

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Neurovědy



MUDr. Filip Barinka

**Neurony exprimující kalcium-vážíci proteiny v neokortexu u nemocných
s epilepsií a v perirhinální kůře potkana**

Neurons expressing calcium-binding proteins in neocortex of patients with
epilepsy and in the perirhinal cortex of the rat

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Rastislav Druga, DrSc.

Konzultant: Doc. MUDr. Josef Zámečník, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 1.2.2013

MUDr. Filip Barinka

Identifikační záznam:

BARINKA, Filip. *Neurony exprimující kalcium-vážíci proteiny v neokortexu u nemocných s epilepsií a v perirhinální kůře potkana. [Neurons expressing calcium-binding proteins in neocortex of patients with epilepsy and in the perirhinal cortex of the rat]*. Praha, 2013. 91 stran, 11 obrázků, 5 tabulek, 2 grafy, 3 originální publikace. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Anatomický Ústav, 2013. Vedoucí práce Druga, Rastislav.

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval svým školitelům prof. MUDr. Rastislavu Drugovi, DrSc. a doc. MUDr. Josefu Zámečnickovi, Ph.D. (školitel konzultant) za soustavnou a všestrannou podporu, trpělivost, důležité rady a četné konzultace v průběhu celého postgraduálního studia. Chci poděkovat doc. Pharm.Dr. Haně Kubové, DrSc. za cenné rady i za poskytnutí laboratorních zvířat a velkorysé umožnění provádět část přípravy imunohistochemických preparátů na Oddělení vývojové epileptologie Fyziologického ústavu AV ČR. Zvláštní dík patří Mgr. Grigorij Tsenovovi, Ph.D. za pomoc při preparaci mozků experimentálních zvířat a paní Blance Čejkové za excelentní technickou pomoc při přípravě imunohistochemických řezů – jejich schopnosti, znalosti a ochota vedly k získání materiálu excelentní kvality umožňujícímu reprezentativní stereologickou analýzu. Za pomoc při získávání teoretických i praktických znalostí metodiky stereologické analýzy tkáně vřele děkuji prof. Asle Pitkänen, MD, Ph.D. a Xavieru Ekolle Ndode-Ekane, MSc. z University of Kuopio ve Finsku, děkuji i RNDr. Lucii Kubínové, CSc. za cenné rady při iniciální přípravě parametrů stereologické analýzy. Za pomoc se statistickým vyhodnocením výsledků děkuji Mgr. Petru Gálovi.

Děkuji všem laborantům a laborantkám Ústavu patologie a laboratorní medicíny 2.LF UK v Praze, kteří se podíleli na přípravě řezů fokálních kortikálních dysplázií. Zvláště děkuji všem pacientům za souhlas s využitím resekované tkáně pro vědecké účely.

Dále chci poděkovat i všem doposud neuvedeným spoluautorům našich publikací – doc. MUDr. Petru Marusičovi, Ph.D., doc. MUDr. Pavlu Krškovi, Ph.D., MUDr. Martinu Salajovi, MUDr. Janu Rybářovi a Ing. Evě Krajčovičové za vynikající spolupráci.

Moje práce byla podpořena Grantovou agenturou Karlovy University (Grant č. 35407) a granty Ministerstva zdravotnictví České republiky (IGA MZCR NS/9915-4, NR/8843-4 a VZ FNM 00064203) a cestovním grantem organizace Network of European Neuroscience Schools (NENS), jímž tímto děkuji za podporu.

Za trpělivost, pochopení a podporu po celou dobu mého studia zasluhuje zvláštní poděkování moje rodina.

OBSAH

1. ÚVOD	9
1.1 Epilepsie a epileptický záchvat	9
1.2 Temporální epilepsie - Temporal lobe epilepsy (TLE)	9
1.2.1 Skleróza hipokampu	11
<i>1.2.1.1 Hipokampální skleróza a epileptogeneze</i>	13
1.2.2 Neokortex a neokortikální léze u TLE	13
<i>1.2.2.1 Význam temporálního neokortexu u TLE s HS</i>	14
<i>1.2.2.2 Dvojí patologie</i>	15
<i>1.2.2.3 Fokální kortikální dysplázie</i>	15
1.3 Kortikální inhibiční interneurony	19
1.4 Perirhinální kortex a jeho souvislost s temporální epilepsií	21
2. OTÁZKY A CÍLE PRÁCE	23
2.1 Calretinin imunoreaktivní inhibiční interneurony ve fokálních kortikálních dyspláziích a v nemalformovaném temporálním neokortexu u pacientů s farmakorezistentní epilepsií	23
2.2 Calretinin, parvalbumin a calbindin imunoreaktivní inhibiční interneurony v perirhinálním kortexu a temporální korové oblasti Te3V u potkana	24
3. MATERIÁL A METODY	25
3.1 Calretinin imunoreaktivní inhibiční interneurony ve fokálních kortikálních dyspláziích a v nemalformovaném temporálním neokortexu u pacientů s farmakorezistentní epilepsií	25
3.1.1 Materiál	25
3.1.2 Imunohistochemie	26
3.1.3 Vyhodnocení histopatologických a imunohistochemických vlastností zkoumané tkáně	27
3.1.4. Statistické zhodnocení	29
3.2 Calretinin, parvalbumin a calbindin imunoreaktivní neurony v perirhinálním kortexu a v temporální asociační oblasti Te3V u potkana	29
3.2.1 Zvířata	29
3.2.2 Příprava materiálu	29
3.2.3 Imunohistochemické barvení	30
3.2.4 Ohraničení korových oblastí a vrstev	31

