µm-es paraffinos, előzetesen deparaffinált és rehidrált metszeteket első lépésként 3x10 percig TB-ben (pH=7,4) mostuk, majd citrát pufferrel 3x5 percig mikrohullámú sütőben (800 W) kezeltük az antigén feltárása céljából. Ezután ismét a metszetek 3x10 percig történő mosása következett TB-ben, majd háttérgátlás céljából 1 órán át inkubáltuk 1%-os normál lószérum (Vectastain Elite ABC Kit) 5 ml TB-ben oldott oldatában, mely 0,4% TritonX-100-at (Sigma-Aldrich, Magyarország) is tartalmazott. A metszeteket primer monoklonális egér anti-SYN antitesttel (1:400, Novocastra, New Castle upon Tyne, Egyesült Királyság) inkubáltuk egy éjszakán át szobahőmérsékleten nedves kamrában. Ezt másnap újabb 3x10 perces TB-ben való mosás követte, majd biotinilált szekunder anti-egér antitesttel szobahőmérsékleten 2 órán át inkubáltuk. Ismét 3x10 perc TB-ben való mosás következett, majd a kötődött antitesteket avidin-biotin peroxidáz detektáló rendszer (Universal Vectastain ABC Elite Kit, Vector, Burlingame, CA) segítségével tettük láthatóvá. Ennek során először az avidin-biotin-peroxidáz komplexet adtuk a metszetekhez 2 órára. Végül egy újabb 3x10 perces TB-ben való mosást követte az előhívás, melynek során a peroxidáz-reakciót alkalmaztuk, a kromogén DAB volt. Az előhíváshoz Vector DAB Peroxidase Substrate Kit-et használtunk. A reakciót fénymikroszkóppal ellenőriztük. Az előhívást követően a metszetek 2x10 percig TB-ben (pH 7,6) történő mosása következett. Ezt követően egyes metszetek esetében Nissl háttérfestést végeztünk krezil-ibolya oldat segítségével. A metszeteket ezután emelkedő koncentrációjú alkoholsorban dehidráltuk, majd a derítést xilollal végeztük, azután DePex-el (Fluka, Svájc) fedtük a metszeteket. A negatív kontroll metszetekkel ugyanígy jártunk el, azonban ezekben az esetekben a primer antitestet kihagytuk.

6.5 *NeuN immunhisztokémia*

A NeuN pan-neuronális antigént expresszáló WM neuronok kimutatására szolgáló immunhisztokémiát a korábban publikált módon végeztük (Richter és mtsai, 2016). A vibratómmal készített 80 µm-es metszeteket első lépésként 3x10 percig TB-ben (pH 7,4)

mostuk, majd 20 percig TB-ben hígított 1%-os hidrogén-peroxid oldattal kezeltük. Ezután a metszetek 3x10 percig történő mosása következett, majd 1 órán át inkubáltuk 1%-os normál lószérum (Vectastain Elite ABC Kit) 5 ml TB-ben oldott oldatában, mely 0,4% TritonX-100-at (Sigma-Aldrich, Magyarország) tartalmazott. A metszeteket primer monoklonális egér anti-NeuN antitesttel (1:500, Chemicon, Temecula, CA, USA) inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 éjszakán át. Másnap újabb 3x10 perces TB-ben való mosás következett, majd a kötőhelyeket biotinilált szekunder anti-egér antitesttel és avidin-biotin peroxidáz detektáló rendszerrel (Universal Vectastain ABC Elite Kit, Vector, Burlingame, CA) tettük láthatóvá. Az előhívás során DAB-ot (Vector DAB Peroxidase Substrate Kit) használtunk kromogénként. A metszeteket zselatinnal kezelt tárgylemezre húztuk fel, melyeket a száradást követően dehidráltuk, majd derítettük, és EuKit-el (Sigma-Aldrich, Budapest) fedtük. A metszetek egy részét a dehidrálás előtt krezil-ibolyával háttérfestettük. A negatív kontroll metszetekkel ugyanígy jártunk el, azonban ezekben az esetekben a primer antitestet kihagytuk.

6.6 A fehérállományi szinapszisok transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálata

A szinapszisok TEM-mel való megjelenítésére a TLE betegek neokortikális szöveteit immunelektronmikroszkópos vizsgálatra is előkészítettük. A betegek temporális lebenyéből származó, a fentiek szerint fixált szövetblokkjaiból 80 µm-es metszeteket készítettünk vibratóm segítségével. Az úsztatott metszeteket „fagyasztásos-olvasztásos” eljárásnak vetettük alá, mellyel az antitestnek szövetbe való penetrációját segítettük. Ennek során a metszeteket előbb 15%-os, majd 30%-os szacharóz oldatba helyeztük (krioprotekció), ez után a metszeteket egymás után háromszor folyékony nitrogén fölé tartottuk. Ezt követően az előző fejezetben leírtak alapján indirekt immunreakciót végeztünk primer anti-SYN antitesttel (1:400, Novocastra, New Castle upon Tyne), a TritonX-100 kihagyásával. Az immunreakciót biotinilált szekunder antitest és az avidin-biotin-peroxidáz komplex (Vector, Burlingame, CA) kötődése után, DAB kromogénnel tettük láthatóvá. A metszetek utófixálását először 2,5%-os glutáraldehid oldatban, majd 1%-os PB-ben hígított ozmium-tetroxid oldatban végeztük. Ezt követően a metszeteket növekvő koncentrációjú etil-alkohollal dehidráltuk, propilén-oxiddal derítettük. A lapos beágyazást (flat-embedding) Durcupan műgyantával (Sigma-Aldrich, Budapest) végeztük. A vizsgálni kívánt WM területet fénymikroszkópos kontroll mellett kivágtuk és Durcupannal töltött zselatin kapszulába ágyasztuk. A blokkból ultramikrotóm (Leica Ultracut, Németország) segítségével ultravékony metszetek (65 nm) készültek, melyeket parlodion hártáival fedett egy-lyukú gridre (single-slot grid) helyeztünk. Ezt követte a

metszetek kontrasztosítása uranyl-acetáttal és ólom-citráttal. A metszeten Jeol 1200 EX-II és JEM-1400 Flash TEM-mel vizsgáltuk az immunreaktív axonterminálisokat.

6.7 *Kvantifikáció*

6.7.1 *Neuronok számának meghatározása*

A temporális neokortex kéreg alatti WM-ában található NeuN+ neuronok mennyiségi meghatározásának részleteit korábban munkacsoportunk publikálta (Richter és mtsai, 2016). Mivel a WM neuronok sűrűsége a WM felszínebb régiója felől a mélyebb részek felé csökken, a neuronok számát a GM-WM határ alatt 500-700 μm -nél mélyebben levő WM-ban határoztuk meg. A neokortex alatti WM-ban a NeuN fehérjét expresszáló idegsejteket számoltuk egy kép-analizáló rendszerrel, mely egy Nikon Optiphot 2 fénymikroszkóphoz szerelt MicroBrightfield Lucivid számítógépvezérelt motorizált állomásból és egy számítógépre telepített Neurolucida szoftverből (Neurolucida 2.0, Microbrightfield Inc., Williston, VT) állt. Az egyes betegek metszeiben meghatároztuk az immunreaktív neuronok számát a mély WM-ban, a neuronszámokat összesítettük, majd a különböző betegek adatait átlagoltuk és az immunreaktív sejtek denzitását „neuron / $\text{mm}^2 \pm \text{SD}$ ”-ban fejeztük ki.

6.7.2 *A szinaptofizin optikai denzitása*

A SYN immunreaktív (SYN+) struktúrák optikai denzitását szintén a temporális neokortex kéreg alatti WM-ában határoztuk meg. 20X-os objektívvel digitális felvételeket készítettünk a GM alatt 500-700 μm -nél mélyebben levő WM-ról Olympus BX50 fénymikroszkópra erősített Olympus E450 fényképezőgéppel. A felvételeket Adobe Photoshop CS6 szoftverrel egyesével fekete-fehér fényképekké konvertáltunk, melyeken a SYN+ struktúrák optikai denzitását az Image J szoftverrel (NIH, US támogatott kép analizáló program, Java) határoztuk meg. A szoftver a kép pixel-intenzitását mérte meg, majd azt mértékegység nélküli számértékként fejezte ki. Betegek és kontrollok egy-egy szövetblokkjából két vagy három metszetet fotóztunk le. Metszetenként átlagosan 10,5 fekete-fehér képet készítettünk és elemeztünk.

Külön mértük a SYN+ struktúrák denzitását és a háttérfestődés denzitását. A SYN immunreaktivitás valós optikai denzitását úgy számítottuk ki, hogy a SYN intenzitásértékeit kivontuk a háttér intenzitásértékeiből. A felvételeken mért denzitásértékeket betegenként összevontuk, majd átlagoltuk a különböző betegekből származó adatokat. A SYN+ struktúrák denzitását egy „mértékegység nélküli szám $\pm \text{SD}$ ”-ban fejeztük ki.

6.8 *A betegek neuropszichológiai vizsgálata*

A terápiarezisztens TLE betegek preoperatív neuropszichológiai vizsgálatát a PTE ÁOK Magatartástudományi Intézetének munkatársai végezték. A vizsgálat során a verbális és a vizuális memória teljesítményét mérték. A vizuális figyelmet a Corsi-kocka segítségével értékelték (Lezak és mtsai, 2004). A vizuális konstrukciós képességet és a memóriát a Rey-Osterrieth-féle összetett ábrateszt (Rey-Osterrieth Complex Figure test, ROCF) segítségével értékelték. Ennek során az ábra lemásolása után a páciensnek 30 perces késleltetéssel emlékezetből kellett lerajzolnia az ábrát. Az ROCF teszt során egy standard Taylor pontszámítási rendszert alkalmaztak, ami alapján az elérhető maximum pontszám 36. Minden ábrát 18 különböző blokkra osztottak. Amikor a páciens a megfelelő helyre a megfelelő blokkot rajzolta, 2 pontot kapott. A megfelelő helyre rajzolt, de torz, vagy a rossz helyre rajzolt, de helyes blokkokat 1-1 ponttal értékelték. A torz és rossz helyre rajzolt blokkokra fél pontot adtak. Hiányzó vagy felismerhetetlen blokkok esetén nem adtak pontot (Hodges, 1996). A verbális tanulást és a memóriát a Rey auditoros verbális tanulási teszt (AVLT) és a számterjedelem teszt magyar változatának felhasználásával tesztelték. Az AVLT 15 köznévi (A és B lista) felhasználásával méri a verbális tanulási képességet. Az „A” listán szereplő szavakat öt alkalommal olvasták fel a páciensnek. Minden felolvasás után a páciensnek fel kellett idéznie a szavakat. A vizsgálat öt ciklusa során történő tanulást pontozták. Az 5. próba után elolvasták a „B” listán szereplő szavakat, és a páciensnek most az új listán szereplő szavakra kellett emlékeznie (interferencia-próba). A 7. próba során a páciensnek újabb felolvasás nélkül kellett felidéznie az „A” listán szereplő szavakat. A 8. próba a késleltetett visszahívást mutatja, mely során 20 perc elteltével kérdezték vissza az „A” listán szereplő szavakat. A teszt után értékelték a teljes tanulási pontszámot (total learning score) az első öt próba során megtanult szavak összesített száma alapján, rövid távú memória pontszámát a 7. próba alapján és a hosszú távú retenciót a 8. próba alapján, valamint az interferenciát (megjegyzett szavak száma a „B” listából). A számterjedelem tesztben a betegnek számsorokat olvastak fel, minden szám után 1 másodperc szünetet hagyva. A vizsgálati személynek az elhangzás sorrendjében kellett visszamondania ezeket a számokat. Egy számsoron belül a számok nem ismétlődtek, és véletlenszerű sorrendben szerepelnek. Egy adott terjedelemben 4 különböző számsor tartozott.

6.9 Statisztikai elemzés

A SYN immunreaktivitás optikai denzitását az autopsziás és a biopsziás kontrollokban Student t-teszttel hasonlítottuk össze. Hasonlóképpen Student-t tesztet használtunk a SYN denzitásának összehasonlítására a TLE betegek és a kontroll minták csoportjai között. A SYN denzitását a WM neuronok számával, valamint a betegek klinikai adataival, továbbá a neuronok számát a betegek klinikai adataival Spearman korrelációs analízissel hasonlítottuk össze. A memória tesztek eredményei és a szövettani megfigyeléseink eredményei közötti kapcsolatot lineáris regresszió elemzéssel vizsgáltuk. A statisztikai szignifikancia szintet $p \leq 0,05$ -nél határoztuk meg. A statisztikai elemzéseket az IBM SPSS szoftvercsomaggal (SPSS Inc. 25. verziója, MN) végeztük.

6.10 Az eredményekhez való személyes hozzájárulás

A minták fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai festését a SYN elleni ellenanyaggal részben én végeztem. A korábban készült, főleg NeuN immunhisztokémiai preparátumok festésében nem vettem részt.

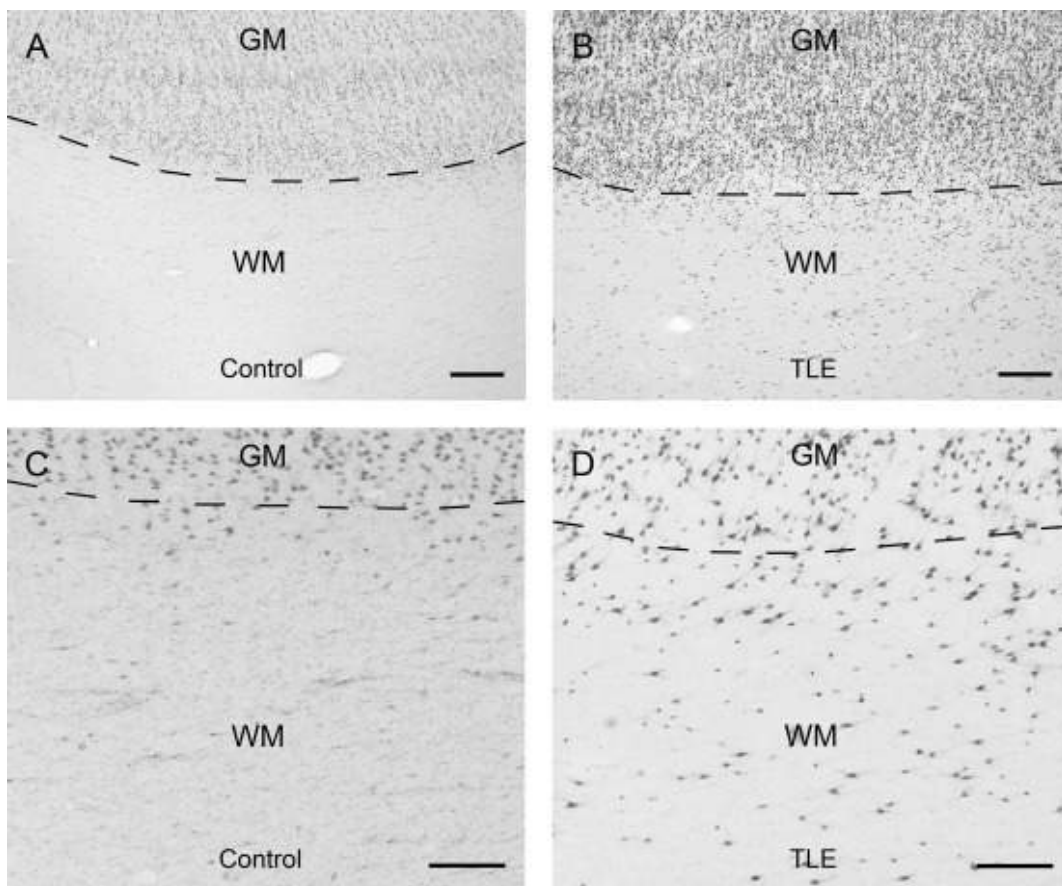
A NeuN immunhisztokémiai preparátumok kvantifikációját nagyrészt kollégám, Richter Zsófia, kisebb részben én végeztem.

A SYN immunhisztokémiai preparátumok fénymikroszkópos értékelését, kvantifikációját egyedül végeztem, míg az elektronmikroszkópos vizsgálatában részt vettem.

A fénymikroszkópos számszerű adatok betegek adataival való összehasonlításhoz a betegek adatainak begyűjtését és előkészítését, a statisztikai elemzéseket, valamint az ábrák készítését én végeztem.

7 Eredmények

Korábbi tanulmányokkal összhangban és a 8. ábrán bemutatottak szerint a TLE betegek neokortex alatti WM-ában több neuron található, mint a kontrollokban, noha ezek szinaptikus kapcsolatainak és funkcionális jelentőségének kiderítése nem történt meg (Emery és mtsai, 1997; Thom és mtsai, 2001; Richter és mtsai, 2016). A szinapszisok azonosítása és kvantifikálása érdekében SYN immunhisztokémiát végeztünk, egy preszinaptikus terminálisokban jelen levő vezikuláris fehérje kimutatásával (Wiedenmann és Franke, 1985; Alder és mtsai, 1992).



8. ábra: NeuN pozitivitás a temporális neokortexben kontroll mintákban (A és C) és TLE betegekben (B és D).

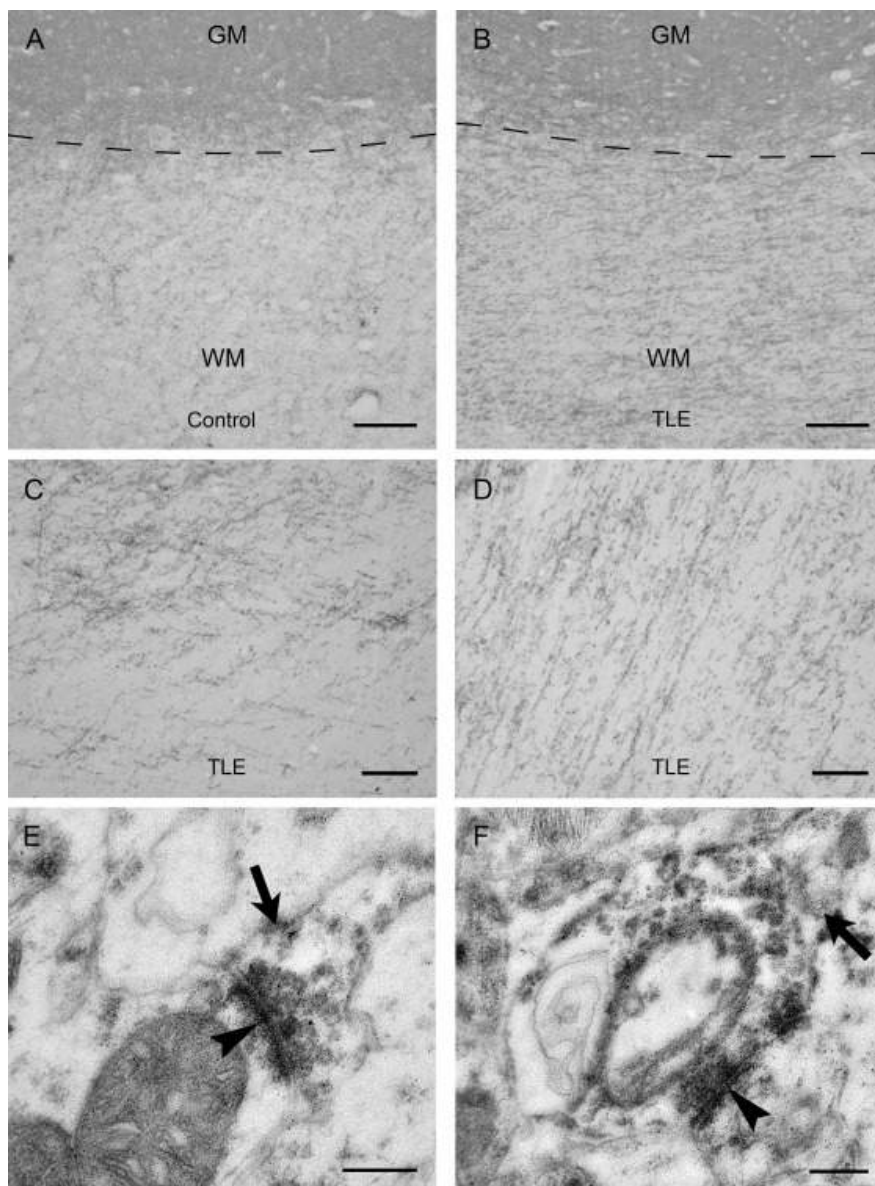
A szaggatott vonalak a szürkeállomány (GM) és a fehérállomány (WM) közötti átmenetet mutatják. Lépték = 500 μm az A és B képen, 200 μm a C és D képen.

7.1 Szinaptofizin immunreaktivitás a fehérállományban

A szinapszisokat immunhisztokémiával a preszinaptikus axonterminálisok SYN fehérjetartalma alapján tettük láthatóvá TLE betegekben és a kontroll személyekben. Két különböző kontrollcsoportot használtunk. Az intrakraniális tumor miatt operált nem epilepsziás betegek középső temporális gyrusának sebészileg eltávolított szövetblokkjaiból készült metszeteken végeztünk immunhisztokémiát. A vizsgált szövetmintákat nem infiltrálták tumorsejtek. A biopsziás minták mellett autopsziából származó kontroll mintákat is használtunk. Mindkét mintában a SYN+ struktúrák kis pontokként jelentek meg a metszetekben. Ahogy várható volt, erős SYN immunreaktivitást figyeltünk meg a GM-ban, és egyértelműen kirajzolódott a GM és a WM közötti határ. Alacsony számban a kontrollcsoport WM-ában is megtalálhatók voltak a SYN+ pontok (9.A ábra).

A TLE betegek mintáiban a SYN immunreaktivitás erősebb volt a GM-ban, mint a WM-ban. Néhány HS-os és MCD-s esetben a WM és a GM közötti határ elmosódott volt (9.B ábra). A TLE mintákban a legszembetűnőbb a SYN+ pontok nagyobb sűrűsége volt a WM-ban (9.B ábra). A mély WM-ban a SYN+ struktúrák eloszlása változó volt (9.C-D ábra). Sok esetben a SYN+ pontok egyenletesen oszlottak el, míg más betegeknél a SYN immunreaktivitás foltos megjelenése volt megfigyelhető. Esetenként a SYN+ pontok párhuzamosan szerveződtek, jelezve a dendritek mentén a szinaptikus terminálisok jelenlétét.

Annak igazolására, hogy a fénymikroszkóppal megfigyelt SYN+ pontok valóban szinapszisok, a SYN+ struktúrákat TEM-mel is megvizsgáltuk. A SYN immunreaktivitás a várákosainknak megfelelően a preszinaptikus axonterminálisokban volt található (9.E-F ábra).

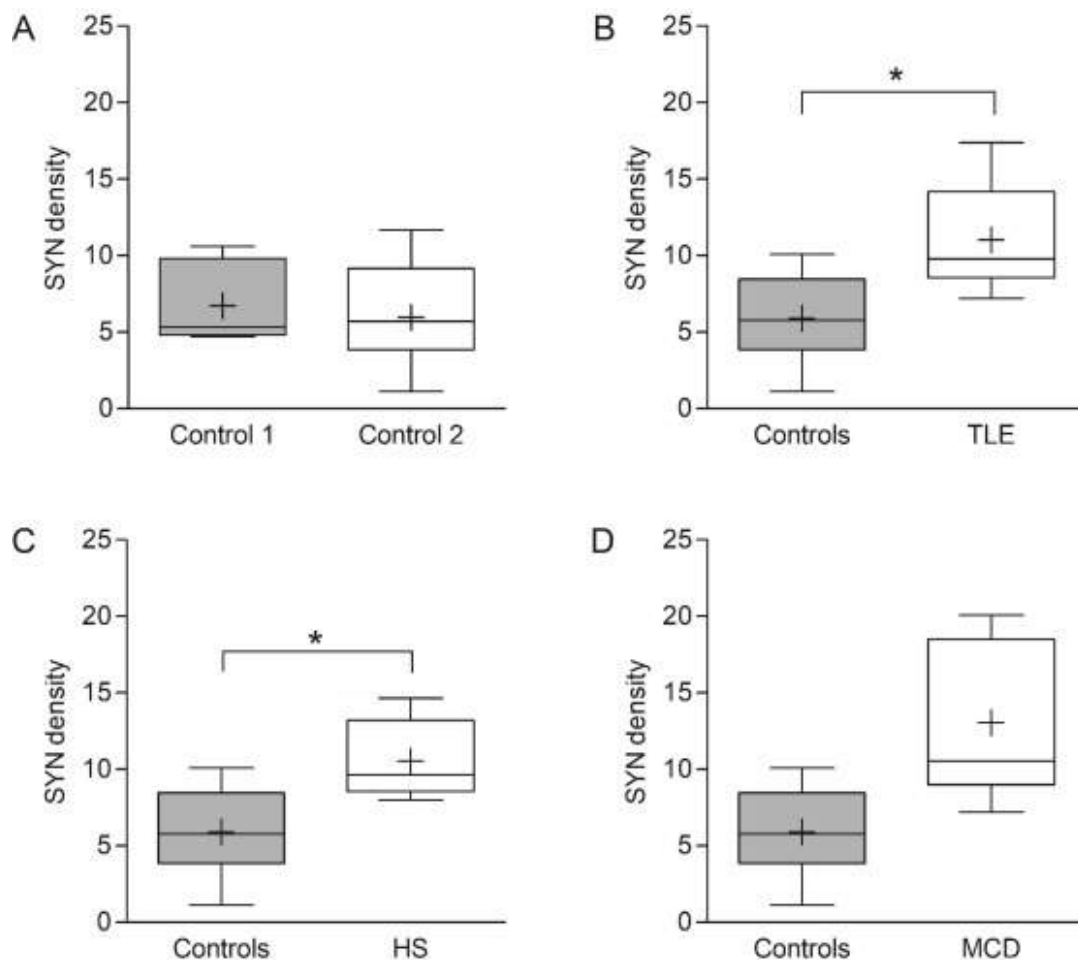


9. ábra: SYN immunreaktivitás a temporális neokortexben fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos felvételeken.

SYN immunreaktivitás egy kontroll (A) és egy epilepsziás beteg (B) fehérállományában (WM) és szürkeállományában (GM). (C) Erős SYN immunreaktivitás egy TLE beteg WM-ában. (D) A párhuzamosan rendezett SYN+ struktúrák preszinaptikus axonterminálisok jelenlétére utalnak, amelyek dendriteken vagy WM neuronok axon-iniciális szegmentumán végződnek TLE betegekben. (E) A SYN+ preszinaptikus terminális (nyíl) által létrehozott axo-dendritikus szinapszis TEM felvétele TLE betegben. (F) A SYN+ preszinaptikus terminális TEM felvétele (nyíl), amely egy dendrittűskével aszimmetrikus szinapszist alkot. A nyílhegyek az E és F képeken a posztszinaptikus denzitásra mutatnak. Lépték = 200 μ m az A és B képeken, 100 μ m a C és D képeken, 200 nm az E és F képeken.

7.2 *A szinaptofizin immunreaktivitás kvantifikációja a fehérállományban*

A SYN immunreaktivitás kvantifikációját a mély WM-ban körülbelül 500 μm -rel a WM és a GM határa alatt végeztük mind az autopsziás, mind a biopsziás kontrollokban, valamint a TLE mintákban. Bár a biopsziás preparátumokban a SYN+ pontok optikai denzitásának átlaga valamivel magasabb volt ($6,73 \pm 2,92$), mint az autopsziás mintákban ($5,09 \pm 3,54$), a különbség a két kontrollcsoport között nem volt szignifikáns (10.A ábra). Ezért összesítettük a két kontroll csoportból nyert denzitásértékeket és a továbbiakban ezt az átlagos SYN immunreaktivitás denzitást ($5,91 \pm 3,04$) használtuk.



10. ábra: SYN immunreaktivitás optikai denzitása kontrollokban és TLE betegekben.

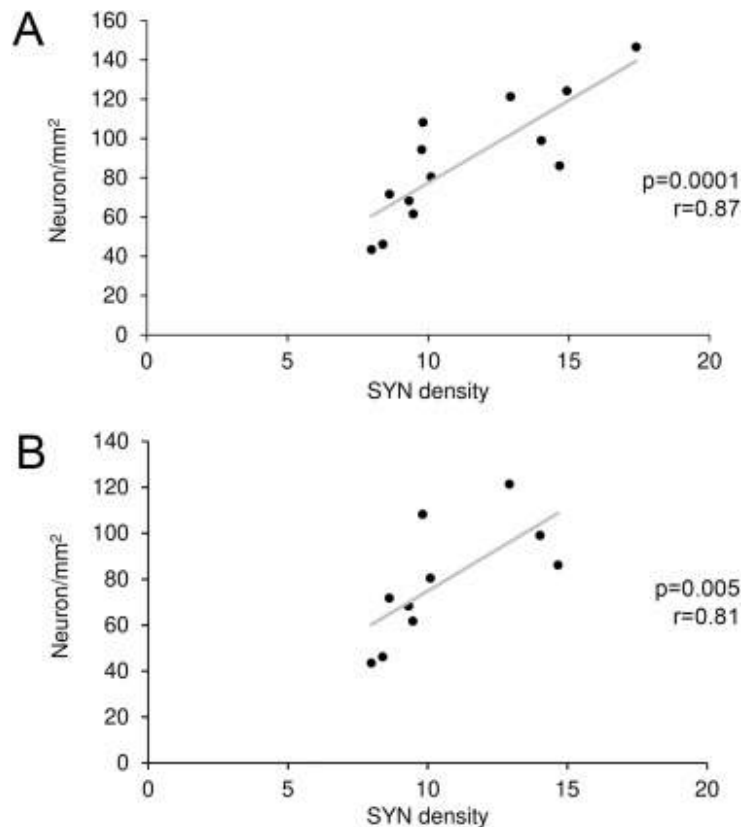
(A) A SYN immunreaktivitás optikai denzitásának átlaga a két kontrollcsoportban. A biopsziás (szürke doboz) és az autopsziás (fehér doboz) minták között nem volt szignifikáns különbség a SYN immunreaktivításban. (B) A SYN immunreaktivitás átlagos optikai denzitása a TLE betegek mintáiban (fehér doboz) és a kontrollokban (szürke doboz). (C) A SYN immunreaktivitás átlagos optikai denzitása HS-ban (fehér doboz) és kontrollokban (szürke doboz). (D) A SYN immunreaktivitás átlagos optikai denzitása MCD indukálta TLE betegek csoportjában (fehér doboz) és kontrollokban (szürke doboz). A csillagok a szignifikáns különbségeket jelzik. (C, D). A dobozdiagramokon a bajuszok az 5-ös és 95-ös percentilis értékeket mutatják.

A SYN⁺ pontok optikai denzitása a neokortex alatti WM-ban egyéni különbségeket mutatott a TLE betegek között. A SYN immunreaktivitás átlagos denzitása 14 TLE beteg neokortex alatti WM-ában $11,04 \pm 3,13$ volt, ami szignifikánsan ($p = 0,0007$) magasabb, mint a kontroll mintáké (10.B ábra).

A HS asszociált TLE betegekben a SYN optikai denzitásának átlaga $10,25 \pm 2,43$ volt. A HS-os betegek és a kontrollok SYN immundenzitása közötti különbség statisztikailag szignifikáns volt ($p = 0,011$; 10.C ábra). MCD-ben a SYN⁺ struktúrák átlagos optikai sűrűsége $13,04 \pm 5,13$ volt, valamint a kontrollok és az MCD-vel asszociált epilepsziában szenvedő betegek SYN immunreaktivitása közötti különbség nem volt statisztikailag szignifikáns (10.D ábra).

7.3 A neuronszám és a szinaptofizin immunreaktivitás optikai denzitása közötti összefüggés a neokortex alatti fehérállományban

Kutatásunk ezen részében a WM neuronok számát korreláltattuk a SYN immunreaktivitás optikai denzitásával. A 14 vizsgált TLE beteg közül 13 beteg esetében rendelkezünk adatokkal mind a SYN immunreaktivitás optikai denzitását, mind a NeuN⁺ WM neuronok területegységre jutó számát illetően. Spearman korrelációs analízist alkalmazva szignifikáns pozitív összefüggést találtunk a WM SYN immunreaktivitás optikai denzitása és az 1 mm²-re eső WM neuronok száma között ($r = 0,87$; $p = 0,0001$; 11.A ábra). A HS-os TLE betegekben szintén szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a SYN denzitása és a WM neuronok száma között ($r = 0,81$; $p = 0,005$; 11.B ábra). Az MCD-s betegcsoportban a betegek alacsony száma miatt statisztikailag nem mutatható ki szignifikáns összefüggés, azonban nagyobb SYN denzitást észleltünk azokban a mintákban, amelyek területegységenként nagyobb számú neuront tartalmaztak.



11. ábra: A SYN immunreaktivitás optikai denzitása és a fehérállományi neuronok területegységre eső száma közötti összefüggés TLE betegek csoportjaiban.

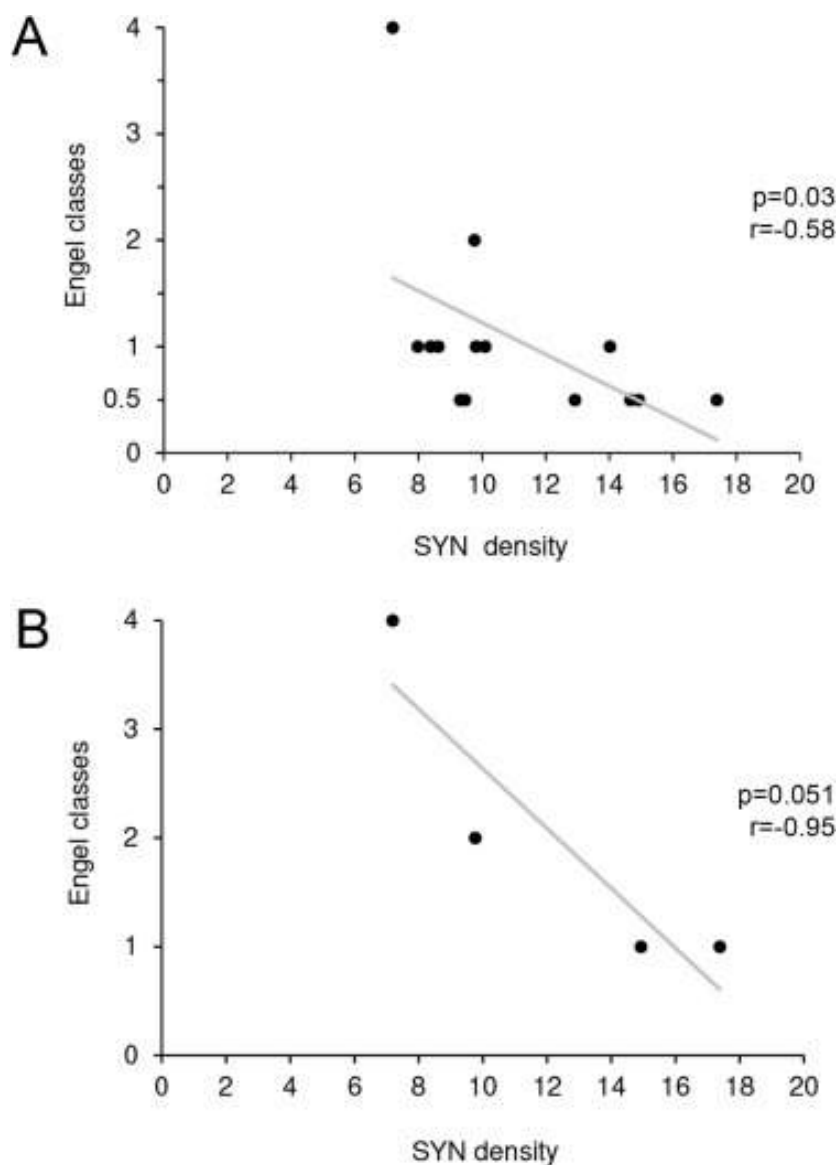
Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a WM neuronok sűrűsége és a SYN immunreaktivitás optikai denzitása között az egész TLE betegpopulációban (A) és a HS asszociált TLE betegeknél (B).

