

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Ľubica Demeterová

**Morfologické změny hipokampu v tetanotoxínovém modelu
temporální epilepsie**

**Morphological changes of the hippocampus in tetanus toxin model of
temporal lobe epilepsy**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. MUDr. Přemysl Jiruška, Ph.D.

Praha 2015

Prehlásenie

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30.04.2015

Podpis

Pod'akovanie

Chcela by som pod'akovať svojmu školiteľovi, doc. MUDr. Přemyslovi Jiruškovi, Ph.D., za trpezlivosť, rady, ochotu a čas, ktoré mi venoval pri vypracovaní mojej diplomovej práce.

Ďalej by som rada pod'akovala doc. MUDr. Jakobovi Otáhalovi, PhD. za mnohé konzultácie, Ing. Janovi Kudláčkovi, DiS. a Ing. Pavlovi Vlčkovi za pomoc s operačnými výkonmi a podporu.

Veľká vďaka tiež patrí mojim rodičom a priateľom za podporu v štúdiu a pomoc pri písaní tejto práce.

Abstrakt v slovenskom jazyku

Epilepsia vychádzajúca z temporálneho laloku predstavuje jej najčastejšiu formu, ktorá je často doprevádzaná farmakorezistenciou. V dôsledku absencie typickej epileptogénnej lézie - hipokampálnej sklerózy - je tetanotoxínový model považovaný za model nelezionálnej formy temporálnej epilepsie. Cieľom tejto práce bolo ozrejmiť s pomocou histochemických metód (Nisslovo farbenie, FluoroJade B) detekujúcich bunkové poškodenie, či v rámci tohoto modelu dochádza ku strate neurónov pri absencii makroskopickej lézie. Epilepsia bola vyvolaná u dospelých potkanov unilaterálnou aplikáciou tetanotoxínu do CA3 oblasti dorzálneho hipokampu. Mozgové tkanivo bolo odobrané 4, 8 a 16 dní po operácii. Výsledky potvrdili nelezionálnu povahu tetanotoxínového modelu TLE. K rozvoju epileptického syndrómu u potkanov dochádzalo aj bez straty neurónov v oblasti hipokampálnej formácie. Hipokampálna skleróza bola detekovaná v kontralaterálnej CA1 u 40 % zvierat v skupine D16 a slepá štúdia naše výsledky potvrdila. Časový profil degenerácie ukázal negatívny nález v skupine D4 a zaznamenali sme posun degenerácie buniek z ipsilaterálnej CA1 v 8. dni na kontralaterálnu CA1 v 16. dni od aplikácie. Táto práca prináša nové poznatky ohľadom morfológických vlastností tetanotoxínového modelu. Strata neurónov je prítomná v špecifických oblastiach hipokampu a kvalitatívne má odlišný charakter v porovnaní s lezionálnymi modelmi temporálnej epilepsie.

Kľúčové slová: strata buniek, hipokampus, hipokampálna skleróza, temporálna epilepsia, tetanotoxínový model

Abstrakt v českém jazyku

Epilepsie vycházející z temporálního laloku představuje její nejčastější formu, která je často doprovázená farmakorezistencí. V důsledku absence typické epileptogenní léze - hipokampální sklerózy - je tetanotoxinový model považován za model nelezionální formy temporální epilepsie. Cílem této práce bylo ozřejmit s pomocí histochemických metod (Nisslovo barvení, FluoroJade B) detekujících buněčné poškození, zda-li v rámci tohoto modelu dochází ke ztrátě neuronů při absenci makroskopické léze. Epilepsie byla vyvolána u dospělých potkanů unilaterální aplikací tetanotoxinu do CA3 oblasti dorzálního hipokampu. Mozková tkáň byla odebrána 4, 8 a 16 dní po operaci. Výsledky potvrdily nelezionální povahu tetanotoxinového modelu TLE. K rozvoji epileptického syndromu u potkanů docházelo i bez ztráty neuronů v oblasti hipokampální formace. Hipokampální skleróza byla detekovaná v kontralaterální CA1 u 40 % zvířat ve skupině D16 a slepá studie naše výsledky potvrdila. Časový profil degenerace ukázal negativní nález ve skupině D4 a zaznamenali jsme posun degenerace buněk z ipsilaterální CA1 v 8. dni na kontralaterální CA1 v 16. dni od aplikace. Tato práce přináší nové poznatky ohledně morfologických vlastností tetanotoxinového modelu. Ztráta neuronů je přítomna ve specifických oblastech hipokampu a kvalitativně má odlišný charakter ve srovnání s lezionálními modely temporální epilepsie.

Klíčová slova: ztráta buněk, hipokampus, hipokampální skleróza, temporální epilepsie, tetanotoxinový model

Abstract

Temporal lobe epilepsy is the most common form of epilepsy and hippocampal sclerosis represents the main underlying structural abnormality. Approximately 20% of TLE cases are non-lesional due to absence of any obvious epileptogenic lesion and tetanus toxin model is traditionally considered as a model of non-lesional temporal lobe epilepsy. The main aim of this study was to evaluate the presence of the cell damage and to determine its spatiotemporal profile. Tetanus toxin was stereotaxically injected into CA3 subregion of dorsal hippocampus in adult male Wistar rats. Brain tissue was extracted 4, 8 and 16 days following the surgery. Postfixed brains were sectioned to 50 μm slices and labeled using Nissl's and FluoroJade B staining (FJB). Hippocampal sclerosis was present only in animals from D16 group, however, it was localized mainly in contralateral CA1 area. Additional finding was decreased Nissl's staining in contralateral hippocampus which corresponded with the presence of FJB positive neurons. In animals from group D8, we have identified presence of FJB positive neurons predominantly in ipsilateral hippocampus. In D4 animals, cellular degeneration was absent. To examine the non-lesional nature of tetanus toxin model, we have performed blind study, when Nissl's staining were reviewed independently by two experience of neuropathologists. Results suggest that from the perspective of classical neuropathology the tetanus toxin model can be still classified as a non-lesional. This study brings new findings on morphological properties of tetanus toxin model. Neuronal loss is present in specific hippocampal subregions. The cell loss has specific time dependent spatial patten. Qualitatively this pattern differs from morphological findings observed in lesional models of temporal lobe epilepsy. Finally, presence of microscopic cell loss must be always considered when this model is used for experimental purposes.

Key words: cell loss, hippocampus, hippocampal sclerosis, temporal lobe epilepsy, tetanus toxin model

Obsah

Obsah	7
Zoznam skratiek	9
Úvod	11
1 Literárny prehľad	12
1.1 Epilepsia.....	12
1.1.1 Epilepsia temporálneho laloku.....	12
1.1.2 Hipokampálna skleróza.....	13
1.1.3 Epileptogenéza.....	15
1.2 Anatómia hipokampálnej formácie	17
1.2.1 Gyrus dentatus	18
1.2.2 Cornu Ammonis – CA oblasti hipokampu	19
1.2.3 Subikulum.....	21
1.3 Animálne modely TLE a ich neuropatologické koreláty	22
1.3.1 Modely hipokampálnej sklerózy.....	23
1.3.2 Tetanotoxínový model TLE.....	24
1.4 Tetanotoxín	25
1.4.1 Mechanizmus účinku	25
1.4.2 Substrát pre TeNT v tetanotoxínovom modeli TLE	27
1.5 Smrť buniek ako následok záchvatu	29
1.5.1 Excitotoxicita.....	29
1.5.2 Smrť neurónov	31
2 Ciele práce	34
3 Metodika	35
3.1 Príprava tetanotoxínu	35
3.2 Skupiny zvierat.....	35
3.3 Operácie zvierat	36
3.4 Videomonitoring	37
3.5 Perfúzia zvierat.....	38
3.6 Spracovanie tkaniva	39

3.7	Nisslovo farbenie	39
3.8	Histochemické farbenie FJB a DAPI	40
3.9	Vyhodnotenie Nisslovho a histochemického farbenia FJB a DAPI	41
3.10	Slepá štúdia	41
4	Výsledky	43
4.1	Optimalizácia dávky TeNT a videomonitoring.....	43
4.2	Indukcia epilepsie.....	43
4.2.1	Indukcia epilepsie u D16	43
4.2.2	Indukcia epilepsie u D4 a D8.....	43
4.3	Indukcia ischémie u slepej kontroly a farbenie pre FJB a DAPI	44
4.4	Skupina D16.....	44
4.4.1	Skupina D16 - Nisslovo farbenie.....	44
4.4.2	Výsledky slepej štúdie	46
4.4.3	Skupina D16 - histochemické farbenie FJB a DAPI	49
4.4.4	Aplikácia TeNT doľava – Nisslovo farbenie	51
4.4.5	Aplikácia TeNT doľava - histochemické farbenie FJB a DAPI	53
4.5	Skupina D8 a D4	54
4.5.1	Skupina D8 a D4 - Nisslovo farbenie	54
4.5.2	Skupina D8 - histochemické farbenie FJB a DAPI	57
4.5.3	Skupina D4 - histochemické farbenie FJB a DAPI	58
5	Diskusia	60
	Záver	64
	Použitá literatúra	65

Zoznam skratiek

AC	asociačné komisurálne spoje
APF-1	faktor 1 aktivujúci proteázu apoptózy, angl. apoptosis protease activating factor 1
ATP	adenozíntrifosfát
CA	Cornu Ammonis
cyt c	cytochróm c
D	deň po operácii
DCX	doublecortine
DG	gyrus dentatus
DH	dorzálny hipokampus
DISC	signálny komplex indukujúci smrť; angl. death-inducing signalling complex
DNA	kyselina deoxyribonukleová
dx	dexter, pravý
EC	enthorinálna kôra
EEG	elektroencefalogram
FADD	doména bunkovej smrti asociovaná s Fas, angl. Fas-associated death domain
FJB	fluoro jade B
GABA	kyselina γ -aminomaslová
Glu	glutamát
HS	hipokampálna skleróza
ICA	ipsilaterálna CA
IS	interneuróny špecifické pre interneuróny, angl. interneuron-specific
KCA	kontralaterálna CA
MF	machové vlákna
MOPP	interneuróny molekulárnej vrstvy asociované s perforovanou dráhou, angl. molecular layer perforant pathway associated cells
NMDA	kyselina N-methyl-D-asparagová
NMDAR	NMDA receptor

NOS	syntetáza oxidu dusného
PBS	fosfátový pufor a soľ
R	respondent
SE	epileptický status, status epilepticus
sin	sinister, ľavý
SL	stratum lucidum
SL-M	stratum lacunosum-moleculare
SO	stratum oriens
SP	stratum pyramidale
SR	stratum radiatum
TeNT	tetanotoxín
TLE	epilepsia temporálneho laloku
TNF	angl. Tumor necrosis factor
VAMP	membránový proteín asociovaný s vezikulami, synaptobrevín
VH	ventrálny hipokampus

Úvod

Epilepsia je ochorenie neuronálnych populácií. Ide o predispozíciu mozgu generovať spontánne záchvaty. Pacienti navyše trpia aj rôznymi kognitívnymi a neuropsychickými poruchami. Jedným z najčastejších typov epilepsie v dospelosti je epilepsia temporálneho laloku (TLE). Na základe patologického nálezu sa delí na lezionálnu a nelezionálnu, pričom nelezionálna forma býva v mnohých prípadoch refrakterná ku farmakologickej aj chirurgickej liečbe. Vzniká preto naliehava potreba nájsť vhodný animálny model, ktorý umožní detailnejšie skúmať patofyziológiu tohoto syndrómu. Na základe doposiaľ publikovaných výsledkov sa ako najvhodnejší model nelezionálnej epilepsie javí tetanotoxínový model TLE.

Epileptický syndróm je potkanom indukovaný prostredníctvom aplikácie tetanotoxínu do hipokampu. Rozvoj záchvatov obvykle nasleduje po 5 – 8 dňoch od operácie. Proces indukcie prebieha bez iniciálneho epileptického statu (SE), ktorý spôsobuje rozsiahle poškodenie celého mozgu a v experimentálnych podmienkach sa používa na vyvolanie epilepsie v modeloch lezionálnej TLE.

Hlavným cieľom tejto práce bude overiť nelezionálnu povahu tetanotoxínového modelu. Z metodického hľadiska pôjde o detekciu hipokampálnej sklerózy (HS) pomocou Nisslovoho farbenia a prítomnosti degenerujúcich neurónov použitím farbenia pre FJB.

1 Literárny prehľad

1.1 Epilepsia

Epilepsia je jedno z najrozšírenejších neurologických ochorení, ktoré postihuje ľudí každého veku a celosvetovo ňou trpia približne 2 % obyvateľstva (Chang a Lowenstein, 2003). Definuje sa ako trvalá predispozícia mozgu generovať spontánne záchvaty. Navyše je ešte sprevádzaná kognitívnymi a neuropsychiatrickými poruchami. Diagnostikuje sa na základe výskytu viac ako jedného spontánneho záchvatu. Epileptický záchvat vzniká ako následok prechodnej dysfunkcie mozgu, ktorá je spôsobená hypersynchrónnou aktivitou neurónov (Fisher et al., 2005). Incidencia epilepsie je najväčšia do desiateho a od šesťdesiateho roku života (Meldrum a Bruton, 1992). Ak je etiológia epilepsie neznáma, definuje sa ako idiopatická. V prípade výskytu patologických podmienok, ako sú tumor alebo malformácie v mozgu, ide o symptomatickú epilepsiu. Existuje celkovo asi 40 rôznych epileptických syndrémov, ktoré sa podľa charakteru záchvatu rozdeľujú na dve základné kategórie: generalizované (vznikajú simultánne v oboch hemisférach) a fokálne (epicentrum je lokalizované na jednom mieste), pričom záchvat sa môže rozšíriť a postihnúť celý mozog (sekundárne generalizované).

1.1.1 Epilepsia temporálneho laloku

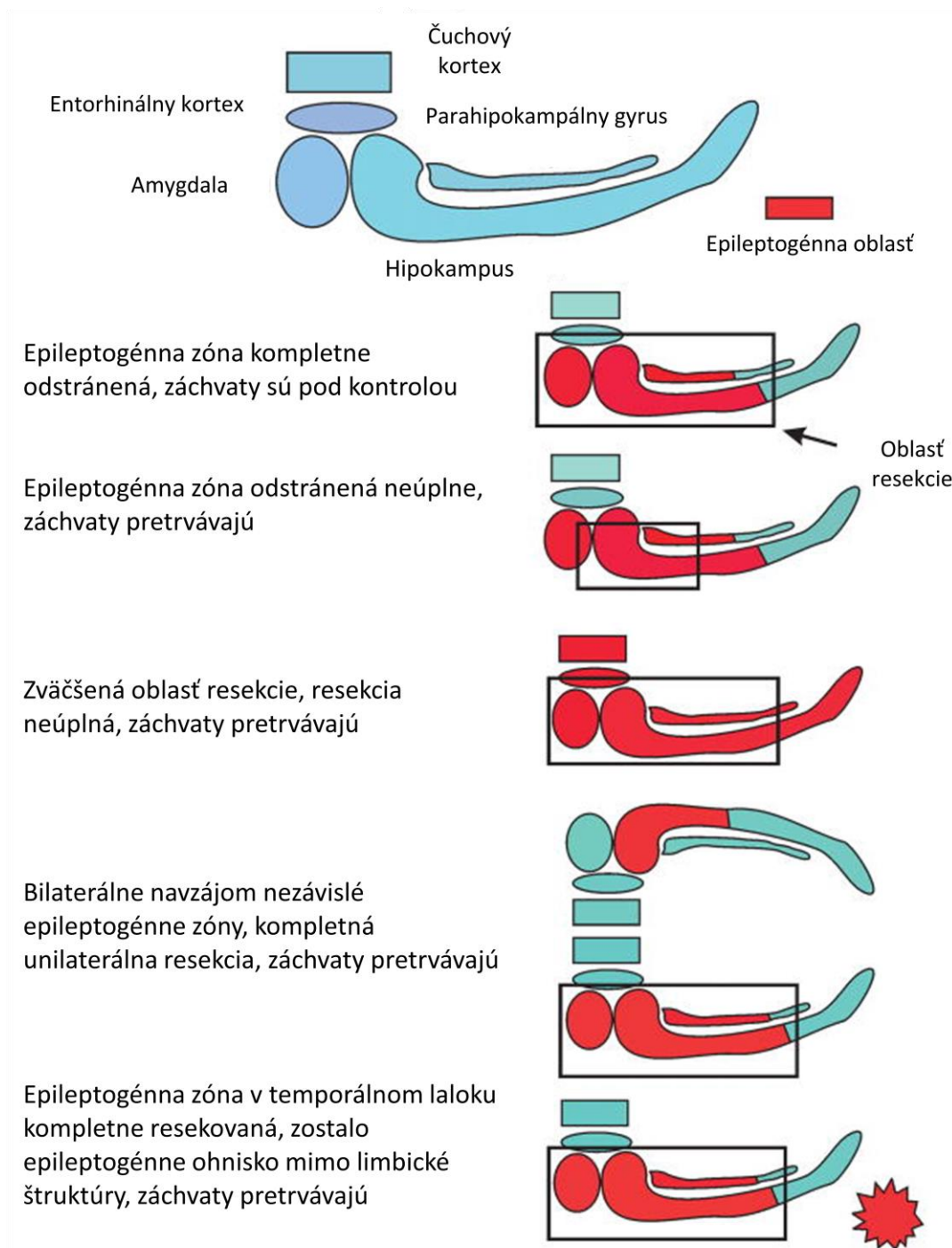
TLE je najčastejšia forma epilepsie v dospelosti (Engel, 2001). Udáva sa, že až 40 % pacientov je refrakterných k farmakologickej liečbe (De Lanerolle a Lee, 2005). Vo väčšine prípadov trpia symptomatickou fokálnou epilepsiou, ktorá vzniká ako následok mozgovej traumy, febrilných kŕčov, predĺženého záchvatu (status epilepticus), ischemickej lézie a tumoru mozgu (French et al., 1993; Mathern et al., 1995). Záchvaty pri TLE môžu alebo nemusia byť sekundárne generalizované. Zobrazovacie techniky a kognitívne testy u pacientov refrakterných k liečbe poukazujú na stratu objemu mozgových štruktúr generujúcich epileptickú aktivitu. Bežne sa tiež vyskytujú symptómy ako sú strach a zvýšená brušná citlivosť (Devinski, 2004).

1.1.2 Hipokampálna skleróza

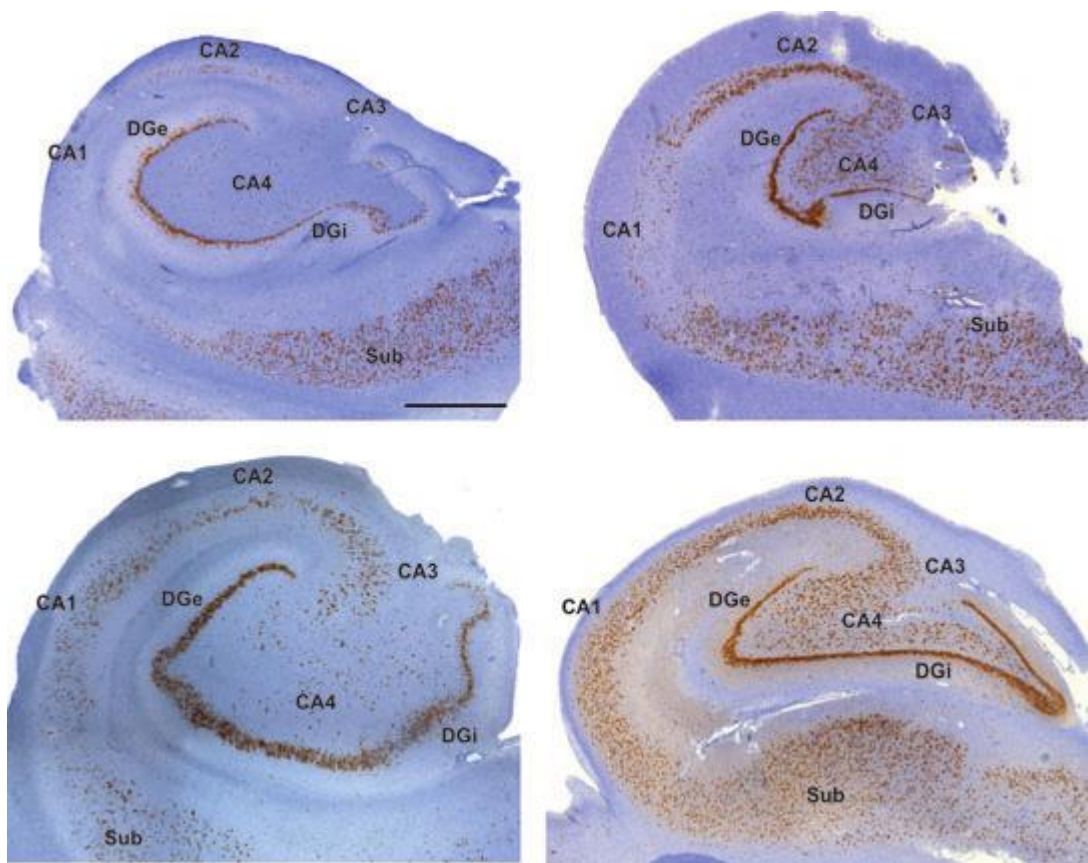
Termín hipokampálna skleróza definuje selektívnu stratu neurónov a pridruženú astrogliózu v hipokampálnej formácii, vrátane DG (gyrus dentatus). Časté býva aj pučanie machových vlákien, ktoré opakovane inervujú molekulárnu vrstvu DG a vytvárajú excitačné synapsy (Cavazos et al., 2003). Po prvýkrát bola zaznamenaná v roku 1825 (Bouchet a Cazauvieilh, 1825) a následne detailnejšie popísaná na základe štúdia 90 prípadov post mortem tkaniva (Sommer, 1880). Súčasné neuropatologické štúdie a predoperačné vyšetrenie pacientov s farmakologicky rezistentou TLE indikujú vysokú asociáciu TLE a HS (Mathern et al., 1995). Histológia tkaniva odobraného pacientom s TLE ukazuje 70% výskyt HS (lezionálna TLE). Zostávajúcich 30 % je bez zjavnej lézie (nelezionálna alebo paradoxikálna TLE) (De Lanerolle, 2003). Termín medziálna temporálna skleróza označuje stratu neurónov nielen v hipokampe, ale tiež v extrahipokampálnych limbických štruktúrach, napr. amygdale a entorhinálnom kortexe.

Hipokampus je v rámci mozgu najcitlivejšou štruktúrou k poškodeniu a strate neurónov, ku ktorému dochádza v dôsledku záchvatov. Medzinárodná liga proti epilepsii (ILAE) zostavila podľa histopatologického nálezu u pacientov štyri základné typy hipokampálnej sklerózy (Blümcke et al., 2013). Kritériom pre zaradenie bol rozsah poškodenia jednotlivých oblastí hipokampu (Obrázok 2).

Doposiaľ sa nevie, či poškodenie temporálneho laloka je následok alebo príčina vzniku epileptických záchvatov, ale chirurgické odstránenie sklerotického hipokampu vedie k úplnému zastaveniu záchvatov alebo aspoň k zníženiu ich počtu. HS sa štandardne považuje za morfológický substrát pre vznik záchvatov. V tomto prípade je ale nevyriešenou otázkou príčina epileptogénnej aktivity u pacientov s nelezionálnou TLE. Liečba tejto cieľovej skupiny je doposiaľ veľmi obtiažna. Jedinci sú vo veľkom počte refrakterní ako k farmakologickej, tak aj k chirurgickej liečbe (Obrázok 1) (Thom et al., 2010).



Obrázok 1 Zlyhanie chirurgickej liečby (Thom et al., 2010). Susediace regióny limbického systému, ktoré boli označené za potenciálnu epileptogénnu zónu na základe patologických nálezov, záznamov EEG alebo štúdií animálnych modelov. Červená označuje epileptogénnu zónu, ktorá sa líši medzi jednotlivcami, a čierny rámček je línia resekcie. Keď je celá epileptogénna zóna v rámci línie resekcie, záchvaty sú kontrolované a potenciálne vyliečené. Keď je epileptogénna zóna širšia vzhľadom k resekcii, existuje u pacientov zvýšené riziko recidívy.