3.2.5 Kvalitativní analýza	31
3.2.6 Kvantitativní analýza	32
3.2.6.1 <i>Denzitometrické hodnocení</i>	32
3.2.6.2 <i>Stereologická analýza</i>	33
3.2.6.3 <i>Statistické hodnocení</i>	35
4. VÝSLEDKY	36
4.1 Calretinin imunoreaktivní inhibiční interneurony ve fokálních kortikálních dyspláziích a v nemalformovaném temporálním neokortexu u pacientů s farmakorezistentní epilepsií	36
4.1.1 Distribuce imunoreaktivity calretininu	36
4.1.1.1 <i>Kontrolní neokortex</i>	36
4.1.1.2 <i>Nemalformovaný temporální neokortex u pacientů s hipokampální sklerózou</i>	37
4.1.1.3 <i>Fokální kortikální dysplázie</i>	37
4.1.2 Denzita CR+ neuronů	38
4.1.2.1 <i>Kontrolní neokortex</i>	38
4.1.2.2 <i>Nemalformovaný temporální neokortex u pacientů s hipokampální sklerózou</i>	39
4.1.2.3 <i>Fokální kortikální dysplázie typu I</i>	39
4.1.2.4 <i>Fokální kortikální dysplázie typu II</i>	39
4.1.3 Denzita CR+ neuronů – SOUHRN	40
4.2 Calretinin, parvalbumin a calbindin imunoreaktivní neurony v perirhinálním kortexu a v temporální asociační oblasti Te3V u potkana	40
4.2.1 Obecná charakteristika imunoreaktivity calretininu, parvalbuminu a calbindinu	40
4.2.1.1 <i>Calretinin</i>	41
4.2.1.2 <i>Parvalbumin</i>	41
4.2.1.3 <i>Calbindin</i>	42
4.2.2 Denzitometrická analýza imunoreaktivity calretininu, parvalbuminu a calbindinu	43
4.2.3 Neuronální morfologie	43
4.2.3.1 <i>Calretinin</i>	44
4.2.3.2 <i>Parvalbumin</i>	44

4.2.3.3 <i>Calbindin</i>	45
4.2.4 Denzita CR+ a PV+ neuronů	46
4.2.4.1 <i>Calretinin</i>	46
4.2.4.2 <i>Parvalbumin</i>	46
4.2.5. Celková neuronální denzita a procentuální zastoupení CR+ a PV+ neuronů	47
4.2.5.1 <i>Celková neuronální denzita</i>	47
4.2.5.2 <i>Procentuální zastoupení calretinin imunoreaktivních neuronů</i>	47
4.2.5.3 <i>Procentuální zastoupení parvalbumin imunoreaktivních neuronů</i>	48
5. DISKUZE	49
5.1 Calretinin imunoreaktivní inhibiční interneurony ve fokálních kortikálních dyspláziích a v nemalformovaném temporálním neokortexu u pacientů s farmakorezistentní epilepsií	49
5.1.1 Nová ILAE klasifikace fokálních kortikálních dysplázií	52
5.2 Calretinin, parvalbumin a calbindin imunoreaktivní neurony v perirhinálním kortexu a v temporální asociační oblasti Te3V u potkana	53
5.2.1 Funkční význam	55
6. ZÁVĚRY	57
6.1 Calretinin imunoreaktivní inhibiční interneurony ve fokálních kortikálních dyspláziích a v nemalformovaném temporálním neokortexu u pacientů s farmakorezistentní epilepsií	57
6.2 Calretinin, parvalbumin a calbindin imunoreaktivní inhibiční interneurony v perirhinálním kortexu a temporální korové oblasti Te3V u potkana	57
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59
8. OBRÁZKY, TABULKY A GRAFY	72
9. PŘÍLOHY	91
9.1 Seznam publikací autora ve vztahu k tématu práce	91
9.2 Seznam ostatních publikací autora	91
9.3 Publikace autora ve vztahu k tématu práce	91

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AP – anteroposteriorně
asf – area sampling fraction
CaBP – kalcium-vážící proteiny
CB – calbindin
CE – koeficient chyby
CR – calretinin
cROD – korigovaná relativní optická denzita
DAB - 3,3'-diaminobenzidin
FCD – fokální kortikální dysplázie
GFAP – gliální fibrilární acidický protein
HS – hipokampální skleróza
ILAE – mezinárodní liga proti epilepsii
IPI – iniciální predisponující inzult
LTLE – lézí způsobená temporální epilepsie
MCD – malformace kortikálního vývoje
mMCD – mírná malformace kortikálního vývoje
MTLE – mesiotemporální epilepsie
MTLE-HS – mesiotemporální epilepsie asociovaná s hipokampální sklerózou
MTLS – záchvaty vznikající ve strukturách mediálního temporálního laloku
MTS – mesiotemporální skleróza
nHSTN - Nemalformovaný temporální neokortex u pacientů s hipokampální sklerózou
NTLE – nekortikální temporální epilepsie
PBS – fosfátový pufr s chloridem sodným
PRC – perirhinální kortex
PV – parvalbumin
ROD – relativní optická denzita
ROI – oblast zájmu
S.E.M. – směrodatná chyba odhadu průměru
ssf – section sampling fraction
TLE – temporální epilepsie
tsf – tissue sampling fraction