7.4 A szövettani eredmények összefüggése a TLE betegek klinikai és kognitív adataival

A neokortex alatti WM-ban mért SYN immunreaktivitást a következő klinikai paraméterekkel korreláltuk: a betegek életkora és neme, életkor az epilepszia kezdetekor és a betegség időtartama. A korrelációs analízis nem mutatott szignifikáns összefüggést a fent említett paraméterek és a SYN immunreaktivitás között. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy az autopsziás kontrollok életkora szignifikánsan magasabb volt, mint a TLE betegek életkora, bár az egyes TLE betegek életkora jelentősen különböző volt, és mindkét irányban szignifikáns eltérést tapasztaltunk a betegek átlagéletkorától. Azon TLE betegek mintáiban, akik fiatalabbak voltak, mint a teljes TLE csoport átlagéletkora, a NeuN és a SYN immunreaktivitást összehasonlítottuk az átlagéletkornál idősebb betegek mintáival. Eszerint nem volt szignifikáns különbség sem a neuronok számában, sem a SYN denzitásban a fiatalabb és az idősebb csoport között.

A SYN immunreaktivitás és a műtét előtti év rohamfrekvenciája közötti összefüggést vizsgálva nem találtunk szignifikáns különbséget. Nem találtunk összefüggést a SYN immunreaktivitás és a gyermekkori lázgörcs előfordulása között sem.

A betegek posztoperatív kimenetelét illetően az Engel osztályozást alkalmaztuk (Engel és mtsai, 1993; Durnford és mtsai, 2011). Tizenkét TLE betegünk vált rohammentessé a műtétet követően, akik így az Engel 1. osztályába kerültek. Egy beteg a 2. osztályba került, ami valamivel rosszabb műtét utáni eredményre utal. Egyetlen betegnél nem történt jelentős javulás, ő a 4. osztályba került. Az Engel 1. osztály további alosztályokra osztható. A legkedvezőbb kimenetelű, antiepileptikumok (AED) nélkül teljesen rohammentessé vált betegek az 1A osztályba tartoznak. Az Engel 1B osztályba azok a betegek tartoznak, akiknek csak egyszerű parciális rohamai voltak az epilepszia műtét óta, míg azok a betegek, akiknek a műtétet követően előfordultak epilepsziás rohamai, de a műtét utáni 2 évben rohammentesek voltak, az 1C osztályba kerültek. Azok a betegek, akiknél generalizált rohamok jelentkeztek az AED megvonása miatt, az Engel 1D osztályába kerültek. A posztoperatív kimenetel és a szövettani eredmények közötti összefüggés elemzése során külön vizsgáltuk azokat a betegeket, akik AED nélkül váltak teljesen rohammentessé (1A osztály), valamint az Engel 1B-D osztályába tartozó betegeket. A két kategóriához számértékeket rendeltünk: az Engel 1A csoporthoz 0,5-öt, a többi, Engel 1B-D osztályokhoz pedig 1-et rendeltünk. Más Engel osztályok esetében az alosztályokat nem vettük figyelembe, és a hozzárendelt számérték megegyezett az osztály számával. Elemzésünk kimutatta, hogy a posztoperatív eredmény és a SYN immunreaktivitás optikai denzitása között szignifikáns ($p = 0,03$) negatív összefüggés van (12.A ábra).

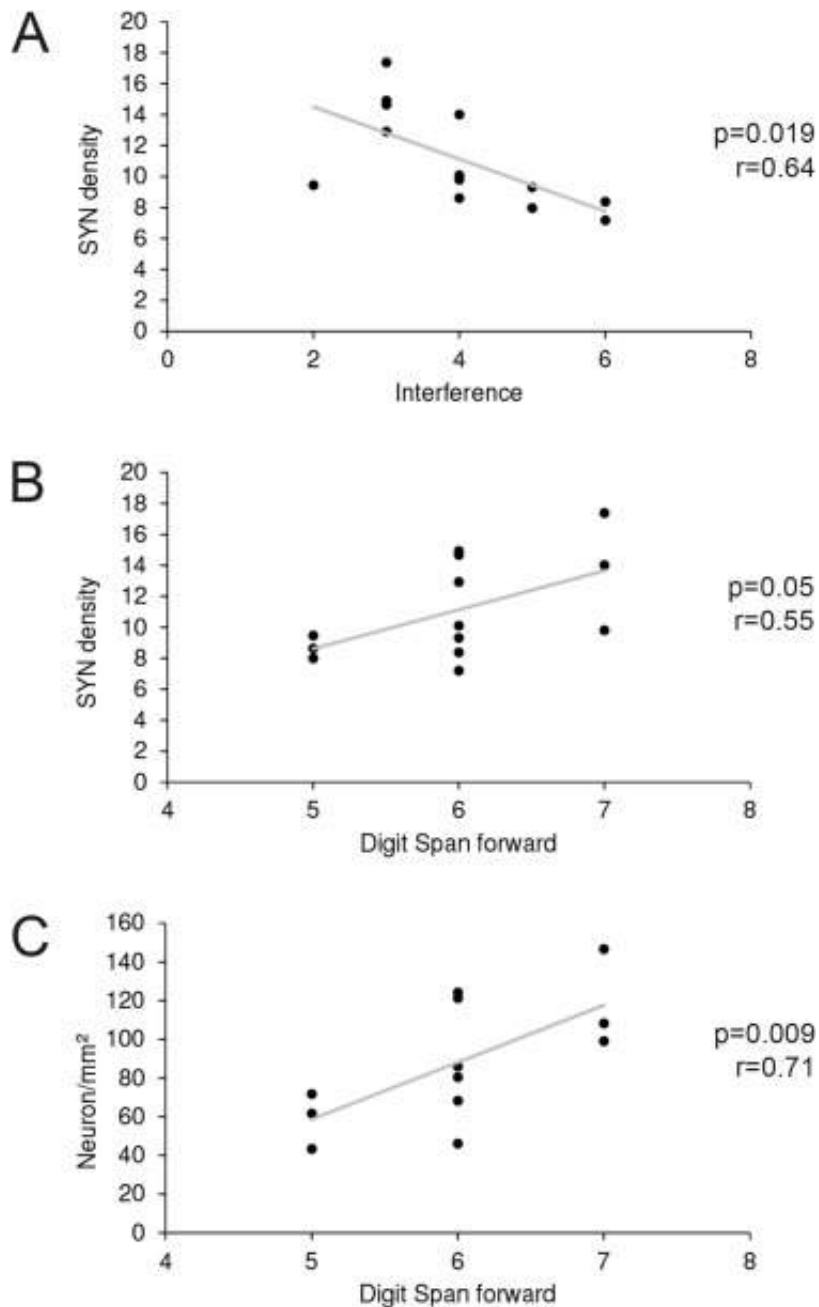


12. ábra: A fehérállományi SYN immunreaktivitás optikai denzitása és a TLE betegek posztoperatív kimenetele közötti összefüggés.

(A) A grafikon a SYN immunreaktivitás optikai denzitása és a TLE betegek Engel-osztályozás szerinti posztoperatív kimenetele közötti szignifikáns korrelációt mutatja. Az Engel 1. osztályt tovább osztottuk 1A és 1B-D alosztályokra. A posztoperatív kimenetel és a szövettani eredmények közötti összefüggés elemzéséhez ezekhez az alosztályokhoz számszerű értékeket rendeltünk a következőképpen: 1A – 0,5, 1B-D –1. Ezek az értékek az A grafikon y-tengelyén láthatók. (B) A SYN immunreaktivitás optikai denzitása és a betegek posztoperatív kimenetele közötti kapcsolat az Engel-osztályozás szerint MCD-indukált TLE-ben.

A TLE csoport HS alcsoportjában minden beteg rohammentessé vált, és az Engel 1. osztályba tartozott. A SYN immunreaktivitás és a HS-os betegek posztoperatív kimenetelének összefüggését elemezve nem találtunk szignifikáns összefüggést. Hasonlóképpen, nem találtunk szignifikáns összefüggést a SYN immundenzitás és a posztoperatív kimenetel között az MCD csoportban, azonban a tendencia ($p = 0,051$) azt mutatta, hogy minél magasabb a SYN immundenzitás, annál kedvezőbb volt a posztoperatív kimenetel (12.B ábra). A WM NeuN+ sejtek sűrűsége és a TLE betegek posztoperatív kimenetele között nem találtunk szignifikáns összefüggést, bár megfigyeltük, hogy minél nagyobb a WM neuronok sűrűsége, annál jobb a posztoperatív eredmény (nem ábrázoltuk).

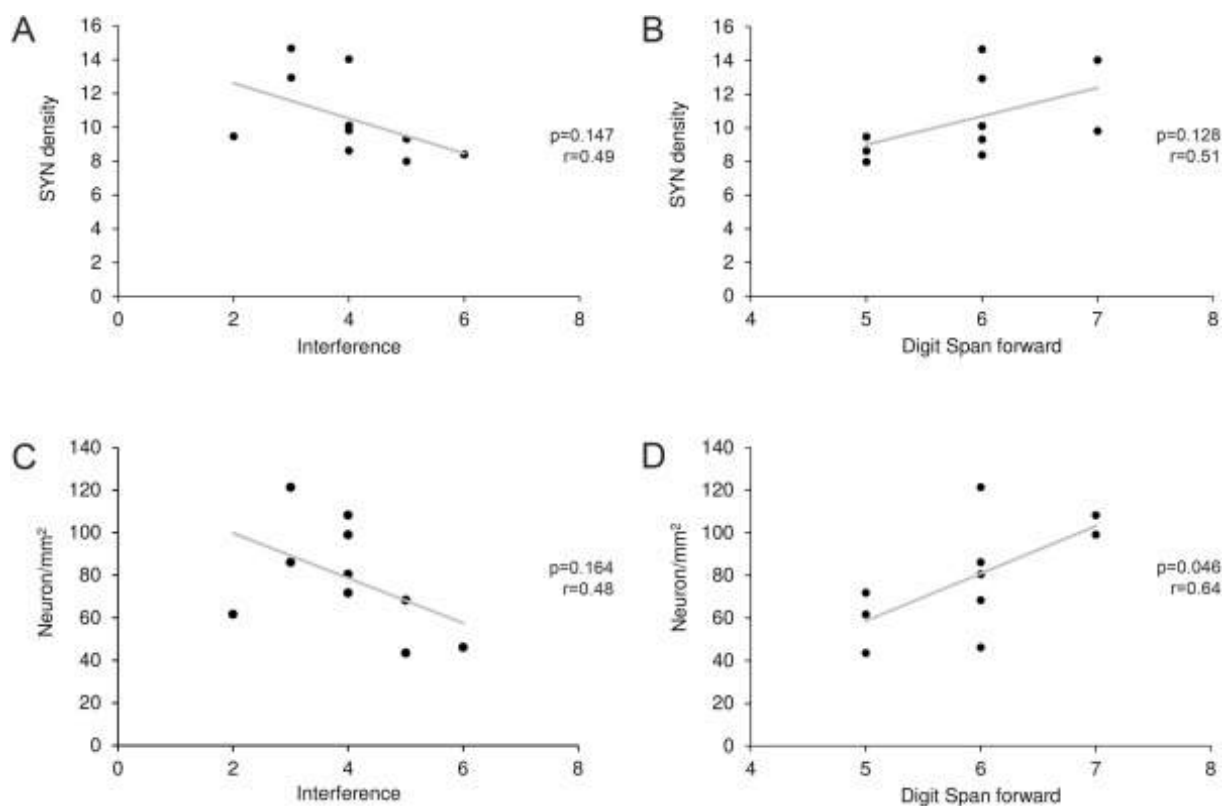
A szövettani eredmények és a betegek kognitív teljesítménye közötti lineáris regressziós elemzés azt mutatta, hogy a neuronok sűrűsége és a szinapszisok denzitása a WM-ban összefügg a verbális memóriával (13. ábra). A SYN immunreaktivitás optikai denzitása szignifikáns negatív összefüggést mutatott az AVLT interferenciájával ($F(1,11) = 7,57$, $p < 0,05$) (13.A ábra). Hasonlóképpen, a nagyobb neuronsűrűség alacsonyabb interferenciapontszámmal járt az AVLT tesztben, bár az összefüggés nem volt statisztikailag szignifikáns ($F(1,11) = 2,86$, $p = 0,11$). A rövid távú verbális memória tekintetében szignifikáns pozitív korrelációt figyeltünk meg a számterjedelem teszt pontszámai és a SYN immunreaktivitás ($F(1,11) = 4,81$, $p = 0,05$), valamint a neuronok sűrűsége ($F(1, 11) = 11,4$, $p < 0,01$) között (13.B és C ábra). A vizuális figyelem és memória tesztek pontszámai, beleértve a ROCF tesztet, nem mutattak szignifikáns korrelációt a SYN immundenzitással és a NeuN+ sejtek sűrűségével.



13. ábra: A SYN immunreaktivitás optikai denzitása (A és B), a WM neuronok területegységre eső száma (C) és a teljes TLE betegpopuláció verbális memória pontszámai közötti összefüggés.

(A) A grafikon a SYN denzitás és az AVLT interferencia közötti szignifikáns negatív lineáris regressziót mutatja a teljes TLE betegpopulációban. (B) A grafikon a SYN denzitás és a számterjedelem teszt pontszámai közötti szignifikáns pozitív lineáris regressziót mutatja. (C) A grafikon a WM neuronok területegységre eső száma és a számterjedelem teszt pontszámai közötti szignifikáns pozitív lineáris regressziót mutatja.

A HS-ban szenvedő TLE betegek csoportjában nem volt szignifikáns lineáris regresszió a SYN immunreaktivitás optikai denzitása és a verbális memória pontszámai között, valamint a NeuN+ sejtek területegységre eső száma és az AVLT interferencia között (14.A, B, C ábra). A HS-os betegek WM neuronsűrűsége és verbális memória teljesítménye közötti összefüggést elemezve szignifikáns ($F(1,8) = 5,573$, $p = 0,046$) pozitív lineáris regressziót találtunk a NeuN+ sejtek denzitása és a számterjedelem teszt pontszámai között (14.D ábra). Bár az MCD-ben szenvedő TLE betegek mintáinak alacsony száma nem tette lehetővé a statisztikai elemzést, a SYN immunreaktivitás optikai denzitása és az AVLT-ben mért interferencia pontszámok, valamint a számterjedelem teszt pontszámai korrelációt mutattak.



14. ábra: A SYN immunreaktivitás optikai sűrűsége (A és B), a fehérállományi neuronok területegységre eső száma (C és D) és a HS-ban szenvedő TLE betegek verbális memória pontszáma közötti összefüggés.

(A) A grafikon a SYN immunreaktivitás optikai denzitása és az AVLT interferencia közötti nem szignifikáns kapcsolatot mutatja. (B) Nem szignifikáns összefüggés a SYN denzitás és a számterjedelem teszt pontszámai között. (C) Nem szignifikáns összefüggés a WM neuronok területegységre eső száma és az AVLT interferencia között. (D) Szignifikáns pozitív korreláció ($p = 0,046$) a WM neuronok területegységre eső száma és a számterjedelem teszt pontszámai között.

A fenti eredmények miatt összefüggést kerestünk a szövettani eredményeink, a lézió oldalisága, valamint a betegek jobb- illetve balkezessége között. 14 betegből 13 beteg volt jobbkezes és egy balkezes. A HS-os betegek mindegyike jobbkezes volt, a balkezes beteg MRI diagnózisa MCD volt. 14 betegünk közül 12 betegnél álltak rendelkezésünkre az operáció előtt elvégzett funkcionális MRI vizsgálatok eredményei, melynek segítségével megállapították, hogy az egyes betegeknek mely agyfélteke a domináns, illetve a subdomináns. A betegeknek néhány esetben enyhén bilaterális beszédközpontot mutatott a vizsgálat, de minden esetben bal oldali dominancia volt megfigyelhető. Mivel a vizsgált betegek között nem volt olyan, akinél az fMRI vizsgálat egyértelműen jobb oldali dominanciát mutatott volna, így nem tudtuk a betegeket ez alapján két csoportra osztani és statisztikai következtetéseket levonni. Elképzelhető, hogy nagyobb esetszámnál találnánk valamilyen összefüggést a féltekei dominancia, a szinaptofizin denzitás és a verbális memória adatok között.

Az előbbiek alapján viszont a betegeinket kettéoszthatjuk domináns és subdomináns TLE csoportokra annak alapján, hogy az epilepsziát okozó lézió az fMRI vizsgálat által dominánsnak, illetve subdominánsnak ítélt féltekén helyezkedett-e el. Így, mivel a mi kutatásunkban minden beteg fMRI vizsgálata bal domináns féltekét mutatott, azok a betegek tartoznak a domináns TLE csoportba, akiknél a lézió a bal oldalon helyezkedett el, míg a jobb oldali lézióval rendelkező betegek alkotják a subdomináns TLE csoportot. A két csoportban megvizsgálva a szinaptofizin denzitást, a domináns TLE csoportban (ahol a lézió bal oldalon volt), enyhén magasabb szinaptofizin denzitást mértünk, mint a subdomináns TLE csoportban (akiknél a jobb agyféltekében volt az epilepsziát okozó lézió), de a különbség nem volt szignifikáns.

Azoknál a jobbkezes betegeknek, akiknél az epilepsziát okozó agyi lézió a bal oldalon (domináns féltekén) volt, összevetettük a verbális memória tesztek eredményeit a szinaptofizin denzitásával, de sem az interferencia, sem a számterjedelem teszt eredményeivel nem találtunk korrelációt. Ugyanezt nem tudtuk megvizsgálni a balkezes, kontralaterális (jobboldali) lézióval diagnosztizált betegeknek, mivel a betegeink közül egy volt balkezes, akinél bal oldali MCD okozta az epilepsziáját.

8 Megbeszélés és következtetések

Jelen tanulmányunkban kimutattuk, hogy a TLE betegek neokortex alatti WM-ában szignifikánsan nagyobb a szinapszisok denzitása, mint a kontrollokban. Emellett szignifikáns pozitív összefüggést figyeltünk meg a szinapszisok és a neuronok denzitása között az epilepsziás betegek WM-ában. A szinapszisok denzitása szignifikánsan korrelált a betegek posztoperatív kimenetelével. Emellett a neuronok száma, a szinapszisok denzitása és a betegek verbális memória teljesítménye között szignifikáns pozitív regressziót láttunk. A szinapszisok denzitását külön vizsgáltuk a HS-ban és a MCD-ben szenvedő TLE betegek csoportjaiban. Eredményeink szerint a szinapszisok denzitása szignifikánsan magasabb volt a HS-ban szenvedő betegek WM-ában, mint a kontrollokban. Emellett szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a szinapszisok denzitása és a neuronok sűrűsége között a HS-ban szenvedő betegek neokortex alatti WM-ában.

Ismert, hogy epilepsziás betegekben nagyobb mind a neokortex alatti, mind az archikortikális WM-ban található neuronok száma a nem epilepsziás kontrollokhoz képest (Emery és mtsai, 1997; Thom és mtsai, 2001; Richter és mtsai, 2016). Munkacsoportunk a WM neuronok között serkentő és gátló neuronokat is kimutatott (Richter és mtsai, 2016). A WM neuronok funkcionális jelentőségéről, valamint szinaptikus kapcsolatairól korábban nem álltak rendelkezésre egyértelmű információk. Vizsgálatunkban a szinapszisokat immunhisztokémiával tettük láthatóvá a preszinaptikus axonterminálisok SYN fehérjetartalma alapján (Wiedenmann és Francke, 1985). SYN+ struktúrákat mind a TLE betegek, mind a kontroll minták WM-ában megfigyelhetünk. Fénymikroszkóppal a SYN+ terminálisokat kis pontokként láttuk. Immunelektronmikroszkópos vizsgálattal igazoltuk a SYN lokalizációját a preszinaptikus axonterminálisokban, ami összhangban van a korábbi tanulmányokkal (Wiedenmann és Franke, 1985; Rehm és mtsai, 1986).

8.1 Technikai megfontolások és a vizsgálatunk korlátai

Vizsgálatunkban a neokortex alatti WM szinapszisainak mennyiségi meghatározását, azaz a SYN immunreaktivitás optikai denzitásának mérését fénymikroszkópos metszetekben végeztük. Egy korábbi munkában Armbruszt és mtsai. (2015) laboratóriumunkban két olyan különböző szoftvert hasonlítottak össze, amely immunreaktív struktúrák optikai denzitásának mérésére alkalmas. Az ImageJ, a NIH USA által támogatott nyílt forráskódú, Java alapú képfeldolgozó és elemző programot hasonlították össze az AnalySIS (Olympus Corporation)

szoftverrel (Armbruszt és mtsai, 2015). Megállapítást nyert, hogy mindkét program alkalmas az optikai denzitás mérésére immunfestett metszeteken, ezért jelen vizsgálatunkban ImageJ-t használtunk. Az így elvégzett kvantifikáció során szignifikánsan magasabb SYN optikai denzitást mértünk TLE-ban a kontrollokhoz képest.

A kontroll minták esetében két kontrollcsoport temporális neokortexének WM-át használtuk. A gyorsan növekvő intrakraniális daganatok miatt idegsebészeti műtéten átesett betegek alkották az egyik kontrollcsoportot. Ezekben az esetekben a neokortex alatti WM rezekcióját szigorúan terápiás célból végezték, mely a tumor biztonságos és radikális eltávolítása érdekében történt. A rezekált szövetet az eltávolítás után azonnal fixálóba helyeztük. A vizsgálatunkban használt WM szövet a radikális rezekció miatt nem tartalmazott tumorsejteket. A biopsziás minták mellett autopsziás kontroll mintákat is alkalmaztunk. Valószínűleg a halál beállta és az agyminták fixálása között eltelt idő miatt a SYN immunreaktivitás az autopsziás kontrollcsoportban gyengébb, az optikai denzitás pedig alacsonyabb volt, mint a műtétilag eltávolított biopsziás kontrolloké. A két csoport közötti különbség azonban nem volt szignifikáns. Ez azt jelzi, hogy mindkét kontroll használható a TLE betegek WM mintáinak SYN immundenzitásával való összehasonlításra. Ennek megfelelően a kontroll mintáink optikai denzitás értékeit összevontuk, hogy egyetlen kontrollcsoportot alkossunk, amely felhasználható a TLE betegek SYN immundenzitásának összehasonlítására.

Jelen munkának természetesen vannak limitációi. Először is, az elemszám viszonylag kicsi, ami a statisztikai összehasonlításokat teszi nehezzé. A HS-ban szenvedő TLE csoportban 10 beteg metszetein vizsgáltuk a NeuN+ sejteket és SYN+ struktúrákat. A minták száma különösen alacsony volt az MCD-s TLE betegek csoportjában ($n = 4$). Az alacsony mintaszám ellenére szignifikáns különbséget találtunk a kontrollok és a TLE betegek SYN immunreaktivitásának optikai sűrűsége, valamint a kontrollok és a HS-ban szenvedő TLE betegek ezen paraméterei között. A teljes betegpopulációt és a HS-os betegeket tekintve szignifikáns pozitív összefüggést találtunk a SYN+ struktúrák optikai denzitása és a NeuN+ sejtek sűrűsége között. Emellett szignifikáns összefüggést figyeltünk meg a SYN immunreaktivitás optikai denzitása és a TLE betegek posztoperatív kimenetele között. Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a NeuN-, valamint a SYN immunreaktivitás és a betegek verbális memóriáját mérő neuropszichológiai tesztek pontszámai között. Nyilvánvaló, hogy a nagyobb mintaszám erősítené tanulmányunk statisztikai erejét. A viszonylag alacsony mintaszám ellenére azonban az eredeti kérdéseinkre, amely a WM neuronok és szinapszisok TLE-ban betöltött lehetséges funkcionális szerepére vonatkozott, választ kaptunk. Korábbi

tanulmányok alapján a TLE leggyakoribb formája a HS, és ezzel összhangban az epilepsziás betegeknek nagyobb csoportja volt HS-os és kevesebben szenvedtek MCD-ben (Lehericy és mtsai, 1997; Blümcke és mtsai, 2002, Blümcke, 2009; Howe és mtsai, 2010). Hangsúlyoznunk kell tehát, hogy az eltérő etiológiájú vizsgált betegcsoportok mintanagyságában megfigyelt különbség korrelál a TLE MR-leletek prevalenciájának különbségével.

Vizsgálatunk másik korlátja a TLE betegek és a kontrollok életkora közötti különbség. Különösen az autopsziás kontrollok életkora volt szignifikánsan magasabb, mint a TLE betegek életkora. Hangsúlyoznunk kell azonban, hogy a TLE csoportba tartozó egyének életkora is eltérő volt, és mindkét irányban jelentős eltérések voltak megfigyelhetők a betegek átlagéletkorától. Ezzel szemben nem találtunk szignifikáns különbséget a neuronok területegységre eső számában és a SYN optikai denzitásában azon TLE betegek mintáiban, akik fiatalabbak voltak a teljes TLE csoport betegeinek átlagéletkoránál, összehasonlítva az átlagéletkoránál idősebbek denzitásaival. Emellett nem találtunk összefüggést a neuronok területegységre eső száma és a betegek életkora, valamint a SYN denzitás és a betegek életkora között sem. Bár nem zárhatjuk ki, hogy a neuronok területegységre eső száma és a SYN denzitás bizonyos mértékű csökkenése a WM-ban összefüggésbe hozható az öregedéssel, a neuronok területegységre eső száma vagy a SYN denzitás és a betegek életkora közötti korreláció hiánya arra utal, hogy a TLE betegekben megfigyelt szignifikánsan magasabb neuron- illetve SYN denzitás értékek inkább az epilepsziának köszönhetőek, mint a betegek alacsonyabb életkorának.

8.2 *Neuronok és szinapszisok a fehérállományban*

Korábbi tanulmányok neuronok jelenlétéről számoltak be TLE-ban szenvedő betegek neokortex alatti WM-ában, bár ezeknek a rohamok kialakulására és fenntartására gyakorolt hatását nem bizonyították (Hardiman és mtsai, 1988; Emery és mtsai, 1997; Kasper és mtsai, 1999; Thom és mtsai, 2001; Suárez-Solá és mtsai, 2009; Liu és mtsai, 2014; Richter és mtsai, 2016). A SYN immunreaktivitás nagyobb optikai denzitása mellett - amit TLE betegekben találtunk a kontrollokhoz képest - szignifikáns pozitív lineáris korrelációt láttunk a WM neuronok területegységre eső száma és a SYN immunreaktivitás optikai denzitása között. Az összefüggés azt sugallja, hogy a WM neuronok funkcionálisan aktívak lehetnek és szerves részét képezhetik a temporális lebeny neuronális köreinek TLE-ban. A WM-ban levő szinaptikus terminálisok eredetét illetően több lehetőség merül fel. A SYN+ terminálisok

kortikális és/vagy szubkortikális neuronokból származhatnak, de a SYN+ preszinaptikus terminálisok forrásai WM neuronok is lehetnek.

Tanulmányunk másik eredménye is alátámaszthatja, hogy a WM neuronok és szinapszisok funkcionálisan aktívak. A neuronok számának és a SYN immunreaktivitás optikai sűrűségének korrelációja a betegek neuropszichológiai adataival – ezen belül is a verbális memóriára vonatkozó értékekkel - szignifikáns pozitív összefüggést mutatott: a rövid távú verbális memória szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a neuronok területegységre eső számával, valamint a SYN immunreaktivitás denzitásával az epilepsziás betegek WM-ában. Ezenkívül a SYN immunreaktivitás optikai denzitása és az AVLT interferencia között szignifikáns regressziót figyeltünk meg. Ezek az adatok egyértelműen jelzik a WM szinapszisok funkcionális jelentőségét a temporális lebenyben. Érdekes, hogy a SYN fehérje eliminációja egerekben viselkedési változásokat idézett elő, beleértve a tanulás és a memória károsodását. Mindez arra utalt, hogy a SYN nem nélkülözhetetlen a szinaptikus vezikula kialakulása és ürülése során, valószínűleg szerepet játszik a szinaptikus átvitel és a tanulási folyamatok hatékonyságának modulálásában is (Schmitt és mtsai, 2009).

A funkcionális neurális hálózatok WM-on belüli létezését MRI-vizsgálatok is alátámasztják, amelyekben úgy tűnik, hogy a GM-hoz hasonlóan a WM is a belső funkcionális szerveződések funkcionális modulok kölcsönható hálózataként van jelen (Ding és mtsai, 2016; Peer és mtsai, 2017). Peer és mtsai. (2017) kimutatták, hogy ezek a hálózatok mélyebbre nyúlnak, mint a WM és a GM határa, és a neuronális tevékenységre utaló jelek a WM-on belülről származnak, ami összhangban van eredményeink értelmezésével.

A neokortex alatti WM érintettségét TLE-ban MRI vizsgálatok is megerősítették (Concha és mtsai, 2009; Riley és mtsai, 2010; Nagy és mtsai, 2016). A temporális lebeny WM axonkötegeiben kiterjedtebb diffúziós abnormalitást figyeltek meg mesialis temporális sclerosis (MTS) esetén, mint a nem lézionális TLE-ban (Liu és mtsai, 2012). Az fMRI vizsgálattal a WM hálózatok funkcionális zavarát mutatták ki MTS-ban, és arra következtettek, hogy a mély WM hálózatok kulcsfontosságú hálózati csomópontok, amelyek hozzájárulhatnak a TLE betegek GM-ának jelentős funkcionális megváltozásához (Cui és mtsai, 2021). Más tanulmányok alapján a heterotóp WM neuronok MCD-ben bizonyos mértékig részt vesznek az agy normál működésében (Müller és mtsai, 1998; Spreer és mtsai, 2001; Janszky és mtsai, 2003).

A temporális kéreg neokortex alatti WM-ában levő szinapszisok jelentőségét a SYN immunreaktivitás optikai denzitása és a TLE betegek posztoperatív kimenetele közötti összefüggés jelzi. A posztoperatív kimenetel értékeléséhez Engel osztályozást alkalmaztunk.

Szignifikáns negatív korrelációt figyeltünk meg a TLE betegek posztoperatív kimenetele és a SYN immunreaktivitás optikai denzitása között, ami azt mutatja, hogy minél nagyobb a SYN immunreaktivitás denzitása, annál jobb a betegek posztoperatív eredménye. Az alacsony betegszám ($n = 4$) ellenére tendencia figyelhető meg az MCD-ben szenvedő TLE betegek posztoperatív kimenetele és a SYN immunreaktivitás optikai denzitása között. A WM neuronok területegységre eső száma és az MCD-ben szenvedő betegek posztoperatív kimenetele között hasonló tendenciát nem találtunk, bár a posztoperatív eredmény valamivel jobb volt azoknál a betegeknél, akiknél nagyobb WM neuronszámot láttunk. Ezek az összefüggések azt mutatják, hogy a WM szinapszisok jelentős szerepet játszhatnak az epilepsziás rohamok kialakulásában és fenntartásában MCD-ban szenvedő betegeknél is, és a WM neuronokat és szinapszisokat tartalmazó terület eltávolítása nagymértékben hozzájárult a betegek kedvező posztoperatív kimeneteléhez. Egy korábbi tanulmány szerint a WM neuronok megnövekedett denzitása a TLE betegek rosszabb posztoperatív kimenetelével járt együtt (Kasper és mtsai, 1999). Azonban Hardiman és mtsai. (1988), valamint Thom és mtsai. (2001) összefüggést találtak a WM neuronok jelenléte és a TLE kedvező posztoperatív kimenetele között. Eredményeink összhangban vannak az ő adataikkal, és kiegészítik azzal, hogy a neuronok mellett a szinapszisok nagyobb denzitása is jobb posztoperatív kimenetelhez kapcsolódik.

A WM szinapszisok WM neuronokon való kialakulásának pontos módja és ideje nem tisztázott, és két alapvető magyarázat vetődik fel. Egyik magyarázat lehet az agykéreg kóros fejlődése, melyet alátámaszt a WM-ban található neuronok nagyobb száma (Hardiman és mtsai, 1988; Kasper és mtsai, 1999; Thom és mtsai, 2001; Richter és mtsai, 2016), valamint a WM neuronok területegységre eső száma és a szinapszisok denzitása közötti szignifikáns pozitív összefüggés. A vizsgálatunkban talált megnövekedett SYN optikai denzitás a WM-ban arra utal, hogy a WM-ban található neuronok szinaptikus bemenetet kapnak, bár az axonjaik eredetét az általunk alkalmazott szövettani technikával nem lehet kimutatni. A WM szinapszisokat normál pozíciójú kortikális neuronok is képezhetik, de a szubkortikális eredet is lehetséges. Másik lehetőség, hogy a WM neuronok egymáson végződnek, és rendellenes szubkortikális köröket képeznek, így részét képezhetik az epilepsziás hálózatoknak, és szerepet játszhatnak az epilepsziás roham kialakulásában és fenntartásában. A kortikális diszgenézis állatmodelljében összetett szinaptikus válaszokat figyelték meg a szomszédos WM elektromos stimulálásakor, ami arra utal, hogy a heterotóp neuronok lokális serkentő és gátló szinaptikus kapcsolatokat hozhatnak létre, és részt vehetnek epileptiform eseményekben (Smith és mtsai, 1999). A WM szinapszisok nagy denzitásának másik magyarázata lehet a szinaptikus átrendeződés jelensége, mely ismert jellemzője az epilepsziának (Maglóczy, 2010; Tóth és mtsai, 2010; Colciaghi és

mtsai, 2014). Az axonsarjadzás és a szinapszisok képződése a trófikus faktorok stimuláló hatásának köszönhető (Cronin és mtsai, 1992; Represa és Ben-Ari, 1997; Peng és mtsai, 2013). Hasonló jelenség valószínű a GM mellett a neokortex alatti WM-ban is, ami növelheti a WM szinapszisok számát.

Munkánk rámutat a WM neuronok és szinapszisok funkcionális jelentőségére, bár a TLE-ban betöltött szerepük további kutatást igényel. A funkcionális hálózatok jelenléte a WM-on belül új utakat nyithat meg a kognitív és klinikai idegtudomány kutatásában.

9 Eredmények összefoglalása

9.1 *Az epilepsziás betegek gyrus dentatusában talált eredmények összefoglalása*

1. HS-ban az ektópiás és a normál pozíciójú PV+ sejtek aránya és a PV+ axonsarjadzás mértéke szignifikánsan nagyobb, mint más etiológiájú TLE betegcsoportban.
2. HS-ban szignifikáns pozitív korrelációt találtunk az axonsarjadzás mértéke és az ektópiás / normál pozíciójú PV+ sejtek aránya között.
3. Az immunelektronmikroszkópos eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy azokon a területeken, ahol fénymikroszkóppal axonsarjadzást láttunk, HS esetén a PV+ neuronok posztszinaptikus célstruktúrája részlegesen megváltozik: a szemcsesejt szómája helyett a dendriten vagy dendrittüskén végződnek az axonterminálisok.
4. HS-ban a szinaptikus reorganizáció következtében a GD molekuláris rétegében is megtalálhatók a PV+ neuronok axonjai, és megváltozik a célstruktúrát érintő szelektivitásuk.
5. Ezek a változások hozzájárulhatnak a GD-on belüli aberráns neuronális hálózatok kialakulásához és ezzel az epilepsziás állapot kialakulását és fenntartását támogatják.

9.2 *Az epilepsziás betegek neokortex alatti fehérállományában talált eredmények összefoglalása*

1. Megállapítottuk, hogy TLE betegekben szignifikánsan magasabb a SYN immunreaktivitás optikai denzitása, mint kontrollokban.
2. Összefüggést találtunk a WM neuronok területegységre eső száma és a SYN immunreaktivitás optikai denzitása között.
3. Szignifikáns korrelációt találtunk a TLE betegek posztoperatív kimenetele és a SYN denzitás között.
4. A TLE betegek szövettani eredményei és a verbális memória között is összefüggést találtunk. A rövid távú verbális memória szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a betegek WM-ában levő neuronok területegységre eső számával és a SYN immunreaktivitás optikai denzitásával.

5. Eredményeink arra utalnak, hogy a TLE betegekben talált WM neuronok funkcionálisan aktívak, hiszen nagyszámú szinaptikus bemenetet kapnak más kérgi, szubkortikális vagy WM-on belül elhelyezkedő idegsejtektől, és feltételezhető, hogy részét képezik az epilepsziás neuronhálózatoknak.