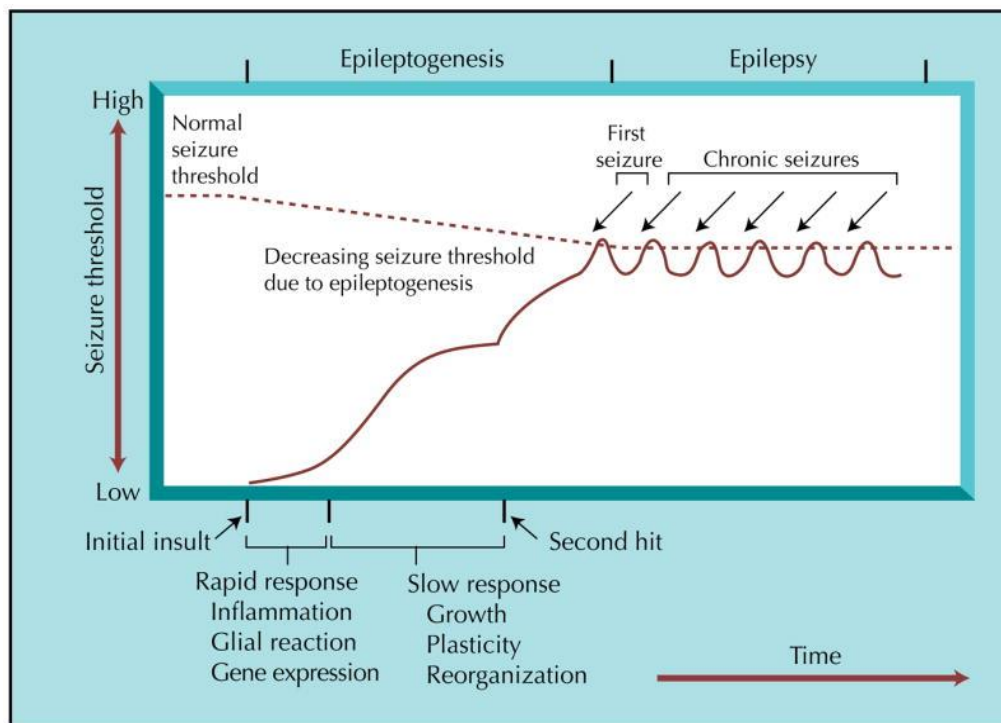
Obrázok 2 Histopatologické podtypy. **A:** Viditeľná strata buniek vo všetkých oblastiach hipokampu, najvýraznejšie v CA1 a CA4; **B:** Typ 2 Viditeľná strata neurónov iba v CA1; **C:** Typ 3 Najvýraznejší úbytok neurónov v CA4; **D:** Typ 4 Bez HS, prítomná je iba glióza; Mierka: 1 000 μm .

1.1.3 Epileptogenéza

Na základe štúdia animálnych modelov (Turski et al., 1983b; Leite et al., 1990) a pacientov sa dá konštatovať, že rozvoj epileptického syndrómu zahŕňa kaskádu udalostí, ktoré generujú aktívne epileptické ohnisko. Z časového hľadiska ide o proces, ktorý u ľudí trvá niekoľko rokov, v prípade animálnych modelov hovoríme o dňoch až týždňoch. Rozdeľuje sa na 3 hlavné štádia: iniciálny inzult, latentná perióda a nakoniec rozvoj spontánnych opakovaných záchvatov (pre prehľad viď Schrafman, 2007).

Iniciálnym inzultom býva mikrobiálne alebo cerebrovaskulárne ochorenie, trauma, nádor alebo zápal. Jednotlivé udalosti, či už sa vyskytnú spoločne alebo individuálne, spúšťajú v mozgu radu rozličných odpovedí a zmien. Nasleduje latentná perióda, kedy

mozog prechádza zložitou epileptogánnou prestavbou, avšak bez zrejmych klinických prejavov. Počas nej prichádza najprv okamžitá reakcia na iniciálny inzult, a to excitácia neurónov a vtok iónov vápnika. Spúšťa sa kaskáda udalostí, vrátane aktivácie génov, modifikácie existujúcich proteínov a syntézu nových. V priebehu niekoľkých dní sa objavuje smrť buniek, proliferácia, zápal, zmena v cievnom zásobení a reakcia gliových buniek. Nasleduje neskoršia odpoveď, kam patrí rast axónov, synaptogenéza a angiogenéza, čo spoločne vedie k reorganizácii neuronálnej siete. Všetky spomínané faktory majú za následok postupné zvyšovanie excitability neurónov a znižujú prah pre vyvolanie záchvatu. Ku koncu latentnej periódy dochádza pôsobením sekundárneho inzultu k rozvoju spontánnych epileptických záchvatov. Môže ním byť vplyv prostredia, postupná zmena expresie génov a ďalšie vývojové komorbidity. Vyplýva z toho, že genetická predispozícia, vývoj jedinca a odpoveď mozgu na primárny inzult môžu spoločne viesť k rozvoju spontánnych epileptických záchvatov (Obrázok 3) (Schrafman, 2007).



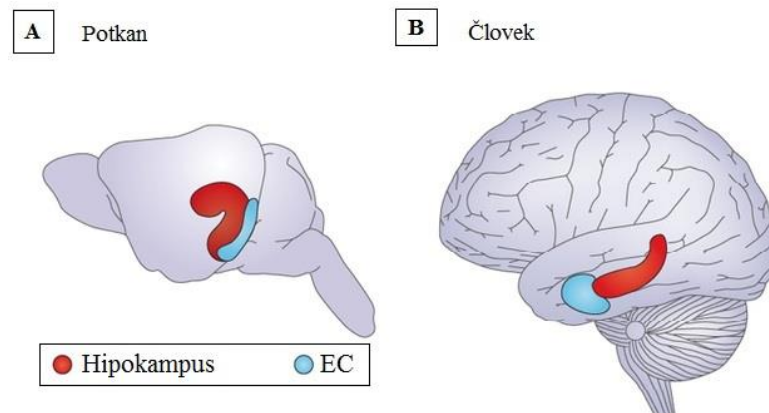
Obrázok 3 Schéma epileptogenézy (Schrafman, 2007). Detailný popis obrázka je v kapitole 2.1.2

Pacienti s rozvinutou TLE demonštrujú progres v počte záchvatov a v pridružených neurologických symptómoch, ako sú kognitívne a behaviorálne poruchy (Aldenkamp a

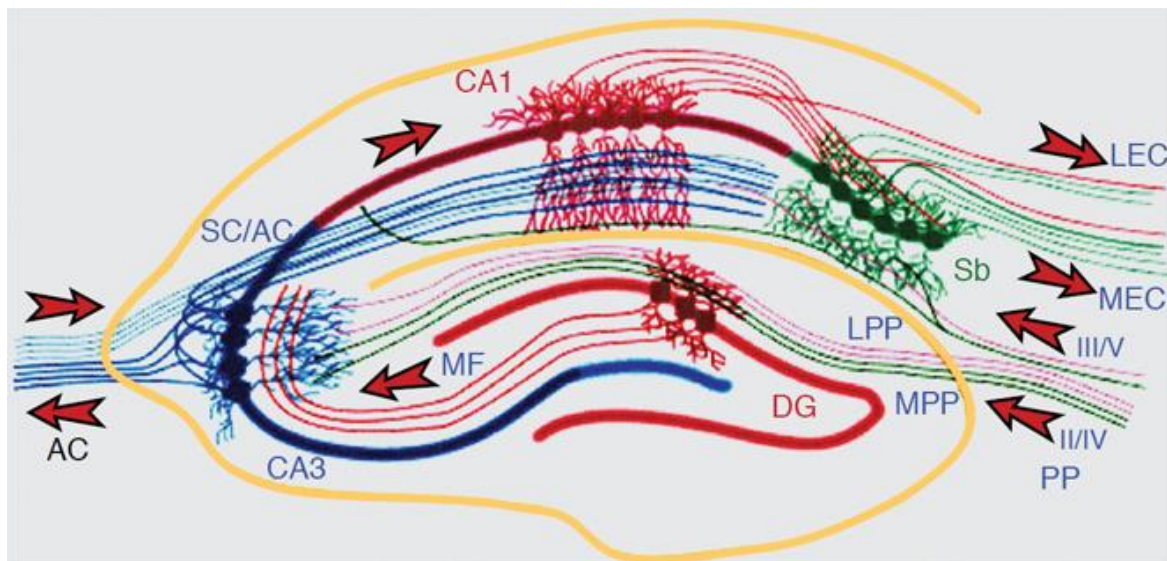
Bodde, 2005; Engel et al., 1991; French et al., 2004). Progresívna povaha epileptogenézy bola detailne popísaná a kvantifikovaná v rámci modelu TLE (Williams a Dudek, 2007). Dlhá latentná perióda pred začiatkom pravidelných záchvatov ponúka časový priestor pre rozmanité terapeutické pôsobenie, čo by predstavovalo alternatívny prístup k doposiaľ zaužívanej liečbe záchvatov až po rozvinutí epilepsie.

1.2 Anatomia hipokampálnej formácie

Hipokampus sa považuje za najčastejší zdroj epileptických záchvatov v syndróme TLE. Z anatomického hľadiska sa spravidla myslí celá hipokampálna formácia, ktorá pozostáva zo štyroch hlavných oblastí: gyrus: DG a oblasti CA1 - CA3 (Cornu Ammonis; vlastný hipokampus). U laboratorneho potkana zaberá pomerne veľkú časť mozgu (Obrázok 4A), u človeka leží v mediálnej časti spánkového laloka (Obrázok 4B). Hlavná hipokampálna dráha sa klasicky popisuje ako tzv. trisynaptická slučka. Axóny z II. vrstvy entorhinálneho kortexu (EC) vedú perforovanou dráhou do ipsilaterálneho DG a inervujú distálne dendrity granulórných buniek v molekulárnej vrstve. Tie vysielajú machové vlákna k pyramídovým neurónom CA3 a bunky z CA3 vedú Schafferove kolaterály k pyramídovým neurónom v CA1. Bunky CA1 vysielajú axóny do subikula a subikulum projekuje ďalej, mimo hipokampálnu formáciu (Obrázok 5). Jednotlivé spoje sú ale omnoho diverzifikovanejšie, zahŕňajú aj iné regióny a priame spojenie medzi nimi. Príkladom je projekcia z III. vrstvy EC do CA1. V nasledujúcich podkapitolách sa budeme venovať anatomickému popisu vybraných štruktúr hipokampálnej formácie.



Obrázok 4 Poloha hipokampu v mozgu potkana a človeka (Strange et al., 2014)



Obrázok 5 Hlavná dráha hipokampu (Kasner, 2013). Entorhinálna kôra (EC) tvorí spojenie DG a pyramídovými neurónmi CA3 cez perforovanú dráhu (PP - rozdelená na laterálnu a mediálu). CA3 neuróny dostávajú informácie z GD cez machové vlákna (MF). Prostredníctvom Schafferových kolaterál (SC) vysielajú axóny do pyramídových buniek CA1 a cez asociačné komisurálne spoje (AC) inervujú aj CA1 kontralaterálneho hipokampu. CA1 neuróny tiež získavajú informácie priamo z perforovanej dráhy a posielajú axóny ďalej do subikula (Sb). Tieto neuróny zase vedú hlavný výstup z hipokampu späť do EC.

1.2.1 Gyrus dentatus

GD je trilaminárna štruktúra s charakteristickým tvarom písmena V. Tvoria ho tri vrstvy: molekulárna, granulárna a polymorfná (Obrázok 6). Skladá sa zo suprapyramidálneho listu, ktorý prebieha medzi oblasťami CA1 a CA3. Oproti nemu leží infrapyramidálny list .

Principiálne bunky granulárnej vrstvy sa nazývajú granulárne neuróny. Sú uložené tesne vedľa seba, zvyčajne bez prítomnosti glií. Majú eliptický tvar a veľkosť tela 10 x 18 μm (Cailborne et al., 1990). Dendrity sa rozprestierajú v molekulárnej vrstve. Medzi granulárnu vrstvu a hilus sú vmedzené GABA-ergné interneuróny, pyramídne košíkovité bunky (Ramón y Cajal, 1909), a ďalšie interneuróny, ktoré sa medzi sebou navzájom líšia distribúciou axónov a vstupnou informáciou (napríklad niektoré prijímajú informáciu iba zo serotoninergných neurónov z raphe nuclei). V subgranulárnej zóne bola v šesťdesiatych rokoch popísaná postnatálne neurogenéza (Altman, 1962; 1963).

Novovzniknuté granulárne bunky sa zapájajú do existujúcich hipokampálnych okruhov a preukázalo sa, že ich počet sa počas života nemení (Rapp a Gallagher, 1996).

Molekulárna vrstva pozostáva hlavne z dendritov granulárnych buniek, pyramidových košíkovitých buniek a buniek polymorfnej vrstvy. Ďalej obsahuje vlastné interneuróny a prebiehajú ňou axóny idúce z EC. Z interneurónov boli identifikované a popísané tri typy. Najhlbšie sú uložené interneuróny molekulárnej vrstvy asociované s perforovanou dráhou (angl. molecular layer perforant pathway associated cells, MOPP bunky) (Han et al., 1993). Bližšie k povrchu sa nachádzajú chandelierove alebo axo-axonické bunky (Sorianoé a Frotscher, 1989). Názov je odvodený od toho, že ich axóny prechádzajú molekulárnou vrstvou a končia výhradne na iniciálnom segmente axónov granulárnej vrstvy. Posledným typom sú špecifické interneuróny, ktoré sa napájajú výlučne na ďalší interneurón (angl. interneuron-specific, IS).

Polymorfná vrstva, nazývaná tiež hilus, obsahuje veľké množstvo rozličných druhov neurónov (Amaral, 1978). Najznámejšie sú machové bunky. Majú triangulárny tvar a rozmer 25 – 35 μm . Dendrity sa bohato vetvia v polymorfnej vrstve, môžu prechádzať cez granulárnu vrstvu až do molekulárnej, ale nikdy nazasahujú do CA3. Sú pozitívne pre glutamát a inervujú vnútornú tretinu ipsilaterálneho a kontralaterálneho hilu DG. Druhou triedou sú bunky vretenovitého typu, tzv. fuziformné neuróny. Delia sa na ďalšie podskupiny, pričom hlavným kritériom pre klasifikáciu je hustota a počet dendritických trňov (Ribak a Seress, 1988).

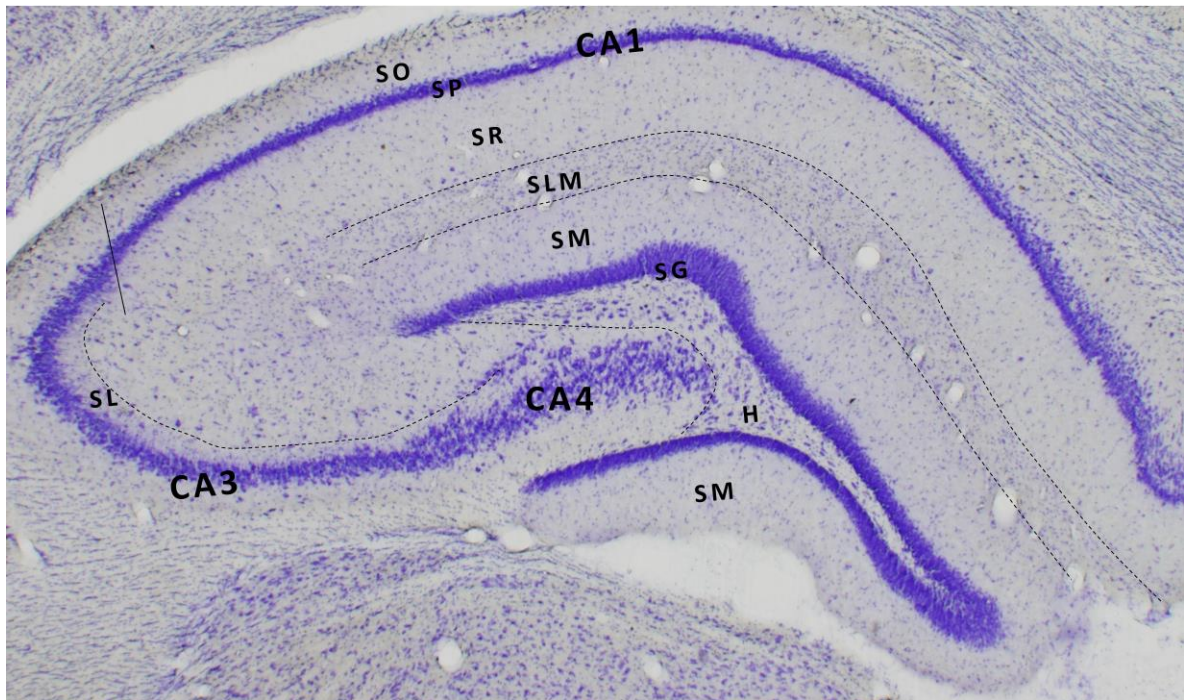
V rámci epileptického syndrómu je DG študovaný najmä kvôli rozsiahlemu pučaniu machových vlákien (Cavazos et al., 1991) a relatívnej odolnosti granulárnych buniek voči poškodeniu následkom záchvatu (Sloviter, 1994). Machové bunky DG sú jednými z najcitlivejších v hipokampálnej formácii. Umierajú následkom epileptických záchvatov, a to sa považuje za možnú príčinu pučania vlákien granulárnych buniek do vnútornej molekulárnej vrstvy. Tento nález je typickým pre pacientov s diagnostikovanou TLE.

1.2.2 Cornu Ammonis – CA oblasti hipokampu

Hipokampus sa prostredníctvom septotemporálnej osi delí na dorzány (DH), ktorý sa spája s priestorovou navigáciou, epizodickou pamäťou a asociatívnym učením (O'Keefe,

1976; Bliss s Collingridge, 1993; Eichenbaum, 1999; Squire, 2007) a ventrálny (VH), ktorý sa podieľa na modulácii stresových odpovedí, motivovanom a emotívnom správaní, ovplyvňuje autonómne funkcie, neuroendokrínne vylučovanie a reprodukčný kontrolný systém (Mosser a Moser, 1998; Bannerman et al., 2004; Kjelstrup et al., 2008).

Súčasnú pomenovanie jednotlivých oblastí hipokampu (CA1, CA2 a CA3) zaviedol v roku 1934 Lorente de Nó. Principiálne neuróny daných regiónov sa od seba líšia veľkosťou tela pyramídovej bunky a vzájomným zapojením. Neuróny v CA1 sú menšie, majú homogénnejšie usporiadanie ako bunky v CA3 a neprijímajú informácie z machových vlákien prichádzajúcich z DG. Pyramídové neuróny v CA2 sa značia pomocou α -aktínu, veľkosťou sú podobné bunkám CA3, ale nedostávajú signál z machových vlákien, rovnako ako neuróny v CA1.



Obrázok 6 Vrstvy hipokampu a DG. CA1-4: Cornu Ammonis 1-4; SO: stratum oriens; SP: stratum pyramidale, pyramídová vrstva; SR: stratum radiatum; SML: stratum lacunosum-moleculare; SM: stratum moleculare; SG: stratum granulosum, granulárna vrstva; H: hilus, polymorfna vrstva. Vlastný zdroj obrázku.

Všetky oblasti majú laminárne usporiadanie. Vrstva, kde sú uložené telá principiálnych neurónov, sa nazýva stratum pyramidale (SP). Superfáciálne leží stratum

oriens (SO), inferiórne stratum radiatum (SR) a ďalej (hlbšie) stratum lacunosum-moleculare (SL-M), kde prichádzajú a končia vlákna temporoammonickej dráhy z EC. Medzi SP a SR v oblasti CA3 sa ešte nachádza stratum lucidum (SL), ktorou prichádzajú machové vlákna z DG (Obrázok 6).

Interneuróny v hipokampe sú dosť podobné bunkám prítomným v DG. Väčšina z nich je imunoreaktívna pre GABA (kyselina γ -aminomaslová) (Ribak et al., 1978). Freud a Buszaki (1996) na základe oblasti inervovanej jednotlivými interneurónmi popísali ich lokalizáciu, organizáciu dendritického stromu a distribúciu axónov. Všetky podtypy a ich uloženie v jednotlivých vrstvách sú detailnejšie zobrazené na Obrázok 7 (Somogyi, 2010). Ďalej sa interneuróny klasifikujú podľa prítomnosti rôznych proteínov viažúcich vápnik a neuropeptidov. Medzi hlavné patria parvalbumín, kalretitín, kalbindín, somatostatín, cholecystokinín, neuropeptid Y a vazoaaktívny intestinálny peptid (Kosaka et al., 1985; Köhler et al., 1986; Sloviter and Nilaver, 1987; Sloviter, 1989; Sloviter et al., 1991; Gulyás et al., 1991; Miettinen et al., 1992; Rogers, 1992).

Pri epileptickom syndróme zohráva úlohu zvýšená expresia CA^{2+} -kanálov na proximálnych dendritoch pyramídových neurónov v CA3. Otvorenie týchto kanálov predlžuje depolarizáciu bunky a zapríčiňuje nadmernú excitáciu CA1 a kontralaterálnej CA3 (Fisfer et al., 1990). Pyramídové neuróny v CA1 majú relatívne slabú inhibíciu (Kauer et al., 1988) a málo vzájomných interakcií (Thomsom a Radpour, 1991). Z toho vyplýva, že v epileptickom hipokampe je za synchronnu aktivitu neurónov v CA1 zodpovedný vstup signálu z CA3 a zároveň nízka ochrana pred hyperexcitabilitou prispieva k smrti pyramídových neurónov CA1 a k rozvoju HS.

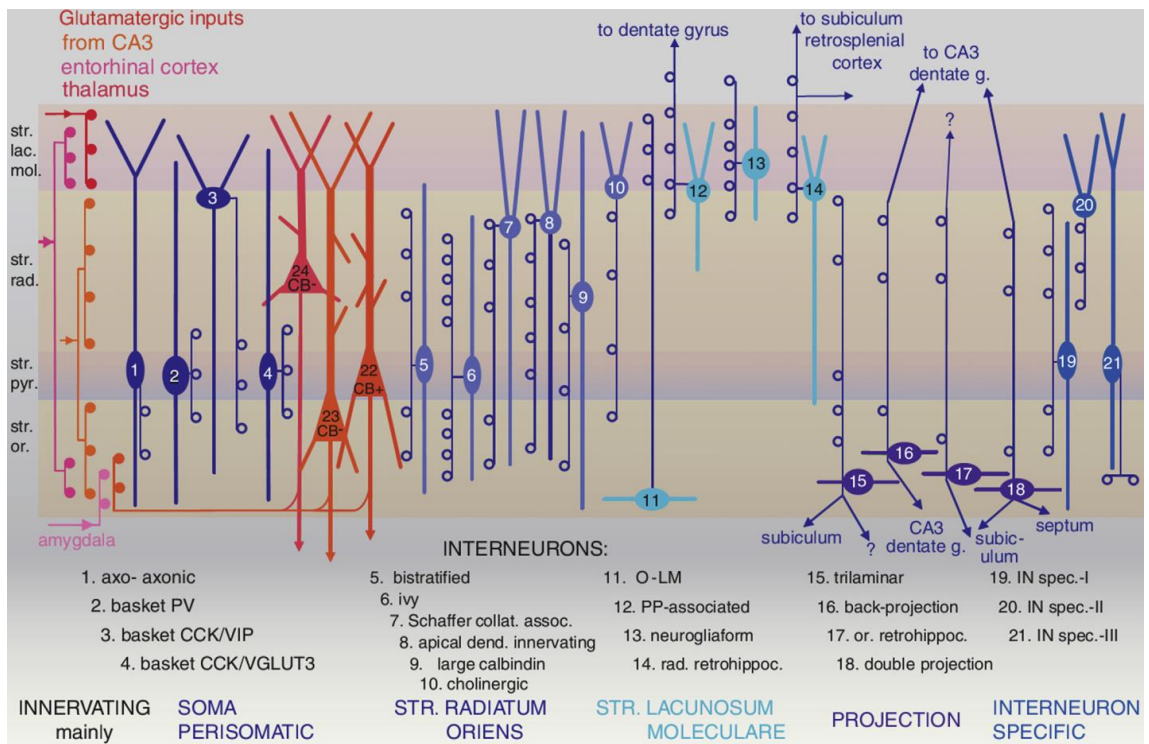
1.2.3 Subikulum

Subikulum sa skladá z dvoch vrstiev: stratum moleculare a stratum pyramidale. Hranicu medzi subikulumom a CA1 možno identifikovať podľa rozšírenia pyramídovej vrstvy a podľa zmeny intenzity farbenia buniek. Stráca sa farbiteľnosť pre kalbindín a zvyšuje sa intenzita pre farbenie Timm (O'Mar et al., 2001).