1. ÚVOD

1.1 Epilepsie a epileptický záchvat

Epileptický záchvat je definován jako transientní přítomnost příznaků vyvolaných abnormálně rozsáhlou či nadměrně synchronizovanou neuronální aktivitou v mozku (Fisher et al., 2005; Komárek, 2007). Epilepsií se pak rozumí skupina neurologických onemocnění, jejichž základním příznakem jsou opakující se, obvykle nevyprovokované epileptické záchvaty (Engel a Pedley, 2008). Přesnější definice uváděná Mezinárodní ligou proti epilepsii (ILAE) popisuje epilepsii jako onemocnění mozku charakterizované jednak jeho trvalou predispozicí generovat epileptické záchvaty a jednak neurobiologickými, kognitivními a psychosociálními důsledky tohoto onemocnění (Fisher et al., 2005; Komárek, 2007). Mezinárodní klinická klasifikace epileptických záchvatů dle ILAE (1981; 1989; Berg et al., 2010) rozeznává podle jejich původu dva základní typy epileptických záchvatů a epilepsií, a to fokální (neboli parciální neboli lokalizovatelnou) a generalizované. Oba typy je dále možné rozdělit na idiopatické (primární) a symptomatické (sekundární). Většinu primárních a některé sekundární epilepsie je terapeuticky možné zvládnout prostřednictvím farmakoterapie a to buď monoterapií nebo kombinací léčiv ze široké nabídky antiepileptik. I přesto zůstává asi 30 % případů pacientů, u kterých je jejich nemoc takzvaně farmakorezistentní (Houser, 1990). Část těchto nemocných je indikována k některému z epileptochirurgických výkonů. Smyslem těchto výkonů je odstranit tzv. epileptogenní zónu, tj. oblast odpovědnou za vznik epileptických záchvatů.

1.2 Temporální epilepsie - Temporal lobe epilepsy (TLE)

Epileptochirurgické zákroky jsou prováděny nejčastěji na strukturách temporálního laloku (Dbalý, 2004). Vůbec nejčastější nosologickou jednotkou indikovanou k chirurgické léčbě je syndrom mesiotemporální epilepsie (mesial temporal lobe epilepsy, MTLE) (Lüders a Comair, 2000). Klinické projevy syndromu MTLE jsou poměrně typické - jedná se

většinou o komplexní parciální záchvaty charakterizované krátkodobou ztrátou kontaktu, oro-alimentárními automatizmy, dilatací pupil, deviací očí a hlavy a kontralaterální dystonickou posturou. Záchvat je často předcházen aurou, nejčastěji epigastrickou (neurčité pocity lokalizované do nadbřišku), může se ale jednat i o čichové halucinace, pocit strachu, nebo komplexní vjemy jako je *déjà vu*. Postiktálně bývá dezorientace, retrográdní amnézie, dysfázie. Nástup nemoci bývá časný, typicky koncem prvního decenia a u většiny pacientů je možné vystopovat časné poškození mozku perinatálně nebo v prvních rocích života, takzvaný iniciální predisponující inzult (*initial precipitating injury* - IPI). Histopatologickým podkladem MTLE je ve většině případů mesiotemporální skleróza (MTS) - přesně definované postižení hipokampu a přilehlých struktur (detailní popis viz dále). Je ale nutné zmínit, že terminologie užívaná v souvislosti s epilepsií vycházející ze struktur temporálního laloku není zdaleka jednotná a různí autoři užívají různé pojmy pro popis často identických jevů. MTLE může být chápána jako jasně vymezený syndrom kauzálně podložený přítomností MTS. Na druhé straně epilepsie vycházející též z temporálního laloku, ale způsobené jinou patologickou lézí (nádory, cévní malformace, vývojové léze, atd.) jsou pak označeny jako „lézí způsobené TLE“ - LTLE (*lesion-related TLE*) (Dbalý, 2004). Podle jiného názoru je mesiotemporální epilepsie s hipokampální sklerózou (HS - v tomto případě chápána jako synonymum mesiotemporální sklerózy) vyčleněna jako samostatný syndrom (MTLE-HS) a pod obecněji chápaným pojmem MTLE se rozumějí všechny epilepsie vycházející z mediálního temporálního laloku a projevující se obvykle výše popsanými typickými záchvaty, nezávisle na typu podmiňující patologie (Engel et al., 2008; Wieser, 2004). V tomto případě jsou i některé zmíněné LTLE klasifikovány jako MTLE. Obecně se má za to, že u záchvatů vznikajících v strukturách mediálního temporálního laloku (*mesial temporal lobe seizures* - MTLs) není spolehlivě možné jenom na základě klinické symptomatologie rozlišit zda se jedná o MTLE-HS nebo o MTLE z jiných příčin, i když některé prvky (např. ipsilaterální automatismy končetin, kontralaterální dystonie a oro-alimentární automatismy) jsou typičtější pro MTLE-HS (Saygi et al., 1994). Nejstarší, dnes již běžně nepoužívaný termín pro popis MTLE a MTLs je psychomotorická epilepsie, resp. psychomotorické záchvaty (Gibbs et al., 2002; Gieson, 1924). Naopak termíny limbická epilepsie a limbické záchvaty jsou často užívaným synonymem MTLE a MTLs, a to jak v klinické medicíně tak zejména v experimentální epileptologii. Prof. Komárek navrhl přeformulovat zkratku MTLE do češtiny jako mesiotemporální-limbická epilepsie