- Ábrahám H, Tornóczky T, Kosztolányi G, Seress L. Cell formation in the cortical layers of the developing human cerebellum. *Int J Dev Neurosci.* 2001; 19: 53–62.
- Ábrahám H, Tóth Z, Seress L. A novel population of calretinin positive neurons comprises reelin-positive Cajal-Retzius cells in the hippocampal formation of the adult domestic pig. *Hippocampus* 2004; 14: 385–401.
- Ábrahám H, Veszprémi B, Gömöri E, Kovács K, Kravják A, Seress L. Unaltered development of the archi- and neocortex in prematurely born infants: genetic control dominates in proliferation, differentiation and maturation of cortical neurons. *Prog Brain Res.* 2007; 164: 3–22.
- Ábrahám H, Richter Z, Gyimesi C, Horváth Z, Janszky J, Dóczi T, Seress L. Degree and pattern of calbindin immunoreactivity in granule cells of the dentate gyrus differ in mesial temporal sclerosis, cortical malformation- and tumor-related epilepsies. *Brain Res.* 2011; 1399: 66–78.
- 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
- Akbarian S, Bunney Jr WE, Potkin SG, Wigal SB, Hagman JO, Sandman CA, Jones EG. Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development. *Arch Gen Psychiatry.* 1993; 50: 169–177.
- Alder J, Xie ZP, Valtorta F, Greengard P, Poo M. Antibodies to synaptophysin interfere with transmitter secretion at neuromuscular synapses. *Neuron.* 1992; 9: 759–768.
- Alix JJ, Domingues AM. White matter synapses: form, function, and dysfunction. *Neurology.* 2011; 76: 397–404.
- Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol.* 1966; 128: 431–474.
- Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965; 124: 319–335.
- Amaral GD, Insausti R, Cowan WM. The commissural connections of the monkey hippocampal formation. *J Comp Neurol.* 1984; 224: 307–336.
- Amaral GD, Lavenex P. Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O’Keefe J, editors. *The Hippocampus Book.* Oxford University Press, Oxford, 2007. p. 37–114.
- André V, Marescaux C, Nehlig A, Fritschy JM. Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 2001; 11: 452–468.
- Andrioli A, Alonso-Nanclares L, Arellano JI, DeFelipe J. Quantitative analysis of parvalbumin-immunoreactive cells in the human epileptic hippocampus. *Neuroscience* 2007; 149: 131–143.
- Arellano JI, Munoz A, Ballesteros-Yán ez I, Sola RG, DeFelipe J. Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain* 2004; 127: 45–64.
- Armbruszt S, Figler M, Ábrahám H. Stability of CART peptide expression in the nucleus accumbens in aging. *Acta Biol Hung.* 2015; 66: 1–13.
- Auer T, Barsi P, Bone B, Angyalosi A, Aradi M, Szalay C, Horvath RA, Kovacs N és mtsai. History of simple febrile seizures is associated with hippocampal abnormalities in adults. *Epilepsia.* 2008; 49: 1562–1569.
- Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Crandall PH. Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J Neurosci.* 1989; 9: 2562–2574.

- Babb TL. Synaptic reorganizations in human and rat hippocampal epilepsy. *Adv Neurol.* 1999; 79: 763–779.
- Bate H, Eldridge P, Varma T, Wiesmann UC. The seizure outcome after amygdalohippocampectomy and temporal lobectomy. *Eur J Neurol.* 2007; 14: 90–94.
- Bayer SA, Altman J. Hippocampal development in the rat: cytogenesis and morphogenesis examined with autoradiography and low-level X-irradiation. *J Comp Neurol.* 1974; 58: 55–79.
- Bekenstein JW, Lothman EW. Dormancy of inhibitory interneurons in a model of temporal lobe epilepsy. *Science* 1993; 259: 97–100.
- Bell GS, de Tisi J, Gonzalez-Fraile JC, Peacock JL, McEvoy AW, Harkness WFJ, Foong J, Pope RA és mtsai. Factors affecting seizure outcome after epilepsy surgery: an observational series. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2017; 88: 933–940.
- Ben-Ari Y. Brain damage caused by seizure activity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl.* 1987; 39: 209–211.
- Ben-Ari Y. Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia.* 2001; 42: 5–7.
- Best N, Mitchell J, Baimbridge KG, Wheal HV. Changes in parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat hippocampus following a kainic acid lesion. *Neurosci Lett.* 1993; 155: 1–6.
- Blümcke I. Neuropathology of focal epilepsies: a critical review. *Epilepsy Behav.* 2009; 15: 34–39.
- Blümcke I, Zuschratter W, Schewe JC, Suter B, Lie AA, Riederer BM, Meyer B, Schramm J és mtsai. Cellular pathology of hilar neurons in Ammon’s horn sclerosis. *J Comp Neurol.* 1999 414: 437–453.
- Blümcke I, Suter B, Behle K, Kuhn R, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD. Loss of hilar mossy cells in Ammon’s horn sclerosis. *Epilepsia Suppl.* 2000; 6: 174–180.
- Blümcke I, Thom M, Wiestler OD. Ammon’s horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol.* 2002; 12: 199–211.
- Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Vinters HV, Palmini A, Jacques TS, Avanzini G és mtsai. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia* 2011; 52: 158–174.
- Blümcke I, Spreafico R. Cause matters: a neuropathological challenge to human epilepsies. *Brain Pathol.* 2012; 22: 347–349.
- Blümcke I, Coras R, Miyata H, Ozkara C. Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain Pathol.* 2012: 402–411.
- Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, Bernasconi N, Bien CG és mtsai. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia.* 2013; 54: 1315–1329.
- Blümcke I, Spreafico R, Haaker G, Coras R, Kobow K, Bien CG, Pfafflin M, Elger C és mtsai. Histopathological findings in brain tissue obtained during epilepsy surgery. *N Engl J Med.* 2017; 377: 1648–1656.
- Blümcke I, Biesel E, Bedenlier S, Händel M, Wilmshurst J, Mehndiratta MM, Yacubian EM, Cendes F és mtsai. A structured, blended learning program towards proficiency in epileptology: the launch of the ILAE Academy Level 2 Program. *Epileptic Disord.* 2022; 24: 1–14.
- Bóné B. Temporális lebeny epilepszia és generalizált rohamok. *Doktori értekezés, Pécs,* 2015. 4.
- Borhegyi Z, Leranth D. Distinct substance P- and calretinin-containing projections from the supramammillary area to the hippocampus in rats, a species difference between rats and monkeys. *Exp Brain Res.* 1997; 115: 369–374.

- Botterill JJ, Nogovitsyn N, Caruncho HJ, Kalynchuk LE. Selective plasticity of hippocampal GABAergic interneuron populations following kindling of different brain regions. *J Comp Neurol*. 2017; 525: 389–406.
- Bruton CJ. *The Neuropathology of Temporal Lobe Epilepsy*. Bruton CJ editor. Maudsley Monograph 31. Oxford: Oxford University Press. Oxford, 1988. 158 pp.
- Buckmaster PS. Does mossy fiber sprouting give rise to the epileptic state? *Adv Exp Med Biol*. 2014; 813: 161–168.
- Butt SJ, Fuccillo M, Nery S, Noctor S, Kriegstein A, Corbin JG, Fishell G. The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron*. 2005; 48:591–604.
- Cameron S, Lopez A, Glabman R, Abrams E, Johnson S, Field C, Gulland FMD, Buckmaster PS. Proportional loss of parvalbumin-immunoreactive synaptic boutons and granule cells from the hippocampus of sea lions with temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol*. 2019; 527: 2341–2355.
- Cavanagh JB, Meyer A. Aetiological aspects of Ammon's horn sclerosis associated with temporal lobe epilepsy. *Br Med J*. 1956; 2: 1403–1407.
- Cavazos JE, Golarai G, Sutula TP. Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *J Neurosci*. 1991; 11: 2795–2803.
- Chakir A, Fabene PF, Ouazzani R, Bentivoglio M. Drug resistance and hippocampal damage after delayed treatment of pilocarpine-induced epilepsy in the rat. *Brain Res Bull*. 2006; 71: 127–138.
- Christenson Wick Z, Leintz CH, Xamonthiene C, Huang BH, Krook-Magnuson E. Axonal sprouting in commissurally projecting parvalbumin-expressing interneurons. *J Neurosci Res*. 2017; 95: 2336–2344.
- Chun JJ, Nakamura MJ, Shatz CJ. Transient cells of the developing mammalian telencephalon are peptide-immunoreactive neurons. *Nature*. 1987; 325: 617–620.
- Chun JJ, Shatz CJ. Interstitial cells of the adult neocortical white matter are the remnant of the early generated subplate neuron population. *J Comp Neurol*. 1989; 282: 555–569.
- Colciaghi F, Finardi A, Nobili P, Locatelli D, Spigolon G, Battaglia GS. Progressive brain damage, synaptic reorganization and NMDA activation in a model of epileptogenic cortical dysplasia. *PLoS One*. 2014; 9: e89898.
- Concha L, Beaulieu C, Collins D.L, Gross D.W. White-matter diffusion abnormalities in temporal-lobe epilepsy with and without mesial temporal sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009; 80: 312–319.
- Cui W, Shang K, Qiu B, Lu J, Gao JH. White matter network disorder in mesial temporal epilepsy: An fMRI study. *Epilepsy Res*. 2021; 172: 106590.
- Cronin J, Obenaus A, Houser CR, Dudek FE. Electrophysiology of dentate granule cells after kainate-induced synaptic reorganization of the mossy fibers. *Brain Res*. 1992; 573: 305–310.
- D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant *reeler*. *Nature*. 1995; 374: 719–723.
- D'Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T. Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *J Neurosci*. 1997; 17: 23–31.
- de Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res*. 1989; 495: 387–395.
- de Lanerolle NC, Kim JH, Williamson A, Spencer SS, Zaveri HP, Eid T, Spencer DD. A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories. *Epilepsia* 2003; 44: 677–687.
- Demeter S, Rosene DL, Van Hoesen GW. Interhemispheric pathways of the hippocampal formation, presubiculum, and entorhinal and posterior parahippocampal cortices in the rhesus monkey: the structure and organization of the hippocampal commissures. *J Comp Neurol*. 1985; 233: 30–47.

- Ding Z, Xu R, Bailey SK, Wu T, Morgan VL, Cutting LE, Anderson AW, Gore JC. Visualizing functional pathways in the human brain using correlation tensors and magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging*. 2016; 34: 8–17.
- Dudek FE, Hellier JL, Williams PA, Ferraro DJ, Staley KJ. The course of cellular alterations associated with the development of spontaneous seizures after status epilepticus. *Prog Brain Res*. 2002; 135: 53–65.
- Durnford AJ, RoGDers W, Kirkham FJ, Mullee MA, Whitney A, Prevett M, Kinton L, Harris M és mtsai. Very good inter-rater reliability of Engel and ILAE epilepsy surgery outcome classifications in a series of 76 patients. *Seizure*. 2011; 20: 809–812.
- Eastwood SL and Harrison PJ. Interstitial white matter neuron density in the dorsolateral prefrontal cortex and parahippocampal gyrus in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2005; 79: 181–188.
- Ebner A. Lateral (neocortical) temporal lobe epilepsy. *Epileptic seizures and syndromes*. Wolf P editor. John Libbey, London, 1994. 375–382.
- Emery JA, Roper SN, Rojiani AM. White matter neuronal heterotopia in temporal lobe epilepsy: a morphometric and immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997; 56: 1276–1282.
- Fahrner A, Kann G, Flubacher A, Heinrich C, Freiman TM, Zentner J, Frotscher M, Haas CA. Granule cell dispersion is not accompanied by enhanced neurogenesis in temporal lobe epilepsy patients. *Exp Neurol*. 2007; 203: 320–332.
- Förster E, Tielsch A, Saum B, Weiss KH, Johanssen C, Graus-Porta D, Müller U, Frotscher M. Reelin, Disabled 1, and beta 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 13178–13183.
- Franck JE, Pokornny J, Kunkel DD, Schwartzkorin PA. Physiologic and morphologic characteristics of granule cell circuitry in human epileptic hippocampus. *Epilepsia* 1995; 36: 543–558.
- Freiman TM, Eismann-Schweimler J, Frotscher M. Granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy is associated with changes in dendritic orientation and spine distribution. *Exp Neurol*. 2011; 229: 332–338.
- French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, Spencer DD. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol*. 1993; 34: 774–780.
- French JA. Febrile seizures: possible outcomes. *Neurology*. 2012; 79: e80-2.
- French JA, Kuzniecky R. Can febrile status cause hippocampal sclerosis? *Ann Neurol*. 2014; 75: 173–174.
- Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. 1996; 6: 347–470.
- Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*. 2015; 7: 42–47.
- Halász P. Temporolimbikus epilepsziák. *Epilepsziás tünetegyüttesek*. Terákné Wurm K. szerk. Springer Hungarica Kiadó Kft., Budapest, 1997. 125–132.
- Hardiman O, Burke T, Phillips J, Murphy S, O'Moore B, Staunton H, Farrell MA. Microdysgenesis in resected temporal neocortex: incidence and clinical significance in focal epilepsy. *Neurology*. 1988; 38: 1041–1047.
- Hodges JR. *Cognitive assessment for clinicians*. Oxford University Press, Oxford, 1996.
- Hollódy K. Az idegrendszer betegségei, Idegrendszeri görcsök. *Klinikai Gyermekgyógyászat*. Tulassay T. szerk. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2016. 315–324.
- Hollódy K. Az epilepsziás rohamok és epilepszia szindrómák új klasszifikációja (ILAE 2017). *Gyermekneurológia*. Hollódy K. szerk. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2019. 142–144.
- Hollódy K. Elektroklinikai szindrómák az életkor szerint. *Gyermekneurológia*. Hollódy K. szerk. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2019. 144–167.

- Houser CR. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* 1990; 535: 195–204.
- Houser CR. Do structural changes in GABA neurons give rise to the epileptic state? *Adv Exp Med Biol.* 2014; 813: 151–160.
- Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, Walsh GO, Rich JR, Delgado-Escueta AV. Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J Neurosci.* 1990; 10: 267–282.
- Houser CR, Swartz BE, Walsh GO, Delgado-Escueta AV. Granule cell disorganization in the dentate gyrus: possible alterations of neuronal migration in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Suppl.* 1992; 9: 41–48.
- Howe KL, Dimitri D, Heyn C, Kiehl TR, Mikulis D, Valiante T. Histologically confirmed hippocampal structural features revealed by 3T MR imaging: potential to increase diagnostic specificity of mesial temporal sclerosis. *Am J Neuroradiol.* 2010; 31: 1682–1689.
- Huusko N, Romer C, Ndoe-Ekane XE, Lukasiuk K, Pitkanen A. Loss of hippocampal interneurons and epileptogenesis: a comparison of two animal models of acquired epilepsy. *Brain Struct Funct.* 2015; 220: 153–191.
- Isokawa M. Preservation of dendrites with the presence of reorganized mossy fiber collaterals in hippocampal dentate granule cells in patients with temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* 1997; 744: 339–343.
- Janszky J, Rásonyi G, Fogarasi A, Bognár L, Eróss L, Barsi P, Halász P. Surgically treatable epilepsya review. *Orv Hetil.* 2001; 142: 1597–1604.
- Janszky J, Woermann FG, Barsi P, Schulz R, Halász P, Ebner A. Right hippocampal sclerosis is more common than left after febrile seizures. *Neurology.* 2003; 60: 1209–1210.
- Janszky J, Janszky I, Ebner A. Age at onset in mesial temporal lobe epilepsy with a history of febrile seizures. *Neurology.* 2004; 63: 1296–1298.
- Janszky J, Komoly S. Epilepsziás rohamok és az epilepszia. *Gyakorlati neurológia és neuroanatómia. 2. javított kiadás.* Komoly S. Palkovits M. szerk. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2012. 117–128.
- Jossin Y, Ogawa M, Metin C, Tissir F, Goffinet AM. Inhibition of SRC family kinases and non-classical protein kinases C induce a reeler-like malformation of cortical plate development. *J Neurosci.* 2003; 23: 9953–9959.
- Judaš M, Sedmak G, Pletikos M, Jovanov-Milošević N. Populations of subplate and interstitial neurons in fetal and adult human telencephalon. *J Anat.* 2010; 217: 381–399.
- Kanold PO. Subplate neurons: crucial regulators of cortical development and plasticity. *Front Neuroanat.* 2009; 3: 16.
- Kasper BS, Stefan H, Buchfelder M, Paulus W. Temporal lobe microdysgenesis in epilepsy versus control brains. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999; 58: 22–28.
- Kirkpatrick B, Conley RC, Kakoyannis A, Reep RL and Roberts RC. Interstitial cells of the white matter in the inferior parietal cortex in schizophrenia: an unbiased cell-counting study. *Synapse.* 1999; 34: 95–102.
- Kirkpatrick B, Messias NC, Conley RR and Roberts RC. Interstitial cells of the white matter in the dorsolateral prefrontal cortex in deficit and nondeficit schizophrenia. *J. Nerv. Ment. Dis.* 2003; 191: 563–567.
- Kostovic I, Rakic P. Cytology and time of origin of interstitial neurons in the white matter in infant and adult human and monkey telencephalon. *J Neurocytol.* 1980; 9: 219–242.
- Kostovic I, Rakic P. Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J Comp Neurol.* 1990; 297: 441–470.

- Kostovic I, Sedmak G, Vukšić M, Judaš M. The relevance of human fetal subplate zone for developmental neuropathology of neuronal migration disorders and cortical dysplasia. *Review CNS Neurosci Ther.* 2015; 21: 74–82.
- Kowall NW and Beal MF. Cortical somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH diaphorase neurons, normal anatomy and alterations in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1988; 23: 105–114.
- Lehericy S, Semah F, Hasboun D, Dormont D, Clemenceau S, Granat O, Marsault C, Baulac M. Temporal lobe epilepsy with varying severity: MRI study of 222 patients. *Neuroradiology.* 1997; 39: 788–796.
- Lehmann TN, Gabriel S, Kovacs R, Eilers A, Kivi A, Schulze K, Lanksch WR, Meencke HJ, és mtsai. Alterations of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsia.* 2000; 41: 190–194.
- Levav-Rabkin T, Melamed O, Clarke G, Farber M, Cryan JF, Dinan TG, Grossman Y, Golan HM. A sensitive period of mice inhibitory system to neonatal GABA enhancement by vigabatrin is brain region dependent. *Neuropsychopharmacology.* 2010; 35: 1138–1154.
- Lewis DV, Shinnar S, Hesdorffer DC, Bagiella E, Bello JA, Chan S, Xu Y, MacFall J és mtsai. Hippocampal sclerosis after febrile status epilepticus: the FEBSTAT study. *Ann Neurol.* 2014; 75: 178–185.
- Lezak M, Howieson D, Loring D, Hannay H, Fischer J. *Neuropsychological Assessment.* Oxford University Press, New York, 2004.
- Liptai Z. Lázás állapotban bekövetkező rohamok, lázas convulsiók. *Gyermekneurológia.* Hollódy K. szerk. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2019. 135–138.
- Liu M, Concha L, Lebel C, Beaulieu C, Gross DW. Mesial temporal sclerosis is linked with more widespread white matter changes in temporal lobe epilepsy. *Neuroimage Clin.* 2012; 1: 99–105.
- Liu JY, Ellis M, Brooke-Ball H, de Tisi J, Eriksson SH, Brandner S, Sisodiya SM, Thom M. High-throughput, automated quantification of white matter neurons in mild malformation of cortical development in epilepsy. *Acta Neuropathol Commun.* 2014; 2: 72.
- Long L, Xiao B, Feng L, Yi F, Li G, Li S, Mutasem MA, Chen S és mtsai. Selective loss and axonal sprouting of GABAergic interneurons in the sclerotic hippocampus induced by LiCl/pilocarpine. *Int J Neurosci.* 2011; 121: 69–85.
- Lossi L, Castagna C, Granato A, Merighi A. The Reeler Mouse: A Translational Model of Human Neurological Conditions, or Simply a Good Tool for Better Understanding Neurodevelopment? *J Clin Med.* 2019; 8: 2088.
- Lőrincz KN, Bóné B, Tóth M, Horváth R, Kovács N, Komoly S, Karádi K, Barsi P és mtsai. Postoperative outcome of surgical interventions for epilepsy between 2005 and 2016 at the Epilepsy Center of Pécs. *Orv Hetil.* 2019; 160: 270–278.
- Maglóczky Z. Sprouting in human temporal lobe epilepsy: excitatory pathways and axons of interneurons. *Epilepsy Res.* 2010; 89: 52–59.
- Maglóczky Z, Freund TF. Selective neuronal death in the contralateral hippocampus following unilateral kainate injections into the CA3 subfield. *Neuroscience.* 1993; 56: 317–335.
- Maglóczky Z, Halász P, Vajda J, Czirják S, Freund TF. Loss of Calbindin-D28K immunoreactivity from dentate granule cells in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 1997; 76: 377–385.
- Maglóczky Z, Wittner L, Borhegyi Z, Halász P, Vajda J, Czirják S, Freund TF. Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience.* 2000; 96: 7–25.
- Maglóczky Z, Freund TF. Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. *Trends Neurosci.* 2005; 28: 334–340.
- Maher J, McLachlan RS. Febrile convulsions. Is seizure duration the most important predictor of temporal lobe epilepsy? *Brain.* 1995; 118: 1521–1528.

- Margerison JH, Corsellis JA. Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain*. 1966; 89: 499–530.
- Mathern GW, Leite JP, Pretorius JK, Quinn B, Peacock WJ, Babb TL. Children with severe epilepsy: evidence of hippocampal neuronal losses and aberrant mossy fiber sprouting during postnatal granule cell migration and differentiation. *Developmental Brain Res*. 1994; 78: 70–80.
- Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK, Leite JP. Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata. *J Neurosci*. 1995; 15: 3990–4004.
- Miyata H, Chute DJ, Fink J, Villablanca P, Vinters HV. Lissencephaly with agenesis of corpus callosum and rudimentary dysplastic cerebellum: a subtype of lissencephaly with cerebellar hypoplasia. *Case Reports Acta Neuropathol*. 2004; 107: 69–81.
- Mrzljak L, Uylings HB, Kostovic I, Van Eden CG. Prenatal development of neurons in the human prefrontal cortex: I. A qualitative Golgi study. *J Comp Neurol*. 1988; 271: 355–386.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 1992; 116: 201–211.
- Müller RA, Behen ME, Muzik O, Rothermel RD, Downey RA, Mangner TJ, Chugani HT. Task-related activations in heterotopic brain malformations: a PET study. *Neuroreport*. 1998; 9: 2527–2533.
- Nagy SA, Horváth R, Perlaki G, Orsi G, Barsi P, John F, Horváth A, Kovács N és mtsai. Age at onset and seizure frequency affect white matter diffusion coefficient in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2016; 61: 14–20.
- Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K. The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron*. 1995; 14: 899–912.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 1997; 17: 3727–3738.
- Parent JM. The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. *Epilepsy Res*. 2002; 50: 179–189.
- Parnavelas JG. The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Review Trends Neurosci*. 2000; 23: 126–131.
- Patterson JL, Carapetian SA, Hageman JR, Kelley KR. Febrile seizures. *Pediatr Ann*. 2013; 42: 249–254.
- Peng Z, Zhang N, Wei W, Huang CS, Cetina Y, Otis TS, Houser CR. A reorganized GABAergic circuit in a model of epilepsy: evidence from optogenetic labeling and stimulation of somatostatin interneurons. *J Neurosci*. 2013; 33: 14392–14405.
- Peer M, Nitzan M, Bick AS, Levin N, Arzy S. Evidence for Functional Networks within the Human Brain's White Matter. *J Neurosci*. 2017; 37: 6394–6407.
- Rehm H, Wiedenmann B, Betz H. Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *EMBO J*. 1986; 5: 535–541.
- Represa A, Tremblay E, Ben-Ari Y. Sprouting of mossy fibers in the hippocampus of epileptic human and rat. *Adv Exp Med Biol*. 1990; 268: 419–424.
- Represa A, Niquet J, Pollard H, Ben-Ari Y. Cell death, gliosis, and synaptic remodeling in the hippocampus of epileptic rats. *J Neurobiol*. 1995; 26: 413–425.
- Represa A, Ben-Ari Y. Molecular and cellular cascades in seizure-induced neosynapse formation. *Adv Neurol*. 1997; 72: 25–34.

- Richter Z, Janszky J, Sétáló G Jr, Horváth R, Horváth Z, Dóczi T, Seress L, Ábrahám H. Characterization of neurons in the cortical white matter in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 2016; 333: 140–150.
- Riley JD, Franklin DL, Choi V, Kim RC, Binder DK, Cramer SC, Lin JJ. Altered white matter integrity in temporal lobe epilepsy: association with cognitive and clinical profiles. *Epilepsia*. 2010; 51: 536–545.
- Salanova V, Markand O, Worth R. Temporal lobe epilepsy: analysis of patients with dual pathology. *Acta Neurol Scand*. 2004; 109: 126–131.
- Sarnat HB, Nochlin D, Born DE. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system. *Brain Dev*. 1998; 20: 88–94.
- Scharfman HE. Functional implications of seizure-induced neurogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2004; 548: 192–212.
- Scheibel ME, Crandall PH, Scheibel AB. The hippocampal dentate complex in temporal lobe epilepsy. A Golgi study. *Epilepsia*. 1974; 15: 55–80.
- Schmitt U, Tanimoto N, Seeliger M, Schaeffel F, Leube RE. Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience*. 2009; 162: 234–243.
- Selke K, Muller A, Kukley M, Schramm J, Dietrich D. Firing pattern and calbindin-D28k content of human epileptic granule cells. *Brain Res*. 2006; 1120: 191–201.
- Seress L. Morphological changes of the human hippocampal formation from mid-gestation to early childhood. In: Nelson CA, Luciana M, editors. *Handbook of Developmental Cognitive Neuroscience*. The MIT Press. Cambridge, Massachusetts, 2001. p. 45–58.
- Seress L, Gulyas AI, Ferrer I, Tunon T, Soriano E, Freund TF. Distribution, morphological features, and synaptic connections of parvalbumin- and calbindin D28-k-immunoreactive neurons in the human hippocampal formation. *J Comp Neurol*. 1993; 337: 208–230.
- Seress L, Ábrahám H, Tornoczky T, Kosztolanyi G. Cell formation in the human hippocampal formation from mid-gestation to the late postnatal period. *Neuroscience*. 2001; 105: 831–843.
- Seress L, Ábrahám H. Pre- and postnatal morphological development of the human hippocampal formation. In: Nelson CA, Luciana M, editors. *Handbook of Developmental Cognitive Neuroscience*. The MIT Press. Cambridge, Massachusetts, 2008. p. 183–211.
- Seress L, Ábrahám H, Horvath Z, Doczi T, Janszky J, Klemm J, Byrne R, Bakay RA. Survival of mossy cells of the hippocampal dentate gyrus in humans with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurosurg*. 2009; 111: 1237–1247.
- Shi XY, Wang JW, Cui H, Li BM, Lei GF, Sun RP. Effects of antiepileptic drugs on mRNA levels of BDNF and NT-3 and cell neogenesis in the developing rat brain. *Brain Dev*. 2010; 32: 229–235.
- Shinnar S, Bello JA, Chan S, Hesdorffer DC, Lewis DV, Macfall J, Pellock JM, Nordli DR és mtsai. MRI abnormalities following febrile status epilepticus in children: the FEBSTAT study. *Neurology*. 2012; 79: 871–877.
- Simić G, Kostović I, Winblad B, Bogdanović N. Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol*. 1997; 379: 482–494.
- Sloviter RS. Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the “dormant basket cell” hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*. 1991; 1: 41–66.
- Sloviter RS, Sollas AL, Barbaro NM, Laxer KD. Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J Comp Neurol*. 1991; 308: 381–396.
- Sloviter RS. The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 1994; 35: 640–654.

- Sloviter RS. Status epilepticus-induced neuronal injury and network reorganization. *Epilepsia*. 1999; 40: 34–39.
- Sloviter RS, Zappone CA, Harvey BD, Bumanglag AV, Bender RA, Frotscher M. “Dormant basket cell” hypothesis revisited: relative vulnerabilities of dentate gyrus mossy cells and inhibitory interneurons after hippocampal status epilepticus in the rat. *J Comp Neurol*. 2003; 459: 44–76.
- Sloviter RS, Bumanglag AV. Defining “epileptogenesis” and identifying “antiepileptogenic targets” in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. *Neuropharmacology*. 2013; 69: 3–15.
- Smith BN, Dudek FE, Roper SN. Synaptic responses of neurons in heterotopic gray matter in an animal model of cortical dysgenesis. *Dev Neurosci*. 1999; 21: 365–373.
- Sommer W. Erkrankung des Ammonhorns als Aetiologisches Moment der Epilepsie. *Arch. Psychiat. Nerv. Kranknh.* 1880; 10: 631–675.
- Sperk G, Drexel M, Pirker S. Neuronal plasticity in animal models and the epileptic human hippocampus. *Epilepsia Suppl*. 2009; 12: 29–31.
- Spreafico R, Arcelli P, Frassoni C, Canetti P, Giaccone G, Rizzuti T, Mastrangelo M, Bentivoglio M. Development of layer I of the human cerebral cortex after midgestation: architectonic findings, immunocytochemical identification of neurons and glia, and in situ labeling of apoptotic cells. *J Comp Neurol*. 1999; 410: 126–142.
- Spreer J, Martin P, Greenlee MW, Wohlfarth R, Hammen A, Arnold SM, Schumacher M. Functional MRI in patients with band heterotopia. *Neuroimage*. 2001; 14: 357–365.
- Suárez-Solá ML, González-Delgado FJ, Pueyo-Morlans M, Medina-Bolívar OC, Hernández-Acosta NC, González-Gómez M, Meyer G. Neurons in the white matter of the adult human neocortex. *Front Neuroanat*. 2009; 3: 7.
- Sun C, Mtchedlishvili Z, Bertram EH, Erisir A, Kapur J. Selective loss of dentate hilar interneurons contributes to reduced synaptic inhibition of granule cells in an electrical stimulation stimulationbased animal model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol*. 2007; 500: 876–893.
- Sutula TP, Golarai G, Cavazos J. Assessing the functional significance of mossy fiber sprouting. *Epilepsy Res Suppl*. 1992; 7: 251–259.
- Suzukawa J, Omori K, Okugawa G, Fujiseki Y, Heizmann CW, Inagaki C. Long-lasting c-fos and NGF mRNA expressions and loss of perikaryal parvalbumin immunoreactivity in the development of epileptogenesis after ethacrynic acid-induced seizure. *Brain Res*. 1999; 834: 89–102.
- Suzuki F, Makiura Y, Guilhem D, Sørensen JC, Onteniente B. Correlated axonal sprouting and dendritic spine formation during kainate-induced neuronal morphogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Exp Neurol*. 1997; 145: 203–213.
- Tang FR, Loke WK. Cyto-, axo- and dendro-architectonic changes of neurons in the limbic system in the mouse pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 2010; 89: 43–51.
- Takahashi DK, Jin S, Prince DA. Gabapentin prevents progressive increases in excitatory connectivity and epileptogenesis following neocortical trauma. *Cereb Cortex*. 2018; 28: 2725–2740.
- Taniguchi H, Lu J, Huang ZJ. The spatial and temporal origin of chandelier cells in mouse neocortex. *Science*. 2013; 339: 70–74.
- Tao Z, Van Gool D, Lammens M, Dom R. NADPH-diaphorase-containing neurons in cortex, subcortical white matter and neostriatum are selectively spared in Alzheimer’s disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord*. 1999; 10: 460–468.
- Tassi L, Meroni A, Deleo F, Villani F, Mai R, Russo GL, Colombo N, Avanzini G és mtsai. Temporal lobe epilepsy: neuropathological and clinical correlations in 243 surgically treated patients. *Epileptic Disord*. 2009; 11: 281–292.

- Thom M, Sisodiya S, Harkness W, Scaravilli F. Microdysgenesis in temporal lobe epilepsy. A quantitative and immunohistochemical study of white matter neurones. *Brain*. 2001; 124: 2299–2309.
- Thom M, Zhou J, Martinian L, Sisodiya S. Quantitative post-mortem study of the hippocampus in chronic epilepsy: seizures do not inevitably cause neuronal loss. *Brain*. 2005; 128: 1344–1357.
- Thomas L, Hartung K, Langosch D, Rehm H, Bamberg E, Franke WW, Betz H. Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science*. 1988; 242: 1050–1053.
- Tóth K, Eross L, Vajda J, Halász P, Freund TF, Maglóczy Z. Loss and reorganization of calretinin-containing interneurons in the epileptic human hippocampus. *Brain*. 2010; 133: 2763–2777.
- Tricoire L, Pelkey KA, Erkkila BE, Jeffries BW, Yuan X, McBain CJ. A blueprint for the spatiotemporal origins of mouse hippocampal interneuron diversity. *J Neurosci*. 2011; 31: 10948–10970.
- Van de Nes JA, Sandmann-Keil D, Braak H. Interstitial cells subjacent to the entorhinal region expressing somatostatin-28 immunoreactivity are susceptible to development of Alzheimer's disease-related cytoskeletal changes. *Acta Neuropathol*. 2002; 104: 351–356.
- Wang X, Yu Y, Ma R, Shao N, Meng H. Lacosamide modulates collapsin response mediator protein 2 and inhibits mossy fiber sprouting after kainic acid-induced status epilepticus. *Neuroreport*. 2018; 29: 1384–1390.
- West MJ, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *Comp Neurol*. 1990; 296: 1–22.
- Wiedenmann B, Franke WW. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*. 1985; 41: 1017–1028.
- Wieser HG. ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*. 2004; 45: 695–714.
- Wittner L, Maglóczy Z. Synaptic Reorganization of the Perisomatic Inhibitory Network in Hippocampi of Temporal Lobe Epileptic Patients. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 7154295.
- Wittner L, Maglóczy Z, Borhegyi Z, Halasz P, Toth S, Eross L, Szabó Z, Freund TF. Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience*. 2001; 108: 587–600.
- Wittner L, Eross L, Szabo Z, Toth S, Czirjak S, Halasz P, Freund TF, Maglóczy ZS. Synaptic reorganization of calbindinpositive neurons in the human hippocampal CA1 region in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 2002; 115: 961–978.
- Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Blümcke I. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem*. 1996; 44: 1167–1171.
- Xu Q, Cobos I, De La Cruz E, Rubenstein JL, Anderson SA. Origins of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci*. 2004; 24: 2612–2622.
- Zecevic N, Chen Y, Filipovic R. Contributions of cortical subventricular zone to the development of the human cerebral cortex. *J Comp Neurol*. 2005; 491: 109–122.
- Zhang W, Yamawaki R, Wen X, Uhl J, Diaz J, Prince DA, Buckmaster PS. Surviving hilar somatostatin interneurons enlarge, sprout axons, and form new synapses with granule cells in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2009; 29: 14247–14256.
- Zhu ZQ, Armstrong DL, Hamilton WJ, Grossman RG. Disproportionate loss of CA4 parvalbumin-immunoreactive interneurons in patients with Ammon's horn sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997; 56: 988–998.

11 Publikációs lista

11.1 *Értekezéssel kapcsolatos közlemények*

Ábrahám H, Molnár JE, Sóki N, Gyimesi C, Horváth Z, Janszky J, Dóczi T, Seress L. **Etiology-related degree of sprouting of parvalbumin-immunoreactive axons in the human dentate gyrus in temporal lobe epilepsy.** Neuroscience 2020; 448: 55-70.

IF: 3, 59

Sóki N, Richter Z, Karádi K, Lőrincz K, Horváth R, Gyimesi C, Szekeres-Paraczkó C, Horváth Z, Janszky J, Dóczi T, Seress L, Ábrahám H. **Investigation of synapses in the cortical white matter in human temporal lobe epilepsy.** Brain Research 2022; 1779: 1477-87.

IF: 2, 9

11.2 *Az értekezés alapját nem képező közlemények*

Boros M, Sóki N, Molnár A, Ábrahám H. **Morphological study of the postnatal hippocampal development in the TRPV1 knockout mice.** Temperature 2023; 10: 102-120.

IF: 4, 69

11.3 *Az értekezés alapját képező konferencia prezentációk*

Oláh Noémi, Richter Zsófia, Janszky József, Lőrincz Katalin, Dóczi Tamás, Seress László, Ábrahám Hajnalka. **A szinaptofizin immunreaktivitás vizsgálata a kéreg alatti fehérállományban temporális lebeny epilepsiában.** Házi TDK Konferencia, PTE-ÁOK, 2018. Előadás.

Sóki Noémi, Richter Zsófia, Janszky József, Lőrincz Katalin, Dóczi Tamás, Seress László, Ábrahám Hajnalka. **A szinaptofizin immunreaktivitás vizsgálata a kéreg alatti fehérállományban temporális lebeny epilepsiában.** Magyar Epilepszia Liga XIV. Kongresszus, Balatonkenese, 2018. Poszterbemutató.