Principiálne neuróny majú ostrý pyramídový tvar, veľké telo a podľa distribúcie sa delia na dva typy. Superficiálne ležia bunky, ktoré pália akčný potenciál pravidelne a sú

pozitívne pre NADPH diaforáza/oxid dusný syntetázu (NOS), hlbšie sa nachádzajú neuróny pozitívne pre somatostatín, ktorých aktivita sa vyznačuje salvami akčných potenciálov (Green a Totterdell, 1997).

V klasickej TLE je HS najviac postihnutá oblasť CA1, ale subikulum ostáva intaktné (Babb et al., 1984; Sloviter, 1994). Z toho plynie hypotéza, že subikulum je jednoznačne zodpovedné za projekciu abnormálnych signálov z hipokampu do celého mozgu.



Obrázok 7 21 tried interneurónov v CA1 (P. Somogyi, 2010). g. - gyrus; IN spec. - interneurón špecifické; lac. mol. - lacunosum moleculare; O-LM - oriens lacunosum-moleculare; or. - oriens; PP - perforovaná dráha; pyr. - pyramidale; retrohippoc. - retrohipokampálna projekcia; str. - stratum.

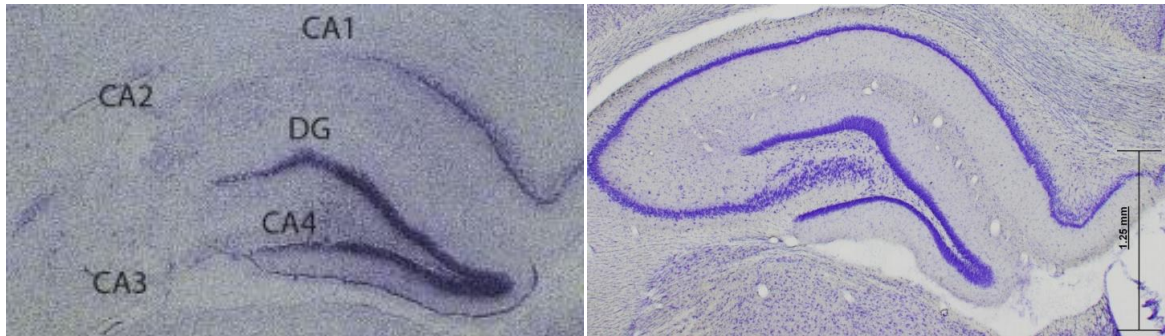
1.3 Animálne modely TLE a ich neuropatologické koreláty

Nenahraditeľným zdrojom informácií o charaktere syndrómu TLE predstavujú animálne modely. Výhodou je, že majú oproti človeku krátky životný cyklus a v laboratórnom prostredí nie je problém kontrolovať ich životné podmienky a genetické faktory. Cieľom je vyvolať u zvierat čo možno najviac patofyziologických zmien podobných pacientom s TLE. Zahŕňajú hlavne opakované spontánne záchvaty, zmenu

morfológie hipokampu, behaviorálne zmeny a odpoveď na farmaká. Pomerne rozšírený a dobre popísaný je kainátový a pilokarpínový model HS. V týchto modeloch je iniciálnym inzultom SE, ktorý je nasledovaný latentnou periódou a nakoniec dochádza k rozvoju opakovaných spontánných epileptických záchvatov. Pre výskum nelezionálnej TLE sa zatiaľ najvhodnejším experimentálnym modelom javí tetanotoxínový model. Epilepsia je indukovaná aplikáciou tetanotoxínu (TeNT) do hipokampu, model je bez iniciálneho SE a podľa doterajších štúdií nedochádza k rozsiahlemu poškodeniu hipokampu a ostatných štruktúr.

1.3.1 Modely hipokampálnej sklerózy

TLE asociovaná s HS sa skúma prevažne na chronických modeloch indukovaných kainátom a pilokarpínom. Ide o antagonizmus muskarínových (pilokarpín) a kainátových receptorov (kainát). Aplikujú sa systémovo, prípadne priamo do hipokampu alebo do amygdaly (Nadler et al., 1978; Ben-Ari et al., 1979; Turski et al., 1983a,b). Tým sa indukuje niekoľkohodinový SE. Nasleduje latentná perióda a po 1 až 6 týždňoch dochádza k rozvoju spontánných epileptických záchvatov (Cavalheiro et al., 1991; Araki et al., 2002; Arabadzisz et al., 2005; Zhang et al., 2002). Histologické nálezy u experimentálnych zvierat korešponujú s patologickým obrazom mozgu pacientov s leziou TLE (Weiser, 2004). Popisuje sa rozsiahla strata pyramídových neurónov v hipokampe (Obrázok 8), pučanie machových vlákien, reorganizácia neuronálnej siete, disperzia granulárnych buniek v GD a strata interneurónov (Haas et al., 2001; Lehmann et al., 2001; Trauck a Nadler, 1985; Mello et al., 1993). Za hlavnú nevýhodu týchto modelov sa považuje prítomnosť extrahipokampálnej lézie. Poškodenie sa vyskytuje naprieč mnohými štruktúrami, napríklad amygdala, subikulum, talamus a neokortex (Curia et al., 2008). Napriek tomu poskytujú modely HS priestor pre štúdium epileptogenézy, reorganizácie neuronálnej siete, lézie hipokampu a rezistencie na antiepileptiká.

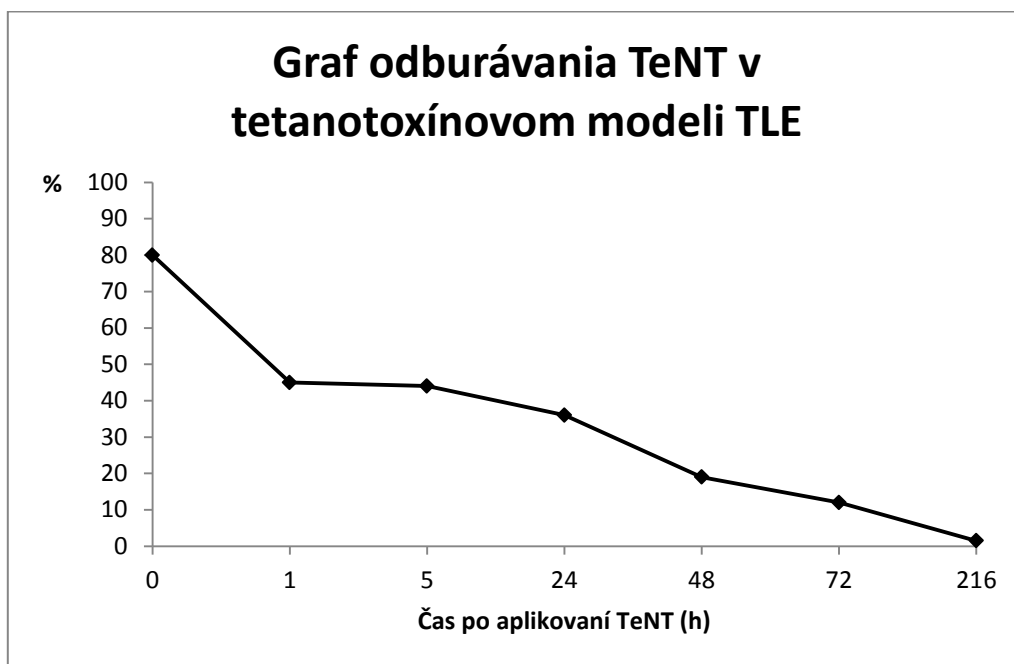


Obrázok 8 Model HS. Na obrázku vľavo takmer úplne chýba pyramídová vrstva (Levesque a Avoli, 2013). Obrázok napravo je hipokampus kontrolného zvierat'a (vlastný zdroj).

1.3.2 Tetanotoxínový model TLE

TeNT patrí medzi najstaršie spôsoby indukcie experimentálnej epilepsie (Roux a Borrell, 1898). Semichronický epileptický syndróm sa vyvoláva stereotaktickou aplikáciou niekoľkých nanogramov TeNT do hipokampu. V závislosti na veľkosti podanej dávky dochádza po 3 - 8 dňoch k rozvoju opakovaných spontánnych záchvatov (Finnerty a Jefferys, 2000). TeNT je z mozgu úplne zmetabolizovaný približne 9 dní od aplikácie (Graf 1) (Melanby, 1989). Záchvaty sa vyskytujú v priemere 30-krát za deň s trvaním do 2 minút (Jefferys et al., 1995) a vymiznú po 6 - 8 týždňoch. V 10 % prípadov pretrávajú do konca života (Jefferys a Williams, 1987). Najvýznamnejšou vlastnosťou tohto modelu je, že záchvaty sú generované limbickými štruktúrami, ale nie sú asociované s rozsiahlym poškodením mozgu vplyvom iniciálneho SE a stratou pyramídových neurónov. HS bola popísaná iba u 10 % zvierat injektovaných do dorzálneho hipokampu (Jefferys et al., 1992). Ďalšie histologické nálezy asociované s tetanotoxínovým modelom TLE sú zhrnuté Tabuľka 1.

Graf 1 Graf odburávania TeNT v tetanotoxínovom modeli TLE (Mellanby, 1989).



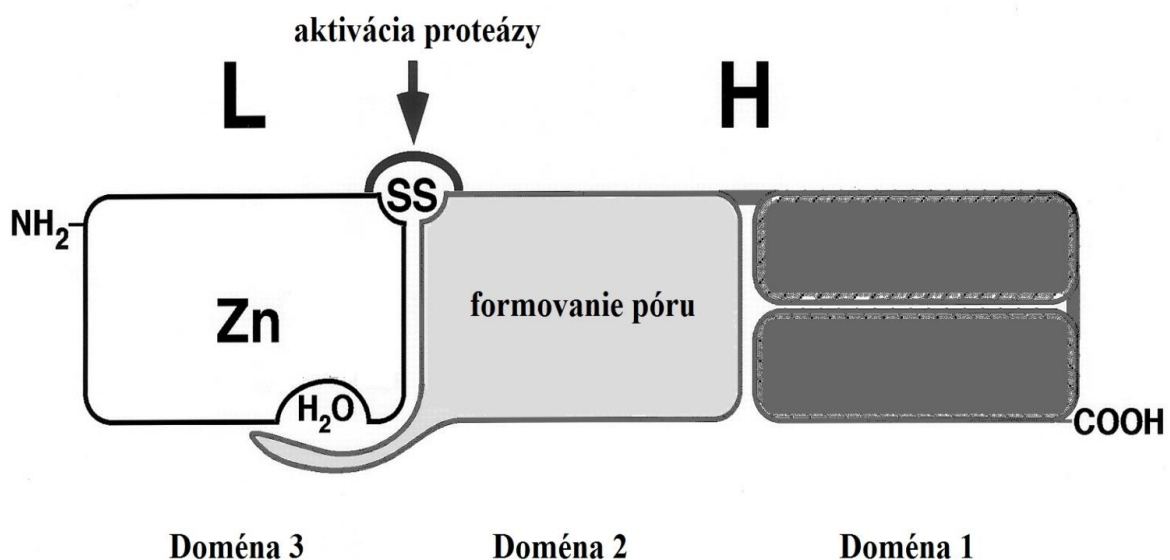
1.4 Tetanotoxín

Jediný prírodný zdroj TeNT je anaeróbná baktéria *Clostridium tetani*. Pre experimentálne využitie sa TeNT izoluje z kmeňových kultúr filtráciou, zrážaním síranom amónnym a chromatografiou (Schiavo a Montecucco, 1995). Z chemického hľadiska ide o polypeptid, zložený z 1 315 aminokyselín. Tvoria ľahký reťazec s hmotnosťou 50 kDa a ťažký reťazec s hmotnosťou 100 kDa, spojené pomocou disulfidovej väzby. Funkčne sa TeNT rozdeľuje na 3 domény (Obrázok 9). Proteázová aktivita ľahkého reťazca je selektívna pre VAMP (membránový proteín asociovaný s vezikulami; synaptobrevín). Ide o proteín asociovaný s fúziou synaptického vaku a presynaptickou membránou počas výlevu neurotransmiteru.

1.4.1 Mechanizmus účinku

Neurointoxikácia TeNT prebieha v piatich krokoch. V 1. kroku dochádza k naviazaniu TeNT pomocou C konca ťažkého reťazca na polygangliozidy presynaptickej membrány. Povaha receptora pre TeNT ešte nie je celkom objasnená, ale ide pravdepodobne o membránový proteín, ktorý zaisťuje 2. krok, endocytózu. Nasleduje

okamžitá internalizácia do endocytickej vezikuly, ktorá je rýchlym retrográdnym transportom vedená axónom do tela neurónu (3. krok). Rýchlosť transportu pre TeNT v *in vivo* podmienkach predstavuje 2,88 - 19,96 mm/h (Stöckel et al., 1975). Na rozdiel od ostatných proteínov, ktoré využívajú retrográdný transport (cholera toxín, lektíny, NGF nervový rastový faktor) sa TeNT neakumuluje v tele neurónu, ale putuje do postsynaptických dendritov. V prípade nízkych dávok sa ďalej translokuje do inhibičných interneurónov, ale vo vysokých dávkach je schopný vstupovať aj do excitačných neurónov (Calabresi et al., 1989). V presynaptickom zakončení nasleduje translokácia ľahkého reťazca z endocytickej vezikuly do cytosolu (4. krok). Pri tomto procese sa zruší disulfidová väzba medzi reťazcami, a tým sa aktivuje proteázová aktivita ľahkého reťazca. V 5. kroku dochádza k proteolýze VAMP, čo znemožní výlev neurotransmiteru. V prípade, že TeNT inhibuje výlev GABA alebo glycínu, klesá prah dráždivosti motorických neurónov v mieche a rozvíja sa obraz tonicko-klonických kŕčov.



Obrázok 9 Funkčné domény TeNT (Schiavo et al., 2000). **Doména 1:** väzba TeNT na membránu neurónu; **doména 2:** tvorba póru v membráne vezikuly pre translokáciu ľahkého reťazca; **doména 3:** metaloproteázová aktivita závislá na zinku, selektívna pre VAMP; L - ľahký reťazec; H - ťažký reťazec; SS - disulfidová väzba.

Tabuľka 1 Histologické nálezy v hipokampe tetanotoxínového modelu

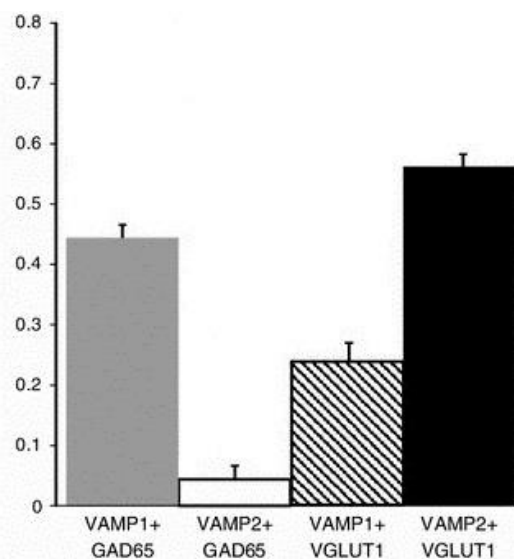
Miesto aplikácie	Histologický nález	Zdroj
CA3	Zvýšený počet GAD pozitívnych buniek v hile, bilaterálne	Najlerahim et al., 1992
DH	5x zvýšená neurogenéza (DCX, BrdU)	Jiruska et al., 2013
DH	Caspase 3 nezvýšená	Jiruska et al., 2013
DH	3/24 zvierat HS kontralaterálne k injekcii	Jefferys et al., 1992
VH	2/12 zvierat HS v dorzálnej CA1	Mellanby a Milward, 2001
VH	aktivovaná mikroglia v kontralaterálnej CA1	Shaw et al., 1990
VH	30% HS v dorzálnej CA1 kontralaterálne	Shaw et al., 1990
VH	30% HS v dorzálnej CA1 kontralaterálne	v článku Shaw et al., 1990, ale preparáty z Mellanby et al., 1977
VH	zvýšená imunoreaktivita pre somatostatín v hile po 1 týždni	Mitchell et al., 1995
VH	výrazná strata imunoreaktivity pre somatostatín po 2 mesiacoch	Mitchell et al., 1995

1.4.2 Substrát pre TeNT v tetanotoxínovom modeli TLE

Prvýkrát bol popísaný mechanizmus účinku TeNT na molekulárnej úrovni v roku 1992 (Link et al., 1992; Schiavo et al., 1992). Ukázalo sa, že TeNT ako zinková endopeptidáza selektívne štiepi VAMP, čím blokuje výlev neurotransmiteru. VAMP

existuje v rôznych isoformách, pričom v mozgu sú najrozšírenejšie VAMP 1 a VAMP 2. Tabuľka 2 ukazuje ich relatívne zastúpenie v hipokampálnej fomácii potkana.

Epileptogénny efekt TeNT pri aplikácii do CA3 oblasti dorzálneho hipokampu je pravdepodobne spôsobený funkčnou selektivitou TeNT. Zisilo sa, že VAMP 1 je primárne kolokalizovaný s inhibičnými interneurónmi v stratum pyramidale, pričom VAMP 2 sa nachádza najmä na excitačných neurónoch stratum lucidum (Obrázok 10). K zníženiu imunoreaktivity pre VAMP 1 dochádza už 2 dni po injekcii TeNT a na 16. deň možno pozorovať začínajúcu obnovu denzity farbenia. U VAMP 2 sa podobná strata farbiteľnosti prejavila až na 8. deň a na 16. deň sa rozšírila do všetkých regiónov hipokampu. Tieto zmeny boli pre VAMP 1 pozorované iba ipsilaterálne k injekcii, ale VAMP 2 ukázal zníženú denzitu aj v kontralaterálnej CA3 oblasti. Elektrofyzilogická štúdia v mieste vpichu, kde došlo k najvyššej redukcii VAMP 1 aj 2 ukázala, že táto oblasť je aj napriek tomu schopná generovať epileptické záchvaty (Ferecskó et al., 2013). Bližší mechanizmus však ešte nebol doposiaľ popísaný.



Obrázok 10 Kolokalizácia VAMP 1 a VAMP 2 s GAD65 a GLUT1 (Ferecskó et al., 2013). GAD65 - dekarboxyláza kyseliny glutámovej; marker GABA-ergných neurónov; VGLUT1 - vezikulárny glutamátový transportér 1; marker glutamátergných neurónov; graf ukazuje vysokú kolokalizáciu VAMP 1 s inhibičnými interneurónmi a VAMP 2 s excitačnými neurónmi.

Tabuľka 2 Distribúcia VAMP 1 a VAMP 2 v hipokampálnej formácii (Raptis et al., 2005)

Hipokampálna formácia	VAMP 1	VAMP 2
Stratum oriens	++	++++
Stratum pyramidale	+	+
Stratum lucidum	++	++++
Stratum radiatum	++	++++
Stratum lacunosum-moleculare	+	++
Stratum granulosum	+	+
Hilus	+	++++

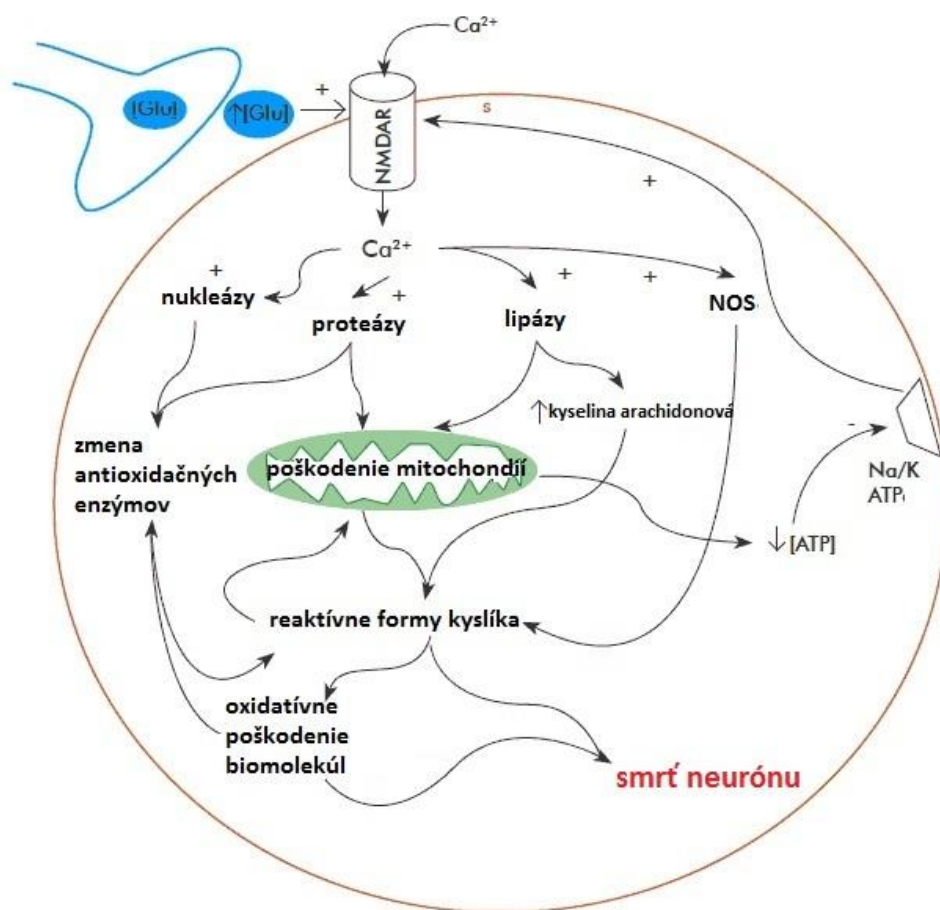
1.5 Smrť buniek ako následok záchvatu

Poškodenie mozgu je najstaršie popisovaný patologický nález u pacientov s TLE. Klinické štúdie a výsledky z experimentálnych modelov dlhé roky poukazujú na to, že predĺžené opakované epileptické záchvaty a status epilepticus zapríčiňujú v mozgu smrť neurónov. Stratu buniek možno pozorovať hlavne v pyramídovej vrstve hipokampu, ale postihnuté bývajú aj ostatné limbické štruktúry, mozoček a kôra (Meldrum a Bruton, 1992). Existuje hypotéza, že neurodegeneratívne zmeny asociované s TLE vychádzajú z permanentnej aktivácie glutamátergnej excitačnej dráhy. Mechanizmus je relatívne jednoduchý. Výlev glutamátu indukuje opakovanú depolarizáciu a repolarizáciu neurónu, po čase dochádza v bunke k excitotoxicite, a to vedie k degenerácii neurónu, ktorá môže byť realizovaná apoptickou aj nekrotickou cestou (Lorigados et al., 2013).

1.5.1 Excitotoxicita

Excitotoxicita je mechanizmus, ktorý spúšťa degeneráciu neurónu pri nadmernej aktivácii glutamátergnych receptorov a ich analógov. Za fyziologických podmienok sú Ca^{2+} ióny uchovávané v mitochondriách a endoplazmatickom retikulu. Hyperaktivácia glutamátergnych receptorov však vedie k nadmernému vtoku Ca^{2+} do neurónov. Dochádza k dysfunkcii metabolizmu, generujú sa voľné radikály, sú aktivované mnohé proteázy,

fosfolipázy, endonukleázy, spúšťa sa syntéza oxidu dusného a je inhibovaná syntéza proteínov (Haglid et al., 1994).



Obrázok 11 Mechanizmus excitotoxicity (Lorigodas et al., 2013). Celý proces je detailnejšie popísaný v texte 2.5.1; Glu - glutamát; NMDAR - NMDA receptor pre glutamát.