(Komárek, 1995). Podobně doporučuje nyní i Mezinárodní liga proti epilepsii pojem „limbické záchvaty“ (*limbic seizures*) rezervovat pro popis klinické iktální aktivity vycházející z limbických struktur mesiálního temporálního laloku a z oblastí se kterými mají temporální limbické struktury vyvinuté masivní spojení (Engel, 2001; Engel, 2006; Engel and Pedley, 2008). Mezi tyto oblasti patří zejména laterální temporální neokortex, orbitofrontální kůra, area cingularis anterior a occipitální kortex uložený ventrálně od fissura calcarina. Epileptická aktivita vznikající v některé z těchto oblastí se může rychle propagovat do temporálních limbických struktur a klinická charakteristika záchvatů se pak neliší od výše popsaných typických MTLs. V rámci temporálního laloku tato skutečnost často znesnadňuje odlišení záchvatů vznikajících na podkladě přítomnosti patologické léze v temporálním neokortexu, tedy mimo vlastní limbické struktury. Takový typ epilepsie se někdy nazývá neokortikální temporální epilepsie (*neocortical temporal lobe epilepsy - NTLE*) nebo nepřesně laterální temporální epilepsie (Williamson and Engel, 2008). Rozlišení MTLE a NTLE dále komplikuje překvapivě častá přítomnost takzvané dvojí patologie (*dual pathology*), tedy současný výskyt hipokampální sklerózy a neokortikální léze, často typu fokální kortikální dysplázie (*focal cortical dysplasia - FCD*) (Marusič et al., 2007).

Ze všech těchto důvodů používám v celé disertační práci pro označení epilepsie vycházející z temporálního laloku neutrální termín „temporální epilepsie“, nezávisle na tom, jestli je jejím podkladem patologie limbických a/nebo neokortikálních struktur. Pro označení typu záchvatů bude použito pojmu parciální epileptické záchvaty, eventuálně pojmu „limbické záchvaty“, pokud se jedná o výše popsané typicky probíhající komplexní parciální záchvaty.

1.2.1 Skleróza hipokampu

Skleróza hipokampu je nejčastěji diagnostikovaná patologická léze u pacientů podstupujících epileptochirurgický resekcční výkon. Její souvislost s epilepsií byla známa již v 19. století. Pravděpodobně první mikroskopický popis sklerotického hipokampu podal Sommer v roce 1880, následně jej doplnil a zpřesnil Bratz v 1899 (Sommer, 1880; Bratz, 1899). Nejnápadnějším znakem HS jsou výrazný a area-specifický úbytek neuronů a významná reaktivní glióza. Úbytek neuronů je nejnápadnější v hipokampálním sektoru CA1, v oblasti prosubikula (tzv. Sommerův sektor) a v hilové oblasti gyrus dentatus.

Naopak, oblast CA3 bývá postižena méně. Oblast CA2 nevykazuje téměř žádný úbytek pyramidových neuronů, a proto je někdy označována jako rezistentní sektor. V gyrus dentatus je kromě úbytku granulárních buněk patrná i jejich disperze, tj. rozvolnění granulární vrstvy, za normálních okolností velmi kompaktní s vysokou hustotou neuronů. Tím dochází i ke zvětšení celkové tloušťky a rozostření okrajů stratum granulare. Tyto změny lze nejlépe pozorovat na řezech barvených podle Nissla a při imunohistochemickém průkazu NeuN a gliálního fibrilárního acidického proteinu (GFAP) (Zámečník, 2012). Margerison a Corsellis (1966), kteří jako první použili termínu hipokampální skleróza, rozlišovali dvě její formy. Výše popsaný patologický obraz pojmenovali (již dříve používaným názvem) jako skleróza Ammonova rohu (Ammon horn sclerosis) a postižení omezené na hilus gyri dentati jako skleróza endfolia. V současnosti se skleróza Ammonova rohu obvykle nazývá klasickou HS, nebo jenom HS. Skleróza endfolia není na rozdíl od klasické HS pevně asociovaná s temporální epilepsií, ale spíše s opakovanými generalizovanými záchvaty a častěji je pozorována v souvislosti s další patologickou lézí mimo hipokampus v rámci dvojí patologie (Margerison a Corsellis, 1966; Zámečník a Hermanová, 2011). Další formou sklerózy hipokampu je tzv. úplná HS, postihující neselektivně všechny oblasti hipokampu. Tato forma je ale spíše než s epilepsií spojena s celkovým postižením mozku v důsledku hypoxie / ischemie. Pokud nebude výslovně uvedeno jinak, pod pojmem hipokampální skleróza bude dál v textu chápána její klasická forma (skleróza Ammonova rohu).

V průběhu analýzy vztahů mezi postižením hipokampální formace a temporální epilepsií bylo zjištěno, že kromě hipokampu jsou patologickými změnami zasaženy i jiné struktury mediálního temporálního laloku, především pak amygdala (Meyer a Beck, 1955). Falconer et al. (1964) proto navrhli používat termín mesiotemporální skleróza (mesial temporal sclerosis), správně zdůrazňující postižení i jiných mesiotemporálních struktur. Dnes se tento termín v epileptologii často (a poněkud nepřesně) používá jako synonymum pro klasickou hipokampální sklerózu. V poslední době bylo zejména díky rozvoji magnetické rezonance potvrzeno významné extrahipokampální postižení u značné části pacientů s temporální epilepsií (Bartolomei et al., 2005; Bernasconi et al., 2003; Moran et al., 2001; Yilmazer-Hanke et al., 2000). Proto se při studiu mechanismů epileptogeneze v hipokampu obrací pozornost i na účast extrahipokampálních struktur při rozvoji temporální epilepsie.