Sóki Noémi, Richter Zsófia, Janszky József, Lőrincz Katalin, Dóczi Tamás, Seress László, Ábrahám Hajnalka. **A kéreg alatti fehérállományban levő szinapszisok vizsgálata halánték lebeny epilepsziában.** 1st. MEDPÉCS, Pécs, Szentágothai János Kutatóközpont, 2018. Előadás.

Sóki Noémi, Richter Zsófia, Janszky József, Lőrincz Katalin, Dóczi Tamás, Seress László, Ábrahám Hajnalka. **A szinaptofizin immunreaktivitás vizsgálata a kéreg alatti fehérállományban temporális lebeny epilepsziában.** PTE Idegtudományi centrum PhD és TDK Konferencia, Pécs, 2018. Előadás.

Noémi Sóki, Zsófia Richter, Katalin Lőrincz, Cecília Paraczký, József Janszky, Tamás Dóczi, László Seress, Hajnalka Ábrahám. **Investigation of synapses in the neocortical white matter in human temporal lobe epilepsy.** 16th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society (MITT), Debrecen, 2019. Poszterbemutató.

Sóki Noémi, Lőrincz Katalin, Paraczký Cecília, Janszky József, Dóczi Tamás, Seress László, Ábrahám Hajnalka. **A szinaptofizin immunreaktivitás vizsgálata a kéreg alatti fehérállományban temporális lebeny epilepsziában.** Magyar Kísérletes és Farmakológiai Társaság, Magyar Anatómus társaság, Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság, Magyar Élettani Társaság közös Vándorgyűlése (FAMÉ), Budapest, 2019. Poszterbemutató.

Karádi Kázmér, Sóki Noémi, Paraczký Cecilia, Janszky József, Ábrahám Hajnalka. **Cortikális fehérállományi szinapszisok és neuronok számának kapcsolata a memória funkcióval temporális lebeny epilepsziában.** Út a reziliens jövő felé. A Magyar Pszichológiai Társaság XXIX. Országos Tudományos Nagygyűlése: Kivonatkiötet, Sass Judit szerk. Magyar Pszichológiai Társaság, Budapest, 2021. 150.

Ábrahám Hajnalka, Sóki Noémi, Richter Zsófia, Karádi Kázmér, Lőrincz Katalin, Horváth Réka, Gyimesi Csilla, Szekeres-Paraczký Cecília és mtsai. **Fehérállományi neuronok és szerepük a temporalis lebeny epilepsziában.** Ideggyógyászati szemle 2022; 7: 8.

11.4 Egyéb prezentációk

Noémi Sóki, Alexandra Stayer-Harci, Bálint Balogh, Melinda Boros, Mónika Vecsernyés, György Sétáló, László Seress, Hajnalka Ábrahám. **Development of Parvalbumin-immunoreactive neurons in organotypic slice culture.** IBRO WORKSHOP, Szeged, 2020. Poszterbemutató.

Alexandra Stayer-Harci; Katalin Götzler; Bálint Balogh; Mónika Vecsernyés; Noémi Sóki; Abigél Molnár; György Sétáló Jr.; László Seress; Hajnalka Ábrahám. **Effect of Urocortin 2 on the maturation of parvalbumin-immunoreactive neurons in organotypic hippocampal slice culture.** IBRO WORKSHOP, Budapest, 2022. Poszterbemutató.

Összesített impakt faktor: 11, 18

12 Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőnek, Dr. Ábrahám Hajnalka, egyetemi docensnek, aki készségesen segítségemre volt az elmúlt évek munkái során.

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Seress Lászlónak, a Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium volt igazgatójának a szakmai tanácsaiért és javaslataiért.

Szeretném megköszönni a Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumban dolgozó asszisztenseknek, Faragó Tündének, Molnár Juditnak, Domján Gábornénak és Dr. Lórándné Miskey Juditnak, hogy a vizsgálat során alkalmazott szövettani módszerekkel megismertettek és hogy munkájukkal vizsgálatainkat segítették.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Idegsebészeti Klinikájának a vizsgálatunkhoz rendelkezésünkre bocsátott műtéti rezekátumokért, különösen Prof. Dr. Dóczi Tamásnak és Dr. Horváth Zsoltnak.

Szeretném megköszönni a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Neurológiai Klinika munkatársainak, Prof. Dr. Janszky József klinikaigazgatónak, Dr. Bóné Beátának, Dr. Gyimesi Csillának, Dr. Horváth Rékának és Dr. Lőrincz Katalinnak a kutatásunkhoz szolgáltatott klinikai adatokat.

Köszönet illeti a Pécsi Diagnosztikai Központot, hogy értékes klinikai adatokkal járultak hozzá a munkánkhoz, külön köszönet Dr. Barsi Péternek, hogy az MRI felvételek kiértékelésével hozzájárult a kutatásunk sikeréhez, valamint Dr. Nagy Szilviának, adatainkkal kapcsolatos konzultációért.

Szeretném megköszönni Dr. Karádi Kázmérnak, valamint a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Magatartástudományi Intézet munkatársainak a betegek neuropszichológiai felmérésének elvégzését.

Köszönöm Dr. Farkas Kornélia egyetemi adjunktusnak, a Bioanalitikai Intézet munkatársának az adatok statisztikai kiértékelésénél nyújtott tanácsait és segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban férjemnek és szüleimnek szeretném megköszönni, hogy az elmúlt években mindvégig támogattak és bátorítottak, hogy megszülethessen ez a PhD dolgozat.

A munkát a Nemzeti Agykutatás Program KTIA_13_NAP-A-II/11, a Nemzeti Agykutatás Program 2.0 (2017-1.2.1-NKP-2017-00002), a PTE EFOP-3.6.1.-16-2016-00004, az EFOP-3.6.2.-16-2017-00008, a 20765/3/2018/FEKUSTRAT, NKFIH K125436, a TKP2020-IKA-08, a 2020-4.1.1-TKP2020 és az Innovációs és Technológiai Minisztérium Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Programja a Pécsi Tudományegyetem 5. tematikus programja támogatta.

A laboratóriumunkban található JEOL JEM-1400Flash TEM elektronmikroszkóp beszerzését a GINOP-2.3.3-15-2016-0002 támogatta.

Etiology-related Degree of Sprouting of Parvalbumin-immunoreactive Axons in the Human Dentate Gyrus in Temporal Lobe Epilepsy

Hajnalka Ábrahám,^{a*} Judit E. Molnár,^a Noémi Sóki,^a Csilla Gyimesi,^b Zsolt Horváth,^c József Janszky,^b Tamás Dóczi^c and László Seress^a

^a Department of Medical Biology and Central Electron Microscopic Laboratory, University of Pécs Medical School, Szigeti u 12., Pécs 7624, Hungary

^b Department of Neurology, University of Pécs Medical School, Rét u. 2., Pécs 7623, Hungary

^c Department of Neurosurgery, University of Pécs Medical School, Rét u. 2., Pécs 7623, Hungary

Abstract—In the present study, we examined parvalbumin-immunoreactive cells and axons in the dentate gyrus of surgically resected tissues of therapy-resistant temporal lobe epilepsy (TLE) patients with different etiologies. Based on MRI results, five groups of patients were formed: (1) hippocampal sclerosis (HS), (2) malformation of cortical development, (3) malformation of cortical development + HS, (4) tumor-induced TLE, (5) patients with negative MRI result. Four control samples were also included in the study. Parvalbumin-immunoreactive cells were observed mostly in subgranular location in the dentate hilus in controls, in tumor-induced TLE, in malformation of cortical development and in MR-negative cases. In patients with HS, significant decrease in the number of hilar parvalbumin-immunoreactive cells and large numbers of ectopic parvalbumin-containing neurons were detected in the dentate gyrus' molecular layer. The ratio of ectopic/normally-located cells was significantly higher in HS than in other TLE groups. In patients with HS, robust sprouting of parvalbumin-immunoreactive axons were frequently visible in the molecular layer. The extent of sprouting was significantly higher in TLE patients with HS than in other groups. Strong sprouting of parvalbumin-immunoreactive axons were frequently observed in patients who had childhood febrile seizure. Significant correlation was found between the level of sprouting of axons and the ratio of ectopic/normally-located parvalbumin-containing cells. Electron microscopy demonstrated that sprouted parvalbumin-immunoreactive axons terminate on proximal and distal dendritic shafts as well as on dendritic spines of granule cells. Our results indicate alteration of target profile of parvalbumin-immunoreactive neurons in HS that contributes to the known synaptic remodeling in TLE. © 2020 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of IBRO. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Key words: hippocampal sclerosis, calcium-binding protein, axo-somatic inhibition, axo-dendritic inhibition, pathology, febrile seizure.

INTRODUCTION

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common form of focal epilepsies. In more than half of the patients, therapy-resistant epilepsy is associated with sclerosis of the medial temporal lobe structures including the hippocampal formation (Lehericy et al., 1997; Blümcke

et al., 2002, 2009; de Lanerolle et al., 2003; Howe et al., 2010). Neuronal loss in the sclerotic hippocampal formation includes death of excitatory and inhibitory cells in Ammon's horn (CA1 and CA3 regions), as well as in the hilus of the dentate gyrus (DG) (de Lanerolle et al., 1989; Robbins et al., 1991; Blümcke et al., 1999; Blümcke et al., 2000; Seress et al., 2009; Tóth et al., 2010). Synaptic reorganization of surviving neurons is another characteristic feature of the hippocampal sclerosis (HS). Data are abundant about the sprouting of granule cell axons (mossy fibers) into the molecular layer of the DG. While mossy fibers normally terminate on both excitatory and inhibitory neurons of the CA3 region and those of the dentate hilus (Frotscher, 1985, 1989; Ribak, 1985; Claiborne et al., 1986; Soriano and Frotscher, 1993; Acsády et al., 1998), in the epileptic human hippocampal formation as well as in animal models of TLE, mossy terminals form synapses on granule cell dendrites in the molecular layer

*Corresponding author.

E-mail address: hajnalka.abraham@aok.pte.hu (H. Ábrahám).
Abbreviations: CA3c, subregion of Ammon's horn; D, dendrite; DAB, diaminobenzidine; DG, dentate gyrus; FS, febrile seizure; g, granule cell layer; GAD, glutamate decarboxylase; h, hilus of the dentate gyrus; HS, hippocampal sclerosis; HS+MCD, hippocampal sclerosis combined with malformation of cortical development; ir, immunoreactive; m, molecular layer; MCD, malformation of cortical development; MR, MRI, magnetic resonance imaging; MR-, MR-negative; PV, parvalbumin; PV-ir, parvalbumin-immunoreactive; s, soma; SD, standard deviation; sp, dendritic spine; TEM, transmission electron microscope; TLE, temporal lobe epilepsy; TU, tumor-related epilepsy.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.09.018>

0306-4522/© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of IBRO.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

of the DG (Houser et al., 1990; Cavazos et al., 1991; Represa et al., 1993; Mathern et al., 1994; Franck et al., 1995).

Sprouting of pyramidal cells' axons in the CA1 region may result in a stronger excitatory input to neighboring pyramidal neurons (Lehmann et al., 2000, 2001). Moreover, stronger excitation may be caused by sprouting of subicular axons terminating on CA1 pyramidal cells (Lehmann et al., 2000). Axons of excitatory neuronal afferents to the hippocampal formation, such as the supramammillary pathway, sprout as well. This results in a wider termination zone on the dendrites of granule cells in the molecular layer of DG that may further increase the excitability of granule cells (Borhegyi and Leranthy, 1997; Maglóczy et al., 2000; Soussi et al., 2015).

In addition to axons of excitatory neurons, synaptic reorganization of GABAergic neurons have also been reported. Axonal sprouting of inhibitory axo-dendritic local circuit neurons, that contain calbindin and innervate inhibitory neurons, may result in stronger excitation (Wittner et al., 2002). Terminals of axo-axonic neurons containing parvalbumin (PV) have been found more frequently on axon-initial segments of granule cells in HS than in controls (Wittner et al., 2001). Sprouting of somatostatin and neuropeptide Y expressing axons was also detected in the DG (de Lanerolle et al., 1989; Mathern et al., 1995; Sperk et al., 2007). Using glutamate decarboxylase (GAD) immunohistochemistry, Mathern et al. (1995) have shown strong GAD immunoreactivity in the inner one-third of the dentate molecular layer. Based on light microscopic results they have suggested axonal sprouting of interneurons including basket cells and their excessive termination on granule cell dendrites. However, this hypothesis has not yet been verified at ultrastructural level.

Basket cells can be visualized by their neurochemical marker PV or cholecystokinin (Greenwood et al., 1981; Nunzi et al., 1985; Kosaka et al., 1987; Braak et al., 1991). In addition to basket cells, PV can be found also in the axo-axonic neurons. In the control DG, PV-immunoreactive (ir) axon terminals have been found primarily on somata and axon-initial segments of granule cells (Seress et al., 1993). Although very rarely, PV-ir axon terminals were present on proximal dendrites and dendritic spines in both control Ammon's horn and DG (Ribak et al., 1993; Seress et al., 1993; Wittner et al., 2001). A previous study has reported stronger innervation of granule cells by PV-ir axo-axonic cells in epilepsy (Wittner et al., 2001). We hypothesize that, in addition to the above-mentioned local-circuit neurons, PV-ir basket cells are also responsible for synaptic reorganization in epilepsy and they form synapses with dendrites and spines of granule cells in the dentate molecular layer.

In the present study, we examined the axonal arborization of the PV-containing local circuit neurons in the DG of TLE patients with HS. In addition, we extended the study to examine TLE with different etiologies. We have included histological samples of TLE patients with malformation of cortical development (MCD), with dual pathology, in which MCD coincided

with HS and patients with epilepsy induced by intracranial tumor. Our histological findings were correlated with the etiology of TLE and with clinical data of the patients.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Patients

Surgically removed tissues of the hippocampal formation of adult medically refractory TLE patients ($n = 40$) were used in this study. Five groups of patients with epilepsy were defined. Patients ($n = 21$) who had HS verified by MRI were in "HS group". Patients ($n = 7$) with MCD-induced TLE formed "MCD group". In four patients MCD coincided with HS, they formed the "HS + MCD group". In four of the TLE patients MRI did not reveal any alteration neither in the neocortex nor in the hippocampal formation before surgery. These patients formed the "MR negative (MR-) group". Four patients belonged to the group of "tumor-induced TLE group". Summary of demographic data and clinical findings in TLE patients' groups is presented in Table 1.

TLE patients were evaluated in the Epilepsy Center of the Department of Neurology at the University of Pécs. Video/EEG monitoring was performed on all patients and the temporal epileptic focus was identified. All patients underwent high resolution brain MR imaging performed on 3-T MR machine (Siemens Trio, Siemens AG, Erlangen, Germany) using a special protocol for TLE focusing on the temporal lobe and especially on the hippocampal formation. All surgeries were performed in the Department of Neurosurgery of the Faculty of Medicine at the University of Pécs under general anesthesia through standard temporal craniotomy. In patients with MCD and with tumor-related epilepsy, in addition to the hippocampal formation, resection included areas of the temporal lobe occupied by developmental malformation or tumor. The removed specimen was sent for both routine pathology and special anatomical studies.

Control group

In addition to TLE cases, hippocampi of non-epileptic controls ($n = 4$) were also included in the study. Temporal lobes were surgically removed from controls (36-, 54-, and 62-year old women and a 73-year-old man) with tumors invading the temporal neocortex but without epileptic seizures. Lobectomy was necessary to ensure removal of the tumor-infiltrated tissue that was in vicinity of the hippocampal formation. In all four cases of the non-epileptic control group, as well as in the cases of tumor-induced TLE group, histopathological examination confirmed that the hippocampi were not invaded by tumor cells. Tissues of some of these patients were used also in another studies (Seress et al., 2009; Ábrahám et al., 2011). All procedures, including surgery, were carried out with the adequate understanding and written consent of the patients, and were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki,

Table 1. Demographic and clinical data of TLE patients with different etiologies

TLE patients groups	HS	HS + MCD	MCD	MR-negative	Tumor-induced
Number of patients	21	4	7	4	4
Age (Y)	41.3 ± 9.01	33.3 ± 7.49	29.6 ± 8.72	42.5 ± 11.38	27.25 ± 9.3
Gender	M: 10, F: 11	M: 3, F: 1	M: 2, F: 5	M: 1, F: 3	M: 3, F: 1
Age at onset (Y)	10.7 ± 6.73	9.3 ± 3.49	14.1 ± 10.23	22.5 ± 13.51	21.25 ± 6.96
Duration (Y)	30.7 ± 12.58	24 ± 7.18	15.4 ± 7.03	20.2 ± 3.03	7.02 ± 4.99
Seizure frequency/month	3.3 ± 1.86	4.9 ± 1.19	6.2 ± 2.03	5.4 ± 2.56	6.7 ± 5.29
Side of focus	L: 10, R: 11	L: 2, R: 2	L: 2, R: 5	L: 1, R: 3	L: 0, R: 4
Febrile seizure	6	2	0	0	0

Abbreviations: HS, hippocampal sclerosis, MCD, malformation of cortical development, HS + MCD, hippocampal sclerosis and additional malformation of cortical development, MR-, MR could not reveal any morphological alteration in the temporal archi- and neocortex, Y, year, M, male, F, female, L, left, R, right.

and have been agreed by the ethical committee of the University of Pécs.

Tissue processing

Resected hippocampal tissues of patients were immediately immersed in 4% paraformaldehyde buffered with phosphate buffer (0.1 M PB, pH 7.4) and kept for approximately 12 h at room temperature under continuous agitation. Following fixation, 10-mm-thick blocks perpendicular to the septotemporal axis of the hippocampal formation were cut and these blocks were sectioned at 80 μm using a Vibratome. Individual serial free-floating sections were collected and processed for immunohistochemistry.

Immunohistochemistry for light microscopy

Sections (80 μm) were washed in Tris buffer (TB, pH 7.4) and pretreated with a solution of 1% hydrogen peroxide for 30 min to block endogenous peroxidase, followed by pre-incubation in 1% normal horse serum in TB containing 0.4% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Hungary) for 1 h. This step was followed by incubation with primary monoclonal mouse anti-PV antibody (1:5000, Swant, Bellinzona, Switzerland) for 72 h at 4 °C. Binding sites of the primary antibodies were visualized with biotinylated secondary anti-mouse antibody (4 h at room temperature) and the avidin–biotin peroxidase detection system (Universal Vectastain ABC Elite Kit, Vector, Burlingame, CA). The chromogen used was 3,3'-diaminobenzidine (DAB). The tissue sections were then mounted on glass slides, air-dried, ethanol series-dehydrated, cleared with xylene, and cover-slipped with DePeX (Fluka, Switzerland). Parts of PV-immunostained sections were counterstained with cresyl violet before dehydration. Immunohistochemical control sections were handled in a similar manner, except that primary antibodies were omitted.

Electron microscopy

For electron microscopy, 80 μm thick sections were cut using a Vibratome and used for immune-electron microscopy using antibody against PV, as well as for common electron microscopy.

Immunohistochemical procedure for electron microscopy was conducted according to that described

earlier (Ábrahám et al., 2004). Briefly, to enhance penetration of the antibodies, the sections were subjected to “freeze-thaw” process. Free-floating sections were cryo-protected in 15%, then in 30% solution of sucrose diluted in PB, and they were “freeze-thawed” by placing them three times above liquid nitrogen. Sections were washed several times with TB and processed for PV immunohistochemistry as described above, except for the use of Triton-X-100.

Successfully immunostained sections were processed for electron microscopy using the routine method of flat embedding. Briefly, sections were first immersed in a solution of 2.5% glutaraldehyde diluted in PB for 2 h, then in a 1% solution of osmium tetroxide in PB for 1 h. This step was followed by a wash with PB and dehydration with a series of increasing concentration of ethanol. Uranyl acetate (1%) was included in the 70% ethanol stage (1 h) to enhance contrast. After the final incubation in absolute ethanol, sections were transferred to propylene oxide then were placed in aluminum foil boats containing Durcupan resin (ACM, Sigma) overnight at room temperature. Sections were mounted on slides, a coverslip applied, and the resin cured for 48 h at 56 °C. The same embedding procedure was performed on sections without immunohistochemistry.

Areas of interest including the molecular and granule cell layers of the DG were cut using light microscopic control and reblocked in Durcupan resin. Serial ultrathin sections were collected on single slot collodion-coated (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) copper grids. The ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate according to a standard procedure. Sections were examined in a JEOL 1200 EX-II and JEM-1400Flash transmission electron microscopes (TEM).

Evaluation of PV-immunoreactive cells and axons

The extent of PV-ir axonal sprouting was determined in the light microscopic sections. Using 10× magnification, digital photomicrographs were taken of the entire DG. The length of granule cell layer, as well as the length of the granule cell layer's segments where sprouted PV-ir axon terminals were visible in the molecular layer of the DG, were measured using the image analyzer tools of the iTEM program (Olympus). PV-ir terminals in the molecular layer were considered sprouted when they

were seen 50 μm above the granule cell layer. The percentage of the granule cell layer's length covered by sprouted PV-ir axon terminals was determined by each patient and the averages of these data \pm standard deviation (SD) were calculated for each patients' group as well as for the control group.

PV-ir neurons in normal location (in the granule cell layer and in the hilus of the DG) as well as in ectopic location (in the molecular layer of the DG and along the hippocampal fissure) were counted, separately. The numbers of PV-ir cells in normal and in ectopic locations were determined to the length (mm) of the granule cell layer. The ratio of ectopic/normally-located PV-ir cells was calculated in each patient and the averages of these data \pm SD were determined for each patients' group as well as for the control group.

During quantification, all available immunostained sections containing the entire granule cell layer were used, and numbers of these available sections/patient varied from 3 to 9. The level of PV-ir axonal sprouting in the molecular layer of DG and numbers of normally-located and ectopic PV-ir cells in TLE with different etiologies as well as in controls were compared with Student's *t*-test. Spearman's correlation analysis was performed to reveal possible correlation between the level of PV-ir axon sprouting, numbers of ectopic and normally-located PV-ir neurons and clinical data of the patients. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

In addition to the evaluation of light microscopic sections, quantification of electron microscopic ultrathin sections were performed. Perisomatic innervation of granule cells of the DG was examined in sections from non-epileptic controls, HS and tumor-related TE patients in TEM, and the numbers of symmetric synapses/granule cell soma in the dentate granule cell layer were determined. In a row of 40–50 granule cells all of the somata was examined using 2–3 consecutive sections of the same dentate gyrus. Identified perisomatic synapses were drawn as well as photographed.

Immuno-electron microscopic preparations were used to quantify PV-ir axon terminals in four TLE patients with HS. The distribution of PV-ir axon terminals ($n = 56$) on different target structures was determined in areas of the DG where sprouting was visible. The numbers of PV-ir axon terminals forming synapses with somata, dendrite and dendritic spines were counted. On immune-electron microscopic preparations only PV-ir axon terminals were counted because the preservation of synapses containing immuno-negative axon terminals are not optimal when immune-electron microscopic method is used. The percentage of the axo-somatic, axo-dendritic and axo-spinous synapses formed by PV-ir axon terminals was determined.

Nomenclature

The generally accepted nomenclature was used in this study to properly identify histological subregions of the hippocampal formation. This nomenclature has previously been used by [Amaral and Lavenex \(2007\)](#) and [Insausti and Amaral \(2004\)](#).

RESULTS

PV immunoreactivity in the control dentate gyrus

Our present observation in non-epileptic control DG is in harmony with previous description. The number of PV-ir large basket cells is relatively low in the human DG when compared to experimental animals, such as rats ([Seress et al., 1993](#)). Large PV-ir neurons that belong to the group of axo-somatic GABAergic cells locate in the hilus, in the subgranular zone and inside the granule cell layer of the DG. Although the number of cell bodies is low, PV-ir axon terminals formed extensive network around somata of granule cells. Density of PV-ir axons was stronger in the inner half of the granule cell layer closer to the hilus than in the outer half of the layer ([Figs. 1 and 2A](#)). A few axonal branch may protrude into the outer half of the granule cell layer, but PV-ir axonal branches are rare in the molecular layer of the control DG. Although rarely, cell bodies of PV-ir cells have been shown in the molecular layer, close to the granule cells ([Fig. 1C](#)).

PV immunoreactivity in TLE patients with different etiologies

The pattern of PV-immunoreactivity in the DG of non-epileptic controls was similar to that of TLE patients with MCD, with tumor-induced epilepsy and with negative MRI results ([Fig. 2A, D–F](#)). In the DG of HS patients, we have observed loss of PV immunoreactivity in the DG of TLE patients, which is in harmony with results of previous studies ([Wittner et al., 2001](#); [Arellano et al., 2004](#); [Andrioli et al., 2007](#)). PV-ir cells almost completely disappeared from the subgranular position and from the hilus of the DG ([Fig. 2B](#)). Density of PV-ir axon terminals in HS displayed less homogenous pattern compared to controls ([Fig. 2A](#)). Parts of the granule cell layer did not contain PV-ir axons, while other parts showed strong PV immunoreactivity ([Fig. 2B](#)). Similar pattern of PV-ir axons could be seen in the DG of patients with HS + MCD ([Fig. 2C](#)). In areas where PV-ir axons were present, the difference of PV immunoreactivity between the inner and the outer parts of the granule cell layer seen in the controls could not be observed, and not only the inner part, but the whole width of the granule cell layer contained PV-ir axon terminals ([Fig. 2B, C](#)). Frequently, PV-ir axons ran perpendicularly to the granule cell layer, intruded deep into the molecular layer and occupied inner half of it ([Fig. 3A–D](#)).

Regarding the extent of PV-ir axons' sprouting in the molecular layer of the DG, we have observed that significantly ($p < 0.01$) larger segments of the granule cell layer were covered with sprouted PV-ir axons in TLE patients with HS and in HS + MCD group than in non-epileptic controls ([Fig. 3E](#)). Comparing the level of sprouting in tumor-related TLE group to HS or to HS + MCD groups, significant ($p < 0.01$) difference was observed ([Fig. 3E](#)). The extent of sprouting in HS patients compared to those with dual pathology (HS + MCD) was slightly higher but showed no significant difference. Significantly ($p < 0.01$) higher extent of PV-ir sprouting was observed in HS patients' group than in

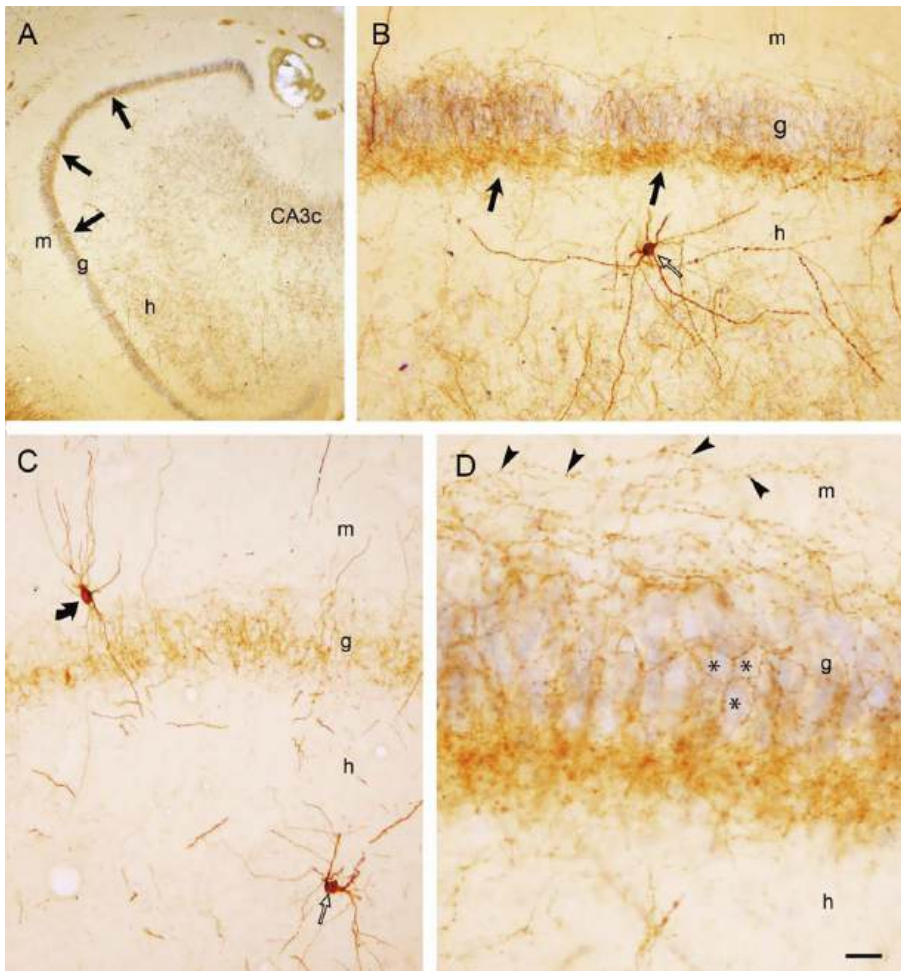


Fig. 1. Light microscopic photomicrographs reveal PV-immunoreactive (ir) cells and axons in the dentate gyrus (DG) of non-epileptic controls. Arrows in (A) and (B) point to the PV-ir axon terminals in subgranular location characteristic to the control DG. Open arrows in (B) and (C) point to PV-ir cells in the hilus. Rarely, PV-ir cells could be detected in molecular layer (curved arrow in (C)) in controls. In (D), asterisks show granule cells surrounded by PV-ir axon terminals. Arrowheads show terminals of axons running parallel with the granule cell layer. Abbreviations: m, molecular layer; g, granule cell layer; h, hilus of the dentate gyrus; CA3c, region of Ammon's horn; DG, dentate gyrus. Scale bar = 250 μ m in A, 50 μ m in (B) and (C), 25 μ m in (D).

MCD and MR- groups (Fig. 3E). Although, the extent of sprouting was larger in HS + MCD than in MCD or MR-patients' groups, the difference did not reach statistical significance (Fig. 3E). In MCD, MR- and tumor-related TLE patients' groups, the extent of PV-ir axon sprouting did not differ significantly from sprouting found in non-epileptic controls (Fig. 3E).

Because of the relatively lower numbers of patients in MCD, MR- and tumor-induced TLE groups, we have analyzed the results of individuals of each group. Out of the 21 patients of the HS group only two had weaker sprouting than the average in the MR- group. Compared to the MCD group, only one HS patient had weaker sprouting than the patients with MCD. No patient was present in MR-, MCD or tumor-induced TLE group that had stronger sprouting than the averages of the extent of sprouting in the HS group. Our data clearly indicate a coincidence between HS and the presence of PV-ir axons in the molecular layer of the DG.

Ectopic PV-immunoreactive cells and sprouting of PV-immunoreactive axons

In HS we have found large loss of normally positioned PV-ir neurons in the subgranular zone and hilus of the DG, and presence of numerous ectopic cells in the molecular layer of DG and along the hippocampal fissure (Fig. 4A–D). These observations are in harmony with results of previous studies of TLE cases (Wittner et al., 2001; Arellano et al., 2004; Andrioli et al., 2007). We analyzed the number of PV-ir cells in normal location (in the granule cell layer and in the hilus of DG) and in ectopic location (in the molecular layer of the DG and along the hippocampal fissure) in our TLE patients' groups.

In MCD, MR- and tumor-related TLE cases, the number of PV-ir cells in the normal hilar and subgranular location did not decrease significantly compared to non-epileptic control cases (Fig. 4E). In HS and HS + MCD groups, large decrease in the normally-positioned PV-ir cells' number could be observed. The difference in normally-located PV-ir cell numbers between controls and HS or HS + MCD patients' groups was statistically significant ($p < 0.05$, Fig. 4E).

Parallel with the decrease in normally-positioned PV-ir cells, the number of ectopic PV-ir neurons increased significantly ($p < 0.05$) in the HS group

compared to that found in non-epileptic control patients (Fig. 4E). The other TLE groups did not reveal significant increase in the number of ectopic PV-ir cells compared to non-epileptic controls. This indicates that the significant decrease in the number of normally-positioned PV-ir cells and the significant increase in numbers of ectopic neurons are characteristics of HS (Fig. 4E). Calculating the ratio of the ectopic/normally-positioned PV-ir cells in TLE patients with different etiologies, we have found that this parameter in HS group is significantly ($p < 0.01$) larger than that of the other etiology groups (Fig. 4F).

Analyzing the results of individuals, we have found that out of 21 HS patients only one has lower ratio of ectopic/normally-positioned PV-ir cells than the average of this data in MCD, MR- or tumor-induced TLE groups. In addition, no patient was present in MR-, MCD or tumor-induced TLE group that had higher ratio of

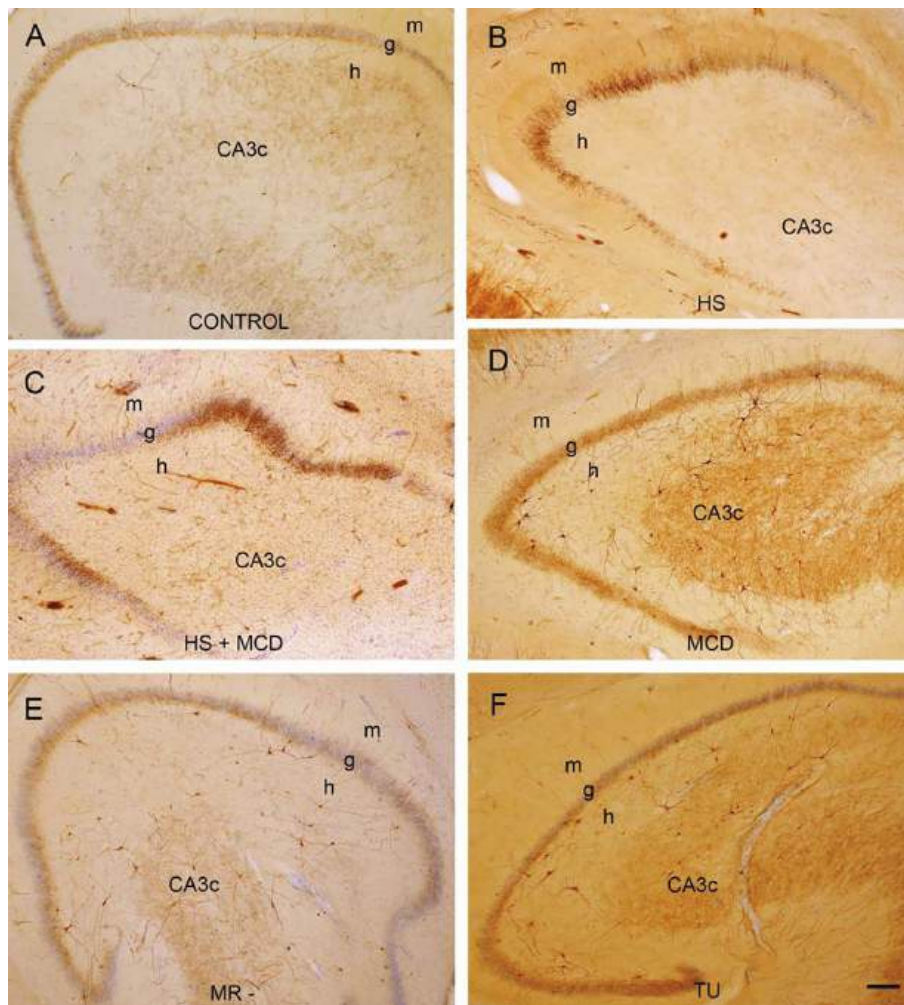


Fig. 2. Photomicrographs of PV-immunostained sections of the DG of TLE patients with different etiology compared to non-epileptic control (A). (B) Granule cell layer (g) reveals patchy appearance of PV immunoreactivity and loss of PV-ir neurons and axons in the hilus and in CA3c in a patients with HS. (C) Patchy appearance of PV-ir axon terminals and loss of PV-ir neurons from the hilus in a section of a patient with HS + MCD. (D) Control-like PV-immunoreactivity in the DG of a patient with MCD-induced TLE. (E) Control-like PV-immunoreactivity in a TLE patient with negative MRI result. (F) Control-like appearance of PV immunoreactivity in the DG of a patient whose TLE was induced by intracranial tumor that did not invade the hippocampal formation. Abbreviations: m, molecular layer; g, granule cell layer; h, hilus of the dentate gyrus; CA3c, region of Ammon's horn; DG, dentate gyrus. Scale bar = 250 μm for (A–F).

ectopic/normally-located PV-ir neurons than the average of the HS group.