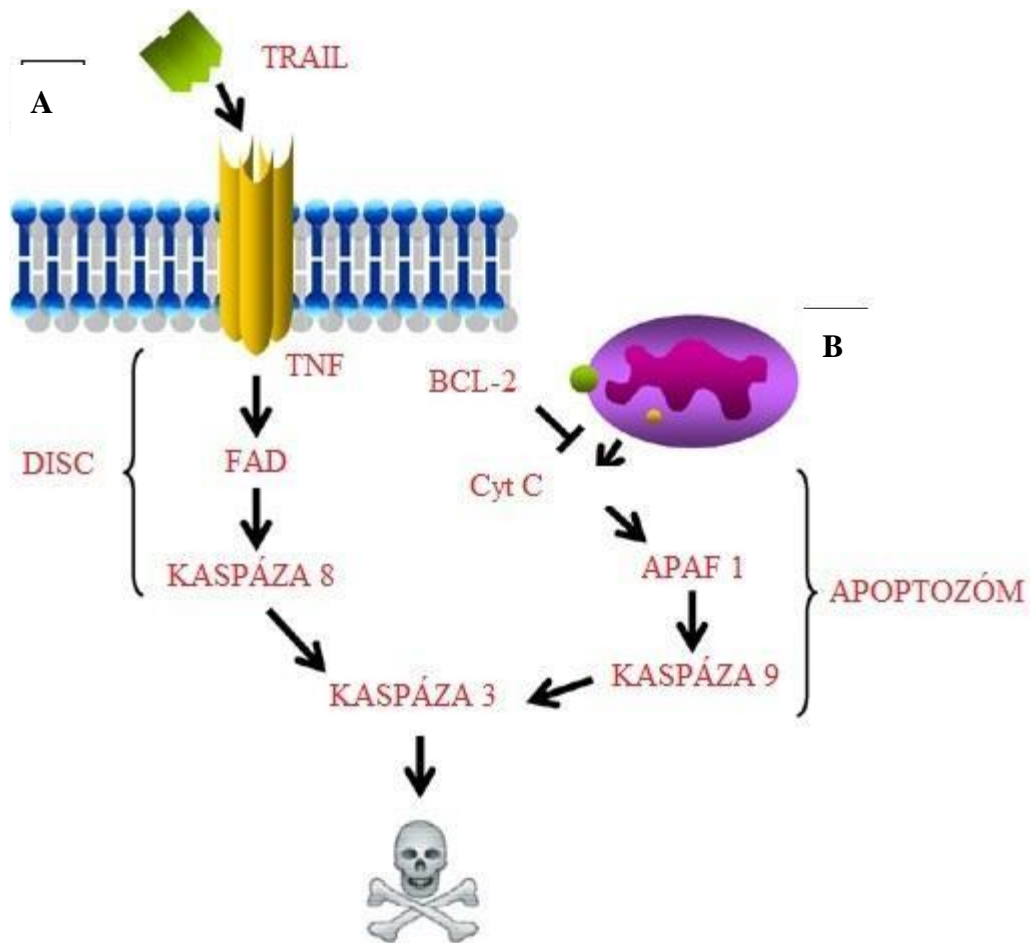
Vápniková pumpa, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výmenník a proteíny viažuce Ca^{2+} zabezpečujú v bunke homeostázu Ca^{2+} . Keď dôjde k saturácii systému, začne sa Ca^{2+} hromadiť v mitochondriálnej matrix. Táto akumulácia depolarizuje mitochondriálnu membránu dvoma mechanizmami: 1.) zvýšená koncentrácia pozitívnych iónov v lumene mitochondrií znižuje chemo-osmotický potenciál membrány, čo spomaľuje syntézu ATP; 2.) aktivácia pórov pre vtok Ca^{2+} späť do cytoplazmy, ktorá v prípade dlhodobej nerovnováhy Ca^{2+} vedie k ireverzibilnej depolarizácii membrány. Vysoká koncentrácia Ca^{2+} v mitochondriách tiež indukuje vznik voľných radikálov, ktoré spôsobujú peroxidáciu membránových lipidov,

syntézu oxidu dusného a aktiváciu enzýmov zapojených v katabolizme proteínov, fosfolipidov a nukleových kyselín (Obrázok 11). Oxid dusný navyše zvyšuje excitotoxický efekt, pretože retrográdne ovplyvňuje presynaptickú membránu a vyvoláva ďalší výlev glutamátu (Lorigodas et al., 2013).

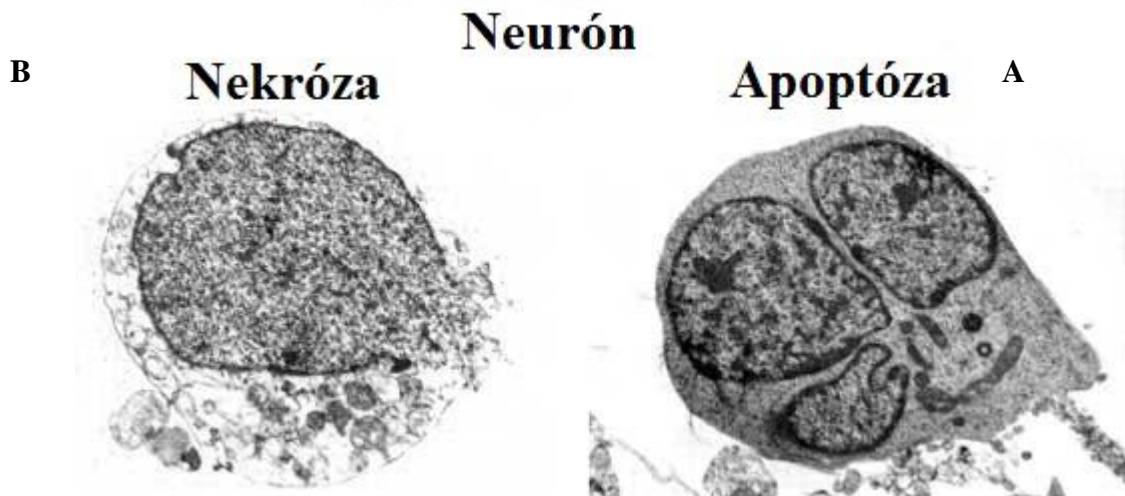
1.5.2 Smrť neurónov

Vo všeobecnosti je neuronálne poškodenie u pacientov s TLE zapríčinené nadmerným vtokom Ca^{2+} do bunky počas epileptického záchvatu (Lado et al., 2002). Spúšťa sa rada signálnych kaskád, ktoré vedú k úmrtiu neurónu či už apoptickou (Obrázok 12) alebo nekrotickou cestou. Prvotný morfológický popis neurónov umierajúcich na následok excitotoxicity poukazoval na prítomnosť nekrózy (Obrázok 13) (Fujikawa et al., 2000). Výskum, ktorý bol zameraný na mechanizmus bunkovej smrti u epileptického syndrómu, však odhalil molekulárne markery apoptózy (Liou et al., 2003) a posledne data dokonca hovoria o programovanej nekróze ako následku SE (Niquet et al., 2012). Dôležité je brať do úvahy fakt, že nízka hladina ATP môže zmeniť osud bunky a proces programovanej apoptózy bude ukončený nekrotickou cestou (Liest et al., 1997). Jedným z kritických krokov je tvorba komplexu medzi cyt c, APF-1 a prokaspázami. Nedostatok ATP v tomto bode blokuje aktiváciu degradatívnych procesov, vrátane aktivácie kaspázy 3. Z energetického hľadiska nie je možné ukončiť iniciovanú apoptickú smrť bunky, preto dochádza k degradácii nekrotickou cestou, ktorá prebieha aj pri nízkych koncentráciách ATP.

Je otázkou, ako sa výskum v tejto oblasti bude vyvíjať ďalej a či sa podarí jednoznačne identifikovať a popísať mechanizmus, akým zomiera epileptický neurón. Výsledky by priniesli ďalšie možnosti pre vývoj neuroprotektívnych a antiepileptických liekov pre pacientov s TLE a ďalšími neurodegeneratívnymi ochoreniami.



Obrázok 12 Vonkajšia a vnútorná cesta aktivácie apoptózy (Fadeel et al., 2007) **A:** Vonkajšia cesta sa aktivuje pomocou TNF receptoru (angl. tumour necrosis factor) na povrchu bunky, formuje sa intracelulárny komplex známy ako DISC (signálny komplex indukujúci smrť; angl. Death-inducing signalling complex), ktorý pozostáva z intracelulárneho adaptoru molekúl FADD (doména bunkovej smrti asociovaná s Fas; angl. Fas-associated death domain) a kaspázy 8 a 10. Kaspázy sú cysteínové proteázy špecifické pre aspartát, v bunkách sú prítomné ako zymogény a po aktivácii formujú aktívny proteolytický enzým. Dochádza k štiepeniu intracelulárnych štruktúr, proteínov a aktivujú sa enzýmy zodpovedné za charakteristickú fragmentáciu DNA. **B:** Vnútnú cestu spúšťa narušenie homeostázy organel alebo poškodenie DNA. Boli identifikované viaceré aktivačné faktory, a to vrátane zvýšenej koncentrácie intracelulárneho vápnika, voľných radikálov a dimerizačné interakcie proteínov rodiny Bcl-2. Proteíny rodiny Bcl-2 pôsobia aktivačne alebo inhibične na proces apoptózy a regulujú funkciu mitochondrií a ostatných organel. Kulminácii mitochondriálnej dysfunkcie končí uvoľnením apoptogénneho faktoru cytochrómu *c*. Aktivuje sa APF-1 (faktor 1 aktivujúci apoptické proteázy; angl. apoptotic protease-activating factor) a kaspázu 9, čo má za následok aktiváciu efektorových kaspáz (kaspáza 3). Ďalšou formou vnútornej aktivácie apoptózy je stres endoplazmatického retikula hipoampálnych buniek, čo vedie u pacientov s TLE k nadmernej tvorbe chaperonových bielkovín a kaspáz 7 a 9 (Yamamoto et al., 2006). TRAIL - ligand súvisiaci s TNF indukujúci apoptózu, angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand.



Obrázok 13 Morfológické rozdiely medzi nekrotickým a apoptickým neurónom. Fotka z elektronového mikroskopu (Ueda et al., 2007); prvotné odlišenie nekrózy od apoptózy bolo na základe morfológického obrazu buniek (Kerr et al., 1972). **A:** Apoptóza. Na základe záznamov z elektónovej mikroskopie bola apoptóza popísaná ako rad dobre definovaných a stereotypných morfológických zmien. Zahŕňa kondenzáciu chromatinu a internukleozomálne štiepenie DNA, na cytoplazmatickej membráne sa tvoria nepravidelné záhyby (angl. blebbing), je zachovaná integrita organel a nakoniec je celý obsah bunky zbalený do apoptických teliesok, ktoré sú následne fagocytované (Wyllie et al., 1980). **B:** Nekróza. Je doprevádzaná nabobtnaním mitochondrií a dilatáciou endoplazmatického retikula. Cytoplazma sa stáva ťažšie rozpoznateľnou, chromatin je neformálny a dochádza ku karyolýze. Peroxidáciou lipidov dochádza k narušeniu membrán, bunka praská a obsah bunky sa vylieva do intercelulárneho priestoru (Majno a Joris, 1995).

2 Ciele práce

1. Optimalizovať dávku TeNT pre vyvolanie epileptického syndrómu u potkana.
2. Stanoviť makroskopické a mikroskopické poškodenie hipokampu v tetanotoxínovom modeli TLE.
3. Overiť nelezionálnu povahu tetanotoxínového modelu TLE.

3 Metodika

3.1 Príprava tetanotoxínu

Chronickú epilepsiu sme potkanom indukovali aplikovaním 10 ng TeNT (T3194, Sigma Aldrich) v 1 μ l základného roztoku. Základný roztok sme pripravili rozpustením 2 g BSA v 100 ml 0,05M PBS (fosfátový pufor a soľ). Alikvotovaný TeNT sa uchovával pri -20 °C a počas operácie bol uložený v ľade. S toxínom sa pri všetkých krokoch manipulovalo veľmi opatrne, bez prudkého miešania a trasenia, aby nedošlo k jeho znehodnoteniu. Dávka potrebná na indukovanie epilepsie sa stanovila empiricky. Testovali sa koncentrácie 5 ng/ μ l (n = 2), 10 ng/ μ l (n = 2) a 20 ng/ μ l (n = 2). Kritériom bolo použiť čo najmenšie množstvo TeNT, pri ktorom dôjde k rozvoju spontánných záchvatov na 5. až 8. deň od aplikácie.

3.2 Skupiny zvierat

Na pokusy boli použité samci potkana kmeňa Wistar albino s hmotnosťou 220 - 360 g. Zvieratá boli držané v plastových boxoch vo zvieratníku Oddelenia vývojovej epileptológie. V miestnosti bola zaistená konštantá teplota, vlhkosť a svetelný režim 12 h svetlo/12 h tma. Prístup k potrave a vode mali *ad libitum*.

Všetky manipulácie so zvieratami boli vykonané podľa Smerníc o chove a využití laboratórnych zvierat, v súlade so Zákonom č. 149/2004 Sb., vrátane dodatku o ochrane zvierat proti týraniu, a Vyhláškou Ministerstva poľnohospodárstva Českej republiky č. 207/2004 Sb., o ochrane, chove a využití pokusných zvierat a odpovedajúcim smerniciam Rady európskych spoločenstiev (European Community Council (2010/63/EC)).

Skupiny zvierat sa zostavili podľa Tabuľka 3. Cieľovou štruktúrou bola oblasť stratum radiatum CA3 pravého dorzálneho hipokampu. Koordináty pre aplikáciu TeNT boli jednotné pre všetky skupiny: AP - 4,1; L 3,9; D 3,8. Výnimku tvoril prípad, keď sa testovala stranová závislosť aplikácie TeNT a injekovalo sa do ľavého hipokampu (L - 3,9). K overeniu správnosti histochemických metód sa pomocou endotelínu pripravila tzv. pozitívna kontrola. Lokálna ischémia v miestach aplikácie (Tabuľka 5) spôsobila

degeneráciu neurónov, čo nám umožnilo testovať funkčnosť farbenia pre FJB. Veľkosť každej injekovanej dávky bola 2 μ l s obsahom endotelínu 40 pmol/ μ l.

Tabuľka 3 Skupiny zvierat

Lézia hipokampu - TeNT 10 ng/ μ l			
Deň perfúzie po operácii	Strana aplikácie	Experimentálne zvieratá (n)	Kontroly (n)
4.	dx	3	3
8.	dx	10	5
16.	dx	10	5
16.	sin	3	-

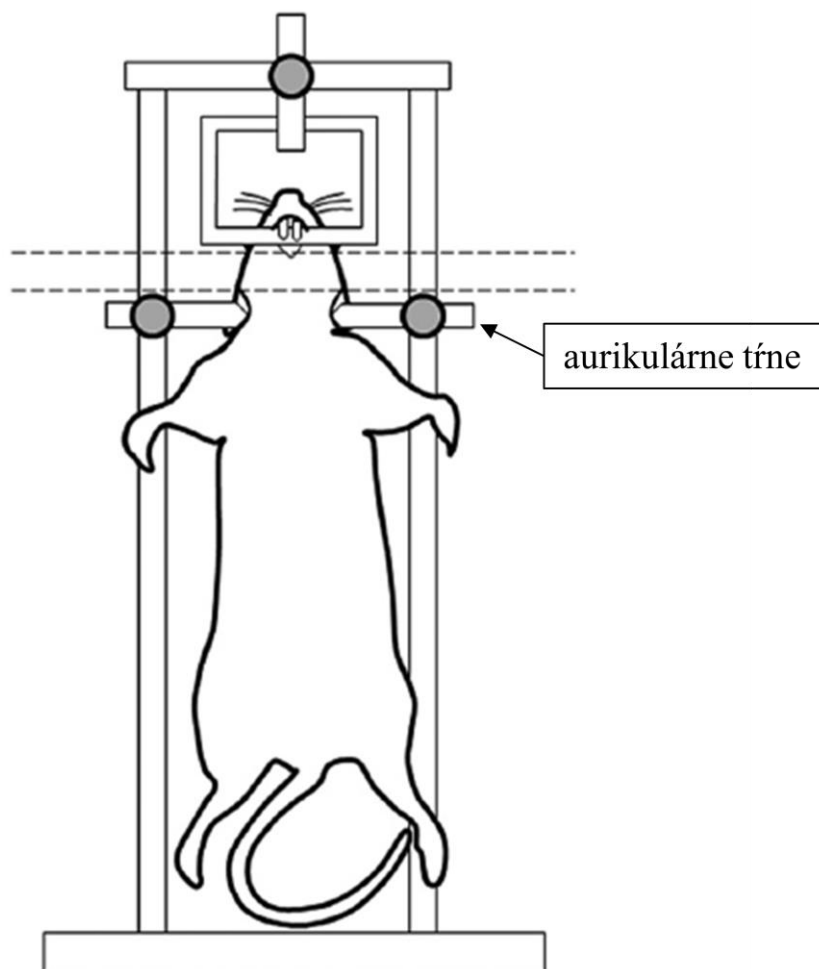
3.3 Operácie zvierat

Zvieratá boli uvedené do celkovej anestézie inhaláciou isofluránu v počiatkovej dávke 5 % a počas operácie bola znížená na 1,3 – 3 %. Hĺbka anestézie sa pravidelne monitorovala pomocou pedálneho reflexu. Telesná teplota bola udržiavaná pomocou vyhrievacej podložky na 37 °C. Zvieratá boli upevnené do stereotaktického rámu (Obrázok 14). Zameranie pozície pre aplikáciu roztoku bolo prevedené pomocou stereotaktického ramena na základe koordinátov, ktoré sú dané vzhľadom k polohe bregmy na lebke (Paxinos a Watson, 1998).

Roztok TeNT sa injekoval mikrolitrovou striekačkou značky Hamilton® Syringe, 7000 Series s tupou ihlou, aby sa zaistila presná lokalizácia miesta aplikácie. Objem jednotlivých dávok TeNT bol 1 μ l, s rýchlosťou aplikácie 0,2 μ l/min. Ihla bola ponechaná v mieste aplikácie po dobu 5 minút, aby sa predišlo vytečeniu roztoku otvorom v tkanive a poskytol sa dostatočný čas pre difúziu roztoku.

Následne sa rana zošila atraumatickou chirurgickou ihlou (silon, monofil; EP 0,5 USP 7/0; DS 12; Chirmax) a ošetrila Collodiom pre lepšie spojenie kožných lemov. Analgézia sa podala subkutánne vo forme Metacamu (dávka 0,5 ml/kg). Zvieratá boli rozdelené do boxov po dvoch a umiestnené na videomonitoring. Kontrolné skupiny absolvovali rovnakú operáciu, ale namiesto roztoku TeNT sa aplikoval 1 μ l základného

roztoku 0,05M PBS + 2 % BSA. V prípade pozitívnej kontroly išlo o 4 aplikácie endotelínu-1 (Sigma Aldrich, E7764) do príslušných štruktúr (Tabuľka 5).



Obrázok 14 Stereotaxický rám (Ceberg et al., 2012). Pohľad zdola. Zviera je počas operácie fixované v troch bodoch: zavedením aurikulárných trňov do zvukovodov a upevnením zubov.

3.4 Videomonitoring

Zvieratá, ktorým bol aplikovaný TeNT, sa ihneď po operácii umiestnili na videomonitoring. Záznam bol snímaný kamerami 24 h denne. Slúžil na monitorovanie zdravotného stavu zvierat a na detekovanie rozvoja epilepsie.

Epileptické záchvaty sa vyhodnocovali podľa Racinovej stupnice (Racine, 1972) (Tabuľka 4 a Obrázok 15 Racinová stupnica). Bez záznamu EEG nebolo možné s istotou

určiť prítomnosť záchvatov 1. a 2. stupňa. Preto sa bral do úvahy iba výskyt konvulzívnych záchvatov (3. - 5. stupeň) najneskôr na 10. deň po operácii.

Tabuľka 4 Racinová stupnica

Racinová stupnica	
1. stupeň	pohyby úst a tváre
2. stupeň	kývanie hlavou
3. stupeň	klonický pohyb jednou prednou končatinou
4. stupeň	klonický pohyb oboma prednými končatinami
5. stupeň	klonické pohyby a strata rovnováhy



Obrázok 15 Racinová stupnica

3.5 Perfúzia zvierat

Transkardiálna perfúzia zvierat prebehla v časových úsekoch podľa Tabuľka 3, pozitívna kontrola sa perfundovala na 3. deň po operácii, pričom deň operácie bol považovaný za deň 0. Potkany sa predávkovali intraperitoneálnou injekciou 20% uretánu. Štandardné podávané množstvo bolo 5 ml, v prípade epileptických potkanov bolo niekedy potrebné zvýšiť dávku až na 10 ml. Počas perfúzie bola zaklipovaná brušná aorta medzi pečňou a tenkým črevom. Ihla sa zaviedla do ľavej komory a prestrihla sa pravá predsieň,

aby mohla krv voľne vytekať. Preplachovalo sa s 0,01M PBS izbovej teploty, a potom ľadovým 4% paraformaldehydrom na zafixovanie tkaniva. Používané objemy oboch roztokov boli 400 ml, prípadne sa individuálne zvyšovali podľa potreby.

Tabuľka 5 Koordináty pre aplikáciu endotelínu

Mozgová štruktúra	Koordináty pre aplikáciu endotelínu (2 µl s obsahom endotelínu 40 pmol/µl)	
bazálne gangliá	AP: 0,0; L: 3,0; D: 5,0	AP: 0,0; L: -3,0; D: 5,0
hipokampus	AP: 5,3; L: 3,0; D: 5,5	AP: 5,3; L: -3,0; D: 5,5

3.6 Spracovanie tkaniva

Mozog bol po extrakcii z lebky 3 hodiny postfixovaný v 4% paraformaldehyde pri 5 °C. Potom nasledovala vzostupná rada 10%, 20% a 30% roztoku sacharózy. V jednotlivých roztokoch bol mozog ponechaný 24 h pri teplote 5 °C. Následne sa zamrazil v suchom ľade na -80 °C alebo v bločku 30% sacharózy na -20 °C. Kryostatom (Leica CM 1900) sa krájali 50 µm hrubé koronárne rezy. Pre okamžité spracovanie sa ukladali do 0,01M PBS. V prípade dlhodobého uskladňenia pri -20 °C sa použilo kryoprotektívne médium (30 % etylénglykolu, 25 % glycerolu a 45 % 0,05M PBS), ktoré bolo nutné odstrániť pred ďalším spracovaním premytím 3 x 5 min v 0,01M PBS.

3.7 Nisslovo farbenie

Pre Nisslovo farbenie sa rezy natáhovali z 0,01M PBS na poželatínované podložné sklíčka. Nechali sa voľne usušiť niekoľko dní pri izbovej teplote, chánené pred prachom. Na úvod farbenia sa rezy nechali v 96% etanole a chloroforme v pomere 1:1 po dobu 1 - 4 hodín. Potom nasledovala rehydratácia rezov v zostupnej etanolovej rade (100% 10 min, 90% 10 min, 70% 5 min), tak krátky oplach v 500 ml destilovanej vody okyslenej 0,25 ml kyseliny octovej a nakoniec farbenie 7 - 12 min v roztoku krezylvej violeti. Rezy sa prepláchli pod prúdom tečúcej vody, následne sa dehydratovali a odfarbovali vo vzostupnej etanolovej rade (70% 3 min, 90% 3 min, 100% 3 min, 100% 3 min). V tomto prípade išlo o

približné časy a rezy sa priebežne kontrolovali pod mikroskopom, aby sa zaistilo dostatočné odfarbenie. Nasledoval krátky preplach v roztoku acetónu a xylénu (2:1, 1:1, 1:2) a v xyléne. Rezy sa uložili do xylénu a na druhý deň sa Solakrylom montovali krycie sklíčka. Preparáty sa uchovávali pri izbovej teplote.

3.8 Histochemické farbenie FJB a DAPI

Fluorojade B (FJB) patrí medzi fluorescentné ligandy. Vyznačuje sa vysokou afinitou k degenerujúcim neurónom (apoptickým aj nekrotickým), vrátane celého tela bunky, axónov a dendritov. Po chemickej stránke sa jedná o zmes troch fluorochrómov. Zatiaľ nie je známa presná molekula, na ktorú sa FJB viaže. Špekuluje sa, že ide o polyamín, konkrétne putrescín, kadaverín, spermadín alebo histamín (Schmued a Hopkins, 2000).

Zásobný roztok FJB sa pripravil v tme rozpustením 10 mg prášku FJB (Chemikon AG 310) v 100 ml redestilovanej vody. Následne sa rozpipetoval po 1 ml do ependorfiek a zamrazil na -20°C . Rovnako sa pripravil aj zásobný roztok DAPI (Sigma Aldrich, 32670). 2,5 mg DAPI sa za tmy rozpustilo v 25 ml redestilovanej vody a po 1 ml zamrazilo na -20°C .

Farbiaci roztok FJB s DAPI sa pripravoval vždy tesne pred použitím z 2 ml zásobného roztoku DAPI, 4 ml zásobného roztoku FJB a 96 ml 0,1% kyseliny octovej.