1.2.1.1 Hipokampální skleróza a epileptogeneze

Souvislost mezi vznikem a přítomností hipokampální sklerózy na straně jedné a vznikem a trváním temporální epilepsie na straně druhé není dodnes dostatečně objasněna. Názory na to, jestli se temporální epilepsie vyvíjí jako důsledek sklerózy hipokampu, nebo jestli se naopak skleróza hipokampu rozvíjí v důsledku opakovaných epileptických záchvatů, se různí. Jako nejlépe podložená se zdá teorie iniciálního predisponujícího inzultu (Mathern et al., 1995a; Mathern et al., 1995b; Mathern et al., 1995c). Podle této teorie je primárním jevem v etiologii HS a TLE inzult v perinatálním nebo časném dětském období, který vyvolá vznik patologických změn v hipokampu (a pravděpodobně i v jiných strukturách) vedoucích po určité době (bezpříznaková, tzv. latentní perioda) k rozvoji obrazu HS a TLE. Takovým IPI mohou být například febrilní záchvaty, perinatální nebo i pozdější kraniocerebrální trauma, nebo meningoencefalitida. Rozsah a typy změn následně vznikajících v hipokampu a vedoucích k epileptogenezi je možné rozdělit zhruba do čtyř skupin: změny v synaptických vlastnostech neuronů, změny neuronální konektivity, změny intrinsických vlastností neuronů a změny gliových buněk a extracelulárního prostředí. Významným faktorem je vznik hyperexcitability, která vede k opakovaným záchvatům, které velmi pravděpodobně dále zhoršují patologické změny, případně i vyvolávají poruchy jiného typu. Pro podrobný přehled změn a další reference doporučuji práci (Mathern et al., 2008).

1.2.2 Neokortex a neokortikální léze u TLE

Dlouhou dobu byl v souvislosti s TLE studován převážně hipokampus, případně ještě ostatní, mesokortikální struktury mediálního temporálního laloku. Epileptogeneze na podkladě změn v temporálním neokortexu byla považována za pouze vzácně se vyskytující proces. V poslední době se ale ukazuje, že temporální neokortex může u nezanedbatelné části pacientů s TLE hrát důležitou, i když zatím ještě ne úplně přesně definovanou roli. Podkladem pro zvýšený zájem o neokortikální oblasti u TLE jsou kromě jiných dvě důležitá zjištění:

1. Možný podíl temporálního pólu a sousedních neokortikálních oblastí na vzniku a šíření záchvatů u části pacientů s HS a klinicky typickou TLE.

2. Častá přítomnost patologických změn, případně jasně definované druhé patologické léze v temporálním neokortexu u pacientů s HS - tzv. „duální patologie“.

1.2.2.1 Význam temporálního neokortexu u TLE s HS

Cytoarchitektonická parcelace kůry temporálního laloku je složitá a to nejen na jeho mediální ploše (Brodmann, 1909). Korová oblast na hrotu temporálního laloku se nazývá temporální pól. Cytoarchitektonicky je definována jako Brodmannova area 38. Mediálně sousedí s limbickými allokortikálními a přechodnými oblastmi (entorhinální a perirhinální arey), laterálně a bazálně pak s temporálními neokortikálními areami 20, 21 a 22 dle Brodmanna. Temporální pól má bohaté, převážně obousměrné spojení s amygdalou, hipokampem, parahipokampálním gyrem, insulou, cingulárním gyrem a orbitofrontální kůrou. Zároveň je prostřednictvím commissura anterior (pars interhemispherica) vytvořeno masivní propojení temporálních pólů obou hemisfér (Chabardès et al., 2002). Jak již bylo zmíněno výše, v poslední době se objevilo velké množství studií, které ukazují na význam temporálního pólu a sousedních neokortikálních oblastí při vzniku a šíření záchvatové aktivity u pacientů s TLE. U části pacientů s typickým obrazem TLE s HS byly zjištěny histologické, morfologické, metabolické a funkční změny v temporopolárním kortexu a přiléhající bílé hmotě (Briellmann et al., 2004; Coste et al., 2002; Chabardès et al., 2005; Jiruška et al., 2008; Kahane et al., 2002; Mitchell et al., 2003; Mitchell et al., 1999; Ryvlin et al., 2002; Sankar et al., 2008; Weder et al., 2006). Chabardès et al. (2005) navíc pomocí stereo-elektroencefalografie zjistili u poloviny vyšetřovaných pacientů časnou aktivaci temporálního pólu na začátku záchvatu. Z této podskupiny pak u čtvrtiny případů aktivace temporálního pólu dokonce předcházela aktivaci hipokampu a temporální pól tak byl identifikován jako spouštěvá zóna záchvatu (*ictal onset zone*) (v polovině případů jako jediný fokus, v druhé polovině zároveň s amygdalou). U části pacientů byl součástí spouštěvé zóny i sousední laterální nebo bazální temporální neokortex. Všechny tyto nálezy jasně potvrzují důležitost dalšího zkoumání podílu extrahipokampálních temporálních korových oblastí na vzniku a průběhu TLE, z praktického klinického hlediska pak mohou přispět k přesnějšímu indikování pacientů s farmakorezistentní TLE k jednotlivým epileptochirurgickým výkonům.