Correlation analysis revealed significant association between the extent of PV-ir axon sprouting and the decrease in normally-located hilar and subgranular PV-ir cells in HS group ($p < 0.05$) as well as in the whole cohort's population ($p < 0.01$, Fig. 5A, B). Similarly, significant correlation was found between the ratio of ectopic/normally-located PV-ir cells and the extent of PV-ir axon sprouting in HS patients ($p < 0.01$) and in the whole population of our cohort ($p < 0.01$, Fig. 5C, D). Regarding the association between the number of ectopic PV-ir cells and the extent of PV-ir axon sprouting, a weak non-significant correlation was observed (not shown).

Correlation between PV-immunoreactive cells, axonal sprouting and clinical data of the patients

Correlation between the extent of PV-ir axonal sprouting and duration of epilepsy, frequency of the seizures and the age at onset of TLE has also been analyzed. No significant correlation was found between these parameters when the whole examined population was examined. In the HS group, significant ($p < 0.05$) association was found between duration of the disease and the extent of PV-ir axonal sprouting (Fig. 6A). The longer the time was between the onset of TLE and the operation, the stronger sprouting of PV-ir axons could be observed. Furthermore, significant ($p < 0.05$) negative correlation could be detected in the HS group between duration of the disease and the density of normally-located PV-ir cells (not shown). This indicates the expected time-dependent decrease of PV immunoreactivity in the DG. However, we could not observe significant association between the duration of the disease and the density of ectopic PV-ir neurons.

No meaningful difference was seen when the extent of sprouting was analyzed in male versus female patients of the HS group. Although, slightly stronger sprouting could be observed in females (34.43 ± 12.72) than in males (29.33 ± 11.63), the difference was not significant ($p = 0.51$). Similarly, the ratio of ectopic/normally-located PV-ir cells did not reveal significant ($p = 0.8$) gender-based difference, since the ratio of these cells was 2.84 ± 1.61 in males and 3.21 ± 2.69 in females. Comparing the extent of sprouting in patients with sclerosis in the left and in the right hippocampus, no meaningful difference could be detected. Patients with right HS had slightly stronger sprouting (33.66 ± 13.38) than patients with left HS (29.68 ± 13.01), but the difference was not significant ($p = 0.6$). We analyzed the side of sclerosis and the ratio of ectopic/normally-located PV-ir neurons, no significant difference ($p = 0.4$) was found between left (2.43 ± 1.39) and right (3.55 ± 2.69) hippocampus.

Analyzing sprouting of PV-ir axons and age at epilepsy onset, an interesting trend could be found in patients with HS. Extent of PV-ir axonal sprouting was

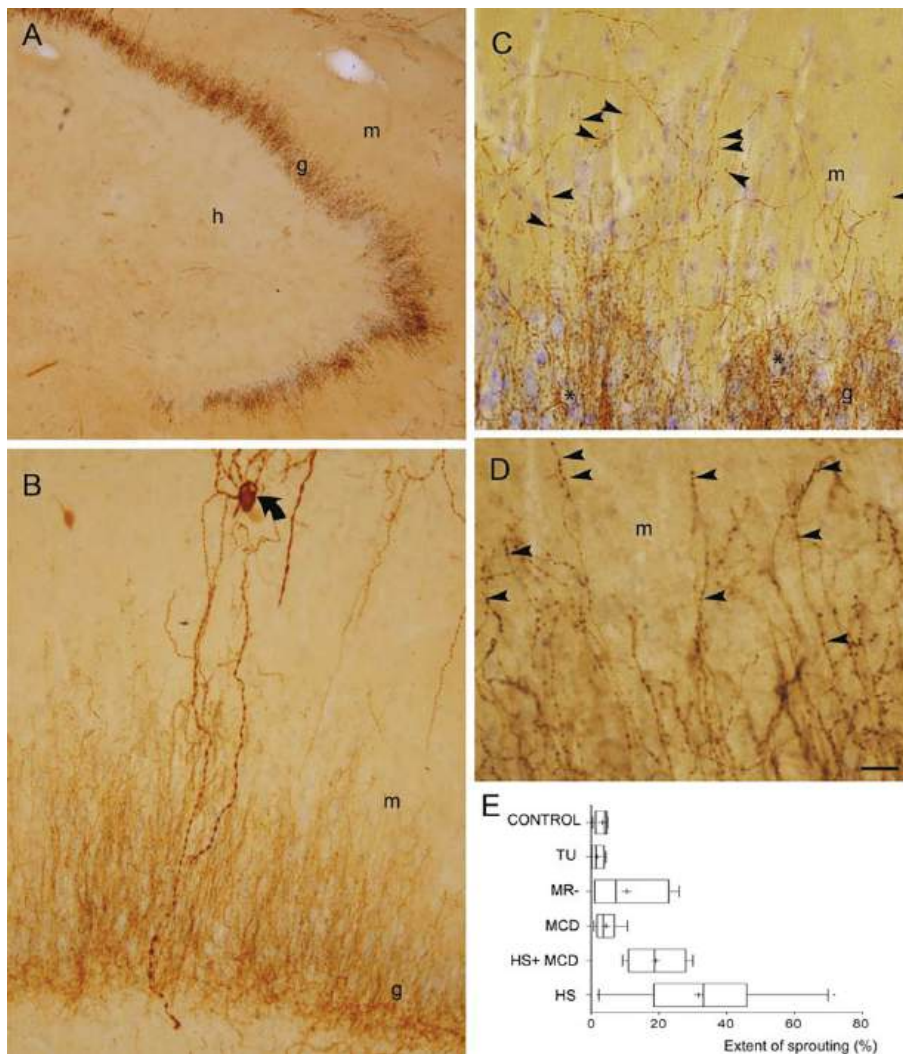


Fig. 3. PV immunoreactivity in the dentate gyrus (DG) in TLE patients. **(A)** Sprouting of PV-immunoreactive axons in the dentate granule cell (g) and molecular (m) layers of the DG. **(B)** Ectopic PV-immunoreactive (ir) neuron (curved arrow) and sprouting of PV-ir axons running perpendicular to the granule cell layer in the molecular layer (m) of the DG. **(C, D)** Large magnification indicates PV-ir axon terminals (arrowheads) in the dentate molecular (m) layer. Asterisks in **(C)** indicate somata of granule cells surrounded by PV-ir axon terminals. **(E)** Extent of sprouting of PV-ir axons in the molecular layer of the DG in TLE patients with different etiology and in non-epileptic controls. Whiskers show the 5th and 95th percentiles. Abbreviations: m, molecular layer; g, granule cell layer; h, hilus of the dentate gyrus; DG, dentate gyrus; HS, hippocampal sclerosis; HS + MCD hippocampal sclerosis combined with malformation of cortical development; MCD, malformation of cortical development; MR-, MR negative; TU, tumor-related epilepsy. Scale bar = 150 μ m in **(A)**, 30 μ m in **(B)**, 20 μ m in **(C)** and 15 μ m in **(D)**.

substantial in patients, whose epilepsy started during childhood (between 4–8 years of age) or in adolescence (13–15 years of age) (Fig. 6B). Moreover, the ratio of ectopic/normally-located PV-ir neurons was considerably higher in those HS patients whose epilepsy started in childhood (4–8 years of age) and in adolescence (13–15 years of age) compared to those patients, whose age at TLE onset differed from these above-mentioned ages. The difference was not statistically significant.

Since childhood period and adolescent age at TLE onset were previously found in the population of patients with febrile seizure (FS) (Janszky et al., 2004), we further analyzed the correlation between the history of FS and

the PV-ir axon sprouting. Patients with FS had larger extent of sprouting than those that had not FS, although the difference was not statistically significant (Fig. 6C). In addition, in TLE patients with childhood FS, the number of ectopic PV-ir cells and the ratio of ectopic/normally-located PV-ir neurons were higher than those that had no FS. The difference was meaningful, but not statistically significant (Fig. 6D). Lack of statistical significance might be explained by the relatively low number of cases both in this and in the previous group.

Synapses in the granule cell layer and in the molecular layer of the DG

Because of the difference in PV-ir axon sprouting found in TLE patients with different etiology, we examined the change of the rate of axo-somatic synapses in three groups of patients: (1) in the HS, (2) in tumor-related epilepsy and (3) in non-epileptic controls. In tumor-related epilepsy, the number of symmetric synapses/soma of granule cells were similar to that found in controls (Table 2). Compared to non-epileptic controls and tumor-related TLE, the number of symmetric axo-somatic synapses/granule cells were decreased in HS (Table 2). Therefore it is highly possible that sprouted PV-ir axons in HS would not be due to the increased perisomatic inhibitory innervation of granule cells.

A previous study has reported strong GAD immunoreactivity in the inner one-third of the molecular layer of DG in TLE. Based on this, axonal sprouting of

interneurons including basket cells and their termination on granule cell dendrites have been suggested (Mathern et al., 1995). Our above-mentioned observations support this notion and indicate a partial change of postsynaptic target of PV-ir sprouted axons. Inside the granule cell layer, immuno-electron microscopy revealed normal symmetric synapses formed by PV-ir axon terminals on the somata of granule cells (Fig. 7A). In addition, PV-ir axon terminals frequently formed symmetric synapses with proximal and small diameter distal dendrites and dendritic spines (Fig. 7B–D). In some cases, PV-ir axon terminal could be seen in close vicinity of neuronal soma, although

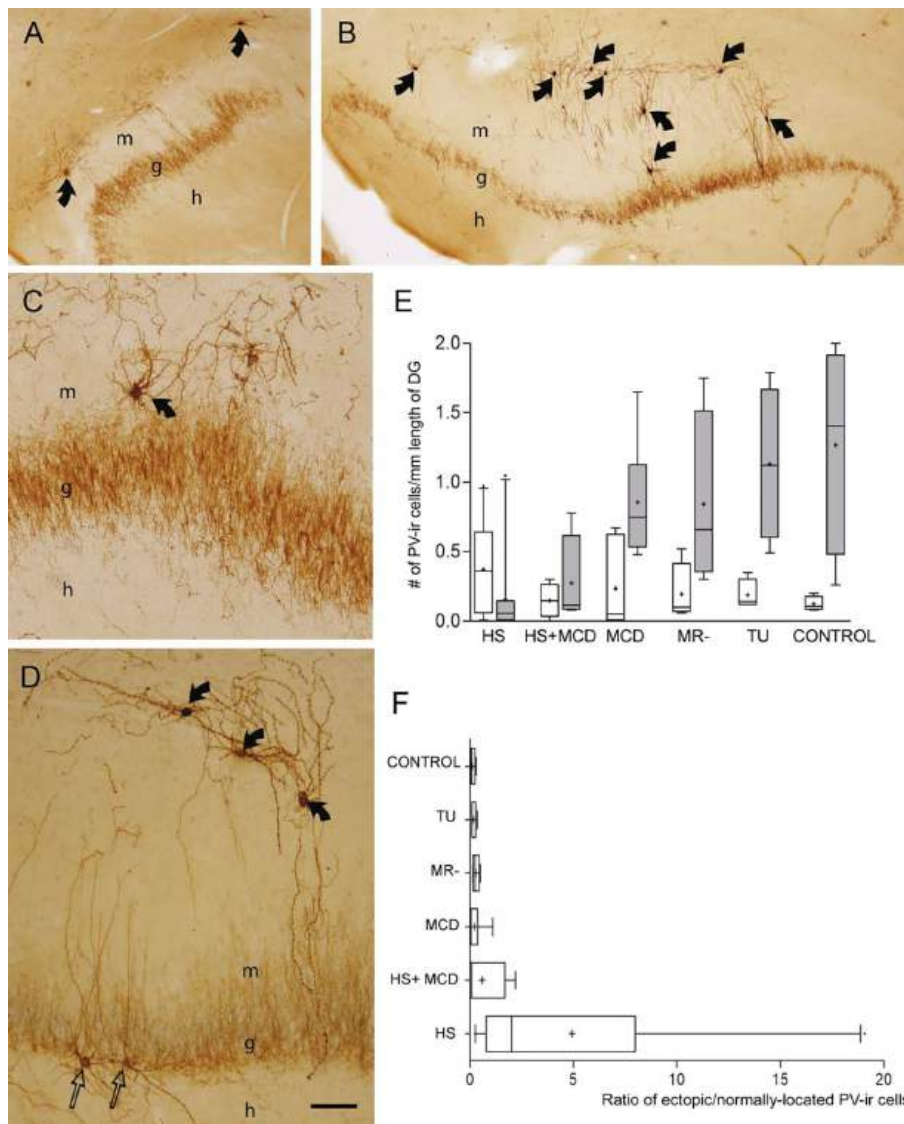


Fig. 4. Photomicrograph showing ectopic PV-immunoreactive neurons in the molecular layer of the dentate gyrus and along the hippocampal fissure. **(A), (B)** Small magnification photomicrographs showing PV-immunoreactive (ir) ectopic neurons (curved arrows) in the molecular layer (m) and along the hippocampal fissure of HS patients. Note the absence of PV-ir neurons in the hilus (h) of the dentate gyrus (DG). **(C)** PV-ir ectopic neuron (curved arrow) in the molecular layer (m) above the granule cell layer covered by sprouted axons in HS patients. **(D)** Ectopic (curved arrows) and normally-located (open arrows) PV-ir neurons in a TLE patient that belong to HS group. **(E)** Diagram reveals density of PV-ir neurons in the normal (gray boxes) and ectopic (white boxes) locations in TLE patients with different etiology and in non-epileptic controls. Whiskers show the 5th and 95th percentiles. **(F)** Diagram reveals ratio of the numbers of ectopic/normally located PV-ir neurons in TLE patients with different etiology and in non-epileptic controls. Whiskers show the 5th and 95th percentiles. Abbreviations: m, molecular layer; g, granule cell layer; h, hilus of the dentate gyrus; DG, dentate gyrus; HS, hippocampal sclerosis; HS + MCD hippocampal sclerosis combined with malformation of cortical development; MCD, malformation of cortical development; MR-, MR negative; TU, tumor-related epilepsy. Scale bar = 200 μ m in **(A)** and **(B)**, 50 μ m in **(C)** and **(D)**.

the synapse was formed by dendrite or dendritic spine next to the granule cell soma (Fig. 7E), but not by the soma.

Study of the distribution of PV-ir axon terminals on different target structures indicated that in those areas of the DG where sprouting of PV-ir axons were visible, the ratio of perisomatic synapses formed by PV-ir axon terminals were significantly lower ($p < 0.01$) than that of

the axo-dendritic synapses. In addition, PV-ir axon terminals formed significantly ($p < 0.01$) more synapses on dendritic spines than on somata of granule cells (Table 3). These results indicate change of the target of PV-ir axon terminals where sprouting of PV-ir axons occurred.

DISCUSSION

The main finding of the present study is that sprouting of axons of PV-ir cells in the dentate molecular layer is associated with HS and with change of PV-ir neurons' number and position in the DG. In addition, we have observed alteration in target structure of PV-ir axon terminals in those areas of the DG where sprouting of PV-ir axons have been found in the DG of TLE patients without HS, our observation has revealed that PV-ir axon sprouting was significantly stronger in HS than in other TLE groups or in non-epileptic controls. In addition, we have found significantly more ectopic PV-ir neurons in the dentate molecular layer and along the hippocampal fissure in HS than in the control group. Regarding the ratio of ectopic/normally-located PV-ir cells, significantly larger ratio was observed in HS than in other TLE groups or in non-epileptic controls. Moreover, we have observed a significant correlation between the degree of PV-ir sprouting and the ratio of ectopic/normally-located PV-ir neurons.

Limitations of the study

Etiology of TLE patients was based on the MR findings prior neurosurgical removal of the hippocampal formation. The largest group of our epileptic patients was characterized with

HS. According to the previously published data, HS is the most frequent form and can be found in 48–75% of all TLE cases (Lehericy et al., 1997; Howe et al., 2010; Blümcke et al., 2002; Blümcke, 2009). Less frequently, TLE is related to MCD (13–45%) while in a subset of TLE cases, HS is combined with MCD (Salanova et al., 2004; Blümcke, 2009; Tassi et al., 2009; Blümcke et al.,

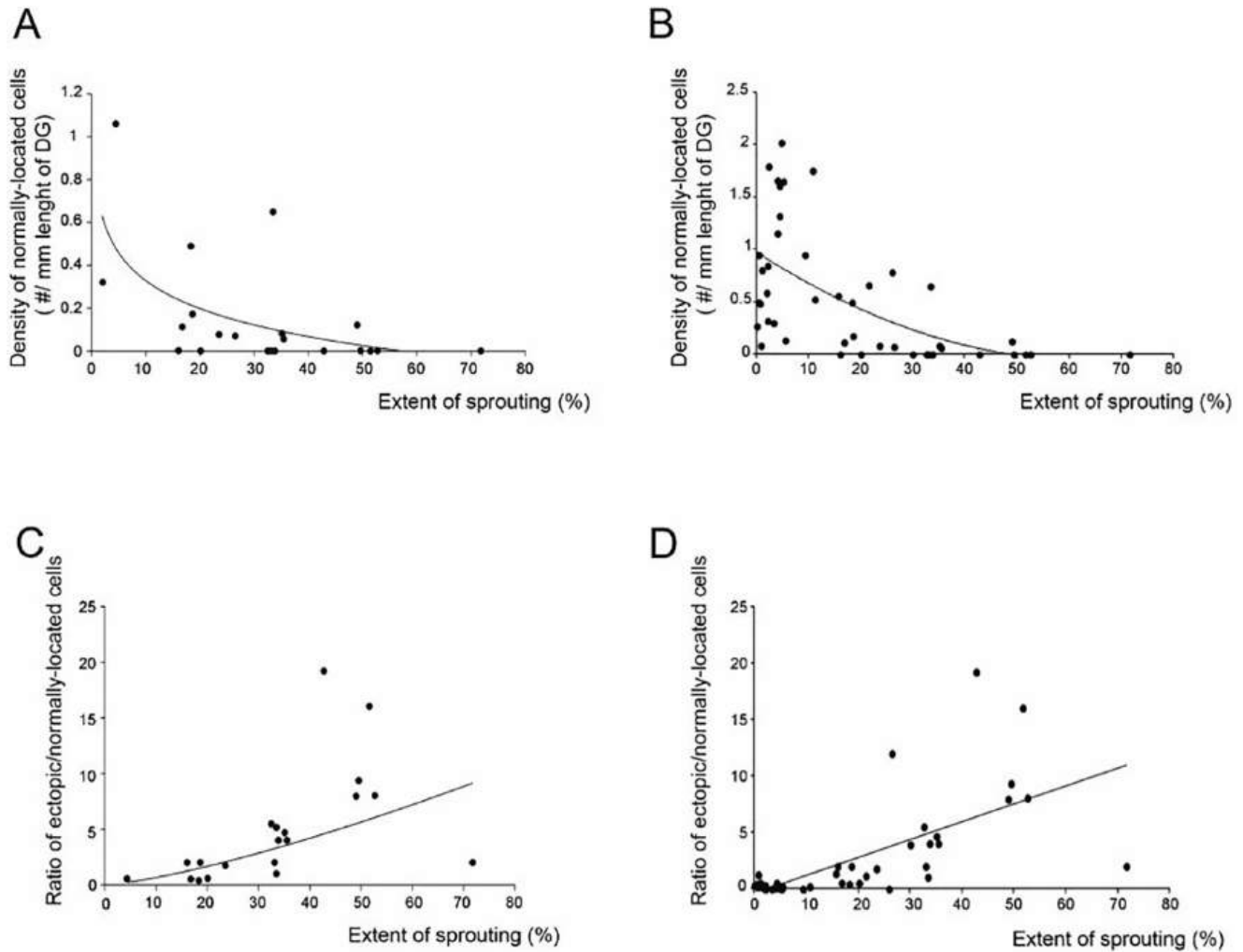


Fig. 5. Diagrams show the association between the extent of PV-ir axon sprouting and the density of normally located PV-ir cells (**A, B**), as well as between the extent of PV-ir axon sprouting and ratio of the numbers of ectopic/normally-located PV-ir cells (**C, D**). (**A**) and (**B**) Diagram reveals significant negative correlation between the numbers of PV-ir neurons in the normal location and the extent of PV-ir axonal sprouting in the group of HS patients (**A**), and in the whole TLE patients population (**B**). (**C, D**) Diagram reveals significant positive correlation between the ratio of the numbers of ectopic and normally-located PV-ir neurons and the extent of PV-ir axonal sprouting in the group of HS patients (**C**), and in the whole TLE patients population (**D**).

2011). In accord with the lower frequency of dual pathology, we had lower numbers of cases in the HS + MCD group. In addition, we had relatively low number of samples of TLE patients without visible MRI finding which, according to the literature, is present in 5–8% of epilepsy cases (Tassi et al., 2009; Blümcke et al., 2017). Because the low numbers of TLE patients in HS + MCD, MCD and MR- groups our study has certain limitation. However, we have to emphasize that the difference observed in the sample size of the examined patients' groups with various etiology reflects the difference in the prevalence of these definite MR findings in TLE.

Although intracranial tumor is the second most frequent cause of TLE (Blümcke, 2009; Tassi et al., 2009), we had relatively low number of samples of tumor-induced epilepsy cases. We have to highlight that tissue of only those TLE patients were used whose hippocampal formations have not been invaded by tumor cells. The rarity of this constellation can explain the low

number of tumor-induced TLE cases. Similarly, low number of samples was in our control group that was formed by patients with intracranial tumor and without history of epilepsy. The inclusion criteria of non-epileptic control group comprised that the hippocampi of patients were not invaded by tumor cells, while we have to underline that removal of the hippocampal formation occurred strictly due to therapeutic reason (in order to complete and radical resection of the tumor).

Thus, according to the prevalence of different TLE groups, we had significantly more cases with HS compared to the other TLE groups. However, the results on the extent of PV-ir axonal sprouting and the ratio of ectopic/normally-located PV-ir cells of the individual patients indicate that stronger sprouting of PV-ir axons and higher ratio of ectopic/normally-located neurons in the HS group are not due to the higher number of patients with sclerotic hippocampus. Instead, it reflects distinctive characteristics of HS. Although, the number

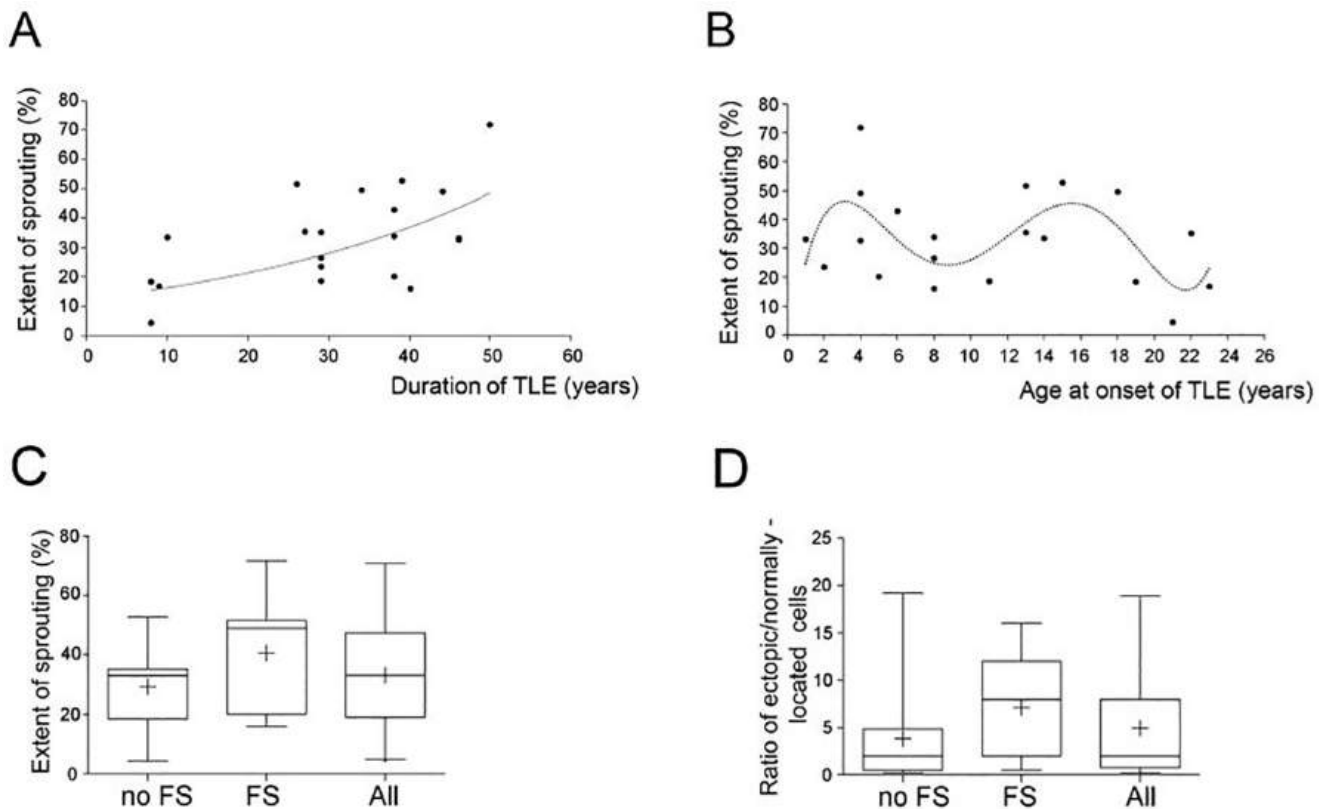


Fig. 6. Association between histological and clinical data of HS patients. **(A)** Diagram reveals correlation ($p < 0.05$) between the extent of PV-ir axonal sprouting and the duration of TLE. **(B)** Diagram reveals trend that can be observed when extent of PV-ir axonal sprouting and the age at onset of epilepsy were correlated. **(C, D)** Extent of PV-ir axonal sprouting **(C)** and ratio of the numbers of ectopic/normally-located PV-ir cells in the dentate gyrus **(D)** were higher in those patients who suffered childhood febrile seizure (FS) when compared to those patient who had not (no FS), although the difference was not statistically significant.

Table 2. Number of symmetric synapses/somata of granule cells of the dentate gyrus of TLE patients and non-epileptic controls

	Non-epileptic control	HS	Tumor-induced TLE
Number of granule cells' somata counted	168	150	154
Number of symmetric synapses/soma	0.406 ± 0.05	0.33 ± 0.07	0.409 ± 0.04

of examined sections per patient varied between 3 and 9, due to the shrinkage of the hippocampal formation, lower number of sections were generally associated with HS. In contrast, relatively higher number of sections was available in MDC and MR- cases, which indicates that weaker axonal sprouting and lower ratio of ectopic/normally-located PV-ir cells in these groups were not due to the number of sections. Therefore, despite the difference in the patients' number of the different TLE groups, we suggest that PV-ir axonal sprouting and the presence of ectopic PV-ir neurons in the dentate molecular layer are characteristics of HS.

Because of the limited availability of hippocampal tissue of non-epileptic controls, in many studies hippocampi of individuals died in accidents have been

used (Wittner et al., 2001; Arellano et al., 2004; Andrioli et al., 2007). While those hippocampi can be regarded as intact samples of healthy individuals, autopsy is inevitably accompanied by several hour-long postmortem delay. According to our earlier experience, delayed fixation reduces the intensity of PV immunoreactivity (Abraham et al., 2007). Therefore we used surgically removed control tissue of non-epileptic patients with brain tumors, which, similarly to the TLE samples were fixed immediately after the resection. This protocol allowed the appropriate preservation of immunoreactivity of PV and the comparability of the histological results of patients' groups with different etiology. Tissue of tumor-induced TLE patients has been used as controls in a few studies (Blümcke et al., 1999, Blümcke et al., 2000, Selke et al., 2006). Results of our present study on the extent of PV-ir axonal sprouting and on the numbers of ectopic and normally-located PV-ir neurons showed no remarkable difference between the group of non-epileptic tumor patients and the tumor-induced TLE group. This would indicate that both groups could have been used as controls. However, our previous study on the calbindin immunoreactivity of granule cells has revealed that the hippocampal formation in tumor-related epilepsies cannot be considered as control tissue and we have suggested that it should be regarded as a

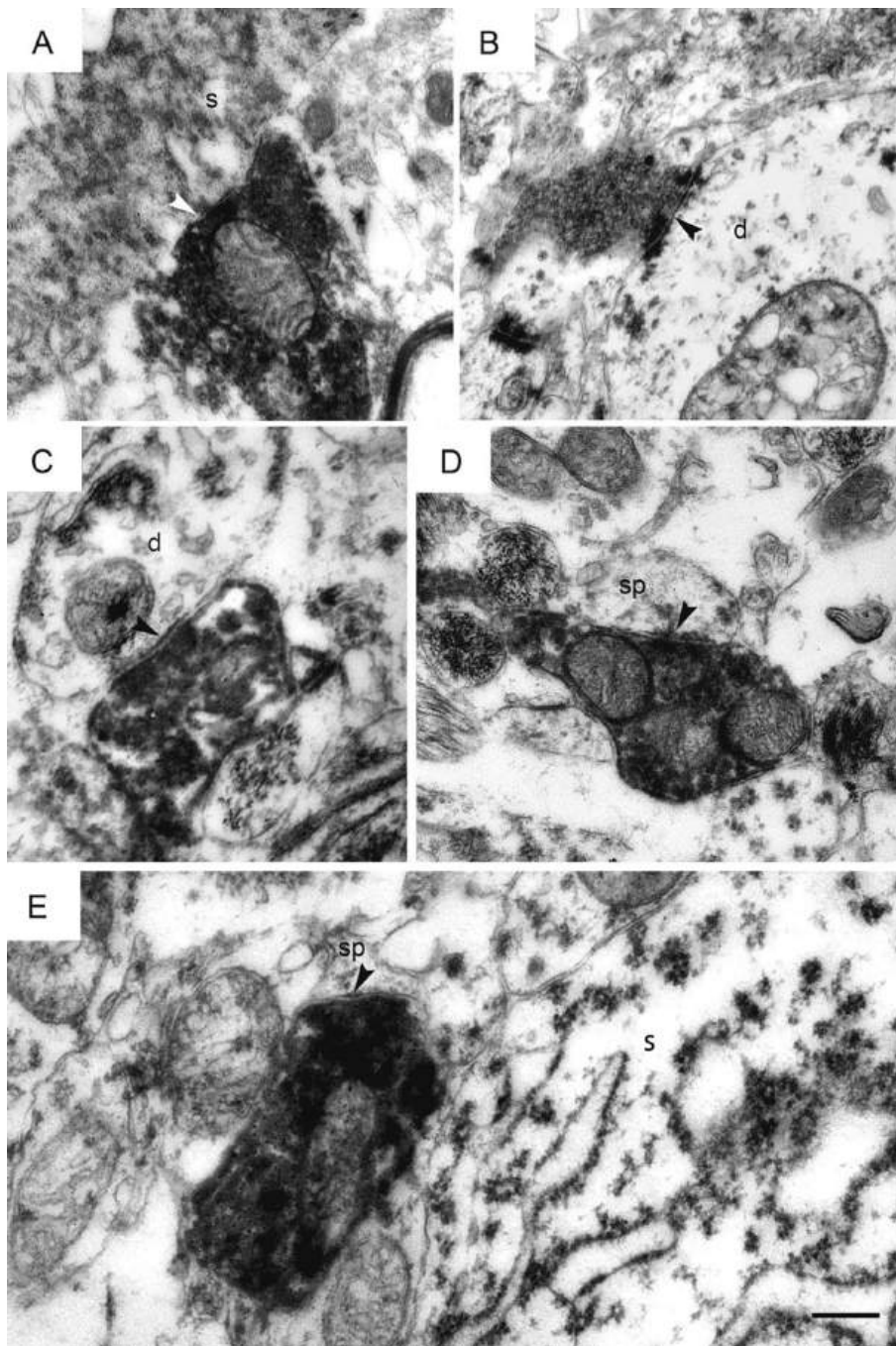


Fig. 7. Photomicrograph showing PV-immunoreactive (ir) axon terminals in the granule cell and in the molecular layers of the dentate gyrus in HS patients. White arrowhead points to synapse of PV-ir axon terminals with soma (s) in the granule cell layer (A). In the molecular layer of the dentate gyrus PV-ir axon terminals form synapses (arrowheads) with large diameter proximal dendrite (d in B), small diameter distal dendrite (d in C), as well as with dendritic spine (sp in D). (E) Axon terminal next to a granule cell soma (s) forming synaptic contact (arrowhead) with a dendritic spine (sp). Abbreviations: s, soma; d, dendrite; sp dendritic spine. Scale bar = 200 nm in (A), (C), (E) 300 nm in (D) and 400 nm in (B).

distinct feature of epilepsy-related pathology (Ábrahám et al., 2011).

The long period of time between the diagnosis of TLE and the surgery coincides with long pharmacological treatment of the patients. Therefore, one may suppose that anti-epileptic drugs (AEDs) could influence PV-ir

axonal sprouting and the incidence of the ectopic neurons. Lacosamide has been shown to inhibit mossy fiber sprouting in kainic-acid model of TLE (Wang et al., 2018), while another widely used AED, gabapentin blocked synaptogenesis and the formation of aberrant excitatory circuitry following neocortical trauma (Takahashi et al., 2018). Although phenobarbital, valproate, topiramate and lamotrigine have been shown to reduce the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA in the rat, no effect was detected on sprouting of mossy fibers (Shi et al., 2010). In a pilocarpine-model of TLE, prompt administration of carbamazepin reduced loss of PV immunoreactivity (Chakir et al., 2006), while early administration of vigabatrin caused increased numbers of PV-ir cells during hippocampal development (Levav-Rabkin et al., 2010). Based on the above mentioned data we can propose that longer duration of TLE and, consequently, longer use of AEDs would cause preservation of PV-ir neurons and decrease axonal sprouting of granule cells. This contradicts our findings, namely, the positive significant correlation between duration of TLE and the decrease of normally-located PV-ir cell number and the extent of axonal sprouting. However, we cannot exclude the possibility that the long-lasting administration of certain antiepileptic drugs would trigger PV-ir axonal sprouting.

We have to consider that during the long period of time (e.g. decades) between the diagnosis of TLE and the operation, patients took several different anti-epileptic drugs. Although, pharmaco-resistance is obvious when the second anticonvulsant drug trial results in failure to achieve seizure control, in many patients' history more than two anti-epileptic trials were recorded.

Especially in the HS group, patients have long lists of anticonvulsant drugs which occasionally contain eight or ten different antiepileptics as their previous medication. Due to the large number and the variability of antiepileptic drugs with different mechanism of action,

Table 3. Distribution of PV-ir axon terminals on different target structures in areas of the dentate gyrus of HS patients where sprouting was visible

Postsynaptic structure	Soma	Dendrite	Spine
Percentage of PV-ir synapses	15.9 ± 5.56	46.3 ± 4.26	41.2 ± 1.1

the influence of them on the sprouting of PV-ir axons could not be explored.

Sprouting of parvalbumin-immunoreactive axons, presence of ectopic parvalbumin-immunoreactive neurons and the clinical data of the patients

Morphological changes of local circuit neurons, including PV-ir basket and axo-axonic cells have been studied in several animal models of epilepsy (Best et al., 1993; Suzukawa et al., 1999; André et al., 2001; Sun et al., 2007; Huusko et al., 2015; Botterill et al., 2017; Cameron et al., 2019). In those works, meaningful loss of PV-containing neurons has been described, but neither sprouting of PV-ir axons, nor ectopic PV-ir cells have been reported. Loss of PV-ir basket and axo-axonic cells have been detected in human TLE associated with HS (Sloviter et al., 1991; Wittner et al., 2001; Arellano et al., 2004; Andrioli et al., 2007). In addition, sprouting of axons terminating on the axon-initial segments of granule cells and the presence of ectopic PV-ir neurons in the dentate molecular layer and along the hippocampal fissure have been observed in epileptic human samples (Wittner et al., 2001). Despite the similarity in pathological changes observed in human TLE and animal models (for review see Dudek et al., 2002; Seress et al., 2009; Sperk et al., 2009; Tang and Loke, 2010; Sloviter and Bumanglag, 2013; Buckmaster, 2014), the presence of ectopic PV-ir neurons and sprouted PV-ir axons in the molecular layer has never been described in epileptic animals. A possible explanation can be that epilepsy in humans lasts several years compared to the relatively short duration of epileptic activity in experimental animals. The long duration of epilepsy in patients may induce cellular changes different from that observed in animal models. The moderate association between the duration of epilepsy and the sprouting of PV-ir axons supports this argument. PV-ir sprouting frequently occurred in those HS patients whose TLE started in childhood (age 4–8 years) and in adolescence (13–15 years). A previous study (Janszky et al., 2004) has shown that a substantial population of TLE patients with HS and with history of childhood FS had the onset of epilepsy during childhood (with an average of 5.4 years of age) or during adolescence (with an average of 15.3 years of age). The coincidence of the age groups mentioned in the paper of Janszky et al. (2004) and in our recent work indicates the role of FS in sprouting of PV-ir axons. Indeed, we have found that patients with history of FS had stronger sprouting than those patients who had no FS. Similarly, the ratio of ectopic/normally-located PV-ir cells was higher among patients with FS comparing to those without FS, although, the difference was not statistically significant.