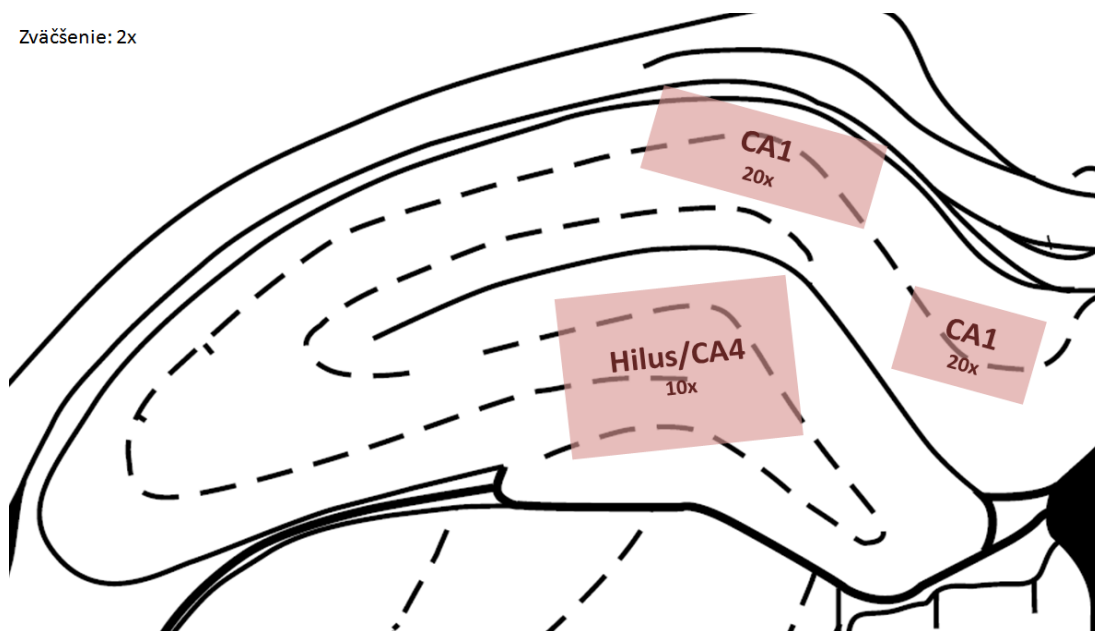
Rezy sa naťahovali z destilovanej vody alebo z 0,01M PBS na podložné sklíčka potiahnuté 1% roztokom želatíny. Pred farbením sa aspoň 24 h sušili pri teplote 37°C . Potom sa ponorili na 5 minút do roztoku absolútneho etanolu a 5% NaOH v pomere 4:1, alebo len do samotného absolútneho etanolu. Nasledovali 2 minúty v 70% etanole, 2 minúty v destilovanej vode, 10 minút v 0,06% permanganáte draselnom (Sigma-Aldrich, 31404) na miešacom stolíku, 2 minúty v destilovanej vode, 20 minút vo farbiacom roztoku za tmy a nakoniec 3 x 1 minúta v destilovanej vode. Rezy sa nechali usušiť v tme pri teplote 37°C do ďalšieho dňa. Pred lepením krycích sklíčok boli odvodnené 3 x 2 minúty v xyléne. Preparáty boli uchovávané v tme pri teplote 5°C .

Na prípravu 0,1% kyseliny octovej a 0,06% permanganátu draselného sa používala redestilovaná voda.

3.9 Vyhodnotenie Nisslovho a histochemického farbenia FJB a DAPI

Farbené rezy sa prezerali na mikroskope Olympus BX. Výsledky sa zakresľovali do 8 koronárnych schém mozgu potkana z neuroanatomického atlasu (Paxinos a Watson, 1998). Určovala sa podľa nich poloha stopy po ihle a prítomnosť FJB pozitívnych buniek. Na základe prvotných pozorovaní Nisslovho farbenia boli z každého zvieraťa v skupine D16. dx zhotovené fotografie dx a sin hipokampu a jeho jednotlivých častí (Obrázok 16). Zostavila sa z nich slepá štúdia podobná tej, akú vykonali Blümcke a kolektív (2013). Z farbenia pre FJB sa stanovil rostro-kaudálny rozsah poškodenia subikula, CA1 a hilu/CA4 podľa vzorca: rozsah = hrúbka rezu 50 μ m x počet rezov x 5 (farbil sa každý 5. rez). Údaje sa ďalej vyhodnocovali štandardnými štatistickými metódami. Fotky boli zhotovené mikroskopom Olympus AX.

Zväčšenie: 2x



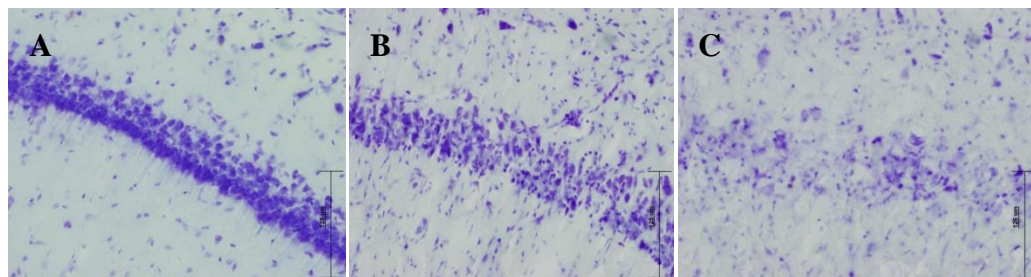
Obrázok 16 Fotky pre slepú štúdiu. Celý hipokampus – zväčšenie 2x; CA1 – zväčšenie 20x; hilus/CA4 – zväčšenie 10x.

3.10 Slepá štúdia

Slepá štúdia obsahovala celkovo 104 fotografií z Nisslovho farbenia. Išlo o 13 zvierat, konkrétne 9 potkanov zo skupiny 16. dx, 2 kontrolné z rovnakej skupiny a 2 zvieratá z iných pokusov z Oddelenia vývojovej epileptológie, u ktorých bola popísaná HS.

Fotografie boli číslované náhodne. Každý hipokampus a detaily jeho štruktúr tvorili jeden súbor s identickým poradovým číslom.

Vybrali sa dve osoby skúsené v oblasti histológie a epilepsie, ktoré mali za úlohu vyhodnotiť fotografie podľa stupnice 0-1-2 (0 = bez viditeľného poškodenia; 1 = viditeľné poškodenie; 2 = hipokampálna skleróza, úbytok neurónov nad 80 %) (Obrázok 17). Taktiež boli požiadané o komentár v prípade zistenia ďalších patologických javoch.



Obrázok 17 Stupnica pre slepú štúdiu. **A:** 0 (bez viditeľného poškodenia); **B:** 1 (viditeľné poškodenie); **C:** 2 (hipokampálna skleróza, úbytok neurónov nad 80 %).

4 Výsledky

4.1 Optimalizácia dávky TeNT a videomonitoring

Rozvoj epileptického syndrómu u potkanov sme vyhodnocovali na základe výskytu konvulzívnych stupňov záchvatov Racinovej stupnice (Tabuľka 4). Bez záznamu EEG sa nedali s určitosťou identifikovať nekonvulzívne záchvaty prvého a druhého stupňa. Preto sme nemohli sledovať dynamiku záchvatov a určiť presný začiatok epilepsie.

S istotou ale môžeme potvrdiť rozvoj epilepsie na 10. deň u všetkých zvierat, ktoré boli injektované dávkou 10 a 20 ng/ μ l. U týchto potkanov sa vyskytovali konvulzívne záchvaty stupňa 5 Racinovej stupnice. Prejavom bolo prerušenie činnosti alebo strhnutie zo spánku. Nasledovali mimické automatizmy a kývavé pohyby hlavou. Záchvat pokračoval klonickým pohybom najprv jednej, potom oboch predných končatín a postupne prerástol do straty rovnováhy. Pri obnovení štandardnej fyziologickej aktivity sa vyskytoval tzv. “wet dog shake”, zvierat sa niekoľkokrát spontánne otriaslo. Pre ďalšie pokusy sme preto zvolili koncentráciu 10 ng/ μ l, pretože kritériom je použiť čo najmenšie množstvo TeNT pre indukciu syndrómu TLE.

4.2 Indukcia epilepsie

4.2.1 Indukcia epilepsie u D16

U všetkých potkanov skupine D16 (dx aj sin) sme potvrdili rozvoj spontánnych opakovaných epileptických záchvatov. Konvulzívne prejavy sa objavili najneskôr na 10. deň po operácii a pretrvávali až do 16. dňa. Ďalším pozorovaním bola zvyšujúca sa agresivita a citlivosť, preto sme museli zvoliť umiestnenie zvierat do individuálnych boxov.

4.2.2 Indukcia epilepsie u D4 a D8

V skupine D4 a D8 sme nedokázali s istotou potvrdiť rozvoj epilepsie. Kvalita videozáznamu neumožňovala rozlíšiť nekonvulzívny epileptický záchvat od prirodzenej fyziologickej aktivity.

4.3 Indukcia ischémie u slepej kontroly a farbenie pre FJB a DAPI

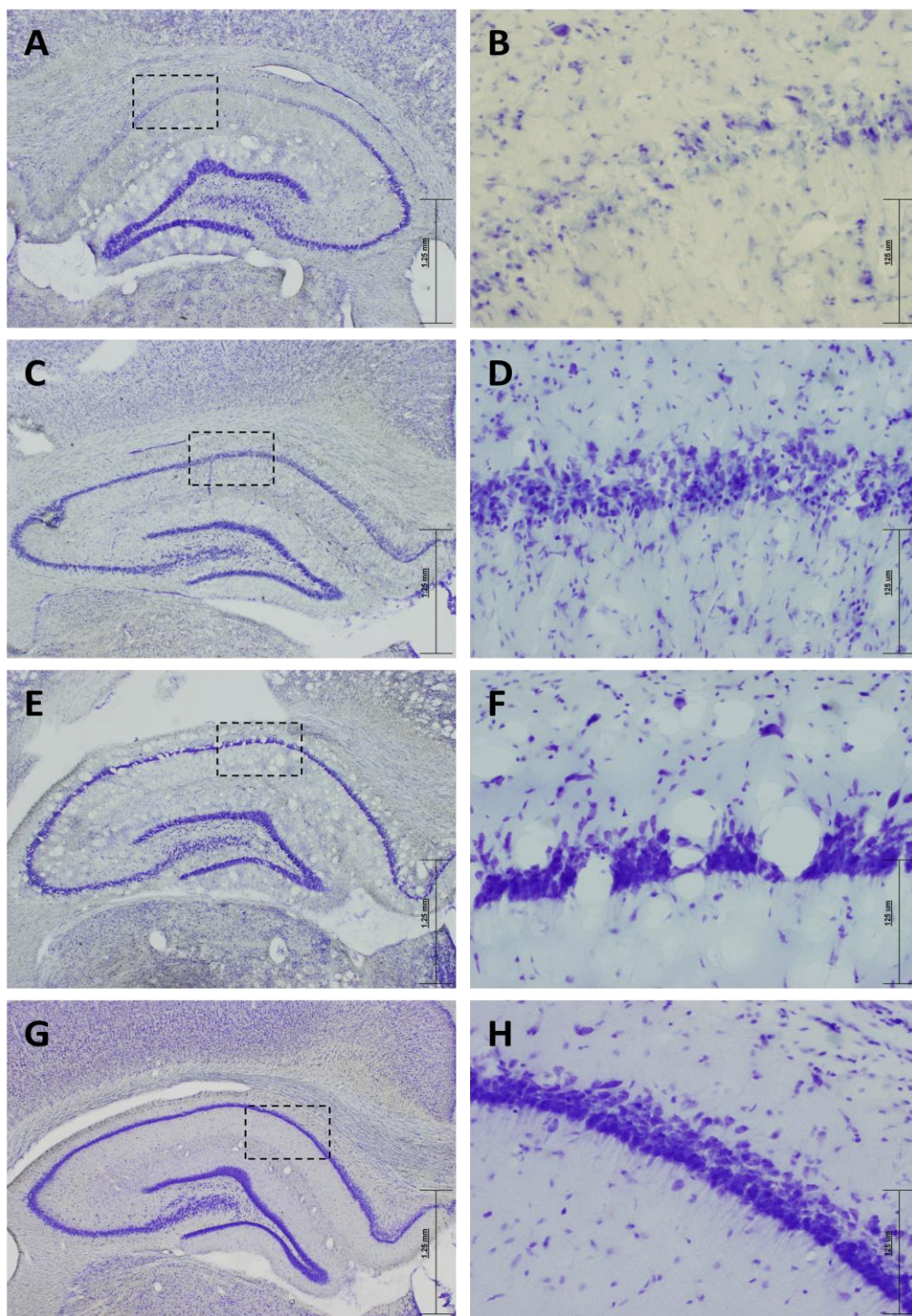
Zvolené koordináty pre aplikáciu endotelínu sa ukázali ako vhodné pre indukciu ischémie u potkana. Zviera malo zníženú schopnosť pohybu a koordináciu, ale bolo naďalej schopné prijímať vodu a potravu. Rezy mozgu sa počas testovania metodiky spoľahlivo farbili pre FJB a DAPI.

4.4 Skupina D16

4.4.1 Skupina D16 - Nisslovo farbenie

Pomocou farbenia Nisslovej substancie sme hodnotili prítomnosť makroskopickej lézie hipokampu. Mrazenie v bločkoch sacharózy zanechávalo na rezoch artefakty v podobe značne rozťahnutých ciev a komôr, zamrazovanie v suchom ľade bolo bez artefaktov. Pri tomto farbení sme tiež lokalizovali stopu po ihle a miesto aplikácie TeNT.

HS je definovaná ako 80% strata neurónov. Na Nisslovom farbení to môžeme pozorovať ako takmer úplne vymiznutie buniek v oblastiach CA1 - CA4. V našom prípade sme makroskopickú léziu identifikovali v CA1 oblasti v dorzálnom hipokampe kontralaterálnom k injekcii u 4/9 potkanov v skupine D16-dx (Obrázok 18A-B). V niektorých prípadoch sme pozorovali zníženú denzitu buniek v oblasti CA1. Zasiiahnuté boli oba dorzálne hipokampy, ipsilaterálny u 4/9 a kontralaterálny u 3/9 potkanov. Išlo o stratu farbiteľnosti štruktúry oproti kontrole, ale znížená hustota buniek nekorelovala s definíciou HS (Obrázok 18C-D). U 2/9 potkanov s TeNT bol hipokampus nepoškodený v celom rozsahu (Obrázok 18E-F).

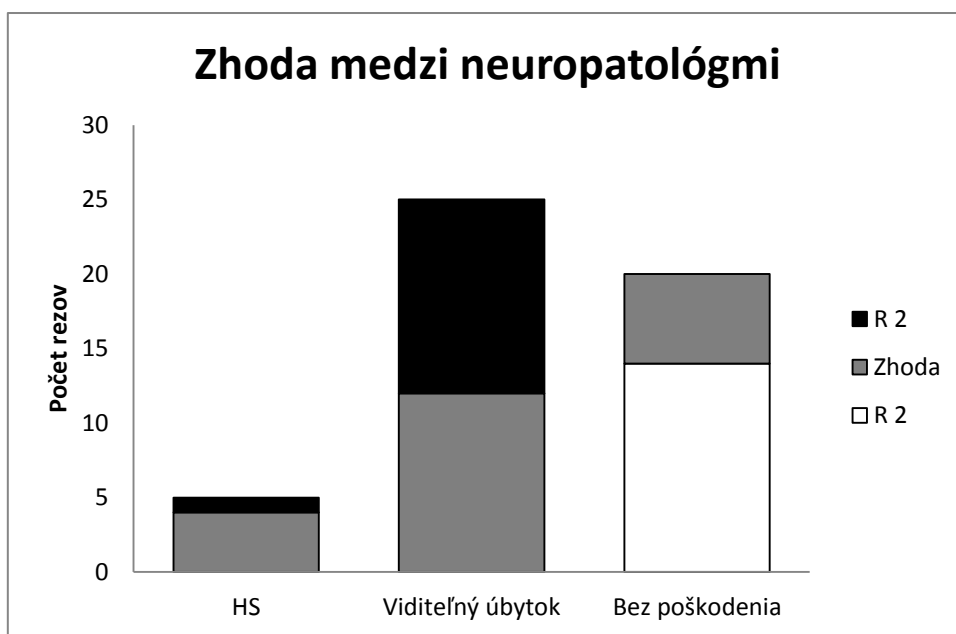


Obrázok 18 Nisslovo farbenie, skupina D16. A-B: hipokampálna skleróza; **C-D:** viditeľný úbytok buniek na Nisslovom farbení; **E-F:** normálny nález u potkana s aplikovaným TeNT, zviera malo rozvinutý epileptický syndróm; **G-H:** kontrolné zviera **A, C, E, G:** kontralaterálny hipokampus; **B, D, F, H:** detail CA1, lokalizácia je vyznačená čiarkovane na A, C, E, G.

4.4.2 Výsledky slepej štúdie

Cieľom slepej štúdie bolo nezávislé hodnotenie morfológických nálezov u tetanotoxínových zvierat dvoma skúsenými neuropatológmi, ktorí majú bohaté skúsenosti s hodnotením epileptického tkaniva ako z experimentu, tak z resekovaného tkaniva u kandidátov chirurgickej liečby epilepsie. Slepej štúdie sa celkovo zúčastnili dvaja neuropatológovia (R1, R2). Vyhodnocovanie fotiek značne zhoršovali artefakty spôsobené nevhodným mrazením. Výsledky hodnotenia jednotlivých rezov sú zobrazené v Graf 4 a Graf 5.

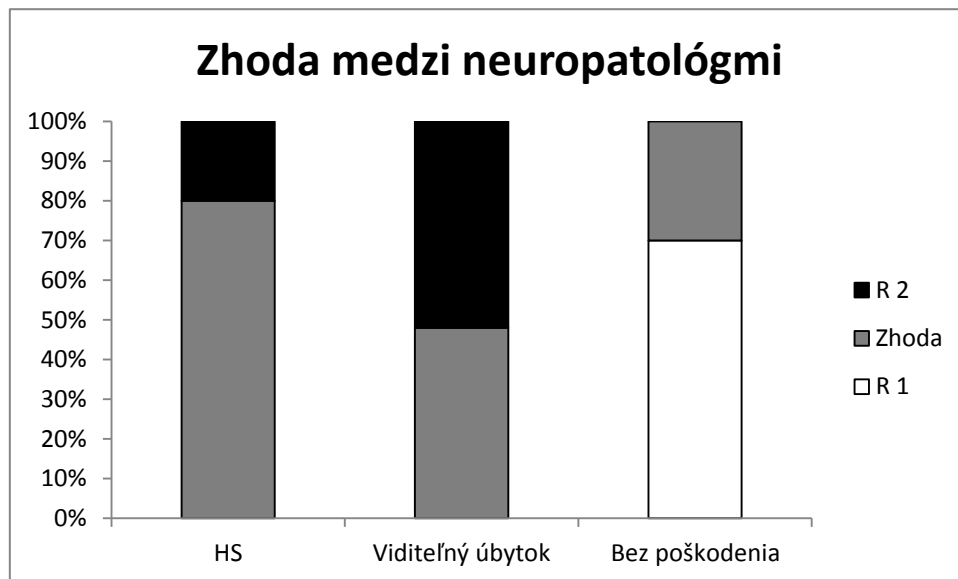
Graf 2 Zhoda medzi neuropatológmi - absolútna



Výsledky hodnotenia naznačovali, že nedochádza k pomerne dobrej zhode, a to predovšetkým v prípade hodnotenia preparátu s viditeľným úbytkom a s nálezom bez poškodenia. Analýzou hodnotenia rezov tetanotoxínových zvierat sme zistili, že v prípade HS dochádzalo ku zhode v 80 % (4/5 rezov, Graf 2 a Graf 3). V prípade viditeľného úbytku sa neuropatológovia zhodovali v 48 % (12/25 rezov) a v prípade rezov bez poškodenia bola zhoda iba 60 % (6/20 rezov). Štatistické porovnanie pomocou neparametrického testu (Mann-Whitney test, $p < 0,01$) potvrdilo prítomnosť signifikantného rozdielu v hodnotení. Použitie Cohenovho kappa testu, ktorý je špecificky určený pre hodnotenie zhody medzi hodnotiteľmi, preukázal nízku zhodu na úrovni kappa 0,28, kedy sa nedá vylúčiť, že

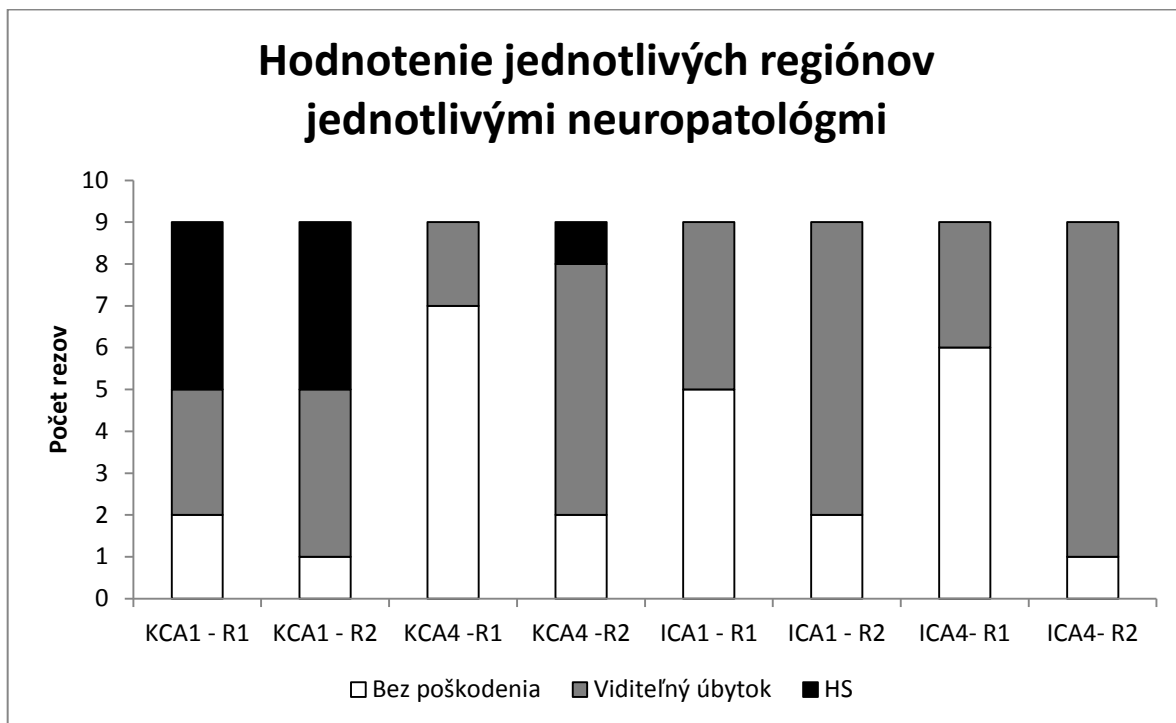
hodnotenie zhody nálezu môže byť náhodné. Pravdepodobnou príčinou rozdielného hodnotenia bola odlišná prítomnosť jednotlivých neuropatológov.

Graf 3 Zhoda medzi neuropatológmi - relatívna

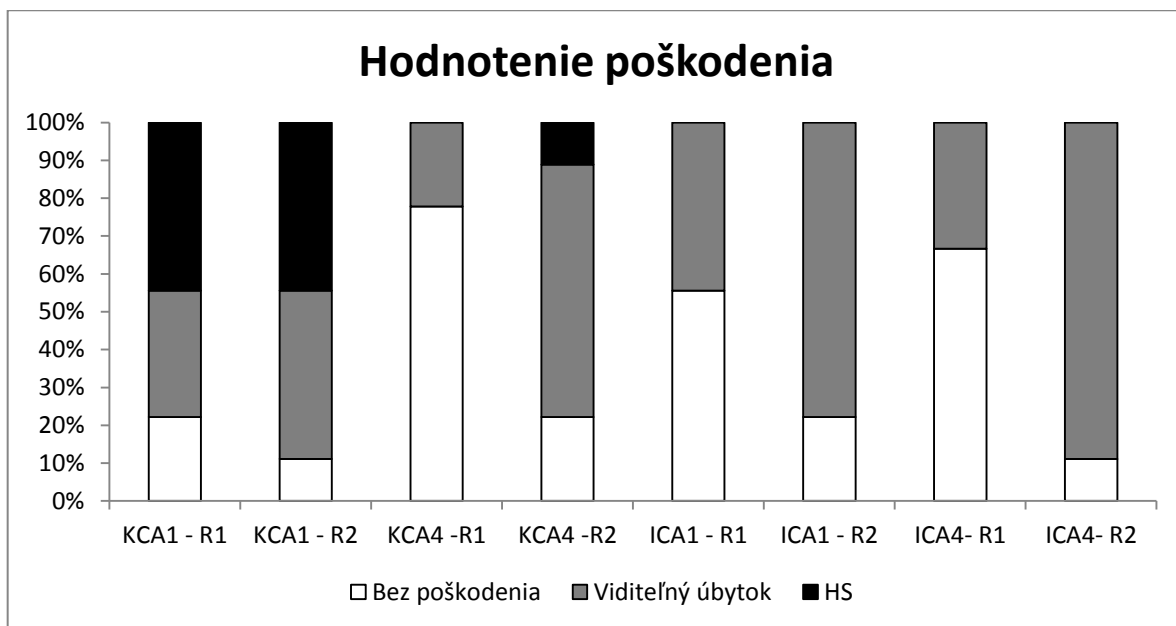


V ďalšom kroku sme testovali hypotézu, či sa hodnotenie tetanotoxínových nálezov bez poškodenia a s viditeľným úbytkom neurónov líši od hodnotenia kontrolných rezov. Overenie tejto hypotézy malo za cieľ zistiť, či je možné tetanotoxínový model považovať za model nelezionálnej epilepsie. V prípade prvého hodnotiteľa sa rozdiel tetanotoxínových rezov významne líšil od kontrolných nálezov (Mann-Whitney test, $p < 0,05$), zatiaľ čo v prípade druhého hodnotiteľa nebolo možné rozlíšiť hodnotenie kontrolných rezov od tetanotoxínových (Mann-Whitney test, $p > 0,05$). Vzťah viditeľného úbytku a HS s prítomnosťou neurónov pozitívnych pre FJB preukázal pozitívnu koreláciu na hladine 0,5 u prvého hodnotiteľa (Kedallov korelačný koeficient, $p < 0,05$), zatiaľ čo u druhého hodnotiteľa popis rezov s Nisslovým farbením nekoreloval s nálezom na rezoch farbených FJB (Kedallov korelačný koeficient, $p < 0,05$).