1.2.2.2 Dvojitá patologie

U přibližně 30 % pacientů s TLE není nalezena HS, ale jiná fokální léze temporálního laloku. Může se jednat o gangliogliom, dysembryoplastický neuroepiteliální tumor nebo fokální kortikální dysplázi. I když je začátek záchvatu u těchto případů nejčastěji také lokalizován v hipokampu, hipokampus většinou nevykazuje specifické změny při vyšetření zobrazovacími metodami, ani při neuropatologické analýze. Další významnou skupinu pacientů s TLE tvoří případy se souběžnou přítomností typické HS a některou z výše jmenovaných fokálních lézí temporálního laloku, případně (pravděpodobně méně často) jiných laloků. Tyto případy dvojitá patologie byly dříve pokládány za vzácně se vyskytující, s rozvojem vyšetřovacích (zejména zobrazovacích) metod se ukazuje, že jejich četnost je mnohem vyšší. Různí autoři udávají různý podíl pacientů s HS a TLE, u kterých je možné zároveň prokázat přítomnost druhé patologie temporálního laloku, což zřejmě souvisí i s rozdílně používanou definicí dvojitá patologie. Mezi extrahipokampálními fokálními lézemi zaujímá důležitou pozici skupina vývojových poruch označovaná jako fokální kortikální dysplázie.

1.2.2.3 Fokální kortikální dysplázie

Fokální kortikální dysplázie spadají do širší skupiny vývojových malformací mozkové kůry, označovaných jako malformace kortikálního vývoje (malformations of cortical development - MCD). Neustálenost a nejednotnost klasifikace MCD svědčí o dosud nejasných vazbách mezi jednotlivými afekcemi a neobjasněné patogenezi většiny z nich. Mezi až dosud navrženými klasifikačními schématy je relativně nejdokonalejší klasifikace rozdělující malformace podle toho, která z fází ontogeneze mozkové kůry je postižena (Barkovich et al., 1996). I tato klasifikace byla na základě nových poznatků opakovaně revidovaná (Barkovich et al., 2001; Barkovich et al., 2005). Její jistou nevýhodou je málo detailní specifikace a členění fokálních kortikálních dysplazií. Právě fokální kortikální dysplázie jsou v rámci skupiny korových malformací kvůli jejich relativně vysoké prevalenci a vysoké epileptogenicitě klinicky jednou z nejvýznamnějších podskupin. Proto byla v roce 2004 navržena speciální klasifikace fokálních kortikálních dysplazií, pro kterou

se podle prvního autora vžilo jméno Palminiho klasifikace (Palmini et al., 2004). Podle ní je možné fokální malformace mozkové kůry dělit následovně:

- A. Mírné MCD (typ I a II) – (*mild malformation of cortical development* – mMCD)
- B. Fokální kortikální dysplázie typu I
- C. Fokální kortikální dysplázie typu II

Fokální kortikální dysplázie se dále dělí na následující podtypy:

- A. FCD typu IA. charakterizovaný především setřením hranic mezi jednotlivými korovými vrstvami, nápadnými vertikálními neuronálními sloupci, přítomností shluků nepravidelně orientovaných neuronů a hypercelulární molekulární korovou vrstvou (obr. 1B v kapitole 8. Obrázky, tabulky a grafy, od str. 72).
- B. FCD typu IB. Ke změnám přítomným u typu IA se přidávají neuronální atypie - objevují se tzv. obrovské neurony (*giant neurons*, někdy označované jako hypertrofické neurony) (obr. 1C) a / nebo nezralé neurony (*immature neurons*) (obr. 1D). Obrovské neurony se od normální pyramidové populace liší nadměrnou velikostí ale nikoli tvarem a expresí různých markerů. U nezralých neuronů jsou prokazovány výraznější strukturální atypie: oválný nebo kulatý tvar a velké jádro s jen tenkým lemem cytoplazmy.
- C. FCD typu IIA se vyznačuje přítomností změn typických pro FCD typ I, navíc se ale vyskytují tzv. dysmorfní neurony (*dysmorphic neurons*, některými autory nepřesně označovanými jako *dysplastic neurons*) (obr. 1E). Již z názvu je patrná abnormální morfologie těchto neuronů, zahrnující jejich variabilní (často abnormálně zvětšenou) velikost a přítomnost výběžků, které mají atypický tvar i orientaci. Abnormální exprese různých markerů (N-CAM, MAP-2 a jiné) potvrzuje porušenou buněčnou diferenciaci.
- D. FCD typu IIB. V tomto typu se kromě výše uvedených změn dále vyskytují tzv. balónovité buňky (*balloon cells*) (obr. 1F). Jedná se o výrazně nezralé buňky s expresí gliových (GFAP-delta, S100) i neuronálních (neurofilamenta, synaptofyzin, MAP-2 a jiné) markerů. Jsou abnormálně velké, s bohatou eozinofilní cytoplazmou a excentricky uloženým vezikulárním jádrem (často s několika jádry). Je možné, že balónovité buňky vznikají z perzistující radiální glie, jejíž diferenciace se zastavila na rozhraní mezi gliovou a neuronální linií.

Fokální kortikální dysplázie typu IA se někdy označuje jako architektonická dysplázie (*architectural dysplasia*), typu IB jako cytoarchitektonická dysplázie. FCD typu IIB bývá taky nazývána podle objevitele jako dysplázie „Taylorského“ typu; jedná se o prvně popsany typ FCD vůbec (Taylor et al., 1971).

Nálezky z vyšetření magnetickou rezonancí typické pro jednotlivé podtypy FCD jsou uvedeny na obr. 2.