Association between FS and dispersion of granule cells in the molecular layer of the GD in TLE has been previously reported (Houser, 1990; Houser et al., 1992). In addition, one may suppose that sprouted PV-ir axons terminate on dispersed granule cells. Our electron microscopic observations contradict this suggestion. First, we have found a non-significant decrease in the number of symmetric axo-somatic synapses on granule cells in HS compared to tumor-induced TLE and to non-epileptic controls. This is against the suggestion that robust sprouting of PV-ir axons is due a stronger axo-somatic innervation of either normal or dispersed granule cells. In addition, PV-ir axon terminals in the dentate molecular layer were rarely seen on somata of dispersed granule cells, and were frequently observed on distal dendrites and dendritic spines. These observations indicate partial change of synaptic target of PV-ir basket cells.

Origin of ectopic parvalbumin-immunoreactive cells and axons

In harmony with previous studies (Sloviter et al., 1991; Arellano et al., 2004; Andrioli et al., 2007; Wittner et al., 2001), we observed reduction in numbers of PV-ir hilar neurons and large numbers of ectopic cells in the dentate molecular layer of patients with HS. In addition, the ratio of ectopic/normally-located PV-ir cells correlated with the sprouting of axon terminals in the HS patients group as well as in the whole cohort's population. These changes has to be considered when origin of the PV-ir axons in the molecular layer is discussed. We suggest that ectopic PV-ir cells are, at least partly, the source of axonal sprouting in the dentate molecular layer. However, one may argue that loss of PV-ir neurons and the lack of PV immunostaining in cell bodies are virtual. According to this argument, somata of normally-positioned basket cells in TLE patients may undergo down regulation of PV expression while PV immunoreactivity remains intact in their axons (Wittner et al. 2001). In such case, PV-negative basket cells can supposedly serve as origin of sprouted PV-ir axons. Our observations contradict the suggestion that epileptic activity would have caused down-regulation of PV expression. We suppose that if the decrease in PV-immunoreactivity in hilar basket cells would have occurred due to epileptic activity, strong decrease in PV-immunoreactivity would be observed in all TLE groups, not only in HS and HS + MCD groups. However, in other groups of TLE patients with similar clinical parameters including frequency of seizures, PV-ir cell numbers did not differ significantly from that of non-epileptic controls. Therefore, we propose that the source of PV-ir axons visible in the molecular layer of the DG cannot be the PV-negative hilar or subgranular basket cells. Instead, we suggest that the source of sprouted PV-ir axons may be, at least partly, the ectopic PV-ir cells. Regarding the origin of sprouted PV-ir axons, the question can be raised whether the origin of PV-ir axons is commissural or associational. In an animal model of epilepsy, Christenson Wick et al. (2017) revealed sprouting of commissural projecting PV-expressing interneurons six months following kainate injection. While in non-human primate brain commissural connections of the hippocam-

pal formation originate in the presubiculum (Amaral et al., 1984) or in the parahippocampal gyrus (Demeter et al., 1985), a very weak connection could be demonstrated solely at the uncus portion of the hippocampus proper and the DG (Amaral et al., 1984). It is highly probable that the commissural connection between hippocampus proper and DG is even weaker in humans (Amaral and Lavenex, 2007). This indicates that sprouting of PV-ir axons observed in our study may not originate at the DG of other hemisphere. This highlights the role of ectopic PV-ir neurons in the formation of abnormal circuitry in HS.

In rodents, PV-ir cells originate prenatally at the medial ganglionic eminence and migrate tangentially in the marginal zone (future molecular layer) of the cortex including the hippocampal formation (Xu et al., 2004; Butt et al., 2005; Tricoire et al., 2011; Taniguchi et al., 2013). Since the majority of granule cells are generated postnatally (Altman and Das, 1965; Altman, 1966; Bayer and Altman, 1974) basket cells can occupy their final position in the hilus before granule cell layer is formed. In human, formation of the granule cell layer occurs mostly prenatally (Seress, 2001; Seress et al., 2001; Seress and Ábrahám, 2008). Therefore, it is difficult to predict the possible mechanism that may be impaired during the development of the human hippocampal formation that results in large numbers of ectopic PV-ir basket cells in the DG of HS patients.

Possible functional consequences

The changes in the target structure of PV-ir axon terminals in HS may result in changes of the excitation of granule cells. The presence of PV-ir axon terminals on dendrites and dendritic spines of granule cells indicates that postsynaptic structures normally covered by excitatory synaptic terminals are partly occupied by boutons of inhibitory neurons. This would result in a decreased excitability of granule cells. However, we have to consider that numbers of dendritic spines can be changed in TLE. In animal model of TLE, moderate increase in spine density has been found on portion of granule cell dendrites that has been innervated by sprouted mossy fibers (Suzuki et al., 1997). Regarding the numbers of dendritic spines on granule cells, results are contradictory in human TLE. While Scheibel et al. (1974) observed loss of spines, another study has revealed increase of spine density of granule cells contacted recurrent mossy fiber collaterals (Isokawa, 1997). In addition, dispersed granule cells exhibit different dendritic tree and variable spine density compared to neurons present in the granule cell layer (Freiman et al., 2011). The above-mentioned results indicate that data are diverse and not yet sufficient to evaluation of physiological role of PV-ir axonal sprouting on granule cell excitability.

According to the dormant basket cell hypothesis, axosomatic interneurons including PV-ir hilar cells are silent and receive less excitatory input due to the vulnerability of mossy cells in the hilus (Sloviter, 1991). While this hypothesis have been supported in animal models (Bekenstein and Lothman, 1993; Sloviter, 1994; Sloviter et al., 2003), human study indicates that mossy cells

are not more vulnerable than other neurons of the epileptic hippocampal formation (Seress et al., 2009). Regarding the axo-somatic innervation of granule cells in human TLE, no difference has been observed in the coverage of granule cell somata by inhibitory terminals (Wittner et al., 2001). This indicates that loss of PV immunoreactivity found earlier and confirmed by our present study is only virtual and does not signify neuronal loss. While the strength of inhibitory synaptic transmission on the granule cell somata in TLE is not known, the fact that granule cells also innervate hilar interneurons (Acsády et al., 1998) indicates that over-excitation of granule cells in epilepsy may exert excitation of interneurons including PV-ir cells.

Presuming that the source of sprouted PV-ir axons are, at least partly, the ectopic PV-ir cells in the molecular layer of the DG, we have to consider alteration of afferents to these ectopic cells. Since these cells are in the target zone of the entorhinal cortex, excitation of ectopic PV-ir cells occurs concurrently with that of granule cells by the performant pathway. This indicates that inhibition provided by ectopic PV-ir cells may arrive earlier onto granule cell dendrites and spines than membrane hyperpolarization provided by synaptic transmission of normally-located interneurons would occur on the somata and axon-initial segments of granule cells. If we suppose that physiological characteristics of normally-located and ectopic PV-ir cells are similar, activity of ectopic PV-ir cells may strengthen inhibition on granule cells provided by normally-located basket and axo-axonic cells. While further studies are needed to support or reject this supposition, our data clearly indicate anatomical difference of internal circuitry of the DG in TLE with different etiologies.

Axonal sprouting and change in target structure in TLE is not an exclusive feature of PV-ir basket cells. In animal models of epilepsy, reorganization of somatostatin-ir axons in Ammon's horn and in the DG, as well as establishment of aberrant synaptic connections presumptively with dendrites and dendritic spines of dentate granule cells have also been reported (Peng et al., 2013; Houser, 2014; Zhang et al., 2009; Long et al., 2011; Botterill et al., 2017), but the exact identification of synaptic sites has not been shown.

Our present data demonstrate axonal reorganization of PV-ir neurons beyond their normal territory in the molecular layer of the DG and change in their target selectivity. These changes may contribute to the formation of aberrant neuronal circuitries of the DG that could support the epileptic condition.

ACKNOWLEDGEMENT

The excellent technical assistance of Mrs. Emese Papp, Mrs. Tünde Faragó, Mrs. Judith Lórándné Mísey and Mrs. Gáborné Domján in immunohistochemistry and electron microscopy is gratefully acknowledged. This work was supported by the Hungarian Brain Research Program NAP 2.0 (2017-1.2.1-NKP-2017-00002), by the Higher Education Institutional Excellence Programme of

the Ministry for Innovation and Technology in Hungary, within the framework of the 5. thematic programme of the University of Pécs, by the 20765-3/2018/FEKUTSTRAT. JEOL JEM-1400Flash TEM electron microscope funded by the GINOP-2.3.3-15-2016-0002 (New generation electron microscope: 3D ultrastructure).

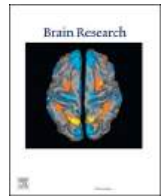
REFERENCES

- Ábrahám H, Tóth Z, Seress L (2004) A novel population of calretinin-positive neurons comprises reelin-positive Cajal-Retzius cells in the hippocampal formation of the adult domestic pig. *Hippocampus* 14:385–401.
- Ábrahám H, Veszprémi B, Gömöri E, Kovács K, Kravják A, Seress L (2007) Unaltered development of the archi- and neocortex in prematurely born infants: genetic control dominates in proliferation, differentiation and maturation of cortical neurons. *Prog Brain Res* 164:3–22.
- Ábrahám H, Richter Z, Gyimesi C, Horváth Z, Janszky J, Dóczi T, Seress L (2011) Degree and pattern of calbindin immunoreactivity in granule cells of the dentate gyrus differ in mesial temporal sclerosis, cortical malformation- and tumor-related epilepsies. *Brain Res* 1399:66–78.
- Acsády L, Kamondi A, Sik A, Freund T, Buzsáki G (1998) GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci* 18:3386–3403.
- Altman J (1966) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol* 128:431–474.
- Altman J, Das DG (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319–335.
- Amaral DG, Insausti R, Cowan WM (1984) The commissural connections of the monkey hippocampal formation. *J Comp Neurol* 224:307–336.
- Amaral DG, Lavenex P (2007) Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. *The Hippocampus Book*. Oxford: Oxford University Press. p. 37–114.
- André V, Marescaux C, Nehlig A, Fritschy JM (2001) Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 11:452–468.
- Andrioli A, Alonso-Nanclares L, Arellano JI, DeFelipe J (2007) Quantitative analysis of parvalbumin-immunoreactive cells in the human epileptic hippocampus. *Neuroscience* 149:131–143.
- Arellano JI, Muñoz A, Ballesteros-Yáñez I, Sola RG, DeFelipe J (2004) Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain* 127:45–64.
- Bayer SA, Altman J (1974) Hippocampal development in the rat: cytogenesis and morphogenesis examined with autoradiography and low-level X-irradiation. *J Comp Neurol* 58:55–79.
- Bekstein JW, Lothman EW (1993) Dormancy of inhibitory interneurons in a model of temporal lobe epilepsy. *Science* 259:97–100.
- Best N, Mitchell J, Baimbridge KG, Wheal HV (1993) Changes in parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat hippocampus following a kainic acid lesion. *Neurosci Lett* 155:1–6.
- Blümcke I (2009) Neuropathology of focal epilepsies: a critical review. *Epilepsy Behav* 15:34–39.
- Blümcke I, Zschratler W, Schewe JC, Suter B, Lie AA, Riederer BM, Meyer B, Schramm J, et al. (1999) Cellular pathology of hilar neurons in Ammon's horn sclerosis. *J Comp Neurol* 414:437–453.
- Blümcke I, Suter B, Behle K, Kuhn R, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD (2000) Loss of hilar mossy cells in Ammon's horn sclerosis. *Epilepsia Suppl* 6:174–180.
- Blümcke I, Thom M, Wiestler OD (2002) Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol* 12:199–211.
- Blümcke I, Kistner I, Clusmann H, Schramm J, Becker AJ, Elger CE, Bien CG, Merschhemke M, et al. (2009) Towards a clinicopathological classification of granule cell dispersion in human mesial temporal lobe epilepsies. *Acta Neuropathol* 117:535–544.
- Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Vinters HV, Palmini A, Jacques TS, Avanzini G, Barkovich AJ, Battaglia G, Becker A, Cepeda C, Cendes F, Colombo N, Crino P, Cross JH, Delalande O, Dubeau F, Duncan J, Guerrini R, Kahane P, Mathern G, Najm I, Ozkara C, Raybaud C, Represa A, Roper SN, Salamon N, Schulze-Bonhage A, Tassi L, Vezzani A, Spreafico R (2011) The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia* 52:158–174.
- Blumcke I, Spreafico R, Haaker G, Coras R, Kobow K, Bien CG, Pfäfflin M, Elger C, Widman G, Schramm J, Becker A, Braun KP, Leijten F, Baayen JC, Aronica E, Chassoux F, Hamer H, Stefan H, Rössler K, Thom M, Walker MC, Sisodiya SM, Duncan JS, McEvoy AW, Pieper T, Holthausen H, Kudernatsch M, Meencke HJ, Kahane P, Schulze-Bonhage A, Zentner J, Heiland DH, Urbach H, Steinhoff BJ, Bast T, Tassi L, Lo Russo G, Özkara C, Oz B, Krsek P, Vogelgesang S, Runge U, Lerche H, Weber Y, Honavar M, Pimentel J, Arzimanoglou A, Ulate-Campos A, Noachtar S, Hartl E, Schijns O, Guerrini R, Barba C, Jacques TS, Cross JH, Feucht M, Mühlebner A, Grunwald T, Trinka E, Winkler PA, Gil-Nagel A, Toledano Delgado R, Mayer T, Lutz M, Zountsas B, Garganis K, Rosenow F, Hermsen A, von Oertzen TJ, Diepgen TL, Avanzini G, EEBB Consortium (2017) Histopathological findings in brain tissue obtained during epilepsy surgery. *N Engl J Med* 377:1648–1656.
- Borhegyi Z, Leranth D (1997) Distinct substance P- and calretinin-containing projections from the supramammillary area to the hippocampus in rats, a species difference between rats and monkeys. *Exp Brain Res* 115:369–374.
- Botterill JJ, Nogovitsyn N, Caruncho HJ, Kalynchuk LE (2017) Selective plasticity of hippocampal GABAergic interneuron populations following kindling of different brain regions. *J Comp Neurol* 525:389–406.
- Braak E, Strotkamp B, Braak H (1991) Parvalbumin-immunoreactive structures in the hippocampus of the human adult. *Cell Tissue Res* 264:33–48.
- Buckmaster PS (2014) Does mossy fiber sprouting give rise to the epileptic state? *Adv Exp Med Biol* 813:161–168.
- Butt SJ, Fuccillo M, Nery S, Noctor S, Kriegstein A, Corbin JG, Fishell G (2005) The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* 48:591–604.
- Cameron S, Lopez A, Glabman R, Abrams E, Johnson S, Field C, Gulland FMD, Buckmaster PS (2019) Proportional loss of parvalbumin-immunoreactive synaptic boutons and granule cells from the hippocampus of sea lions with temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 527:2341–2355.
- Cavazos JE, Golarai G, Sutula TP (1991) Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *J Neurosci* 11:2795–2803.
- Chakir A, Fabene PF, Ouazzani R, Bentivoglio M (2006) Drug resistance and hippocampal damage after delayed treatment of pilocarpine-induced epilepsy in the rat. *Brain Res Bull* 71:127–138.
- Christenson Wick Z, Leintz CH, Xamonthiene C, Huang BH, Krook-Magnuson E (2017) Axonal sprouting in commissurally projecting parvalbumin-expressing interneurons. *J Neurosci Res* 95:2336–2344.
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1986) A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 246:435–458.
- de Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD (1989) Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 495:387–395.

- de Lanerolle NC, Kim JH, Williamson A, Spencer SS, Zaveri HP, Eid T, Spencer DD (2003) A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories. *Epilepsia* 44:677–687.
- Demeter S, Rosene DL, Van Hoesen GW (1985) Interhemispheric pathways of the hippocampal formation, presubiculum, and entorhinal and posterior parahippocampal cortices in the rhesus monkey: the structure and organization of the hippocampal commissures. *J Comp Neurol* 233:30–47.
- Dudek FE, Hellier JL, Williams PA, Ferraro DJ, Staley KJ (2002) The course of cellular alterations associated with the development of spontaneous seizures after status epilepticus. *Prog Brain Res* 135:53–65.
- Franck JE, Pokornny J, Kunkel DD, Schwartzkorin PA (1995) Physiologic and morphologic characteristics of granule cell circuitry in human epileptic hippocampus. *Epilepsia* 36:543–558.
- Freiman TM, Eismann-Schweimler J, Frotscher M (2011) Granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy is associated with changes in dendritic orientation and spine distribution. *Exp Neurol* 229:332–338.
- Frotscher M (1989) Mossy fiber synapses on glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons: evidence for feed-forward inhibition in the CA3 region of the hippocampus. *Exp Brain Res* 75:441–445.
- Frotscher M (1985) Mossy fibers form synapses with identified pyramidal basket cells in the CA3 region of the guinea-pig hippocampus: a combined Golgi-electron microscope study. *J Neurocytol* 14:245–259.
- Greenwood RS, Godar SE, Reaves Jr TA, Hayward JN (1981) Cholecystokinin in hippocampal pathways. *J Comp Neurol* 203:335–350.
- Houser CR (1990) Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 535:195–204.
- Houser CR (2014) Do structural changes in GABA neurons give rise to the epileptic state? *Adv Exp Med Biol* 813:151–160.
- Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, Walsh GO, Rich JR, Delgado-Escueta AV (1990) Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J Neurosci* 10:267–282.
- Houser CR, Swartz BE, Walsh GO, Delgado-Escueta AV (1992) Granule cell disorganization in the dentate gyrus: possible alterations of neuronal migration in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Suppl* 9:41–48.
- Howe KL, Dimitri D, Heyn C, Kiehl TR, Mikulis D, Valiante T (2010) Histologically confirmed hippocampal structural features revealed by 3T MR imaging: potential to increase diagnostic specificity of mesial temporal sclerosis. *Am J Neuroradiol* 31:1682–1689.
- Huusko N, Römer C, Ndode-Ekane XE, Lukasiuk K, Pitkänen A (2015) Loss of hippocampal interneurons and epileptogenesis: a comparison of two animal models of acquired epilepsy. *Brain Struct Funct* 220:153–191.
- Insausti R, Amaral DG (2004) Hippocampal formation. In: Paxinos G, Mai JK, editors. *The Human Nervous System*. San Diego: Elsevier Academic Press. p. 872–914.
- Isokawa M (1997) Preservation of dendrites with the presence of reorganized mossy fiber collaterals in hippocampal dentate granule cells in patients with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 744:339–343.
- Janszky J, Janszky I, Ebner A (2004) Age at onset in mesial temporal lobe epilepsy with a history of febrile seizures. *Neurology* 63:1296–1298.
- Kosaka T, Katsumaru H, Hama K, Wu JY, Heizmann CW (1987) GABAergic neurons containing the Ca²⁺-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res* 419:119–130.
- Lehericy S, Semah F, Hasboun D, Dormont D, Clemenceau S, Granat O, Marsault C, Baulac M (1997) Temporal lobe epilepsy with varying severity: MRI study of 222 patients. *Neuroradiology* 39:788–796.
- Lehmann TN, Gabriel S, Kovacs R, Eilers A, Kivi A, Schulze K, Lanksch WR, Meencke HJ, et al. (2000) Alterations of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsia* 41:190–194.
- Lehmann TN, Gabriel S, Eilers A, Njunting M, Kovacs R, Schulze K, Lanksch WR, Heinemann U (2001) Fluorescent tracer in pilocarpine-treated rats shows widespread aberrant hippocampal neuronal connectivity. *Eur J Neurosci* 14:83–95.
- Levav-Rabkin T, Melamed O, Clarke G, Farber M, Cryan JF, Dinan TG, Grossman Y, Golan HM (2010) A sensitive period of mice inhibitory system to neonatal GABA enhancement by vigabatrin is brain region dependent. *Neuropsychopharmacology* 35:1138–1154.
- Long L, Xiao B, Feng L, Yi F, Li G, Li S, Mutasem MA, Chen S, et al. (2011) Selective loss and axonal sprouting of GABAergic interneurons in the sclerotic hippocampus induced by LiCl-pilocarpine. *Int J Neurosci* 121:69–85.
- Maglóczy Z, Wittner L, Borhegyi Z, Halász P, Vajda J, Czirkák S, Freund TF (2000) Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 96:7–25.
- Mathern GW, Leite JP, Pretorius JK, Quinn B, Peacock WJ, Babb TL (1994) Children with severe epilepsy: evidence of hippocampal neuronal losses and aberrant mossy fiber sprouting during postnatal granule cell migration and differentiation. *Developmental Brain Res* 78:70–80.
- Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK, Leite JP (1995) Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata. *J Neurosci* 15:3990–4004.
- Nunzi MG, Gorio A, Milan F, Freund TF, Somogyi P, Smith AD (1985) Cholecystokinin-immunoreactive cells form symmetrical synaptic contacts with pyramidal and nonpyramidal neurons in the hippocampus. *J Comp Neurol* 237:485–505.
- Peng Z, Zhang N, Wei W, Huang CS, Cetina Y, Otis TS, Houser CR (2013) A reorganized GABAergic circuit in a model of epilepsy: evidence from optogenetic labeling and stimulation of somatostatin interneurons. *J Neurosci* 33:14392–14405.
- Represa A, Pollard H, Moreau J, Ghilini G, Khrestchatsky M, Ben-Ari Y (1993) Mossy fiber sprouting in epileptic rats is associated with a transient increased expression of alpha-tubulin. *Neurosci Lett* 156:149–152.
- Ribak CE (1985) Axon terminals of GABAergic chandelier cells are lost at epileptic foci. *Brain Res* 326:251–260.
- Ribak CE, Seress L, Laranth C (1993) Electron microscopic immunocytochemical study of the distribution of parvalbumin-containing neurons and axon terminals in the primate dentate gyrus and Ammon's horn. *J Comp Neurol* 327:298–321.
- Robbins RJ, Brines ML, Kim JH, Adrian T, de Lanerolle N, Welsh S, Spencer DD (1991) A selective loss of somatostatin in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 29:325–332.
- Salanova V, Markand O, Worth R (2004) Temporal lobe epilepsy: analysis of patients with dual pathology. *Acta Neurol Scand* 109:126–131.
- Scheibel ME, Crandall PH, Scheibel AB (1974) The hippocampal-dentate complex in temporal lobe epilepsy. A Golgi study. *Epilepsia* 15:55–80.
- Selke K, Müller A, Kukley M, Schramm J, Dietrich D (2006) Firing pattern and calbindin-D28k content of human epileptic granule cells. *Brain Res* 1120:191–201.
- Seress L (2001) Morphological changes of the human hippocampal formation from midgestation to early childhood. In: Nelson CA, Luciana M, editors. *Handbook of Developmental Cognitive Neuroscience*. Cambridge: Massachusetts: The MIT Press. p. 45–58.
- Seress L, Ábrahám H, Horváth Z, Dóczi T, Janszky J, Klemm J, Byrne R, Bakay RA (2009) Survival of mossy cells of the hippocampal dentate gyrus in humans with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurosurg* 111:1237–1247.

- Seress L, Ábrahám H (2008) Pre- and postnatal morphological development of the human hippocampal formation. In: Nelson CA, Luciana M, editors. *Handbook of Developmental Cognitive Neuroscience*. Cambridge: Massachusetts: The MIT Press. p. 183–211.
- Seress L, Ábrahám H, Tornóczky T, Kosztolányi G (2001) Cell formation in the human hippocampal formation from mid-gestation to the late postnatal period. *Neuroscience* 105:831–843.
- Seress L, Gulyás AI, Ferrer I, Tunon T, Soriano E, Freund TF (1993) Distribution, morphological features, and synaptic connections of parvalbumin- and calbindin D28-k-immunoreactive neurons in the human hippocampal formation. *J Comp Neurol* 337:208–230.
- Shi XY, Wang JW, Cui H, Li BM, Lei GF, Sun RP (2010) Effects of antiepileptic drugs on mRNA levels of BDNF and NT-3 and cell neogenesis in the developing rat brain. *Brain Dev* 32:229–235.
- Sloviter RS (1991) Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the “dormant basket cell” hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 1:41–66.
- Sloviter RS (1994) The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 35:640–654.
- Sloviter RS, Sollas AL, Barbaro NM, Laxer KD (1991) Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J Comp Neurol* 308:381–396.
- Sloviter RS, Zappone CA, Harvey BD, Bumanglag AV, Bender RA, Frotscher M (2003) “Dormant basket cell” hypothesis revisited: relative vulnerabilities of dentate gyrus mossy cells and inhibitory interneurons after hippocampal status epilepticus in the rat. *J Comp Neurol* 459:44–76.
- Sloviter RS, Bumanglag AV (2013) Defining “epileptogenesis” and identifying “antiepileptogenic targets” in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. *Neuropharmacology* 69:3–15.
- Soriano E, Frotscher M (1993) GABAergic innervation of the rat fascia dentata: a novel type of interneuron in the granule cell layer with extensive axonal arborization in the molecular layer. *J Comp Neurol* 334:385–396.
- Soussi R, Boulland JL, Bassot E, Bras H, Coulon P, Chaudhry FA, Storm-Mathisen J, Ferhat L, et al. (2015) Reorganization of supramammillary-hippocampal pathways in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: evidence for axon terminal sprouting. *Brain Struct Funct* 220:2449–2468.
- Sperk G, Hamilton T, Colmers WF (2007) Neuropeptide Y in the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:285–297.
- Sperk G, Drexel M, Pirker S (2009) Neuronal plasticity in animal models and the epileptic human hippocampus. *Epilepsia Suppl.* 12:29–31.
- Sun C, Mtchedlishvili Z, Bertram EH, Erisir A, Kapur J (2007) Selective loss of dentate hilar interneurons contributes to reduced synaptic inhibition of granule cells in an electrical stimulation-based animal model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 500:876–893.
- Suzukawa J, Omori K, Okugawa G, Fujiseki Y, Heizmann CW, Inagaki C (1999) Long-lasting c-fos and NGF mRNA expressions and loss of perikaryal parvalbumin immunoreactivity in the development of epileptogenesis after ethacrynic acid-induced seizure. *Brain Res* 834:89–102.
- Suzuki F, Makiura Y, Guilhem D, Sørensen JC, Onteniente B (1997) Correlated axonal sprouting and dendritic spine formation during kainate-induced neuronal morphogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Exp Neurol* 145:203–213.
- Tang FR, Loke WK (2010) Cyto-, axo- and dendro-architectonic changes of neurons in the limbic system in the mouse pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 89:43–51.
- Takahashi DK, Jin S, Prince DA (2018) Gabapentin prevents progressive increases in excitatory connectivity and epileptogenesis following neocortical trauma. *Cereb Cortex* 28:2725–2740.
- Taniguchi H, Lu J, Huang ZJ (2013) The spatial and temporal origin of chandelier cells in mouse neocortex. *Science* 339:70–74.
- Tassi L, Meroni A, Deleo F, Villani F, Mai R, Russo GL, Colombo N, Avanzini G, Falcone C, Bramero M, Citterio A, Garbelli R, Spreafico R (2009) Temporal lobe epilepsy: neuropathological and clinical correlations in 243 surgically treated patients. *Epileptic Disord* 11:281–292.
- Tóth K, Eross L, Vajda J, Halász P, Freund TF, Maglóczy Z (2010) Loss and reorganization of calretinin-containing interneurons in the epileptic human hippocampus. *Brain* 133:2763–2777.
- Tricoire L, Pelkey KA, Erkkila BE, Jeffries BW, Yuan X, McBain CJ (2011) A blueprint for the spatiotemporal origins of mouse hippocampal interneuron diversity. *J Neurosci* 31:10948–10970.
- Wang X, Yu Y, Ma R, Shao N, Meng H (2018) Lacosamide modulates collapsin response mediator protein 2 and inhibits mossy fiber sprouting after kainic acid-induced status epilepticus. *Neuroreport* 29:1384–1390.
- Wittner L, Maglóczy Z, Borhegyi Z, Halász P, Tóth S, Eross L, Szabó Z, Freund TF (2001) Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 108:587–600.
- Wittner L, Eross L, Szabó Z, Tóth S, Czirják S, Halász P, Freund TF, Maglóczy ZS (2002) Synaptic reorganization of calbindin-positive neurons in the human hippocampal CA1 region in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 115:961–978.
- Xu Q, Cobos I, De La Cruz E, Rubenstein JL, Anderson SA (2004) Origins of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* 24:2612–2622.
- Zhang W, Yamawaki R, Wen X, Uhl J, Diaz J, Prince DA, Buckmaster PS (2009) Surviving hilar somatostatin interneurons enlarge, sprout axons, and form new synapses with granule cells in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 29:14247–14256.

(Received 11 May 2020, Accepted 5 September 2020)
(Available online 12 September 2020)



Research report

Investigation of synapses in the cortical white matter in human temporal lobe epilepsy



Noémi Sóki^{a,b}, Zsófia Richter^{a,1}, Kázmér Karádi^c, Katalin Lőrincz^{d,2}, Réka Horváth^d, Csilla Gyimesi^d, Cecília Szekeres-Paraczkó^e, Zsolt Horváth^f, József Janszky^{d,g}, Tamás Dóczi^{f,g}, László Seress^{a,b}, Hajnalka Ábrahám^{a,b,*}

^a Department of Medical Biology and Central Electron Microscopic Laboratory, University of Pécs Medical School, Szigeti u. 12, Pécs 7643, Hungary

^b Neuromorphology and Cellular Neurobiology Research Group, Center for Neuroscience, University of Pécs, Ifjúság u. 20, Pécs 7624, Hungary

^c Department of Behavioral Sciences, University of Pécs Medical School, Szigeti u. 12, Pécs 7624, Hungary

^d Department of Neurology, University of Pécs Medical School, Rét u. 2, Pécs 7623, Hungary

^e Human Brain Research Laboratory, Institute of Experimental Medicine, ELKH, Szegény u. 43, Budapest 1083, Hungary

^f Department of Neurosurgery, University of Pécs Medical School, Rét u. 2, Pécs 7623, Hungary

^g MTA-PTE Clinical Neuroscience MR Research Group, Center for Neuroscience, University of Pécs, Ifjúság u. 20, Pécs 7624, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:

Epileptic seizures
Neuronal network
Synaptophysin
Subplate
White matter neurons

ABSTRACT

Temporal lobe epilepsy (TLE) is one of the most common focal pharmacotherapy-resistant epilepsy in adults. Previous studies have shown significantly higher numbers of neurons in the neocortical white matter in TLE patients than in controls.

The aim of this work was to investigate whether white matter neurons are part of the neuronal circuitry. Therefore, we studied the distribution and density of synapses in surgically resected neocortical tissue of pharmacotherapy-resistant TLE patients. Neocortical white matter of temporal lobe from non-epileptic patients were used as controls. Synapses and neurons were visualized with immunohistochemistry using antibodies against synaptophysin and NeuN, respectively. The presence of synaptophysin in presynaptic terminals was verified by electron microscopy. Quantification of immunostaining was performed and the data of the patients' cognitive tests as well as clinical records were compared to the density of neurons and synapses.

Synaptophysin density in the white matter of TLE patients was significantly higher than in controls. In TLE, a significant correlation was found between synaptophysin immunodensity and density of white matter neurons. Neuronal as well as synaptophysin density significantly correlated with scores of verbal memory of TLE patients. Neurosurgical outcome of TLE patients did not significantly correlate with histological data, although, higher neuronal and synaptophysin densities were observed in patients with favorable post-surgical outcome.

Our results suggest that white matter neurons in TLE patients receive substantial synaptic input and indicate that white matter neurons may be integrated in epileptic neuronal networks responsible for the development or maintenance of seizures.

Abbreviations: AED, antiepileptic drug; AVLT, Rey auditory verbal learning test; BW, black and white; d, day; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; F, female; FS, febrile seizure; GM, gray matter; HS, hippocampal sclerosis; IPI, initial precipitating injury; L, left; M, male; m, month; MRI, magnetic resonance imaging; MCD, malformation of cortical development; NeuN, neuronal nuclear antigen; PB, phosphate buffer; PFA, paraformaldehyde; R, right; ROCF, Rey-Osterrieth Complex Figure; SD, standard deviation; SYN, synaptophysin; TEM, transmission electron microscopy; TLE, temporal lobe epilepsy; TRIS, Tris-buffer; UPMS, University of Pécs Medical School; Y, year; w, week; WM, white matter.

* Corresponding author at: Department of Medical Biology and Central Electron Microscopic Laboratory, University of Pécs Medical School, Szigeti u. 12, Pécs 7643, Hungary.

E-mail address: hajnalka.abraham@ok.pte.hu (H. Ábrahám).

¹ Present address: Department of Emergency, Semmelweis University, Budapest, Hungary.

² Present address: Department of Neurosurgery, University Hospital Tübingen, Tübingen, Germany.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.147787>

Received 16 September 2021; Received in revised form 27 December 2021; Accepted 10 January 2022

Available online 15 January 2022

0006-8993/© 2022 The Authors.

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Previous studies have shown the presence of neurons in the neocortical white matter (WM) of healthy adults (Meyer et al., 1992; Suárez-Solá et al., 2009). The majority of these neurons are remnants of the subplate, a transient layer during fetal cortical development (Chun and Shatz, 1989; Kostovic and Rakic, 1990; Mrzljak et al., 1988; Suárez-Solá et al., 2009). A portion of subplate neurons undergoes programmed cell death in the perinatal period, while many of them survive and are distributed in the subcortical WM as interstitial neurons (Chun and Shatz, 1989; Judas et al., 2010; Kostovic and Rakic, 1990; Suárez-Solá et al., 2009). Although, the role of WM neurons in adults is not clear, a potential role of them was proposed in schizophrenia or in Alzheimer disease (Akbarian et al., 1993; Eastwood and Harrison, 2005; Kirkpatrick et al., 1999, 2003; Kowall and Beal, 1988; Tao et al., 1999; Van de Nes et al., 2002).

In temporal lobe epilepsy (TLE), which is one of the most common form of focal epilepsies, a higher number of WM neurons have been found in the neurosurgically resected neo- and archicortex (Emery et al., 1997; Hardiman et al., 1988; Kasper et al., 1999; Liu et al., 2014; Richter et al., 2016; Thom et al., 2001). Etiology of TLE can be attributed to various pathological conditions including malformation of cortical development (MCD) and hippocampal sclerosis (HS). Heterotopic neurons are present in the WM of the temporal lobes of patients with MCD as well as with classical type of HS characterized by severe neuronal loss in Ammon's horn and in the hilus of the dentate gyrus (Liu et al., 2014; Richter et al., 2016; Thom et al., 2001). Characterization of WM neurons using specific markers for excitatory and inhibitory neurons has shown that these neurons comprise both excitatory and inhibitory cells in controls and TLE patients (Judas et al., 2010; Richter et al., 2016). The functional role of WM neurons in epilepsy has already been indicated by the association of the presence of WM neurons with favorable post-surgical outcome in TLE found by Hardiman et al. (1988) and by Thom et al. (2001). According to other studies, increased density of WM neurons was associated with worse outcome of patients following surgery and despite the removal of the cortical area containing large number of WM neurons, TLE patients did not become seizure free (Emery et al., 1997; Kasper et al., 1999). Therefore, it has been suggested that the presence of WM neurons is an epiphenomenon rather than the cause of seizure activity (Emery et al., 1997; Kasper et al., 1999).

Thus, the question about the role of WM neurons in the pathophysiology of epileptic seizures is still open. We hypothesize that due to their excess numbers, WM neurons form abnormal neuronal circuitry, which may have pathological significance and may play a role in the development and/or maintenance of epilepsy. Therefore, our aim was to investigate the possible synaptic connections of WM neurons, which would indicate that WM neurons are functionally active and may be integral part of epileptic neuronal networks. Therefore we have studied the distribution of neurons and synapses in the neocortical WM in surgically resected tissue samples of patients with pharmacotherapy-resistant TLE.