Graf 4 Hodnotenie jednotlivých regiónov jednotlivými neuropatológmi



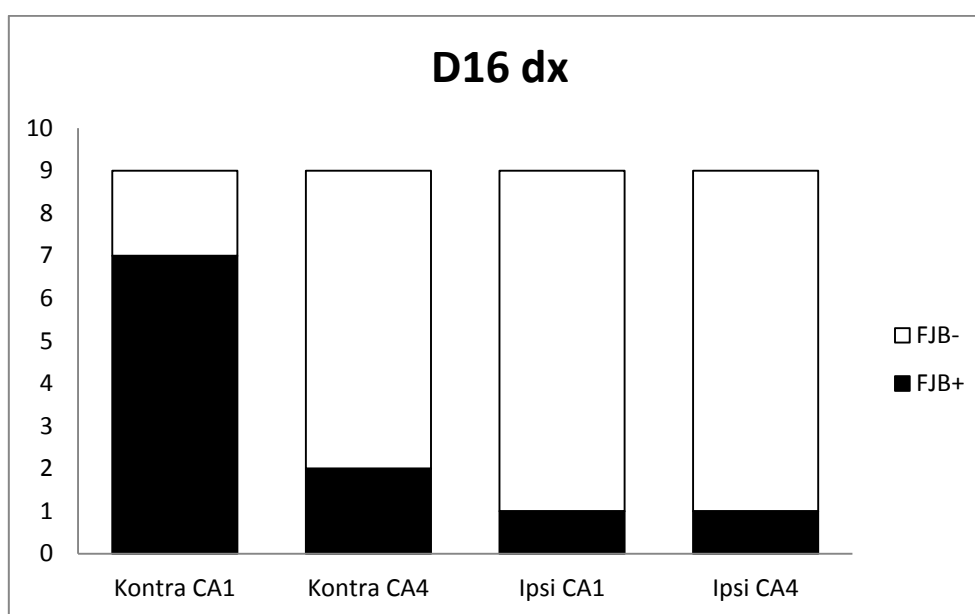
Graf 5 Hodnotenie poškodenia



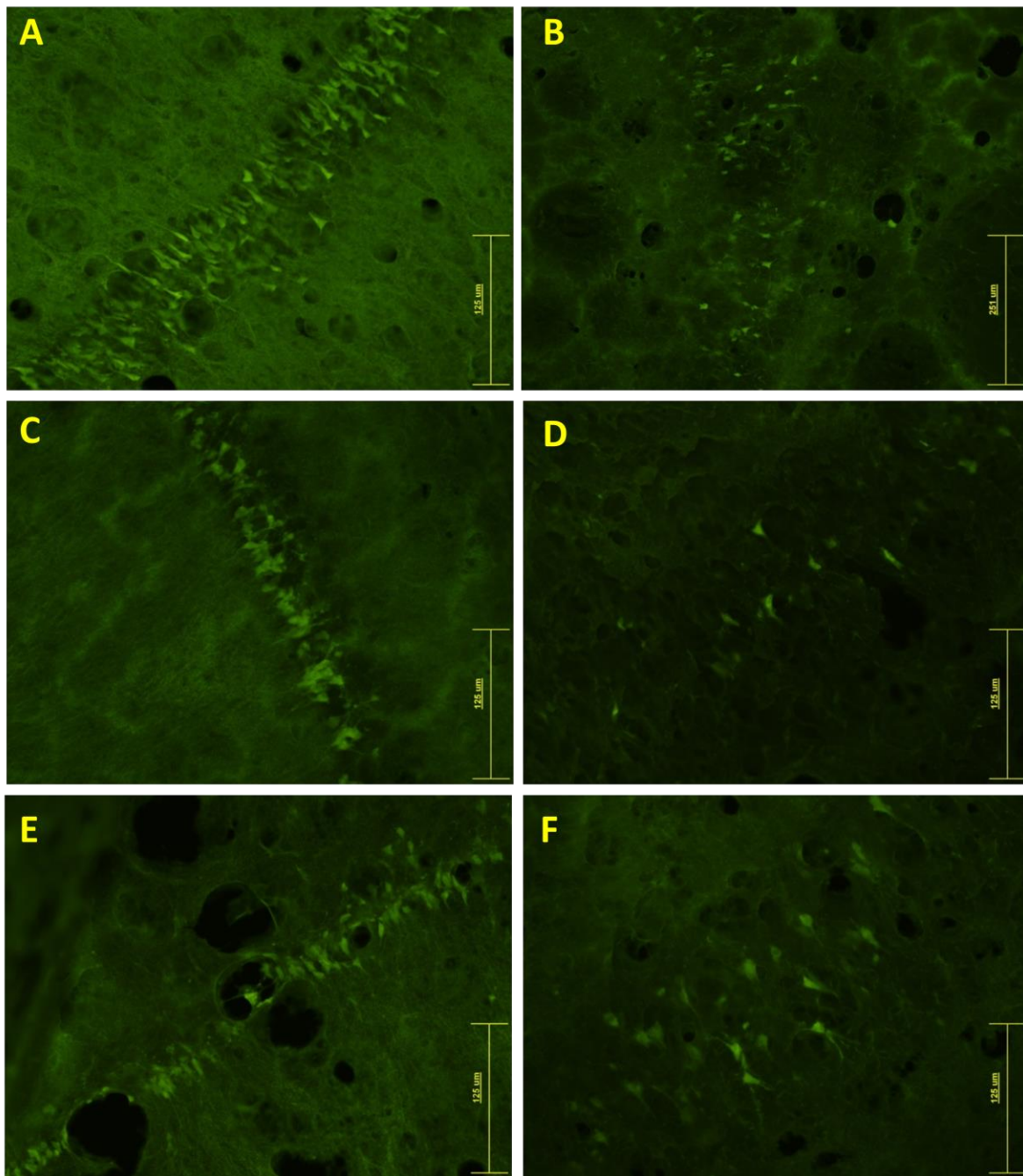
4.4.3 Skupina D16 - histochemické farbenie FJB a DAPI

Pomocou pozitívnej kontroly sme potvrdili funkčnú metodiku farbenia pre FJB a DAPI, čím sme vylúčili prítomnosť falošne negatívnych výsledkov. Vyhodnocované štruktúry na rezoch sa považovali za pozitívne pre FJB (FJB+), ak boli v ich oblasti prítomné minimálne 3 pozitívne bunky. Bez ďalších markerov nebolo možné odlíšiť oblasť CA2, preto bola hodnotená spoločne s CA1. Farbenie DAPI sa využívalo na identifikáciu štruktúry s FJB pozitívnymi bunkami.

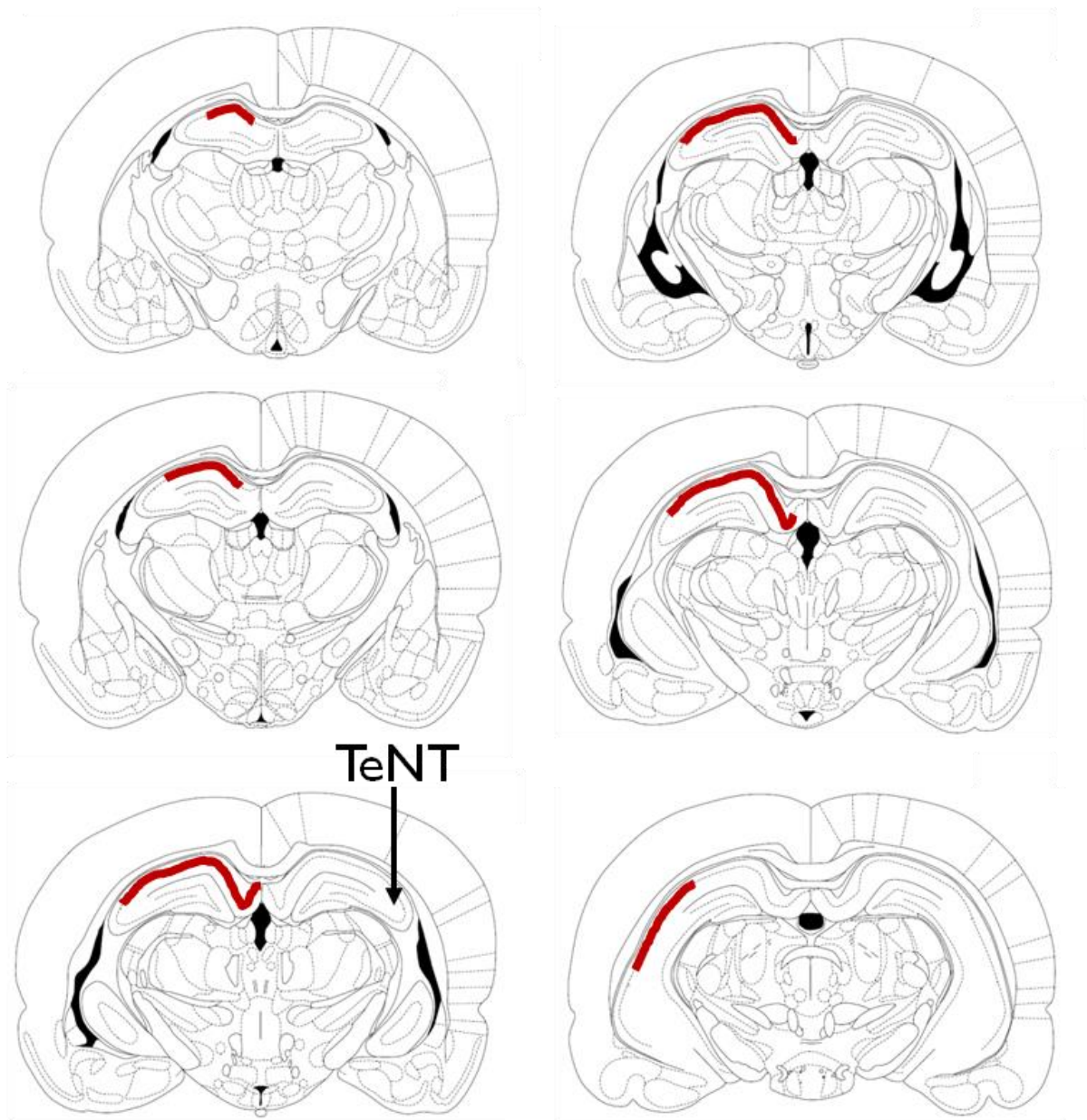
Graf 6 Distribúcia FJB v skupine D16 dx



V mieste vpichu u kontrolných zvierat v D16 sa už nenachádzali žiadne degenerujúce neuróny ani FJB+ prach. Experimentálne potkany (7/9) mali FJB+ bunky prítomné v CA1 dorzálneho hipokampu kontralaterálnemu k injekcii, u 1/7 zvierat aj ipsilaterálne. Ďalej sa degenerujúce bunky vyskytovali v CA4 kontralaterálneho hipokampu u 2/7 zvierat (Graf 6). Zaznamenali sme koreláciu medzi zníženým úbytkom neurónov a hipokampálnou sklerózou s miestom výskytu FJB+ buniek v oblasti CA1 (Obrázok 19). Názorná distribúcia pozitívnych buniek popisuje schématický Obrázok 20.



Obrázok 19 FJB, skupina D16. A, C, E: detail CA1; **B, D, F,** : detail CA4; **A-B:** hipokampálna skleróza, kontralaterálny hipokampus; **C-D:** na Nisslovom farbení bola popísaný viditeľný úbytok neurónov, ipsilaterálny hipokampus; **E-F:** viditeľný úbytok buniek na Nisslovom farbení, kontralaterálny hipokampus.

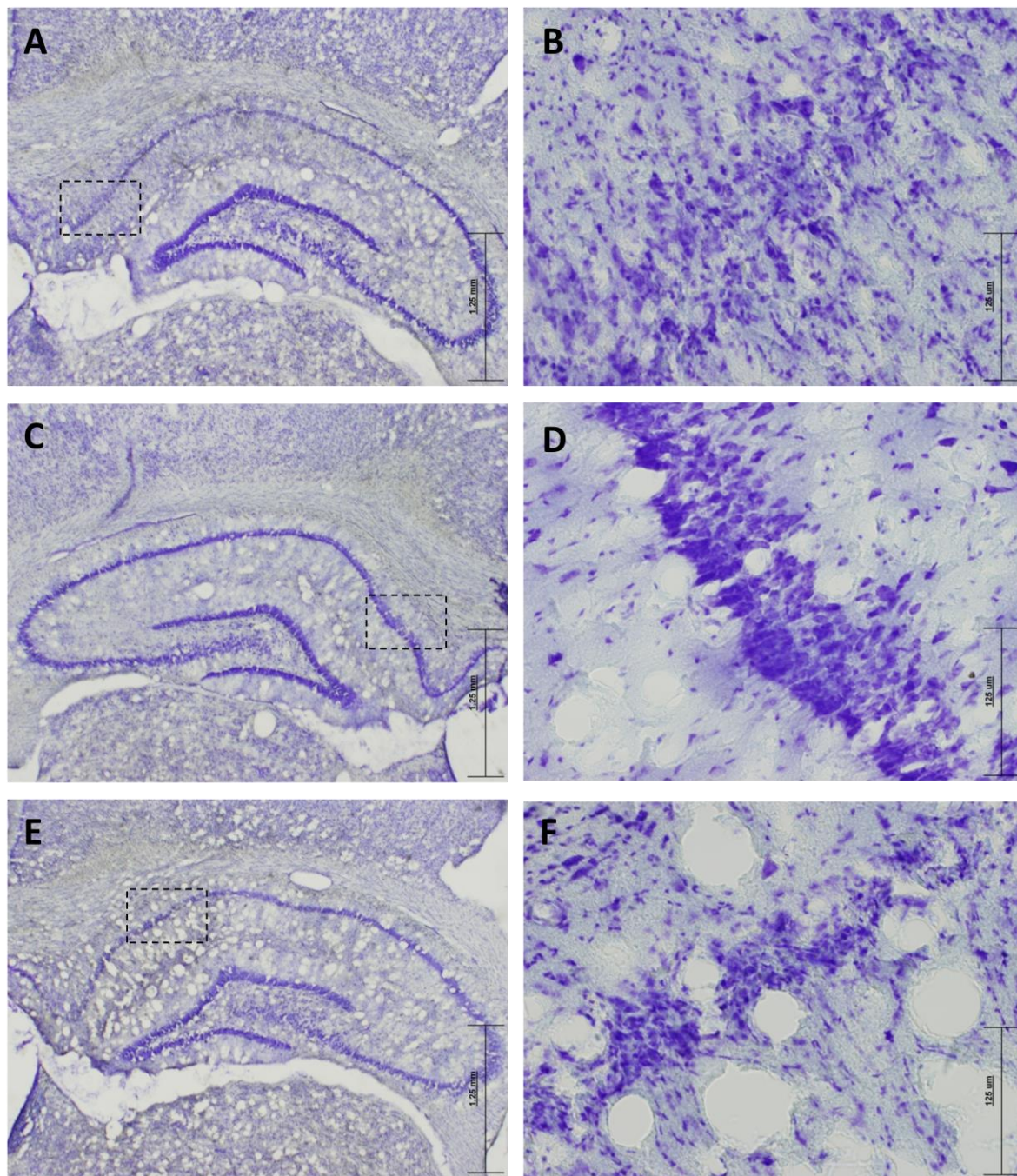


Obrázok 20 Schéma distribúcie buniek pozitívnych pre FJB. Obrázok demonštruje rostro-kaudálnu distribúciu FJB+ buniek v CA1 kontralaterálneho hipokampu u 7/9 zvierat v skupine D16-dx (vyznačené červenou).

4.4.4 Aplikácia TeNT doľava – Nisslovo farbenie

Testovali sme závislosť nálezu na Nisslovom farbení v skupine D16 od strany, na ktorú sa TeNT aplikoval. Výsledky opäť ukázali poškodenie CA1 v kontralaterálnom

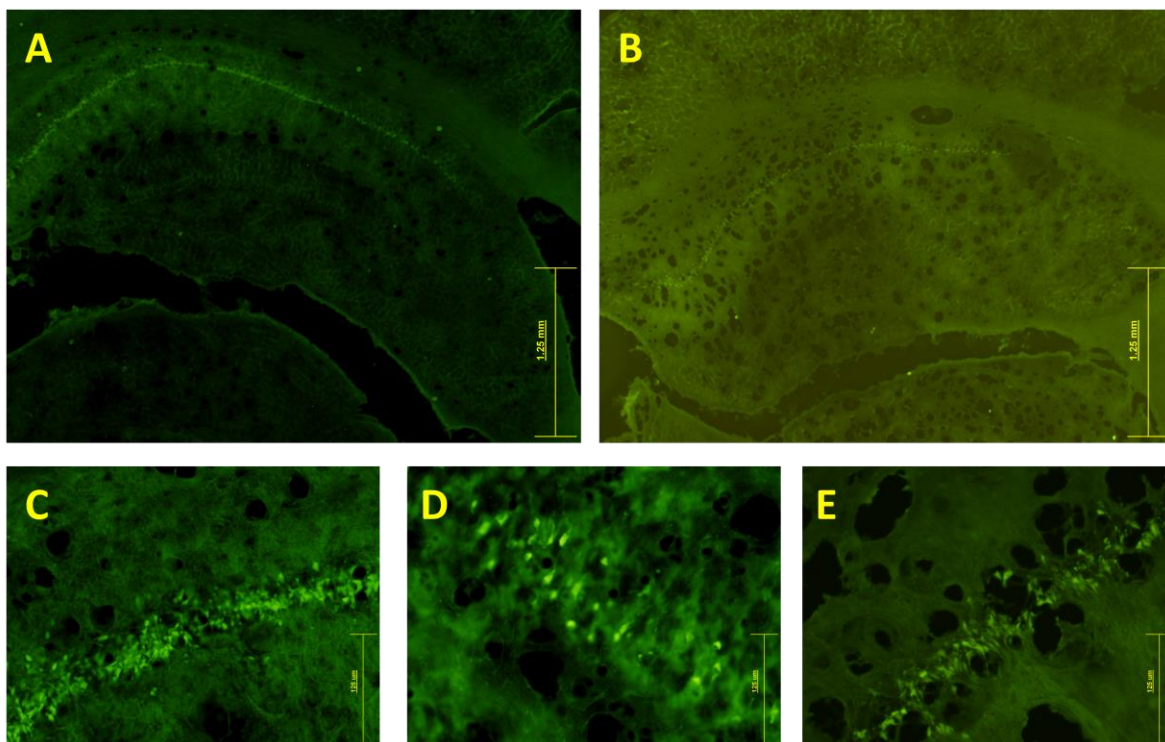
hipokampe. HS bola u 1/3 zvierat a viditeľný úbytok u 2/3. Ipsilaterálne sme nezaznamenali žiadnu zníženú denzitu farbenia.



Obrázok 21 Nisslovo farbenie, skupina D16-sin. **A,E:** kontralaterálny hipokampus; **B, D, F, :** detail CA1, lokalizácia je vyznačená čiarkovane na A, C, E; **C:** ipsilaterálny hipokampus; **A-B:** hipokampálna skleróza; **C-D:** ipsilaterálny hipokampus bez viditeľného nálezu na Nisslovom farbení; **E-F:** viditeľný úbytok buniek na Nisslovom farbení, kontralaterálny hipokampus.

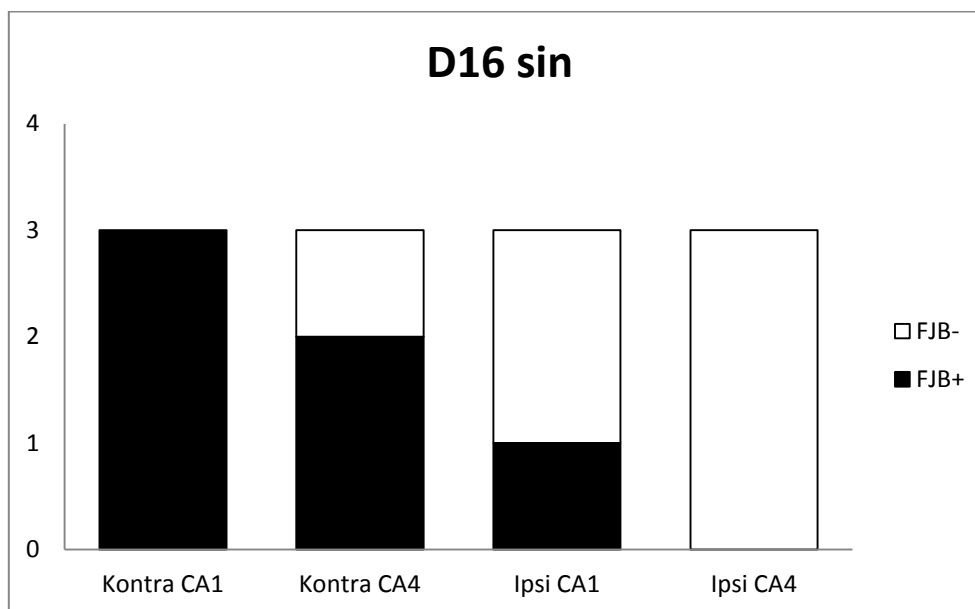
4.4.5 Aplikácia TeNT doľava - histochemické farbenie FJB a DAPI

Lokalita buniek pozitívnych pre FJB opäť korelovala s miestom výskytu HS a viditeľného úbytku. Zasiahnuá bola CA1 kontralaterálneho hipokampu u 3/3 zvierat a ipsilaterálneho u 1/3. Navyše boli pozitívne bunky prítomné aj v kontralaterálnej CA4 u 2/3 potkanov (Graf 7).



Obrázok 22 FJB, skupina D16 sin. A-B: celý hipokampus, kontralaterálny; **C a E:** detail oblasti CA1; **D:** detail CA4.