Etiopatogeneze fokálních kortikálních dysplázií není doposud objasněna, obecně jsou většinou autorů pokládány za důsledek porušené migrace a diferenciacie neuronů a kortikální organizace v gestačním období vývoje. U FCD typu II se pravděpodobně jedná především o poruchu diferenciacie neuronů v časných fázích fetálního vývoje, u FCD typu I je porušena zejména kortikální organizace, kde k poruše dochází pravděpodobně až v pozdním období fetálního vývoje a v perinatálním období (Kršek et al., 2008). Patologické faktory schopné vyvolat vznik lokalizované poruchy mozkové kůry a genetický podklad FCD nejsou dodnes dostatečně objasněny. Zejména u FCD typu I se na základě časté asociace s perinatálním nebo postnatálním inzultem a také na základě poznatků získaných ze studia zvířecích modelů FCD spekuluje i o možné sekundární – exogenní příčině vzniku korové poruchy včetně možnosti následné „de-diferenciacie“ primárně intaktních neuronů a dezorganizace primárně normálních neuronálních okruhů v postižené oblasti (Spreafico a Blümcke, 2010).

Stejně jako etiopatogeneze FCD, není zatím dostatečně prozkoumán ani mechanismus epileptogeneze u pacientů s FCD. Mechanizmy vedoucí ke zvýšené neuronální synchronizaci a následnému rozvoji epileptické aktivity v postižené tkáni je didakticky možné rozdělit do dvou (souvisejících) skupin:

a) abnormální fyziologické / patofyziologické vlastnosti postižených neuronů,

b) abnormální organizace neuronálních okruhů (Schwartzkroin a Walsh, 2000).

Elektrofyziologické studie neuronů v FCD prokázaly vysokou excitabilitu obrovských neuronů a dysmorfních neuronů, kde zejména dysmorfní neurony by mohly fungovat jako generátory epileptické aktivity. Naopak, balónovité buňky postrádají veškeré napěťové nebo ligandem řízené iontové kanály (Cepeda et al., 2003; Cepeda et al., 2005).

U fokálních kortikálních dysplázií typu IIB se v podoblastech

malformovaného kortexu s vysokou denzitou balónovitých buněk zjistila snížená epileptická aktivita při předoperačním elektrokortikografickém vyšetření. Tyto okrsky malformovaného kortexu také nebývají součástí spouštěcí zóny (ictal onset zone) a obvykle v nich ani není zachována fyziologická funkce příslušné kortikální arey. Naopak, v oblastech bez balónovitých buněk a s vysokým podílem dysmorfních neuronů je fyziologická funkce alespoň částečně zachována, ale zároveň jsou tyto okrsky typické svou výraznou epileptiformní aktivitou (Marusič et al., 2002). Tato zjištění jsou v souladu s hypotézou, podle které záchvatovitá aktivita vzniká na základě interakce mezi malformovanou a normální, fyziologickou složkou korových neuronálních okruhů (Cepeda et al., 2006).

Stejně jako u pravděpodobně většiny (když ne u všech) epileptogenních lézí je dalším faktorem přispívajícím k epileptogenicitě FCD nerovnováha mezi excitací a inhibicí v postižené mozkové kůře. Na rozdíl od původních představ o „jednoduché“ převaze excitační glutamátové transmise nad GABA-ergní inhibiční v epileptické tkáni se nyní tato problematika jeví být neobyčejně komplexní. U FCD resekovaných u dětských pacientů byla zdánlivě paradoxně nalezena významná predominance GABA-ergní synaptické aktivity nad glutamátovou, GABA ale na rozdíl od situace v dospělém kortexu (ale v souladu se situací v normálním, nezralém kortexu v časném postnatálním období) působila převážně jako excitační neurotransmitter (Cepeda et al., 2007). Stejní autoři dále prokázali přítomnost dysmorfních, „cytomegalických“ GABA-ergních interneuronů se známkami celulární hyperexcitability v FCD typu II a vyslovili předpoklad, že tyto malformované elementy se mohou podílet na epileptogenicitě fokálních kortikálních dysplázií (André et al., 2007). V neposlední řadě byl ve větším množství prací nalezen úbytek především parvalbumin (PV) exprimujících interneuronů v různých podtypech FCD (Ferrer et al., 1994; Garbelli et al., 2006; Garbelli et al., 1999; Spreafico et al., 1998; Spreafico et al., 2000; Thom et al., 2003), ukazující na možnou poruchu inhibičních systémů v malformovaném kortexu. U jiné skupiny - calretinin (CR) exprimujících interneuronů - je situace dosud nevyjasněná. V některých studiích byl popisován úbytek (Garbelli et al., 1999; Spreafico et al., 1998) zatímco v jiných nebyly nalezeny signifikantní změny v CR imunoreaktivitě u FCD (Garbelli et al., 2006), případně byl popsán jak úbytek tak i zvýšení CR imunoreaktivity v různých studovaných vzorcích u pacientů s FCD (Thom et al., 2003). U všech citovaných prací se jednalo o nanejvýš semikvantitativní hodnocení intenzity imunoreaktivity nebo denzity CR imunoreaktivních

neuronů. Jedním z hlavních cílů naší práce proto bylo podat podrobný kvantitativní popis stavu CR imunoreaktivní interneuronální populace v jednotlivých typech FCD.

1.3 Kortikální inhibiční interneurony

V mozkové kůře savců se nacházejí dvě základní populace neuronů. První, početně větší skupinou, jsou pyramidové glutamatergní neurony, tvořící přibližně 70 - 80 % všech korových neuronů. Jsou „projekční“ komponentou, zabezpečující spojení kůry s jinými oblastmi kůry a s ostatními podkorovými strukturami CNS (bazální ganglia, thalamus, kmen, mícha). Druhou, podstatně heterogennější skupinou jsou interneurony.