Visualization of WM neurons was performed by the detection of a neuronal nuclear antigen (NeuN) suitable for the study of the whole neuronal population present in the WM (Gusel'nikova et al., 2015; Mullen et al., 1992; Richter et al., 2016; Sarnat et al., 1998; Wolf et al., 1996). Synapses have been studied with an antibody against synaptophysin (SYN), a 38 kDa transmembrane synaptic vesicle protein that binds to another essential fusion molecule synaptobrevin II (Becher et al., 1999; Edelmann et al., 1995; Südhof, 1987). SYN is present in the presynaptic terminals of both excitatory and inhibitory neurons in the central nervous system and because of its general occurrence, SYN immunostaining can be used for quantification of synapses (Alder et al., 1992; Bragina et al., 2007; Calhoun et al., 1996; Gaardsvoll et al., 1988; Gronborg et al., 2010; Micheva et al., 2010; Rehm et al., 1986; Thomas et al., 1988; Wiedenmann and Franke, 1985). In addition to the

distribution of WM neurons and synapses, we studied the correlation between the density of WM neurons and synapses that would indicate functional significance of WM neurons in the temporal neocortex of TLE patients. We further analyzed the possible correlation between the density of neurons as well as synapses and the clinical data of patients, including the age of onset, the duration of the epilepsy as well as the post-surgical outcome. Since WM abnormalities have been associated with cognitive performance (Alexander et al., 2014; Reyes et al., 2019; Riley et al., 2010; Rodríguez-Cruces et al., 2018), histological data were correlated with the scores of verbal and visual cognitive tests of TLE patients.

2. Results

In harmony with earlier studies and as demonstrated in Fig. 1, we detected larger number of neurons in the neocortical WM of TLE patients than in controls, although, the possible synaptic contacts and the functional impact of WM neurons remained to be elucidated (Emery et al., 1997; Richter et al., 2016; Thom et al., 2001). To identify and quantify synapses in the neocortical WM, we used immunohistochemistry to detect SYN, a vesicular protein present in presynaptic terminals (Alder et al., 1992; Wiedenmann and Franke, 1985).

2.1. Synaptophysin immunoreactivity in the white matter

Synapses were visualized with immunohistochemistry based on the SYN protein content of the presynaptic axon terminals in TLE patients and in control subjects who had no epilepsy. We used two different control groups. SYN immunohistochemistry was performed on sections of the middle temporal gyrus from surgically resected tissue blocks of patients who have been operated with intracranial tumor. The tissue samples examined in this study were completely tumor-free. In addition to biopsy, autopsy control samples were used as well. In both samples, SYN-immunoreactive profiles could be seen as small dots in the sections. As it was expected, dense SYN immunoreactivity was observed in the GM and the border between GM and WM was clearly outlined. In low numbers, SYN-immunoreactive puncta could be also found in the WM in the control group (Fig. 2A).

In TLE patients' samples, SYN immunoreactivity was also remarkably stronger in GM than in WM, and in a few HS and in MCD cases, the border between WM and GM appeared to be blurred (Fig. 2B). The most striking observation in TLE samples was the higher density of SYN-immunoreactive puncta in the neocortical WM (Fig. 2B). In the deep WM, distribution of SYN-immunoreactive profiles was variable (Fig. 2C, D). In many cases, SYN-immunoreactive dots were evenly distributed in the WM, while in other patients patchy appearance of SYN immunoreactivity could be observed. Occasionally, SYN-immunoreactive puncta were organized in parallel indicating the presence of synaptic terminals along dendrites.

In order to verify that SYN-immunoreactive puncta observed with light microscope signify synapses, we examined SYN-immunoreactive profiles with TEM. SYN-immunoreactivity was located in presynaptic axon terminals (Fig. 2E-F).

2.2. Quantification of synaptophysin immunoreactivity in the white matter

Quantification of SYN immunoreactivity was performed in the deep WM, approximately 500 μ m below the border of WM and GM in both autopsy and biopsy controls, as well as in TLE samples. Although the average of optical density of SYN-immunoreactive puncta in biopsy preparations was slightly higher (6.73 ± 2.92) than in autopsy samples (5.09 ± 3.54), the difference between the two patient groups was not significant (Fig. 3A). Therefore, we pooled the control samples of both groups, and averaged the SYN-immunoreactive optical density values (5.91 ± 3.04) of autopsy and biopsy controls (Fig. 3B).

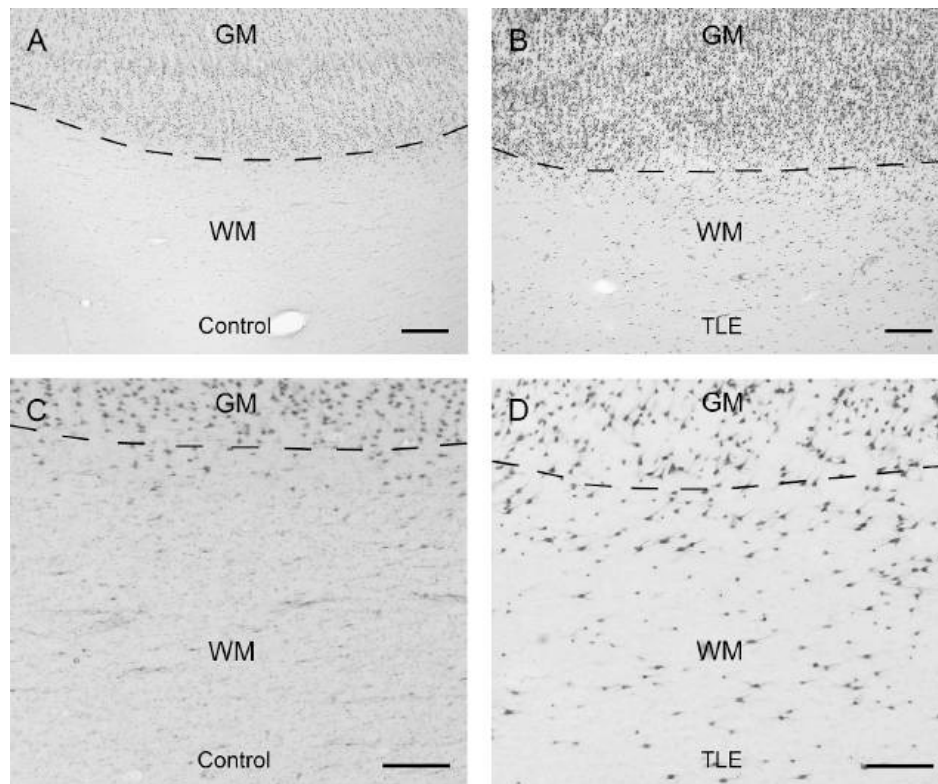


Fig. 1. NeuN immunoreactivity in the temporal neocortex NeuN immunoreactivity in a control sample (A and C) and in a patient with TLE (B and D). Dashed lines show the transition between gray matter (GM) and white matter (WM). Abbreviations: GM, gray matter; WM, white matter. Scale bar = 500 μ m in A, B and 200 μ m in C, F.

Quantification revealed that optical density of SYN-immunoreactive dots in the neocortical WM showed individual differences among TLE patients. The average density of SYN immunostaining in the neocortical WM of 14 TLE patients was 11.04 ± 3.13 , which was significantly ($p = 0.007$) higher than that in control samples (Fig. 3B).

In TLE patients with HS, average of SYN optical density was 10.25 ± 2.43 . The difference between SYN immunodensity in WM of the HS patients and that of controls were statistically significant ($p = 0.011$, Fig. 3C). In MCD, average of optical density of SYN-immunoreactive profiles was 13.04 ± 5.13 , and the difference between SYN-immunoreactivity of controls and patients with MCD-related epilepsy was not statistically significant (Fig. 3D).

2.3. Correlation between optical density of synaptophysin immunoreactivity and density of neurons in the neocortical white matter

In this part of the study, we correlated the density of WM neurons with the optical density of SYN-immunoreactivity. In case of 13 TLE samples, we had data on both optical density of SYN immunostaining and density of NeuN-immunoreactive WM neurons. Spearman's analysis has revealed significant ($p = 0.001$) positive correlation between SYN optical density and density of neurons in the WM (Fig. 4A). In addition, significant ($p = 0.005$) correlation was observed in the WM of HS patients between SYN-optical density and density of neurons (Fig. 4B). Due to the low number of patients in the MCD group, association between SYN optical density and density of neurons in the WM was not statistically significant. However, larger SYN optical density was detected in those samples that contained larger number of neurons per unit area.

2.4. Correlation between histological findings and the clinical and cognitive data of TLE patients

We correlated SYN immunoreactivity in the neocortical WM with the

following clinical parameters: age and gender of patients, age at onset of epilepsy and duration of the disease. Correlation analysis revealed no significant association between the above-mentioned parameters and the SYN immunoreactivity. We have to note, however, that age of autopsy controls were significantly higher than that of TLE patients, although, ages of individuals in the TLE group varied and significant deviation could be found in both directions from the average age of the patients. In contrast, no significant difference was observed in neuronal and SYN densities in the samples of those TLE patients who were younger than the average age of the whole TLE group when compared to those who were older.

In addition, association of SYN immunopositivity in the WM with the frequency of the seizures in the year before operation was examined, but no significant association could be found. No correlation was found between SYN immunoreactivity and the incidence of childhood febrile convulsions.

Regarding the postoperative outcome of patients, the Engel classification was used (Durnford et al., 2011; Engel et al., 1993). Twelve of our TLE patients became seizure-free and belonged to Engel class 1. One patient belonged to class 2, which indicate a slightly worse postsurgical outcome than for Engel class 1 patients. No meaningful improvement occurred in one patient who belonged to class 4. Engel class 1 can be further divided into subclasses. Patients with the most favorable outcome, who were completely seizure free without antiepileptic drugs (AED) belonged to class 1A. Those patients who had non-disabling simple partial seizures only since epilepsy surgery belonged to Engel class 1B, while patients with some disabling seizures after surgery, but who were free of disabling seizures for at least 2 years were registered in class 1C. Patients who had generalized convulsions with antiepileptic AED withdrawal only belonged to Engel class 1D. While analyzing the association between postsurgical outcome and histological findings, we separately examined those patients who became completely seizure free without AEDs (class 1A) and other patients who belonged to Engel class

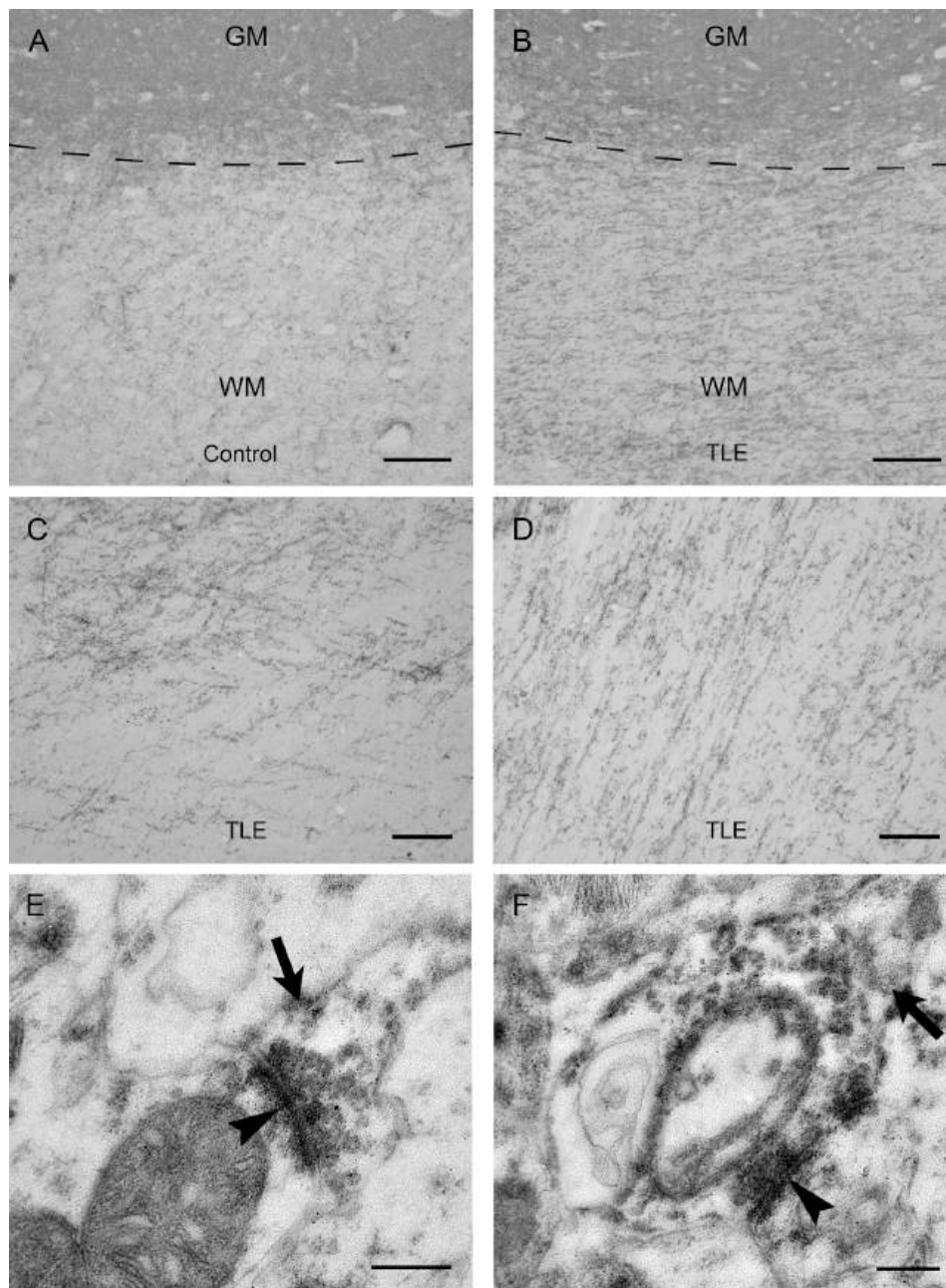


Fig. 2. Synaptophysin immunoreactivity in the white matter Synaptophysin (SYN) immunoreactivity in the gray matter (GM) and white matter (WM) of a control (A) and a patient with epilepsy (B). C. Dense SYN immunoreactivity in the WM of a TLE patient. D. Parallel-organized SYN-immunopositive profiles indicate presynaptic axon terminals terminating on dendrites or axon-initial segments of WM neurons in a TLE patient. E: Electron micrograph of an axo-dendritic synapse formed by a SYN-immunoreactive presynaptic terminal (arrow) in a TLE patient. F: Electron micrograph of a SYN-immunoreactive presynaptic terminal (arrow) forming an asymmetric synapse with a dendritic spine. Arrowheads in E and F point to post-synaptic density. Scale bars = 200 μm in A, B, 100 μm in C, D and 200 nm in E and F.

1B-D. We assigned numerical values to these two categories as follows: to 1A 0.5, to Engel class 1 other than 1A (1B-D) 1 were allocated. Regarding other Engel classes, subclasses were not considered and the numerical value assigned was identical with the number of the class. Our analyses revealed that post-surgical outcome significantly ($p = 0.03$) correlated with the optical density of SYN-immunoreactivity (Fig. 5A).

In the subgroups of TLE, all patients with HS became seizure free and belonged to Engel class 1. Analyzing association of SYN-immunoreactivity with the postsurgical outcome of HS patients, no significant association was found (not shown). Similarly, no significant association was observed between SYN-immunodensity and postsurgical outcome in the MCD group, however, trend showed that the higher the SYN immunodensity, the more favorable the postsurgical outcome was (Fig. 5B).

The density of NeuN-immunoreactive cells in the WM and the postsurgical outcome of TLE patients did not show significant association, although an interesting trend was observed indicating that the larger the

density of neurons the better was the postsurgical outcome (not shown).

Linear regression analysis between the histological findings and the cognitive performance of patients indicated that neuronal and synaptic densities in the WM were associated with verbal memory (Fig. 6). The optical density of SYN immunoreactivity was significantly correlated with the interference in AVLT ($F(1,11) = 7.57$, $p < 0.05$) (Fig. 6A). Similarly, higher neuronal density was associated with lower scores of interference in AVLT, although the association was not statistically significant ($F(1,11) = 2.86$, $p = 0.11$, not shown). Regarding short-term verbal memory, a significant correlation was observed between scores of digit span forward test and SYN immunodensity ($F(1,11) = 4.81$, $p = 0.05$), as well as density of neurons ($F(1,11) = 11.4$, $p < 0.01$) (Fig. 6B and C). The scores of visual attention and memory tests including copy of ROCF did not show significant correlation with SYN-immunodensity and with the density of NeuN-immunoreactive cells, although a tendency ($p = 0.08$) could be observed when forward version of the Corsi Block-Tapping task scores and neuronal density were correlated (not

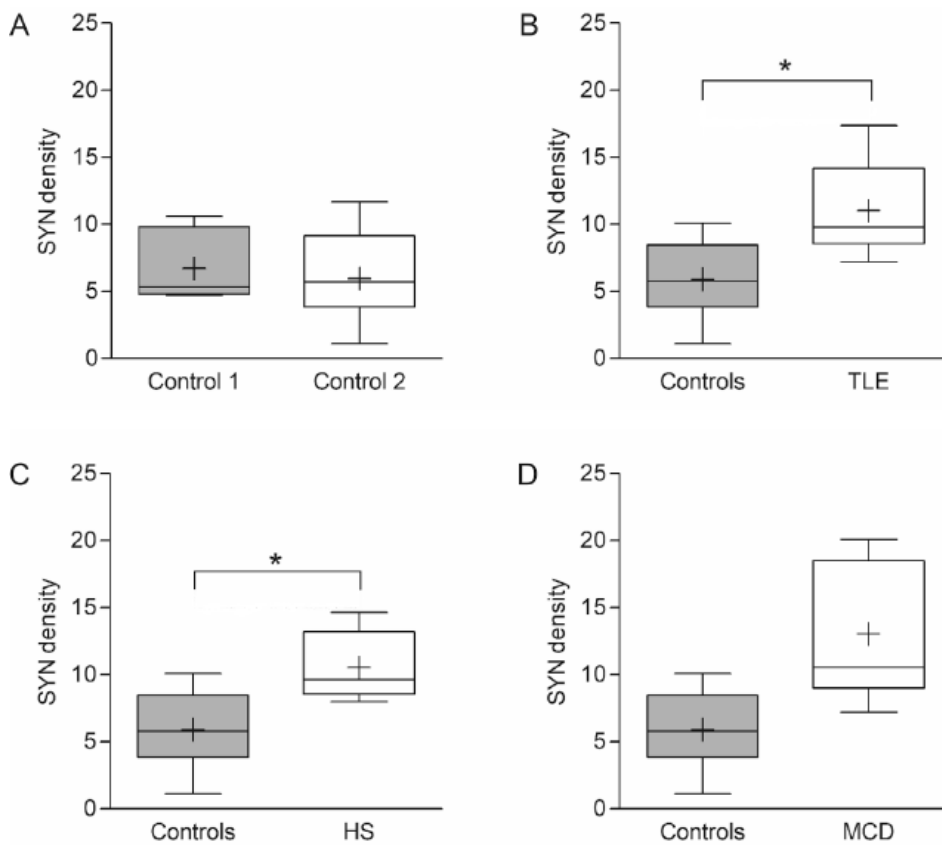


Fig. 3. Graphs showing optical density of synaptophysin immunoreactivity in controls and in TLE patients A. Mean of optical density of synaptophysin (SYN) immunoreactivity in the two control groups. No significant difference can be seen in SYN immunoreactivity in samples taken by biopsy (gray box) and after autopsy (white box). B. Mean optical density of SYN immunoreactivity measured in TLE patients' samples (white box) and in controls (gray box). C. Mean optical density of SYN immunoreactivity measured in HS (white box) and in controls (gray box). D. Mean optical density of SYN immunoreactivity measured in the group of MCD-induced TLE patients (white box) and in controls (gray box). Asterisks indicate significant differences. Whiskers show the 5th and 95th percentiles.

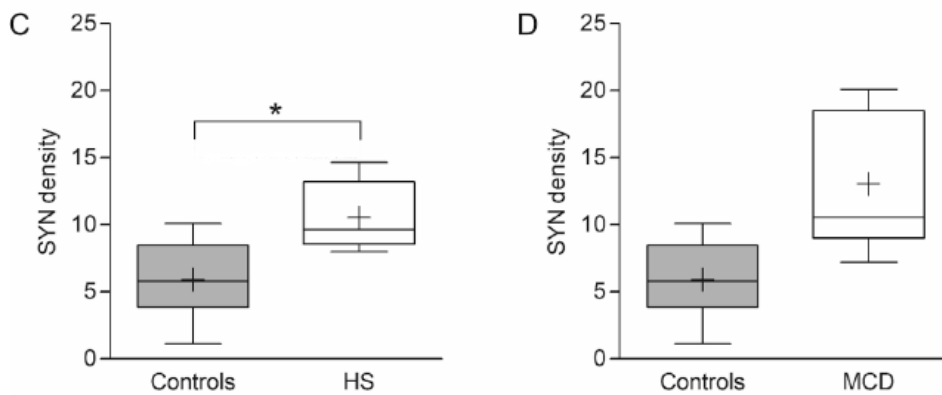


Fig. 4. Diagrams reveal the association between optical density of synaptophysin immunoreactivity and density of WM neurons in TLE patients' groups. A and B: Significant positive correlation was observed between the density of WM neurons and the optical density of synaptophysin (SYN) immunopositivity in all TLE patients (A) and in TLE patients with HS (B).

shown).

In the group of TLE patients with HS, no significant linear regression could be seen between optical density of SYN immunoreactivity and scores of verbal memory, and between density of NeuN-immunopositive cells and interference of AVLT (Fig. 7A, B, D). Analyzing the association between WM neuronal density and verbal memory performance of HS patients, a significant ($F(1,8) = 5,573$, $p = 0.046$) linear regression was found between the density of NeuN-immunopositive cells and the scores of digit span forward test (Fig. 7C). Although, the low number of samples of TLE patients with MCD did not allow statistical analysis, a trend was detected when the optical density of SYN-immunoreactivity and the scores of interference in AVLT and digit span forward tests were correlated.

3. Discussion

In the present study, we have shown that a significantly higher density of synapses could be found in the neocortical WM of TLE patients than in controls. In addition, we have observed a significant correlation between the density of synapses and the density of neurons in the WM of epilepsy patients. Density of synapses in the WM significantly correlated with the postsurgical outcome of TLE patients. In addition, the number of neurons and the density of synapses significantly associated with the verbal memory performance of patients. In groups of TLE patients with HS and with MCD, synapse density was separately examined. According to our findings, the density of synapses was significantly higher in the WM of TLE patients with HS than in controls. In addition, a significant correlation could be found between the density of synapses and the density of neurons in the neocortical WM of those TLE patients who had HS.

Neuronal numbers in the neocortical and archicortical WM have been reported to be increased in epileptic patients compared to non-epileptic controls (Emery et al., 1993; Richter et al., 2016; Thom

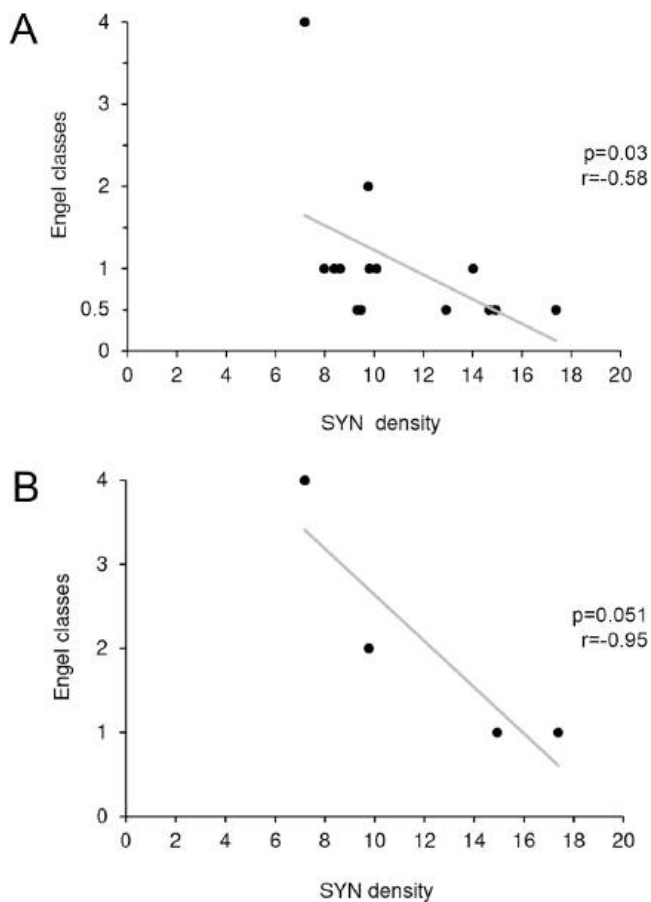


Fig. 5. Relationship between optical density of synaptophysin immunoreactivity in the WM and postoperative outcome of TLE patients. A: Chart demonstrates significant correlation between optical density of synaptophysin (SYN) immunoreactivity in the WM and TLE patients' postoperative outcome according to the Engel classification. Engel class 1 was further divided into subclasses 1A and 1B-D. For the analysis of the association between postsurgical outcome and histological findings, we assigned numerical values to these subclasses as follows: 1A – 0.5, 1B-D – 1. These values are present also on the Y axis of the chart in A. B. Relationship between optical density of SYN immunoreactivity and patients' postoperative outcome according to the Engel classification in MCD-induced TLE.

et al., 2001). Among WM neurons, both excitatory and inhibitory neurons were present (Richter et al., 2016). Regarding the functional significance, as well as the synaptic connections of WM neurons, no clear information was available. In our study, synapses were visualized with immunohistochemistry based on the SYN protein content of the presynaptic axon terminals (Wiedenmann and Francke, 1985). SYN-immunoreactive profiles have been observed in WM of both TLE patients and control samples. Under the light microscope, SYN-immunoreactive terminals were visible as small dots. Using immunoelectron microscopy, we verified the localization of SYN in presynaptic axon terminals, which is in harmony with previous studies (Rehm et al., 1986; Wiedenman and Francke, 1985).

3.1. Technical considerations and limitation of the study

In our study, quantification of synapses in the neocortical WM was performed in light microscopic sections and optical density of SYN immunoreactivity was measured. In a previous work, we have compared two different software for optical densitometry of immunoreactive profiles, in which ImageJ, an open source Java-based image processing and analyzer program supported by the NIH USA and AnalySIS software

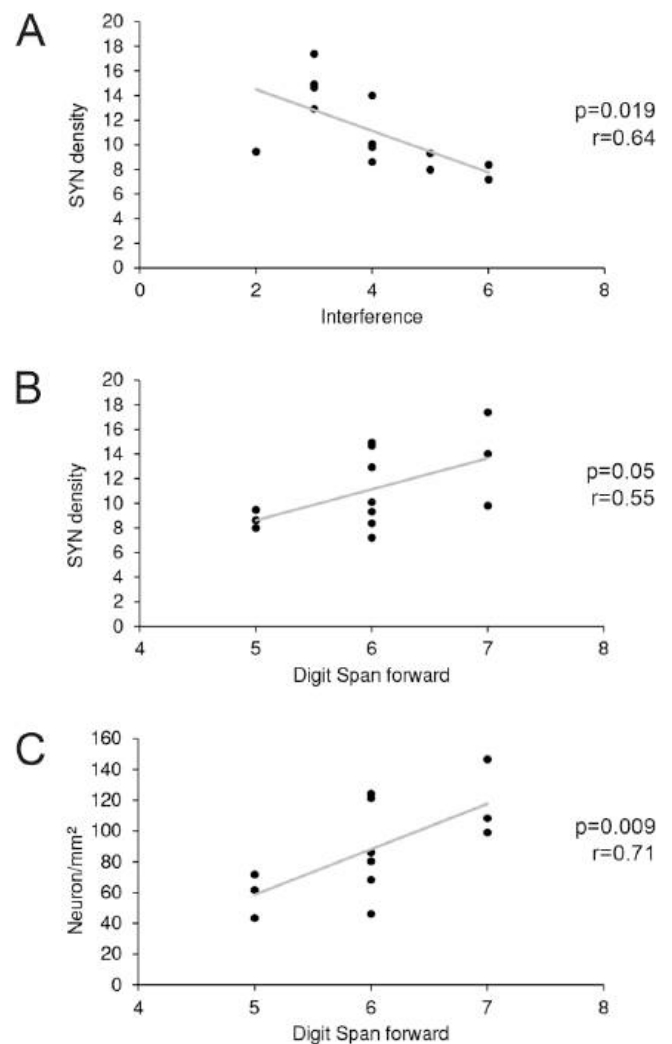


Fig. 6. Linear regression between the optical density of synaptophysin immunoreactivity (A and B), density of WM neurons (C) and the verbal memory scores of the entire TLE patients' population. A. Diagram shows significant negative linear regression between synaptophysin (SYN) density and the interference in AVLT. B. Chart reveals significant positive linear regression between SYN density and scores of digit span forward test. C. Diagram reveals significant positive linear regression between density of WM neurons and scores of digit span forward test.

(Olympus Corporation) have been used and compared (Armbruszt et al., 2015). We have found that both programs are suitable for the measurement of optical density on immunostained sections, therefore, in the present study we used ImageJ. Quantification revealed a significantly higher SYN optical density in TLE compared to controls.

Regarding the control samples, we have used the WM of the temporal neocortex of two control groups. Patients who underwent neurosurgery with fast-growing intracranial tumors formed one of our control groups. Resection of neocortical WM in these cases has been performed for strictly therapeutic reasons and has been indicated to guarantee safe and radical removal of the tumor. The resected tissue was put in fixative immediately after removal. Due to the radical resection, WM tissue used in our study did not contain tumor cells. In addition to biopsy samples, autopsy controls with short post-mortem delay were used as well. Probably, due to the longer interval between the time of death and fixation of brain samples, SYN immunoreactivity in autopsy control group was slightly weaker and optical density was slightly lower than that of surgically removed biopsy controls. However, the difference between the two groups was not significant. This indicates that both

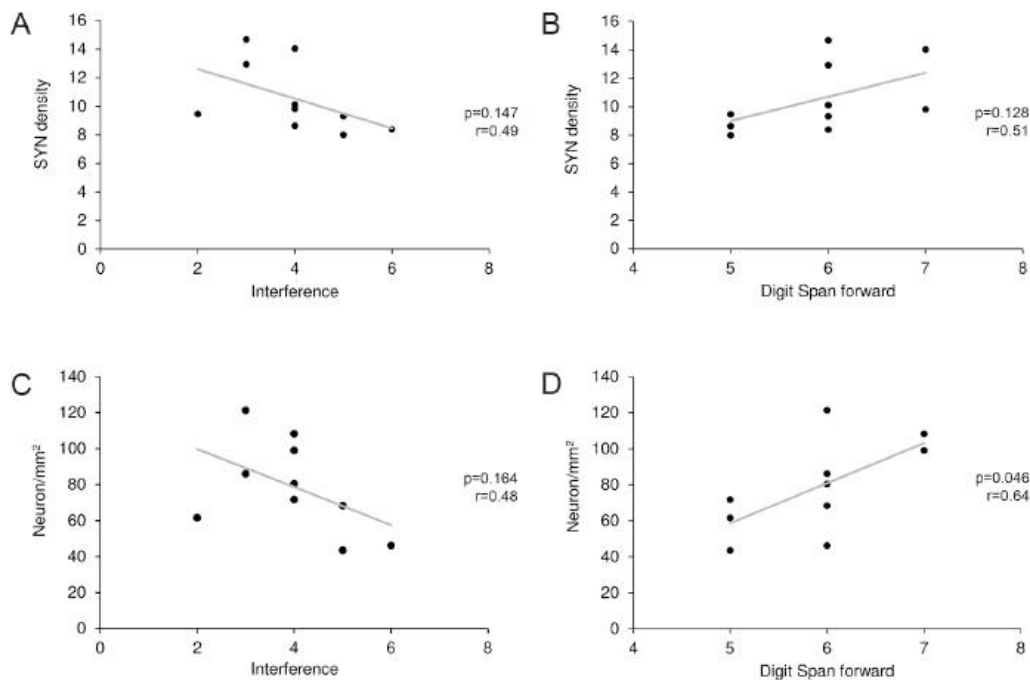


Fig. 7. Linear regression between the optical density of synaptophysin immunoreactivity (A and B), density of WM neurons (C and D) and the verbal memory scores of TLE patients with HS. A. Diagram shows non-significant association between optical density of synaptophysin (SYN) immunostaining and interference in AVLT. B. Non-significant association between SYN density and scores of digit span forward test. C. Non-significant relationship between density of WM neurons and interference in AVLT. D. Diagram reveals significant positive correlation ($p = 0.046$) between density of WM neurons and scores of digit span forward test.

controls can be used as a comparison to the SYN immunodensity of TLE patients' WM samples. Accordingly, we have pooled the optical density values of our control samples, in order to form a single control group that could be used for the comparison of SYN immunodensity in TLE patients.

There are limitations in the present study. First, the sample size is relatively small, which might result in a reduction of statistical power. In the TLE group with HS, we had sections containing NeuN-immunopositive cells and SYN-immunoreactive profiles of 10 patients. The number of samples was especially low regarding the group of TLE patients with MCD ($n = 4$). Despite the small sample size, a significant difference could be found between optical density of SYN-immunoreactivity of controls and TLE patients, and between these parameters of controls and TLE patients with HS. Regarding to the whole cohorts' population, and to HS patients, a significant correlation was found between optical density of SYN-immunoreactive profiles and the density of NeuN-immunopositive cells. In addition, a significant association was observed between the optical density of SYN-immunoreactivity and the postsurgical outcome of TLE patients. A significant correlation was found between NeuN as well as SYN-immunoreactivity and scores of neuropsychological tests measuring verbal memory of patients. It is obvious that a larger sample size would strengthen the statistical power of our study. However, despite the relatively low sample size, our original question that was related to the possible functional role of WM neurons and synapses in TLE, was answered. Based on previous studies, the most frequent form of TLE is HS, and in harmony with these data, the larger group of our epileptic patients was characterized with HS and lower number of patients had MCD (Blümcke et al., 2002; Blümcke, 2009; Howe et al., 2010; Lehericy et al., 1997). Thus, we have to emphasize that the difference observed in the sample size of the examined patients' groups with different etiology correlates with the difference in the prevalence of MR findings in TLE.

Another limitation of our study is the difference between the ages of TLE patients and that of controls. Especially, the ages of autopsy controls were significantly higher than that of TLE patients. We have to emphasize, however, that ages of individuals in the TLE group varied also and significant deviations could be observed in both directions from the average age of the patients. In contrast, no significant difference was found in neuronal and SYN densities in the samples of those TLE patients

who were younger than the average age of the whole TLE group when compared with the densities found in those who were older than the average age of the patients. In addition, no correlation could be found between the neuronal or SYN densities and the age of the patients. Although, we cannot exclude that certain level of decrease in neuronal and SYN densities in the WM is associated to aging, the lack of correlation between neuronal or SYN densities and the ages of patients indicates that the significantly higher neuronal and SYN densities observed in TLE patients are rather due to the epilepsy than to the lower ages of the patients.

3.2. Neurons and synapses in the white matter

Previous studies have reported the presence of neurons in neocortical WM of patients with TLE, although their impact on generation and maintenance of seizure activity has not been proven (Emery et al., 1997; Hardiman et al., 1988; Kasper et al., 1999; Liu et al., 2014; Richter et al., 2016; Suárez-Solá et al., 2009; Thom et al., 2001). In addition to the higher optical density of SYN immunoreactivity - that we found in TLE patients compared to controls -, we revealed a significant positive linear correlation between the density of WM neurons and the optical density of SYN immunoreactivity. The correlation suggests that WM neurons may be functionally active, integral parts of the neuronal circuitries in the temporal lobe in TLE. Regarding the origin of synaptic terminals in the WM, many options are plausible. The SYN-immunoreactive terminals might originate from cortical and/or subcortical neurons. In addition, the WM neurons might be the source of SYN-immunopositive presynaptic terminals as well.