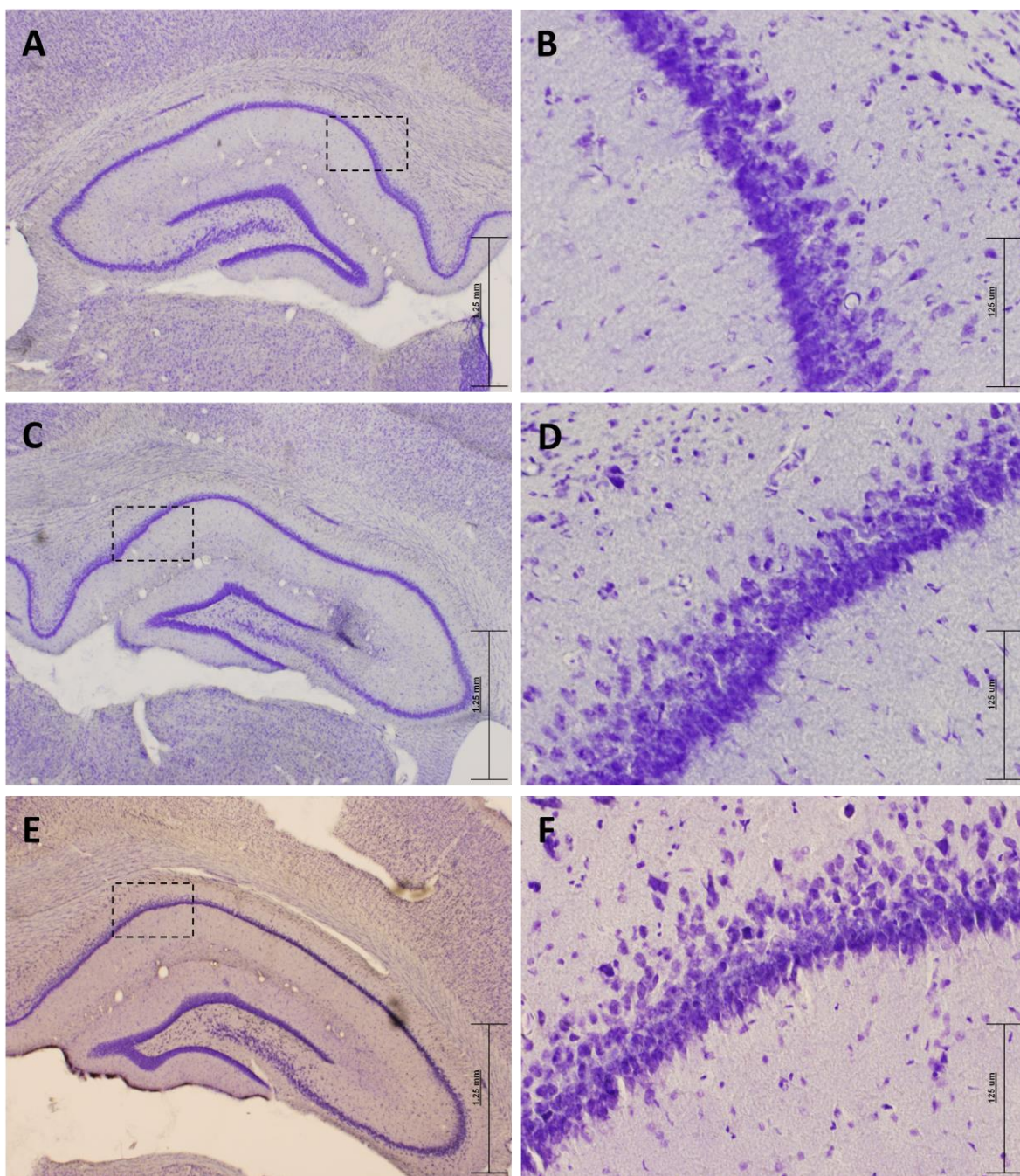
Graf 7 Distribúcia FJB v skupine D16 sin



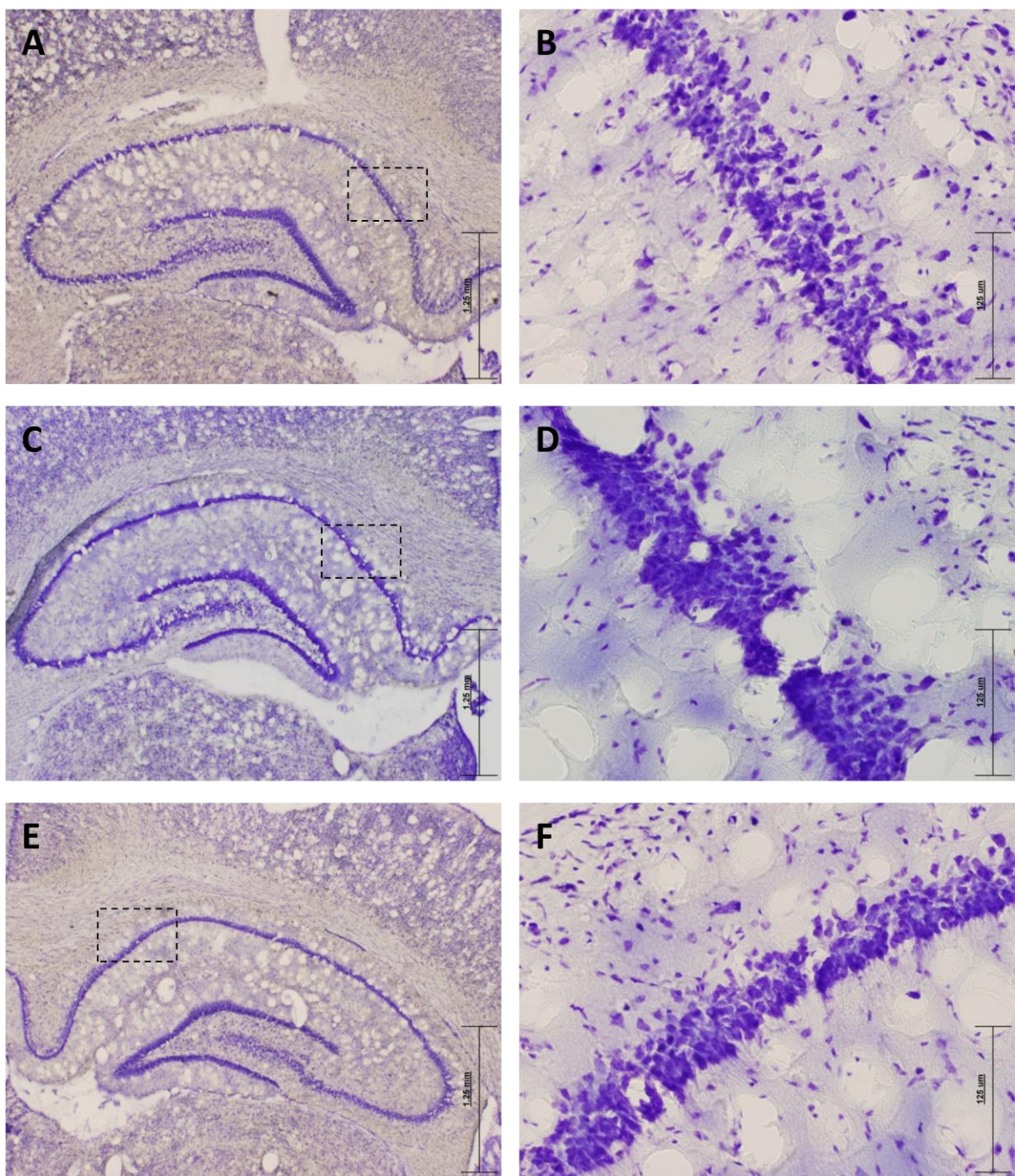
4.5 Skupina D8 a D4

4.5.1 Skupina D8 a D4 - Nisslovo farbenie

Na základe nálezu u skupiny D16 sme sa pozreli, ako sa mení štruktúra hipokampu v skorších obdobiach po aplikácii TeNT. Nisslovo farbenie však neukázalo prítomnosť HS a ani viditeľný úbytok u zvierat v skupinách D8 a D4. Mikroskopický obraz experimentálnych zvierat sa zhodoval s kontrolami, iba u jedného zvierat'a z D8 bol pozorovaný viditeľný úbytok neurónov v CA1 kontralaterálneho hipokampu (Obrázok 24).



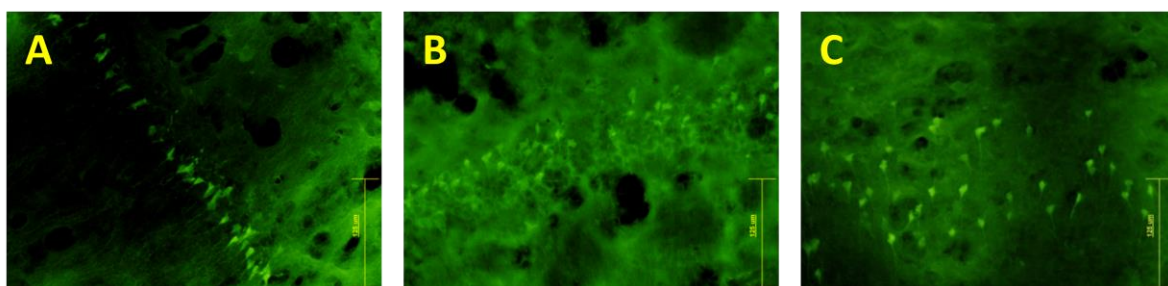
Obrázok 23 Nisslovo farbenie, skupina D4. **A-B:** kontralaterálny hipokampus, experimentálne zviera; **C-D:** ipsilaterálny hipokampus, experimentálne zviera; **E-F:** ipsilaterálny hipokampus, kontrolné zviera. **A, C, E:** hipokampus; **B, D, F:** detail CA1, lokalizácia na reze znázornená čiarkovane na fotkách A, C, E.



Obrázok 24 Nisslovo farbenie, skupina D8. A-B: kontralaterálny hipokampus, u ktorého bol pozorovaný viditeľný úbytok buniek; **C-D:** kontralaterálny hipokampus bez zjavného úbytku; **E-F:** ipsilaterálny hipokampus bez zjavného úbytku neurónov. **A, C, E:** hipokampus; **B, D, F:** detail CA1, lokalizácia na reze znázornená čiarkovane na fotkách A, C, E.

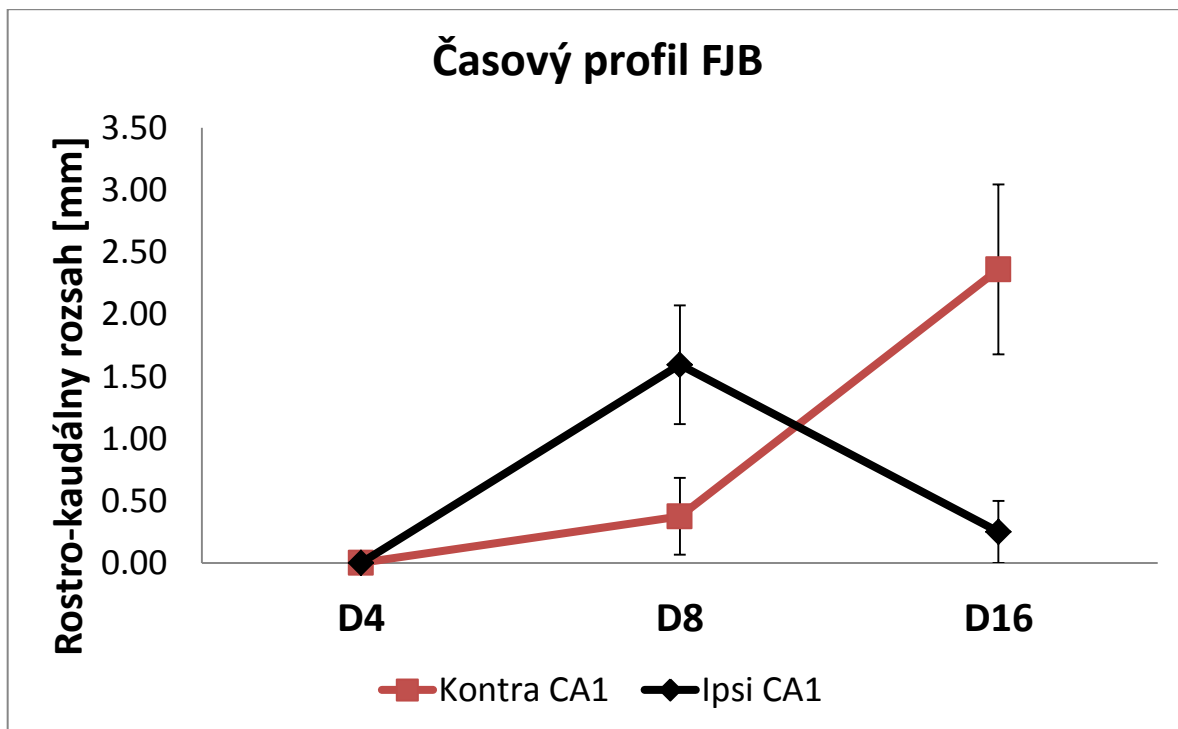
4.5.2 Skupina D8 - histochemické farbenie FJB a DAPI

Miesto distribúcie TeNT ešte vykazovalo istú slabú pozitivitu pre FJB, rovnako sa FJB+ bunky vyskytovali aj v oblasti prechodu ihly cez CA1. Degenerujúce neuróny sme pozorovali ipsilaterálne u 3/8 a bilaterálne u 2/8 potkanov (Obrázok 25) (Graf 9). Ipsilaterálne išlo o pozitivitu v oblasti subikula a CA1, kontralaterálne sa pozitivita vyskytovala iba v CA1. Rostro-kaudálny rozsah degenerujúcich buniek je zaznamenaný v Graf 8.



Obrázok 25 FJB, skupina D8. A: detail CA1 kontralaterálneho hipokampu; B: detail CA1 ipsilaterálneho hipokampu; C: detail subikula ipsilaterálneho hipokampu.

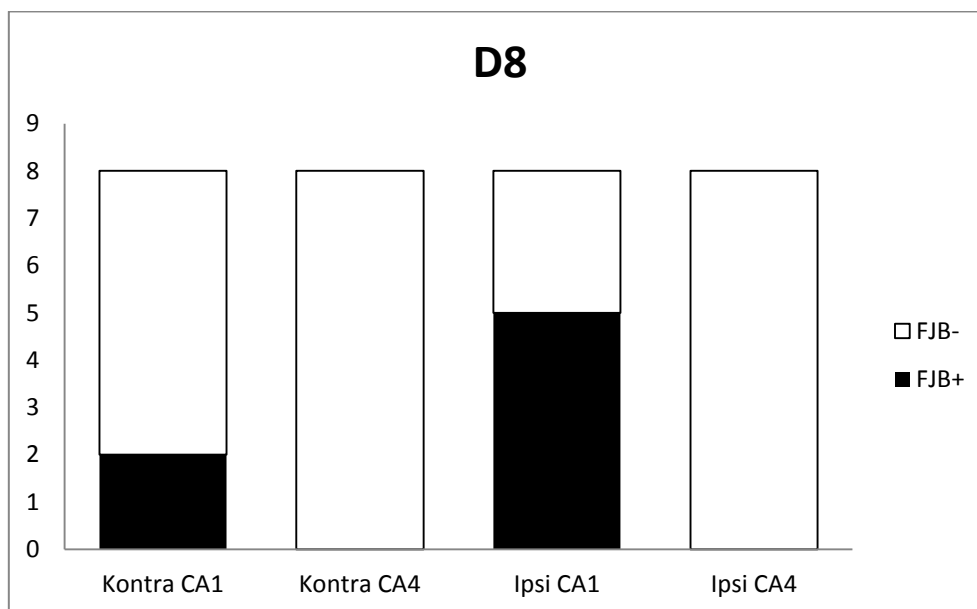
Graf 8 Rostro-kaudálny rozsah distribúcie FJB. Smerodatná odýchla (SEM).

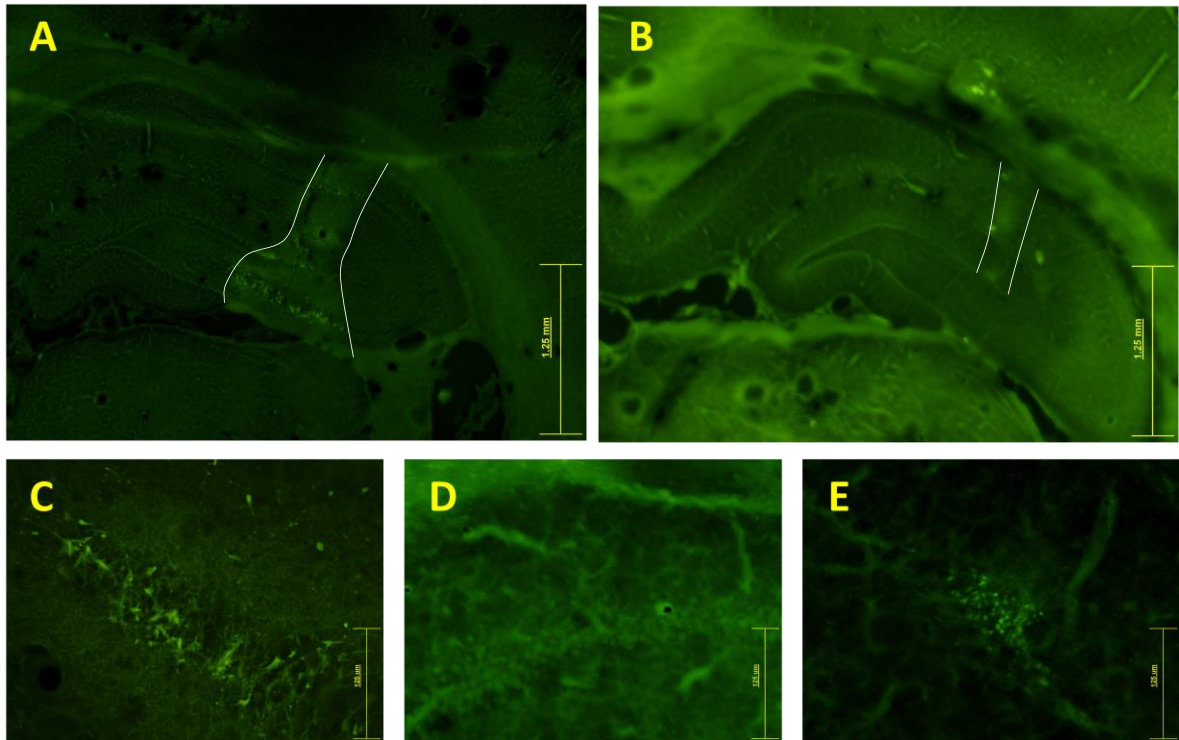


4.5.3 Skupina D4 - histochemické farbenie FJB a DAPI

U všetkých experimentálnych zvierat bolo miesto distribúcie TeNT viditeľné ako FJB+ prach (Obrázok 26A). U kontrol sa podobný nález nevyskytoval. Jeden potkan mal rozsiahlu pozitivitu v DG a CA4, ktorá bola spôsobená pravdepodobne aplikáciou TeNT priamo do CA4 (Obrázok 26C).

Graf 9 Distribúcia FJB v skupine D8





Obrázok 26 FJB, skupina D4. **A:** celý hipokampus, miesto vpichu vyznačené čiarkovane; experimentálne zviera; **B:** celý hipokampus, miesto vpichu vyznačené čiarkovane, kontrolné zviera; **C:** detail CA4 v mieste distribúcie TeNT; **D:** detail CA1, experimentálne zviera, negativita pre FJB; **E:** detail oblasti DG, miesto prechodu ihly, kontrolné zviera.

5 Diskusia

TeNT sa v experimentálnych podmienkach využíva na indukciu epileptického syndrómu u potkana. Doposiaľ je zaznamenaný epileptogénny efekt po aplikácii do kôry (Nilsen et al., 2005) a do dorzálneho aj ventrálneho hipokampu (Ferecskó et al., 2013; Mellanby et al., 1977). V našej štúdii sme potvrdili rozvoj epileptických záchvatov u potkanov v skupine D16 po aplikácii TeNT do CA3 dorzálneho hipokampu. Behaviorálne prejavy záchvatu korelovali s Racinovou stupnicou používanou pre klasifikáciu záchvatov u pilokarpínového a kainátového modelu (Tabuľka 4) (Racine, 1972). Zvolili sme minimálnu dávku TeNT, aby sa predišlo nadmernému umieraniu neurónov v mieste aplikácie (Bagetta et al., 1990).

Pri upevňovaní mozgov zamrazených na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ na podložku v kryostate pomocou vody nedochádzalo k vyplneniu vzduchových priestorov medzi hemisférami a mozgovým kmeňom. Takéto nedokonalé fixovanie zapríčinilo odlamovanie kaudálnych častí hemisfér a znehodnocovalo sa tkanivo s entorhinálnou kôrou, ktorá predstavuje jednu z významných štruktúr zapojených do epileptogénnej aktivity pri TLE (Bartolomei et al., 2005). Preto sme pristúpili k zamrazovaniu mozgov zaliatych v bločku 30% sacharózy, čo sa ale z technických príčin realizovalo pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Táto modifikácia sa ukázala ako nevhodná, pretože pri pomalom zamrazovaní vznikajú veľké kryštály ľadu a znehodnocujú tkanivo artefaktami v podobe rozťahnutých ciev. Výsledný obraz bol značne skreslený a znemožňoval akúkoľvek kvantifikáciu výsledkov. Bunky pozitívne pre FJB a HS sa dali rozlíšiť bez väčších ťažkostí, problém predstavovala identifikácia zníženej denzity buniek od neporušeného tkaniva.

Prítomnosť degenerujúcich neurónov bola popísaná už 24 h po iniciálnom SE v lezionálnom modeli TLE (Furtado et al., 2011). V našej štúdii sme u zvierat v skupine D4 zachytili morfológickú stavbu hipokampu v období epilepogenézy. Ide o čas medzi aplikáciou TeNT a rozvojom spontánnych záchvatov (Finnerty a Jefferys, 2000). Na základe nezmeného histologického obrazu Nisslovho farbenia experimentálnych zvierat oproti kontrolám a nálezom negatívnym pre FJB môžeme konštatovať, že TeNT nespôsobuje bezprostredne po aplikácii stratu neurónov hipokampu.

Obraz Nisslovho farbenia skupiny D8 neukázal žiadne morfológické rozdiely medzi experimentálnymi a kontrolnými potkanmi, ale na základe FJB sme už pozorovali prítomnosť degenrujúcich neurónov. Prednostne bol zavzatý ipsilaterálny hipokampus a subikulum (63 % zvierat), ale u 25 % prípadov sme zaznamenali začínajúcu degeneráciu aj v kontralaterálnej CA1. Z hľadiska epileptogenézy u tetanotoxínového modelu sa jedná o obdobie rozvoja nekonvulzívnych epileptických záchvatov (Jefferys a Williams, 1987).

U D16-sin bol obraz distribúcie FJB+ buniek a behaviorálne prejavy záchvatu totožné so zvieratami v D16-dx, preto sme vylúčili závislosť efektu TeNT na rozvoj epilepsie a degeneráciu neurónov od injekovanej strany mozgu. V Nisslovom farbení sa 10% HS popisuje kontralaterálne k aplikácii TeNT do ventrálneho (Shaw et al., 1990) a 30% HS pri injekcii do dorzálneho hipokampu (Jefferys et al., 1992). Naša štúdia ukázala kontralaterálnu HS až v 44 % potkanov, čo však môže byť zapríčinené nižším počtom zvierat v experimentálnej skupine. Doposiaľ publikované články zamerané na histologický obraz hipokampu u tetanotoxínového modelu udávajú 30 potkanov na skupinu, pričom my sme pracovali so vzorkou iba 9 zvierat. Zatiaľ nie je známe, čo je príčinou stranového posunu degenerácie neurónov z ipsilaterálnej strany u D8 na kontralaterálnu u D16. Pre kompletný obraz o degenerácii neurónov v tetanotoxínovom modeli TLE by ešte bolo vhodné zmapovať výskyt FJB pozitívnych buniek bezprostredne po aplikácii v intervale 24 aj 48 h a sledovať vývoj degenerácie v kontralaterálnej CA1 od 16. dňa až do definitívnej straty pozitivity pre FJB.

Použili sme slepú štúdiu na potvrdenie výsledkov ohľadom HS a viditeľného úbytku neurónov, ktoré boli pozorované pri Nisslovom farbení. Rezy sa hodnotili podľa rovnakej stupnice aká bola popísaná pri klasifikácii typov TLE u ľudí (Blümcke et al., 2013). Napriek tomu sa nám podarilo potvrdiť výskyt HS so zhodou 80 %. Pre viditeľný úbytok neurónov boli výsledky variabilnejšie, čo môže byť následok rozdielnej prítomnosti hodnotiteľov pre normálny nález a malého počtu rezov s klasickou HS. Pre ďalšiu štúdiu zvažujeme použitie farbenia NeuN v kombinácii z hematoxylínom, pretože farbí priamo neuróny, a to umožní lepšie kvalitatívne hodnotenie straty neurónov, či morfológiu danej štruktúry. V budúcnosti tiež plánujeme použiť okrem trojstupňového hodnotenia aj ďalší

parameter, kde budú neuropatológovia hodnotiť proporcionálnu stratu neurónov a hodnotiť sa budú predovšetkým celé rezy.

Ná základe výsledkov z Nisslovho farbenia a farbenia pre FJB sme potvrdili nelezionálnu povahu tetanotoxínového modelu TLE. Straty neurónov, HS a viditeľný úbytok, boli pozorované až na 16. deň od aplikácie, čo je obdobie, kedy mali všetky experimentálne zvieratá opakované spontánne záchvaty po dobu minimálne 7 dní. Proces epileptogenézy prebiehal bez degenerácie neurónov (D4). Napriek tomu, že na 8. deň boli zaznamenané FJB+ bunky v oblasti CA1, Nisslovo farbenie neukázalo žiadnu viditeľnú léziu hipokampu. Nelezionálnu povahu ďalej potvrdzuje zistenie, že k úspešnému rozvoju epileptického syndrómu došlo aj u potkanov, ktorí nevykazovali žiadnu pozitivitu pre FJB a ich hipokampus bol totožný s hipokampom kontrolných zvierat. TeNT sa v neurónoch šíri retrográdnym transportom s rýchlosťou 2,88 - 19,96 mm/h (Stöckel et al., 1975). To naznačuje, že sa môže v priebehu niekoľkých hodín po aplikácii potenciálne rozšíriť do celého mozgu potkana. Zároveň existuje zmienka o silných kontralaterálnych spojoch z CA3 do stratum oriens CA1, ktoré tvoria až 60 % (Shinohara et al., 2012). Na základe týchto faktov môžeme predpokladať, že TeNT v neurónoch kontralaterálnej a ipsilaterálnej CA1, v niektorých prípadoch aj v CA4, spôsobuje zmeny, ktoré vplyvom epileptických záchvatov vedú k degenerácii neurónov. Samotná degenerácia však neslúži ako substrát pre vznik záchvatov, pretože k nej dochádza až pri nástupe epilepsie, nie počas epileptogenézy, ako je tomu u lezionálnych modelov epilepsie (Furtado et al., 2011).

Otázka lezionality tetanotoxínového modelu je dôležitá pre interpretáciu výsledkov elektrofyzilogických štúdií. Existuje hypotéza, že vysokofrekvenčné oscilácie (HFO; angl. high frequency oscillations) charakteristické pre epileptogénnu aktivitu sú následkom straty neurónov (Staba et al., 2007). V tetanotoxínovom modeli TLE boli HFO popísané v DG a oblastiach CA1-3 (Jiruska et al., 2010), avšak naša štúdia neukázala stratu buniek v DG u žiadneho z injekovaných zvierat. Z toho vyplýva, že strata neurónov nebude mať primárnu úlohu v genéze HFO ako sa pôvodne myslelo.

Na strate neurónov je založená aj hypotéza zvýšenej neurogenézy v DG. Predpokladá sa, že lézia DG, ktorá vzniká ako následok SE v modeli chronickej epilepsie, vedie k nárastu neurogenézy v subgranulárnej zóne (Kuruba et al., 2009) a rovnako bola

zvýšená neurogenéza popísaná aj v tetanotoxínovom modeli, avšak počet buniek pozitívnych pre kaspázu 3 (marker apoptózy) sa oproti kontrolám nelíšil (Jiruska et al., 2013). Použitím farbenia FJB naše výsledky vylúčili prítomnosť aj ostatných typov bunkovej smrti v oblasti DG. Preto naďalej ostáva otvorená otázka, čo zvyšuje neurogenézu v modeloch TLE.

Záver

V tejto štúdií sme potvrdili nelezionálnu povahu tetanotoxínového modelu TLE. K rozvoju epileptického syndrómu u potkanov dochádzalo aj bez straty neurónov v oblasti hipokampálnej formácie. HS bola detekovaná v kontralaterálnej CA1 u 40 % zvierat v skupine D16 a slepá štúdia naše výsledky potvrdila. V prípade určovania viditeľného úbytku neurónov voči kontrolám a zvieratám bez degenerujúcich buniek môžeme hodnotenie respondentov považovať za náhodné, čo opäť podporuje nelezionalitu tetanotoxínového modelu. Časový profil degenerácie ukázal negatívny nález v skupine D4 a zaznamenali sme posun degenerácie buniek z ipsilaterálnej CA1 v 8. dni na kontralaterálnu CA1 v 16. dni od aplikácie. Tieto výsledky ponúkajú priestor pre ďalšie otázky ohľadom substrátu pre vznik záchvatov v epileptickom syndróme a zároveň zvyšujú dôveryhodnosť tetanotoxínového modelu pre výskum patofyziológie nelezionálnej epilepsie.

Použitá literatúra

- Aldenkamp, A. P. and Bodde, N. (2005) Behaviour, cognition and epilepsy. *Acta. Neurol. Scand. Suppl.* 182: 19–25.
- Altman, J. (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science.* 135: 1127–1128.
- Altman, J. (1963) Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat. Rec.* 145: 573–591.
- Amaral, D. G. (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 182: 851–914.
- Arabadzisz, D., Antal, K., Parpan, F., Emri, Z., Fritschy, J. M. (2005) Epileptogenesis and chronic seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy are associated with distinct EEG patterns and selective neurochemical alterations in the contralateral hippocampus. *Exp. Neurol.* 194: 76–90.
- Araki, T., Simon, R. P., Taki, W., Lan, J. Q. Henshall, D. C. (2002) Characterization of neuronal death induced by focally evoked limbic seizures in the C57BL/6 mouse. *J. Neurosci. Res.*, 69: 614–621.
- Babb, T. L., Brown, W. J., Pretorius, J., Davenport, C., Lieb J. P, Crandall, P. H. (1984) Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 25: 729–740.
- Bagetta, G., Corasaniti, M. T., Nisticó, G, Bowery, N. G. (1990) Behavioural and neuropathological effects produced by tetanus toxin injected into the hippocampus of rats. *Neuropharmacology.* 29: 765-770.

-
- Bannerman D. M., Rawlins J. N., McHugh S. B., Deacon R. M., Yee B. K., Bast T., Zhang, W. N., Pothuizen, H. H., Feldon, J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28: 273–283.
- Bartolomei, F., Khalil, M., Wendling, F., Sontheimer, A., Régis, J., Ranjeva, J. P., Maxime Guye, M., Chauvel, P. (2005) Entorhinal Cortex Involvement in Human Mesial Temporal Lobe Epilepsy: An Electrophysiologic and Volumetric Study. *Epilepsia.* 46: 677–687.
- Ben-Ari, Y., Lagowska, J., Tremblay, E., La Salle, G. (1979) A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res.* 163: 176–910.
- Bliss, T. V. and Collingridge, G. L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361: 31-39.
- Blümcke, I., Thom, M., Aronica, E., Armstrong, D. D., Bartolomei, F., Bernasconi, A., Bernasconi, N., Bien, C. G., Cendes, F., Coras, R., Cross, J. H., Jacques, T. S., Kahane, P., Mathern, G. W., Miyata, H., Moshé, S. L., Oz, B., Özkara, Ç., Perucca, E., Sisodiya, S., Wiebe, S., Spreafico, R. (2013) International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia.* 54: 1315-1329.
- Bouchet, C. and Cazauvieilh, M. (1825) De L'epilepsie considerée dans ses rapports avec l'alienation mentale. *Arch. Gen. Med.* 9: 510–542.
- Cajal, S. R. (1909). *Histologie du Système Nerveux de L'homme et des Vertébrés* (Translated by L. Azoulay). Paris: Maloine.
- Calabresi, P., Benedetti, M., Mercuri, N. B., Bernardi, G. (1989) Selective depression of synaptic transmission by tetanus toxin: a comparative study on hippocampal and neostriatal slices. *Neuroscience.* 30: 663-670.

-
- Cavalheiro, E. A., Leite, J. P., Bortolotto, Z. A., Turski, W. A., Ikonomidou, C., Turski, L. (1991) Long-term effects of pilocarpine in rats: Structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*. 32: 778–782.
- Cavazos, J. E., Golarai, G., Sutula, T. P. (1991) Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *J. Neurosci*. 11: 2795-2803.
- Cavazos, J. E., Zhang, P., Qazi, R., Sutula, T. P. (2003) Ultrastructural features of sprouted mossy fiber synapses in kindled and kainic acid-treated rats. *J. Comp. Neurol*. 458: 272–292.
- Ceberg, C., Jönsson, B. A., Prezado, Y., Pommer, T., Nittby, H., Englund, E., Grafström, G., Edvardsson, A., Stenvall, A., Strömblad, S., Wingårdh, K., Persson, B., Elleaume, H., Baldetorp, B., Salford, L. G., Strand, S.E. (2012) Photon activation therapy of RG2 glioma carrying Fischer rats using stable thallium and monochromatic synchrotron radiation. *Phys. Med. Biol*. 57: 8377-8391.
- Chang, B. S. and Lowenstein, D. H. (2003) Epilepsy. *N. Engl. J. Med*. 349: 1257-1266.
- Claiborne, B. J., Amaral, D. G., Cowan, W. M. (1990) Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol*. 302: 206–219.
- Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R. S. G., Avoli, M. (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci. Methods*. 172: 143–157
- de Lanerolle, N. C, Kim, J. H, Williamson, A., Spencer, S. S., Zaveri, H. P., Eid, T., Spencer, D. D. (2003) A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories. *Epilepsia* 44: 677-687.
- de Lanerolle, N. C. and Lee, T. S. (2005) New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*. 7: 190-203.

-
- Devinski, O. (2004) Diagnosis and treatment of temporal lobe epilepsy. *Reviews in Neurol. Dis.* 1: 2-9.
- Eichenbaum H. (1999) The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav. Brain Res.* 103: 123-133.
- Engel, J. Jr. (2001) Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist.* 7: 340-352.
- Engel, J. Jr., Bandler, R., Griffith, N. C., Caldecott-Hazard, S. (1991) Neurobiological evidence for epilepsy-induced interictal disturbances. In: *Advances in Neurology.* Eds. Smith, D., Treiman, D., Trimble, M. Raven Press, New York, pp. 97-111.
- Fadeel, B., Ottosson, A., Pervaiz, S. (2008) Big wheel keeps on turning: apoptosome regulation and its role in chemoresistance. *Cell Death Differ.* 15: 443-452.
- Ferecskó, A. S., Jiruska, P., Foss, L., Powell, A. D., Chang, W. C., Sik, A., Jefferys, J. G. (2014) Structural and functional substrates of tetanus toxin in an animal model of temporal lobe epilepsy. *Brain Struct. Funct.* 220: 1013-1029.
- Finnerty, G. T. and Jefferys, J. G. (2000) 9-16 Hz oscillation precedes secondary generalization of seizures in the rat tetanus toxin model of epilepsy. *J. Neurophysiol.* 83: 2217-2226.
- Fisher, R. E., Gray, R., Johnston, D. (1990) Properties and distribution of single voltage-gated calcium channels in adult hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 64: 91-104.
- Fisher, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J. Jr. (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 46: 470-472.

-
- French, J. A., Williamson, P. D., Thadani, V. M., Darcey, T. M., Mattson, R. H., Spencer, S. S., Spencer, D. D. (2004) Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann. Neurol.* 34: 774-780.
- Freund, T. F. and Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* 6: 347-470.
- Fujikawa, D. G., Shinmei, S. S., Cai, B. (2000) Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. *Neuroscience.* 98: 41-53.
- Furtado, M. A, Castro, O. W., Del Vecchio, F., de Oliveira, J. A., Garcia-Cairasco, N. (2011) Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status epilepticus induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. *Epilepsy. Behav.* 20: 257-266.
- Greene, J. R. and Totterdell, S. (1997) Morphology and distribution of electrophysiologically defined classes of pyramidal and nonpyramidal neurons in rat ventral subiculum in vitro. *J. Comp. Neurol.* 380: 395-408.
- Gulyás, A. I., Tóth, K., Dános, P., Freund, T. F. (1991) Subpopulations of GABAergic neurons containing parvalbumin, calbindin-d28k, and cholecystokinin in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 312: 371-378.
- Haas, K. Z., Sperber, E. F., Opanashuk, L. A., Stanton, P. K., Moshé, S. L. (2001) Resistance of immature hippocampus to morphologic and physiologic alterations following status epilepticus or kindling. *Hippocampus.* 11: 615-625.
- Haglid, K. G., Wang, S., Qiner, Y., Hamberger, A. (1994) Excitotoxicity. Experimental correlates to human epilepsy. *Mol. Neurobiol.* 9: 259-263.
- Han, Z. S., Buhl, E. H., Lorinczi, Z., Somogyi, P. (1993). A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-

-
- circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 5: 395–410.
- Jefferys, J. G. and Williams, S. F. (1987) Physiological and behavioural consequences of seizures induced in the rat by intrahippocampal tetanus toxin. *Brain.* 110: 517-32.
- Jefferys, J. G., Borck, C., Mellanby, J. (1995) Chronic focal epilepsy induced by intracerebral tetanus toxin. *Ital. J. Neurol. Sci.* 16: 27-32.
- Jefferys, J. G., Evans, B. J., Hughes, S. A., Williams, S. F. (1992) Neuropathology of the chronic epileptic syndrome induced by intrahippocampal tetanus toxin in rat: preservation of pyramidal cells and incidence of dark cells. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 18: 53-70.
- Jiruska, P., Finnerty, G. T. , Powell, A. D., Lofti, N., Cmejla, R., Jefferys, J. G. (2010) Epileptic high-frequency network activity in a model of non-lesional temporal lobe epilepsy. *Brain.* 133: 1380-1390.
- Jiruska, P., Shtaya, A. B., Bodansky, D. M., Chang, W. C., Gray, W. P., Jefferys, J. G. (2013) Dentate gyrus progenitor cell proliferation after the onset of spontaneous seizures in the tetanus toxin model of temporal lobe epilepsy. *54:* 492-498.
- Kauer, J.A., Malenka, R.C., Nicoll, R.A. (1988) A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron.* 1: 911-917.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26: 239–257.
- Kesner, R. P. (2013). Neurobiological foundations of an attribute model of memory. *Comp. Cogn. Behav. Rev.* 8: 29-59.
- Kjelstrup K. B., Solstad T., Brun V. H., Hafting T., Leutgeb S., Witter M. P., Moser, E. I., Moser, M. B. (2008). Finite scale of spatial representation in the hippocampus. *Science.* 321: 140–143.

-
- Köhler, C., Eriksson, L., Davies, S., Chan-Palay, V. (1986) Neuropeptide Y innervation of the hippocampal region in the rat and monkey brain. *J. Comp. Neurol.* 244: 384–400.
- Kosaka, T., Kosaka, K., Tateishi, K., Hamaoka, Y., Yanaihara, N., Wu, J. Y., Hama, K. (1985) GABAergic neurons containing CCK-8-like and/or VIP-like immunoreactivities in the rat hippocampus and dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 239: 420–430.
- Kuruba, R., Hattiangady, B., Shetty, A. K. (2009) Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 1: 65-73.
- Lado, F. A., Laureta, E. C., Moshe, S. L. (2002) Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brain. *Epileptic Disord.* 4: 83-97.
- Lehmann, T. N., Gabriel, S., Eilers, A., Njunting, M., Kovacs, R., Schulze, K. (2001) Fluorescent tracer in pilocarpine-treated rats shows widespread aberrant hippocampal neuronal connectivity. *Eur. J. Neurosci.* 14: 83–95.
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, S., Nicotera, P. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* 185: 1481-1486.
- Leite, J. P., Bortolotto, Z. A., Cavalheiro, E. A. (1990) Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14: 511-517.
- Lévesque, M. and Avoli, M. (2013) The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37: 2887-2899.
- Link, E., Edelmann, L., Chou, J. H., Binz, T., Yamasaki, S., Eisel, U., Baumert, M., Südhof, T. C., Niemann, H., Jahn, R. (1992) Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 1017-1023.

-
- Liou, A. K., Clark, R. S., Henshall, D. C., Yin, X. M., Chen, J. (2003) To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog. Neurobiol.* 69: 103-142.
- Lorente de Nó, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex II Continuation of the study of the ammonic system. *J. Neurol. Psychol.* 46: 113–177.
- Lorigados Pedre L, Morales Chacón LM, Orozco Suárez S, Pavón Fuentes N, Estupiñán Díaz B, Serrano Sánchez T, García Maeso I, Rocha Arrieta L. (2013) Inflammatory mediators in epilepsy. *Curr Pharm Des.* 19: 6766-6772.
- Majno, G. and Joris, I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146: 3–15.
- Mathern, G. W., Babb, T. L., Pretorius, J. K., Leite, J. P. (1995) Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata. *J. Neurosci.* 15: 3990–4004.
- Mathern, G., Babb, T., Pretorius, J., Melendez, M., Lévesque, M. (1995). The pathophysiologic relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 21: 133–147.
- Meldrum, B. S. and Bruton, C. J. (1992) Epilepsy. In: *Greenfield's neuropathology* (Adams, J. H., Duchen, L. W., eds), New York: Oxford University Press, pp. 1246–1283.
- Mellanby, J. and Milward, A. J. (2001) Do fits really beget fits? The effect of previous epileptic activity on the subsequent induction of the tetanus toxin model of limbic epilepsy in the rat. *Neurobiol. Dis.* 8: 679-691.
- Mellanby, J. H. (1989) Elimination of ¹²⁵I from rat brain after injection of small doses of ¹²⁵I-labelled tetanus toxin into the hippocampus. *Neurosci. Lett.* 36: 55.

-
- Mellanby, J., George, G., Robinson, A., Thompson, P. (1977) Epileptiform syndrome in rats produced by injecting tetanus toxin into the hippocampus. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 40: 404-414.
- Mello, L., Cavalheiro, E., Tan, A., Kupfer, W., Pretorius, J., Babb, T., Finch, D. M. (1993) Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia.* 34: 985–995.
- Miettinen, R., Gulyás, A. I., Baimbridge, K. G., Jacobowitz, D. M., Freund, T. F. (1992) Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus. 2. Co-existence with other calcium binding proteins and GABA. *Neuroscience.* 48: 29–43.
- Mitchell, J., Gatherer, M., Sundstrom, L. E. (1995) Loss of hilar somatostatin neurons following tetanus toxin-induced seizures. *Acta. Neuropathol.* 89: 425-430.
- Moser, M. B. and Moser, E. I. (1998) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus.* 8: 608–619.
- Nadler, J. V., Perry, B. W., Cotmon, C. W. (1978) Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature.* 271: 676–677.
- Najlerahim, A., Williams, S. F., Pearson, R. C., Jefferys J. G. (1992) Increased expression of GAD mRNA during the chronic epileptic syndrome due to intrahippocampal tetanus toxin. *Exp. Brain. Res.* 90: 332-342.
- Nilsen, K. E., Walker, M. C., Cock, H. R. (2005) Characterization of the tetanus toxin model of refractory focal neocortical epilepsy in the rat. *Epilepsia.* 46: 179-187.
- Niquet, J., Lopez-Meraz, M. L., Wasterlain, C. G. (2012) Programmed Necrosis After Status Epilepticus. In: Noebels, J. L., Avoli, M., Rogawski, M. A., Olsen, R. W., Delgado-Escueta, A. V., editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies.* 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98212/>.
-

-
- O'Mara, S. M., Commins, S., Anderson, M., Gigg, J. (2001) The subiculum: a review of form, physiology and function. *Prog Neurobiol.* 64: 129–155.
- O'Keefe, J. (1976) Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp. Neurol.* 51: 78-109.
- Paxinos, G. and Watson, Ch., (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academia Press.
- Racine, R.J., (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32: 281-294.
- Rapp, P. R. and Gallagher, M. (1996) Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 9926-9930.
- Raptis, A., Torrejón-Escribano, B., Gómez de Aranda, I., Blasi, J. (2005) Distribution of synaptobrevin/VAMP 1 and 2 in rat brain. *J Chem Neuroanat.* 30: 201-211.
- Ribak, C. E. and Seress, L. (1988). A Golgi-electron microscopic study of fusiform neurons in the hilar region of the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 271: 67–78.
- Ribak, C. E., Vaughn, J. E., Saito, K. (1978). Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res.* 140: 315–332.
- Rogers, J. H. (1992) Immunohistochemical markers in rat cortex: co-localization of calretinin and calbindin-D28k with neuropeptides and GABA. *Brain Res.* 587: 147–157.
- Roux, E. and Borrel, A. (1898). Tétanos cérébral et immunité contre le tétanus. *Ann. Inst. Pasteur.* 12: 225–239.
- Scharfman, H. E. (2007) The neurobiology of epilepsy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 7: 348–354.

-
- Schiavo, G. and Montecucco, C. (1995) Tetanus and botulism neurotoxins: isolation and assay. *Methods. Enzymol.* 248: 643-652.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino, de Laureto, P., DasGupta, B. R., Montecucco, C. (1992) Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature.* 359: 832-835.
- Schiavo, G., Matteoli, M., Montecucco, C. (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev.* 80: 717-766.
- Schmued, L. C. and Hopkins, K. J. (2000) Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 874: 123-130.
- Shaw, J. A., Perry, V. H., Mellanby, J. (1990) Tetanus toxin-induced seizures cause microglial activation in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 120: 66-69.
- Sloviter, R. S. (1989) Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J. Comp. Neurol.* 280: 183-196.
- Sloviter, R. S. (1994) On the relationship between neuropathology and pathophysiology in the epileptic hippocampus of humans and experimental animals. *Hippocampus.* 4: 250-253.
- Sloviter, R. S. and Nilaver, G. (1987) Immunocytochemical localization of GABA-, cholecystokinin-, vasoactive intestinal polypeptide-, and somatostatin-like immunoreactivity in the area dentata and hippocampus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 256: 42-60.
- Sloviter, S., Sollas, A. L., Barbaro, N. M., Laxer, K. D. (1991) Calcium binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 308: 381-396.

-
- Sommer, W. (1880) Erkrankung des Ammonshorns als aetiologisches Moment der Epilepsie. Arch. Psychiatr. Nervenkr. 10: 631–675.
- Somogyi, P. (2010). Hippocampus: Intrinsic organization. In G. Shepherd and S. Grillner (Eds.), Handbook of Brain Microcircuits, New York: Oxford University Press, pp. 148–164.
- Soriano, E., and Frotscher, M. (1989). A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. Brain Res. 503: 170–174.
- Squire, L. R. (2007) Neuroscience. Rapid consolidation. Science. 316:57-58.
- Staba, R. J., Frigetto, L., Behnke, E. J., Mathern, G. W., Fields, T., Bragin, A., Ogren, J., Fried, I., Wilson, C. L., Engel, J. Jr. (2007) Increased fast ripple to ripple ratios correlate with reduced hippocampal volumes and neuron loss in temporal lobe epilepsy patients. Epilepsia. 48: 2130-2138.
- Stöckel, K., Schwab, M., Thoenen, H. (1975) Comparison between the retrograde axonal transport of nerve growth factor and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic neurons. Brain. Res. 99: 1–16.
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., Moser, E. I. (2014) Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. Nat. Rev. Neurosci. 15: 655-669.
- Tauck, D. L. and Nadler, J. V. (1985) Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. J. Neurosci. 5: 1016-1022.
- Thom, M., Mathern, G. W., Cross, J. H., Bertram, E. H. (2010) Mesial temporal lobe epilepsy: How do we improve surgical outcome? Ann. Neurol. 68: 424-434.
- Thomson, A. M. and Radpour, S. (1991) Excitatory Connections Between CA1 Pyramidal Cells Revealed by Spike Triggered Averaging in Slices of Rat Hippocampus are Partially NMDA Receptor Mediated. Eur. J. Neurosci. 3: 587-601.

-
- Turski, W. A., Cavalheiro, E. A., Schwarz, M., Czuczwar, S. L. J., Kleinrok, Z., Turski, L. (1983a) Limbic seizures produced by pilocarpine I rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav. Brain. Res.* 9: 315–335.
- Turski, W. A., Czuczwar, S. J., Kleinrok, Z., Turski, L. (1983b) Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia.* 39: 1408–1411.
- Ueda, H., Fujita, R., Yoshida, A., Matsunaga, H., Ueda, M. (2007) Identification of prothymosin- α 1, the necrosis-apoptosis switch molecule in cortical neuronal cultures. *J. Cell Biol.* 176: 853–862.
- Wieser, H. G. (2004). ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia.* 45: 695-714.
- Williams, P. A. and Dudek, F. E. (2007) A chronic histopathological and electrophysiological analysis of a rodent hypoxic-ischemic brain injury model and its use as a model of epilepsy. *Neuroscience.* 149: 943-961.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., Currie, A. R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251–306.
- Yamamoto, A., Murphy, N., Schindler, C. K., So, N. K., Stohr, S., Taki, W., Prehn, J. H. Henshall, D. C. (2006) Endoplasmic reticulum stress and apoptosis signaling in human temporal lobe epilepsy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 217–225.
- Zhang, X., Cui, S. S., Wallace, A. E., Hannesson, D. K., Schmued, L. C., Saucier, D. M., Honer, W. G., Corcoran, M. E. (2002) Relations between brain pathology and temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22: 6052–6061.