The functional activity of WM neurons and synapses might be supported by another finding of our study. Correlation of the neuronal numbers and the optical density of SYN immunoreactivity with neuropsychological data of patients revealed a significant association between our histological findings and the verbal memory of TLE patients. Short-term verbal memory significantly correlated with neuronal density as well as with optical density of SYN immunoreactivity in the WM of epilepsy patients. In addition, optical density of SYN immunoreactivity was significantly associated to interference in AVLT. These data clearly indicate the functional importance of WM synapses in the temporal lobe. Interestingly, elimination of SYN in mice induced behavioral changes

including impairments in learning and memory, indicating that SYN is apparently not essential for the synaptic vesicle cycle, but it likely has a function in modulating synaptic strength and efficiency of memory formation (Schmitt et al., 2009).

The existence of functional neural networks within the WM is supported by MRI studies in which the WM appears to display intrinsic functional organizations as interacting networks of functional modules, similarly to the GM (Ding et al., 2016; Peer et al., 2017; Wu et al., 2016). Interestingly, Peer et al. (2017) have shown that these networks extend deeper than the border of the WM and GM, indicating that signals arise from activity within the WM itself, which supports the interpretation of our results.

In TLE, the involvement of the neocortical WM has been confirmed by MRI (Concha et al., 2009; Nagy et al., 2016; Riley et al., 2010). More widespread diffusion abnormalities have been observed in the WM tracts of the temporal lobe in mesial temporal sclerosis than in non-lesional TLE (Liu et al., 2012). Using fMRI, results indicated functional disruption in WM networks in mesial temporal sclerosis and led to the suggestion that deep WM networks are key network nodes that may contribute to massive functional alterations in the GM of TLE patients (Cui et al., 2021). Other studies indicate that heterotopic WM neurons in MCD participate to some degree in normal brain functions (Janszky et al., 2003; Muller et al., 1998; Spreer et al., 2001).

The significance of synapses in the WM of the temporal neocortex is highlighted by the correlation of optical density of SYN immunoreactivity and the postsurgical outcome of TLE patients. For the evaluation of postsurgical outcome, Engel classification was used (Engel et al., 1993). We observed significant negative correlation between postsurgical outcome of TLE patients and the optical density of SYN immunoreactivity showing that the larger optical density of SYN immunoreactivity, the better is the postsurgical outcome of the patients. Despite the low number of patients ($n = 4$), tendency could be found between the postsurgical outcome of TLE patients with MCD and the optical density of SYN immunoreactivity. A similar trend could be seen when the density of WM neurons and the postsurgical outcome of patients with MCD were correlated. These associations indicate that WM synapses might play a substantial role in the generation and maintenance of epileptic seizures in patients with MCD, and the removal of the area containing WM neurons and synapses largely contributed to the favorable postsurgical outcome of the patients. According to a previous study, the increased density of WM neurons was associated with a worse outcome of TLE patients following surgery (Kasper et al., 1999). However, Hardiman et al. (1988) and Thom et al. (2001) have found an association of the presence of WM neurons with a favorable post-surgical outcome in TLE. Our results are in harmony with their data, and extend it with the finding that in addition to neurons, larger density of synapses in the WM is also associated with a better postoperative outcome.

The exact way and the time of formation of WM synapses on WM neurons, however, are still unclear, and two basic explanations may occur. It may be due to abnormal cortical development that is highlighted by the larger number of neurons in the WM (Hardiman et al., 1988; Kasper et al., 1999; Richter et al., 2016; Thom et al., 2001) and the significant correlation found between the density of WM neurons and synapses. The increased SYN density in the WM found in our study suggests that WM neurons receive synaptic input, although the origin of these axons could not be verified with the histological technique we used. WM synapses may be formed by cortical neurons in normal position and the subcortical origin can also be a possibility. Another option might be that WM neurons terminate on each other and form abnormal subcortical circuitries which may be part of epileptic networks and play a role in the development and maintenance of epilepsy. In an animal model of cortical dysgenesis, complex synaptic responses were observed upon electrical stimulation of the adjacent WM which suggest that heterotopic neurons can form local excitatory and inhibitory synaptic connections and may participate in epileptiform events (Smith et al., 1999). Another explanation for the high density of WM synapses can be

synaptic reorganization that is a known feature in epilepsy (Colciaghi et al., 2014; Maglóczy, 2010; Tóth et al., 2010). Axonal sprouting and synapse formation are due to the stimulating effect of trophic factors (Cronin et al., 1992; Peng et al., 2013; Represa and Ben-Ari, 1997). A similar phenomenon is also plausible in the neocortical WM, which may increase the number of synapses.

Our work indicates the functional importance of WM neurons and synapses, although, further research is needed about the exact role of them in TLE. The presence of functional networks within the WM may open new avenues of research in cognitive and clinical neuroscience.

4. Experimental procedures

4.1. Patients

Surgically removed tissue of the middle temporal gyrus of pharmacotherapy-resistant TLE patients ($n = 14$) were used in this study. In 10 patients HS, in four patients MCD have been verified with magnetic resonance imaging (MRI). In addition, in HS patients, neuropathological examination revealed typical neuronal loss in Ammon's horn and in the hilus of the dentate gyrus. The hippocampal and cortical sections of TLE patients have been partly used in previous studies as well (Ábrahám et al., 2011; Karádi et al., 2012; Richter et al., 2016). Demographics and clinical data of TLE patients used in this study are summarized in Table 1.

TLE patients have been evaluated in the Epilepsy Center of the Department of Neurology of the University of Pécs Medical School (UPMS), and surgery has been performed in the Department of Neurosurgery under general anesthesia, through a standard temporal craniotomy. Fixation of tissue samples has been started immediately after the removal.

4.2. Controls

Neocortical WM of temporal lobe tissues from non-epileptic patients with intracranial tumor ($n = 3$) and from autopsy ($n = 3$) were used as controls. Demographics and clinical data of controls are summarized in Table 2.

Neurosurgery of non-epileptic patients ($n = 3$) has been performed in the Department of Neurosurgery of UPMS, because of rapidly growing brain tumors in the temporal neocortex. Resections have been done for strictly therapeutic reasons and temporal lobectomy has been indicated to guarantee safe and radical removal of the tumor. To ensure this, the tumor was removed with a margin of 2 cm to 3 cm intact temporal neocortex. Fixation of tissue samples has been started immediately after the removal. Histological diagnosis of the tumor was performed in the Department of Pathology at UPMS. In the intact temporal neocortex, histological examinations revealed no peritumoral tissue changes or infiltration of the tumor. The intact peritumoral WM tissues used in this study were examined by Ki-67 immunohistochemistry in our laboratory. All procedures including the surgery were carried out with the adequate understanding and written consent of the patients. Tissue samples were processed and histological evaluation has been carried out according to the institutional regulation (PTE KK RIKEB/5342). In addition, regulations of the Hungarian Ministry of Health and the policy of Declaration of Helsinki has been followed.

Autopsy samples have been received from the Human Brain Research Laboratory of the Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungary. The control subjects were processed for autopsy in the Department of Pathology of Saint Borbála Hospital, Tatabánya, Hungary. Informed consent was obtained for the use of brain tissue and for access to medical records for research purposes. Tissue was obtained and used in a manner compliant with the Declaration of Helsinki. All procedures were approved by the Regional and Institutional Committee of Science and Research Ethics of Scientific Council of Health (ETT TUKEB 15032/2019/EKU). Control subjects died from causes unrelated

Table 1
Demographics and clinical data of patients with temporal lobe epilepsy.

Case number	Age (Y)	Gender	Age at onset (Y)	Duration (Y)	Seizure frequency	MR-diagnosis	Affected side	IPI
1	25	M	5	20	6–7/m	HS	L	FS
2	29	M	14	15	4/m	HS	R	FS
3	48	M	8	40	6–8/m	HS	R	FS
4	51	F	22	29	1–4/m	HS	L	–
5	40	M	11	29	1–2/m	HS	L	–
6	27	F	19	8	2–4/w	HS	R	–
7	50	M	4	46	1–2/m	HS	R	–
8	48	F	4	44	6/m	HS	L	FS
9	34	F	23	11	5–8/m	HS	L	–
10	48	F	28	20	2–3/w	HS	L	–
11	48	F	38	10	6–8/m	MCD	L	–
12	33	F	4	29	6–10/m	MCD	L	–
13	32	F	14	18	1–6/d	MCD	R	–
14	19	M	7	12	2–3/d	MCD	L	–

Table 2
Demographics and clinical data of controls.

Tumor patients	Age (Y)	Gender	Tumor location on MRI	Side of tumor	Histopathological diagnosis
1	39	M	Parahippocampal, piriform gyri	R	Glioblastoma, WHO Grade IV
2	74	F	Temporal pole, hippocampus, parahipp. gyrus	R	Astrocytoma, WHO Grade III
3	38	F	Fronto-insulo-temporal cortex, hippocampus, parahipp. gyrus	R	Glioblastoma WHO Grade IV
Autopsy patients	Age (Y)	Gender	Side of the examined cortex	Cause of death	
1	77	M	L	Cardiac arrest	
2	60	F	R	Respiratory arrest	
3	72	M	R	Respiratory arrest	

to any brain disease and the clinical data or the autopsy did not show any signs of neurological disorders. The control brains ($n = 3$) were removed 2–4 h after death, the internal carotid and vertebral arteries were cannulated, and the brains were perfused first with physiological saline (1.5 L in 30 min) containing 5 ml of heparin, followed by a fixative solution containing 4% paraformaldehyde, 0.05% glutaraldehyde and 15% picric acid in phosphate buffer (PB, pH 7.4), (4–5 L in 1.5–2 h). After perfusion, 0.5–1 cm thick blocks were cut from the temporal cortical region Brodmann area 21 and post-fixed in the Zamboni solution without glutaraldehyde overnight (Magloczky et al., 1997; Tóth et al., 2010). Following fixation, blocks were cryo-protected in 30% of sucrose diluted in PB for two days, deep-frozen over liquid nitrogen and stored at -80°C .

4.3. Tissue processing

The cortical tissues resected from TLE and tumor patients were immediately put in fixative containing 4% paraformaldehyde (PFA) buffered with phosphate buffer (PB, 0.1 M, pH 7.4) and tissues were fixed for 12 h at 4°C . Autopsy samples were stored following a deep-freezing procedure as described above. Fixation of tissue samples in 4% PFA buffered with PB (0.1 M, pH 7.4) was carried out immediately after melting, then blocks were fixed for an additional 12 h.

Tissue blocks containing neocortical WM and gray matter (GM) were embedded into paraffin and 10 μm thin sections were cut with a sliding-microtome and mounted on gelatin-coated glass slides. Other parts of tissue blocks of surgically removed samples of TLE patients were cut with vibratome at 80 μm , and free-floating sections were processed for immunohistochemistry.

4.3.1. Synaptophysin immunohistochemistry for light microscopy

Following the removal of paraffin, immunohistochemistry was performed according to described earlier (Ábrahám et al., 2001). Briefly, deparaffinization was followed by the washing of sections in Tris-buffer (TRIS 0.1 M, pH 7.4). Antigen retrieval was performed with citrate buffer (pH 6.0) in a microwave oven (800 W), and sections were heated three times for 5 min (min) each. This step was followed by pre-

incubation of sections in 10% normal horse serum diluted in TRIS containing 0.4% Triton X-100 for 1 h. Incubation with the primary mouse monoclonal anti-SYN (Novocastra, New Castle upon Tyne, 1:400) antibody diluted in TRIS was carried out in a humid chamber overnight at room temperature. Binding sites were visualized with biotinylated secondary antibody and with the avidin–biotin peroxidase detection system (Universal Vectastain ABC Elite Kit, Vector, Burlingame, CA). The chromogen was 3,3'-diaminobenzidine (DAB).

4.3.2. NeuN immunohistochemistry for light microscopy

Immunohistochemistry detecting WM neurons expressing NeuN pan-neuronal antigen was carried out as previously published (Richter et al., 2016). Briefly, 80 μm thin free-floating sections were pretreated with 1% H_2O_2 diluted in TRIS for 20 min, then pre-incubated in 10% normal horse serum in TRIS containing 0.4% Triton X-100. This step was followed by incubation with monoclonal anti-NeuN (Chemicon, Temecula, CA, USA, 1:500) primary antibody overnight at room temperature. Binding sites were visualized with biotinylated secondary antibody and avidin–biotin peroxidase detection system (Universal Vectastain ABC Elite Kit, Vector, Burlingame, CA) using DAB as chromogen.

4.3.3. Synaptophysin immunoelectron microscopy

In order to visualize synapses with transmission electron microscope (TEM), preparations of neocortical tissues of TLE patients for immunoelectron microscopy have also been done. Therefore, PFA-fixed blocks of temporal lobe were cut with vibratome at 80 μm . Free-floating sections were subjected to „freeze-thaw” process to enhance penetration of antibodies. Sections were cryoprotected in 15%, then in 30% solution of sucrose diluted in PB, and they were „freeze-thawed” by placing them three times above liquid nitrogen. After this pretreatment, indirect immunoreaction was performed using primary anti-SYN antibody (Novocastra, New Castle upon Tyne, 1:400). Binding sites were visualized with biotinylated secondary antibody and avidin–biotin peroxidase detection system (Vector, Burlingame, CA). The immunoreaction was visualized with DAB. Post-fixation of the sections was performed with 2.5% glutaraldehyde and then with 1% osmium-tetroxide diluted in PB. Subsequently, sections were dehydrated with increasing concentrations

of ethyl alcohol, cleared with propylene oxide, then were flat-embedded in Durcupan resin (Sigma-Aldrich, Budapest). Region of interest in the WM was re-embedded in Durcupan resin using gelatin capsules. Ultrathin sections were cut at 65 nm with ultramicrotome (Leica Ultracut, Germany). Then sections were placed on a single-slot grid covered with parlodion membrane. Uranyl-acetate and lead-citrate were used for contrasting the sections which were examined in JEOL 1200 EX-II and JEM-1400Flash transmission electron microscopes (TEM).

4.4. Quantification

4.4.1. Determination of neuronal density

Details of quantification of NeuN-immunoreactive neurons in cortical WM of the temporal neocortex was previously published (Richter et al., 2016). Since the neuronal density differs in the superficial and deep parts of WM, quantification was carried out approximately 500–700 μm below the border between the GM and the WM. In the neocortical WM, NeuN-immunoreactive neurons were counted using an image analyzer system consisting of a Nikon Optiphot 2 microscope equipped with a MicroBrightfield Lucivid, computer-controlled motorized stage attached to a computer running NeuroLucida software (NeuroLucida 2.0, MicroBrightfield Inc., Williston, VT). The number of immunoreactive neurons in the deep WM of the sections of each patient were determined and pooled, then data were averaged, and the density of NeuN-immunoreactive cells was expressed as neurons/ $\text{mm}^2 \pm$ standard deviation (SD).

4.4.2. Determination of synaptophysin immunoreactivity

Determination of the optical density of SYN-immunoreactive profiles was performed in the WM of the temporal neocortex. Measurements were carried out on digital pictures taken with an Olympus BX50 light microscope using 20X magnifying objective lens in the deep neocortical WM, approximately 500 μm below the GM. In black and white (BW) images of the neocortical WM, the density of SYN-immunoreactive profiles was determined using an Image J software (NIH, US-supported image analyzer) that measured the intensity of pixels and expressed it as numerical values without measure unit. Two or three sections per tissue blocks were photographed in each patient. As an average, 10.5 BW photos were captured and analyzed per section.

The density of SYN-immunoreactive profiles and that of the background staining were separately measured. The real optical density of SYN-immunoreactivity was calculated by subtracting intensity values of the SYN from intensity values of the background, the average \pm SD was determined.

4.5. Memory tests

Preoperative verbal and visual memory performance of TLE patients were tested. Verbal attention was measured with the forward version of the digit span task. Visual attention was assessed using forward version of the Corsi Block-Tapping task (Lezak et al., 2004). Visual construction ability and memory were assessed using the Rey–Osterrieth Complex Figure (ROCF) test. After copying the ROCF, the patient had to draw it from memory in delayed recall (30 min). In the ROCF test, a standard Taylor's scoring system was administered with a maximum of 36 points over copying and memory versions. Each figure was divided into 18 different blocks. When the subject drew properly placed, correct blocks, 2 points were given. Properly placed and distorted or poorly placed and correct blocks were rated with 1 point. Distorted, poorly placed blocks were scored with half point. In case of absent or unrecognizable blocks, no points were given (Hodges, 1996). Verbal learning and memory were tested using a Hungarian version of the Rey auditory verbal learning test (AVLT). The AVLT measures verbal learning ability using 15 common nouns (A and B lists). Five presentations of the A list were given. After each presentation, the subject had to recall the words from the list. Learning was evaluated over five trials. After the 5th trial, the B list was

read, and the subject had to remember this new list (interference trial). In the 7th trial, the subject recalled the A list without auditory presentation. The 8th trial presented the delayed recall after 20 min. After testing, we evaluated the total learning score (TL) by the total number of learned words over the first five trials, short-term retention on the 7th trial, long-term retention on the 8th trial and the interference (remembered number of words of B list).

4.6. Statistical analysis

Optical density of SYN-immunoreactivity in autopsy controls was compared to biopsy controls with Student's *t*-test. Similarly, Student's *t*-test was used for the comparison of optical density of SYN-immunoreactivity in TLE patients and in controls. Optical density of SYN-immunoreactivity and the density of WM neurons, as well as clinical and cognitive data of TLE patients were correlated with Spearman's correlation and linear regression, respectively. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$. Statistical analyses were performed by IBM SPSS software package (version 25. SPSS Inc, MN).

CRediT authorship contribution statement

Noémi Söki: Investigation, Visualization, Writing – original draft, Formal analysis. **Zsófia Richter:** Investigation, Writing – review & editing. **Kázmér Karádi:** Investigation, Writing – review & editing, Formal analysis. **Katalin Lőrincz:** Investigation. **Réka Horváth:** Resources. **Csilla Gyimesi:** Resources. **Cecília Szekeres-Paraczký:** Resources, Writing – review & editing. **Zsolt Horváth:** Resources. **József Janszky:** Resources, Writing – review & editing. **Tamás Dóczy:** Resources, Writing – review & editing, Funding acquisition. **László Seress:** Writing – review & editing, Supervision. **Hajnalka Ábrahám:** Writing – original draft, Writing – review & editing, Funding acquisition, Supervision.

Acknowledgments

The authors wish to thank Tünde Faragó and Dr. Judit Misley Lórándné (Department of Medical Biology and Central Electron Microscopic Laboratory, University of Pécs Medical School) for the excellent technical assistance.

Funding

This work was supported by the Hungarian Brain Research Program NAP 2.0 (2017-1.2.1-NKP-2017-00002), by National Research, Development and Innovation Fund of Hungary (NKFIH) K125436, by PTE EFOP-3.6.1.-16-2016-00004 and by project no. TKP2020-IKA-08 that has been implemented with the support provided from the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, financed under the 2020-4.1.1-TKP2020 funding scheme and by the Thematic Excellence Program 2021 Health Sub-programme of the Ministry for Innovation and Technology in Hungary, within the framework of the EGA-16 project of the Pécs of University. JEOL JEM-1400Flash TEM electron microscope was funded by the GINOP-2.3.3-15-2016-00026 (New generation electron microscope: 3D ultrastructure).

References

- Ábrahám, H., Tornóczky, T., Kosztolányi, G., Seress, L., 2001. Cell formation in the cortical layers of the developing human cerebellum. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19, 53–62. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(00\)00065-4](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(00)00065-4).
- Ábrahám, H., Richter, Z., Gyimesi, C., Horváth, Z., Janszky, J., Dóczy, T., Seress, L., 2011. Degree and pattern of calbindin immunoreactivity in granule cells of the dentate gyrus differ in mesial temporal sclerosis, cortical malformation- and tumor-related epilepsies. *Brain Res.* 1399, 66–78. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.05.010>.
- Akbarian, S., Bunney, W.E., Potkin, S.G., Wigal, S.B., Hagman, J.O., Sandman, C.A., Jones, E.G., 1993. Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of

- cortical development. *Arch. Gen. Psychiatry* 50, 169–177. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1993.01820150007001>.
- Alder, J., Xie, Z.P., Valtorta, F., Greengard, P., Poo, M., 1992. Antibodies to synaptophysin interfere with transmitter secretion at neuromuscular synapses. *Neuron* 9, 759–768. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90038-F](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90038-F).
- Alexander, R.P., Concha, L., Snyder, T.J., Beaulieu, C., Gross, D.W., 2014. Correlations between Limbic White Matter and Cognitive Function in Temporal-Lobe Epilepsy. Preliminary Findings. *Front. Aging Neurosci.* 6, 142. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00142>.
- Armbruszt, S., Figler, M., Ábrahám, H., 2015. Stability of CART peptide expression in the nucleus accumbens in aging. *Acta Biol. Hung.* 66, 1–13. <https://doi.org/10.1556/abiol.66.2015.1.1>.
- Becher, A., Drenckhahn, A., Pahnner, I., Margittai, M., Jahn, R., Ahnert-Hilger, G., 1999. The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J. Neurosci.* 19, 1922–1931. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-06-01922.1999>.
- Blümcke, I., 2009. Neuropathology of focal epilepsies: a critical review. *Epilepsy Behav.* 15, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.02.033>.
- Blümcke, I., Thom, M., Wiestler, O.D., 2002. Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol.* 12, 199–211. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2002.tb00436.x>.
- Bragina, L., Candracchi, C., Barbarelli, P., Giovedi, S., Benfenati, F., Conti, F., 2007. Heterogeneity of glutamatergic and GABAergic release machinery in cerebral cortex. *Neuroscience* 146, 1829–1840. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.02.060>.
- Calhoun, M.E., Jucker, M., Martin, L.J., Thinkaran, G., Price, D.L., Mouton, P.R., 1996. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J. Neurocytol.* 25, 821–828. <https://doi.org/10.1007/BF02284844>.
- Chun, J.J., Shatz, C.J., 1989. Interstitial cells of the adult neocortical white matter are the remnant of the early generated subplate neuron population. *J. Comp. Neurol.* 282, 555–569. <https://doi.org/10.1002/cne.902820407>.
- Colciaghi, F., Finardi, A., Nobili, P., Locatelli, D., Spigolon, G., Battaglia, G.S., 2014. Progressive brain damage, synaptic reorganization and NMDA activation in a model of epileptogenic cortical dysplasia. *PLoS ONE* 9, e89898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089898>.
- Concha, L., Beaulieu, C., Collins, D.L., Gross, D.W., 2009. White-matter diffusion abnormalities in temporal-lobe epilepsy with and without mesial temporal sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 80, 312–319. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.139287>.
- Cronin, J., Obenaus, A., Houser, C.R., Dudek, F.E., 1992. Electrophysiology of dentate granule cells after kainate-induced synaptic reorganization of the mossy fibers. *Brain Res.* 573, 305–310. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90777-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90777-7).
- Cui, W., Shang, K., Qiu, B., Lu, J., Gao, J.H., 2021. White matter network disorder in mesial temporal epilepsy: An fMRI study. *Epilepsy Res.* 172, 106590. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2021.106590>.
- Ding, Z., Xu, R., Bailey, S.K., Wu, T., Morgan, V.L., Cutting, L.E., Anderson, A.W., Gore, J. C., 2016. Visualizing functional pathways in the human brain using correlation tensors and magnetic resonance imaging. *Magn. Reson. Imaging* 34, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2015.10.003>.
- Durnford, A.J., Rodgers, W., Kirkham, F.J., Mullee, M.A., Whitney, A., Prevett, M., Kinton, L., Harris, M., Gray, W.P., 2011. Very good inter-rater reliability of Engel and ILAE epilepsy surgery outcome classifications in a series of 76 patients. *Seizure* 20, 809–812. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2011.08.004>.
- Eastwood, S.L., Harrison, P.J., 2005. Interstitial white matter neuron density in the dorsolateral prefrontal cortex and parahippocampal gyrus in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 79, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2005.07.001>.
- Edelmann, L., Hanson, P.I., Chapman, E.R., Jahn, R., 1995. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.* 14, 224–231. PMID: PMC398074.
- Emery, J.A., Roper, S.N., Rojiani, A.M., 1997. White matter neuronal heterotopia in temporal lobe epilepsy: a morphometric and immunohistochemical study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 1276–1282. <https://doi.org/10.1097/00005072-199712000-00002>.
- Engel, J., Cascino, G.D., Ness, P.C.V., Rasmussen, T.B., Ojemann, L.M., 1993. Outcome with respect to epileptic seizures. In: Engel, J. (Ed.), *Surgical treatment of the epilepsies*. Raven Press, New York.
- Gaardsvoll, H., Obendorf, D., Winkler, H., Bock, E., 1988. Demonstration of immunochemical identity between the synaptic vesicle proteins synaptin and synaptophysin/p38. *FEBS Lett.* 242, 117–120. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80997-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80997-9).
- Grönberg, M., Pavlos, N.J., Brunk, I., Chua, J.J., Münster-Wandowski, A., Riedel, D., Ahnert-Hilger, G., Urlaub, H., Jahn, R., 2010. Quantitative comparison of glutamatergic and GABAergic synaptic vesicles unveils selectivity for few proteins including MAL2, a novel synaptic vesicle protein. *J. Neurosci.* 30, 2–12. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4074-09.2010>.
- Gusel'nikova, V.V., Korzhevskiy, D.E., 2015. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae* 7, 42–47. PMID: PMC4463411.
- Hardiman, O., Burke, T., Phillips, J., Murphy, S., O'Moore, B., Staunton, H., Farrell, M.A., 1988. Microdysgenesis in resected temporal neocortex: incidence and clinical significance in focal epilepsy. *Neurology* 38, 1041–1047. <https://doi.org/10.1212/WNL.38.7.1041>.
- Hodges, J.R., 1996. *Cognitive assessment for clinicians*. Oxford University Press, Oxford.
- Howe, K.L., Dimitri, D., Heyn, C., Kiehl, T.R., Mikulis, D., Valiante, T., 2010. Histologically confirmed hippocampal structural features revealed by 3T MR imaging: potential to increase diagnostic specificity of mesial temporal sclerosis. *Am. J. Neuroradiol.* 31, 1682–1689. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A2154>.
- Janszky, J., Ebner, A., Kruse, B., Mertens, M., Jokeit, H., Seitz, R.J., Witte, O.W., Tuxhorn, I., Woermann, F.G., 2003. Functional organization of the brain with malformations of cortical development. *Ann. Neurol.* 53, 759–767. <https://doi.org/10.1002/ana.10545>.
- Judaš, M., Sedmak, G., Pletikos, M., Jovanov-Milošević, N., 2010. Populations of subplate and interstitial neurons in fetal and adult human telencephalon. *J. Anat.* 217, 381–399. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01284.x>.
- Karádi, K., Janszky, J., Gyimesi, C., Horváth, Z., Lucza, T., Dóczi, T., Kállai, J., Ábrahám, H., 2012. Correlation between calbindin expression in granule cells of the resected hippocampal dentate gyrus and verbal memory in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 25, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.06.007>.
- Kasper, B.S., Stefan, H., Buchfelder, M., Paulus, W., 1999. Temporal lobe microdysgenesis in epilepsy versus control brains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 22–28. <https://doi.org/10.1097/00005072-199901000-00003>.
- Kirkpatrick, B., Conley, R.C., Kakoyannis, A., Reep, R.L., Roberts, R.C., 1999. Interstitial cells of the white matter in the inferior parietal cortex in schizophrenia: an unbiased cell-counting study. *Synapse* 34, 95–102. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199911\)34:2<95::AID-SYN2>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199911)34:2<95::AID-SYN2>3.0.CO;2-I).
- Kirkpatrick, B., Messias, N.C., Conley, R.R., Roberts, R.C., 2003. Interstitial cells of the white matter in the dorsolateral prefrontal cortex in deficit and nondeficit schizophrenia. *J. Nerv. Ment. Dis.* 191, 563–567. <https://doi.org/10.1097/01.nmd.00000087181.61164.e1>.
- Kostovic, I., Rakic, P., 1990. Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J. Comp. Neurol.* 297, 441–470. <https://doi.org/10.1002/cne.902970309>.
- Kowall, N.W., Beal, M.F., 1988. Cortical somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH diaphorase neurons, normal anatomy and alterations in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 23, 105–114. <https://doi.org/10.1002/ana.410230202>.
- Lehericy, S., Semah, F., Hasboun, D., Dormont, D., Clemenceau, S., Granat, O., Marsault, C., Baulac, M., 1997. Temporal lobe epilepsy with varying severity: MRI study of 222 patients. *Neuroradiology* 39, 788–796. <https://doi.org/10.1007/s002340050507>.
- Lezak, M., 2004. *Neuropsychological Assessment*. Oxford University Press, New York.
- Liu, M., Concha, L., Lebel, C., Beaulieu, C., Gross, D.W., 2012. Mesial temporal sclerosis is linked with more widespread white matter changes in temporal lobe epilepsy. *Neuroimage Clin.* 1, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2012.09.010>.
- Liu, J.Y., Ellis, M., Brooke-Ball, H., de Tisi, J., Eriksson, S.H., Brandner, S., Sisodiya, S.M., Thom, M., 2014. High-throughput, automated quantification of white matter neurons in mild malformation of cortical development in epilepsy. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 72. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-72>.
- Maglóczy, Z., 2010. Sprouting in human temporal lobe epilepsy: excitatory pathways and axons of interneurons. *Epilepsy Res.* 89, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2010.01.002>.
- Maglóczy, Z., Halasz, P., Vajda, J., Czirjak, S., Freund, T.F., 1997. Loss of Calbindin-D28K immunoreactivity from dentate granule cells in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 76, 377–385. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00440-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00440-X).
- Meyer, G., Wahle, P., Castaneya-Perdomo, A., Ferrer-Torres, R., 1992. Morphology of neurons in the white matter of the adult human neocortex. *Exp. Brain Res.* 88, 204–212. <https://doi.org/10.1007/BF02259143>.
- Micheva, K.D., Busse, B., Weiler, N.C., O'Rourke, N., Smith, S.J., 2010. Single-synapse analysis of a diverse synapse population: proteomic imaging methods and markers. *Neuron* 68, 639–6353. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.024>.
- Mrzljak, L., Uylings, H.B., Kostovic, I., Van Eden, C.G., 1988. Prenatal development of neurons in the human prefrontal cortex: I. A qualitative Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 271, 355–386. <https://doi.org/10.1002/cne.902710306>.
- Mullen, R.J., Buck, C.R., Smith, A.M., 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201–211. PMID: 1483388.
- Muller, R.A., Behen, M.E., Muzik, O., Rothermel, R.D., Downey, R.A., Mangner, T.J., Chugani, H.T., 1998. Task-related activations in heterotopic brain malformations: a PET study. *NeuroReport* 9, 2527–2533. <https://doi.org/10.1097/00001756-199808030-00019>.
- Nagy, S.A., Horváth, R., Perlaki, G., Orsi, G., Barsi, P., John, F., Horváth, A., Kovács, N., Bogner, P., Ábrahám, H., Bóné, B., Gyimesi, C., Dóczi, T., Janszky, J., 2016. Age at onset and seizure frequency affect white matter diffusion coefficient in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 61, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.04.019>.
- Peng, Z., Zhang, N., Wei, W., Huang, C.S., Cetina, Y., Otis, T.S., Houser, C.R., 2013. A reorganized GABAergic circuit in a model of epilepsy: evidence from optogenetic labeling and stimulation of somatostatin interneurons. *J. Neurosci.* 33, 14392–14405. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2045-13.2013>.
- Peer, M., Nitzan, M., Bick, A.S., Levin, N., Arzy, S., 2017. Evidence for Functional Networks within the Human Brain's White Matter. *J. Neurosci.* 37, 6394–6407. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3872-16.2017>.
- Represa, A., Ben-Ari, Y., 1997. Molecular and cellular cascades in seizure-induced neosynapse formation. *Adv. Neurol.* 72, 25–34. PMID: 8993681.
- Reyes, A., Kaestner, E., Bahrami, N., Balachandra, A., Hegde, M., Paul, B.M., Hermann, B., McDonald, C.R., 2019. Cognitive phenotypes in temporal lobe epilepsy are associated with distinct patterns of white matter network abnormalities. *Neurology* 92, 1957–1968. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000007370>.
- Rehm, H., Wiedenmann, B., Betz, H., 1986. Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *EMBO J.* 5, 535–541. PMID: PMC1166795.
- Richter, Z., Janszky, J., Sétáló Jr., G., Horváth, R., Horváth, Z., Dóczi, T., Seress, L., Ábrahám, H., 2016. Characterization of neurons in the cortical white matter in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 333, 140–150. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.011>.

- Riley, J.D., Franklin, D.L., Choi, V., Kim, R.C., Binder, D.K., Cramer, S.C., Lin, J.J., 2010. Altered white matter integrity in temporal lobe epilepsy: association with cognitive and clinical profiles. *Epilepsia*. 51, 536–545. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02508.x>.
- Rodríguez-Cruces, R., Velázquez-Pérez, L., Rodríguez-Leyva, I., Velasco, A.L., Trejo-Martínez, D., Barragán-Campos, H.M., Camacho-Téllez, V., Concha, L., 2018. Association of white matter diffusion characteristics and cognitive deficits in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 79, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.11.040>.
- Sarnat, H.B., Nochlin, D., Born, D.E., 1998. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system. *Brain Dev.* 20, 88–94. [https://doi.org/10.1016/S0387-7604\(97\)00111-3](https://doi.org/10.1016/S0387-7604(97)00111-3).
- Schmitt, U., Tanimoto, N., Seeliger, M., Schaeffel, F., Leube, R.E., 2009. Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience* 162, 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.04.046>.
- Smith, B.N., Dudek, F.E., Roper, S.N., 1999. Synaptic responses of neurons in heterotopic gray matter in an animal model of cortical dysgenesis. *Dev. Neurosci.* 21, 365–373. <https://doi.org/10.1159/000017386>.
- Spreer, J., Martin, P., Greenlee, M.W., Wohlfarth, R., Hammen, A., Arnold, S.M., Schumacher, M., 2001. Functional MRI in patients with band heterotopia. *Neuroimage*. 14, 357–365. <https://doi.org/10.1006/nimg.2001.0813>.
- Suárez-Solá, M.L., González-Delgado, F.J., Pueyo-Morlans, M., Medina-Bolívar, O.C., Hernández-Acosta, N.C., González-Gómez, M., Meyer, G., 2009. Neurons in the white matter of the adult human neocortex. *Front. Neuroanat.* 3, 7. <https://doi.org/10.3389/neuro.05.007.2009>.
- Südhof, T.C., Lottspeich, F., Greengard, P., Mehl, E., Jahn, R., 1987. A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions. *Science* 238, 1142–1144. <https://doi.org/10.1126/science.3120313>.
- Tao, Z., Van Gool, D., Lammens, M., Dom, R., 1999. NADPH-diaphorase-containing neurons in cortex, subcortical white matter and neostriatum are selectively spared in Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 10, 460–468. <https://doi.org/10.1159/000017190>.
- Thom, M., Sisodiya, S., Harkness, W., Scaravilli, F., 2001. Microdysgenesis in temporal lobe epilepsy. A quantitative and immunohistochemical study of white matter neurones. *Brain*. 124, 2299–2309. <https://doi.org/10.1093/brain/124.11.2299>.
- Thomas, L., Hartung, K., Langosch, D., Rehm, H., Bamberg, E., Franke, W.W., Betz, H., 1988. Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science* 242, 1050–1053. <https://doi.org/10.1126/science.2461586>.
- Tóth, K., Eross, L., Vajda, J., Halász, P., Freund, T.F., Maglóczy, Z., 2010. Loss and reorganization of calretinin-containing interneurons in the epileptic human hippocampus. *Brain*. 133, 2763–2777. <https://doi.org/10.1093/brain/awq149>.
- Van de Nes, J.A., Sandmann-Keil, D., Braak, H., 2002. Interstitial cells subjacent to the entorhinal region expressing somatostatin-28 immunoreactivity are susceptible to development of Alzheimer's disease-related cytoskeletal changes. *Acta Neuropathol.* 104, 351–356. <https://doi.org/10.1007/s00401-002-0551-7>.
- Wiedenmann, B., Franke, W.W., 1985. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41, 1017–1028. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(85\)80082-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(85)80082-9).
- Wolf, H.K., Buslei, R., Schmidt-Kastner, R., Schmidt-Kastner, P.K., Pietsch, T., Wiestler, O.D., Blümcke, I., 1996. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J. Histochem. Cytochem.* 44, 1167–1171. <https://doi.org/10.1177/44.10.8813082>.
- Wu, T., Wang, F., Anderson, A.W., Chen, L.M., Ding, Z., Gore, J.C., 2016. Effects of anesthesia on resting state BOLD signals in white matter of non-human primates. *Magn. Reson. Imaging* 34, 1235–1241. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2016.07.001>.