Interneuronální systém mozkové kůry je v poslední době jednou z nejpodrobněji studovaných oblastí v neurovědách (Druga, 2009; Mott a Dingledine, 2003). Interneurony představují strukturálně i funkčně rozdílné populace, lišící se navzájem v mnoha aspektech. Celkově tvoří interneurony asi 20 - 30 % z celkové populace korových neuronů, přičemž většina typů interneuronů jsou GABAergní inhibiční neurony (Markram et al., 2004). GABAergní neurony mají v mozkové kůře mnoho důležitých úloh a pro správnou funkci kůry a mozku jako celku jsou mnohem důležitější, než by se dalo předpokládat na základě jejich nižšího počtu oproti pyramidovým neuronům (Markram et al., 2004; McBain a Fisahn, 2001). První rozdělení, a to na základě jejich morfologie, předložili už Ramón y Cajal a Lorente de Nó v první polovině 20. století (Lorente de Nó, 1938; Ramón y Cajal, 1968). Toto rozdělení, i když v rozšířené a upravené verzi, je stále relevantní a přínosné. Mezi základní morfologické typy GABAergních interneuronů (v neokortexu) patří košíčkové buňky - basket cells, svícnové buňky - *chandelier cells*, „double bouquet“ buňky, bipolární a „bitufted“ buňky, neurogliaformní buňky, Martinottiho buňky a Cajal-Retziusovy buňky (Markram et al., 2004). („Bitufted“ neurony jsou neurony s fusiformním tělem, kdy z obou protilehlých pólů odstupuje jeden „svazek“ primárních dendritů. Tím se tyto buňky odlišují od bipolárních neuronů, kde z každého pólu odstupuje jenom jeden primární dendrit, který se až v dalším průběhu větví. Vzhledem k chybějícímu vhodnému českému názvu pro „bitufted“ neurony je v tomto textu budu dále označovat původním anglickým výrazem.)

Ke studiu korových GABAergních interneuronů se dnes užívá mnoha metodických přístupů. Nejběžnější jsou, kromě zmíněných morfologických metodik, elektrofyziologický

a imunohistochemický přístup. Z hlediska elektrofyziologie je možné interneurony rozdělit do několika skupin (Gupta et al., 2000; Kawaguchi a Kondo, 2002; Kawaguchi a Kubota, 1997; Kawaguchi a Kubota, 1998). Podobně je tomu i při imunohistochemické analýze, kde je možné na základě exprese různých markerů peptidové nebo polypeptidové povahy rozdělit interneuronovou populaci do více skupin. Všechny prokazované markery jsou molekuly přirozeně se vyskytující v interneuronech. Nejčastěji jsou užívané kalcium-vážíci proteiny a neuropeptidy.

V oblasti početné rodiny kalcium-vážících proteinů (*calcium-binding proteins* – CaBP) vyskytujících se v savčích buňkách se při výzkumu interneuronů uplatňují tři z nich: jsou to parvalbumin (PV), calbindin (CB) a calretinin (CR) (Demeulemeester et al., 1989; Kubota et al., 1994; Rogers a Resibois, 1992). Jejich pravděpodobně hlavní funkcí je pufovat intracelulární kalcium a tím udržovat jeho koncentraci v požadovaném rozmezí. Kromě toho je calretinin považován za senzor kalciových iontů a byla popsána jeho interakce s intermediálními filamenty neurotubulů (Billing-Marczak a Kuznicki, 1999). Při studiu interneuronů se ale více než jejich funkce využívá fakt, že jsou exprimovány v různých populacích se žádným nebo jenom minimálním překrytím (Demeulemeester et al., 1989; Rogers a Resibois, 1992). To znamená, že interneurony exprimující jeden z těchto tří proteinů neexprimují zbývající dva. Neplatí to úplně stoprocentně a určité překrývání se objevuje, zejména mezi CB a PV, a též mezi CB a CR. Míra tohoto překrývání je různá v závislosti na živočišném druhu a korové oblasti (Kawaguchi a Kubota, 1997; Markram et al., 2004).

Při kombinaci morfologického popisu a klasifikace na základě exprese CaBP (a případně neuropeptidů) je možné získat vzorec interneuronální populace zkoumané oblasti, který je zajímavý i z funkčního hlediska. Například PV imunopozitivní (PV+) košičkové buňky a svícnové buňky (neexprimující ostatní CaBP a neuropeptidy, z elektrofyziologického hlediska jsou popisované jako „*fast spiking*“) zabezpečují výraznou inhibici somatu a iniciálního segmentu axonu pyramidových neuronů stejné korové vrstvy (tj. horizontální inhibice) a mají tak výrazný vliv na generování jejich akčních potenciálů (Benes a Berretta, 2001; DeFelipe, 2002; Freund a Buzsáki, 1996; Kawaguchi a Kondo, 2002). PV+ košičkové buňky jsou vzájemně propojeny pomocí chemických i elektrických synapsí a tvoří tak síť, která je schopna synchronizovat aktivitu pyramidových buněk. Jsou pravděpodobně základní komponentou nutnou pro tvorbu gama a theta oscilací jak v hipokampu tak i v neokortexu (Buzsáki a Draguhn, 2004; Buzsáki a Chrobak, 1995;

Freund, 2003; Freund a Buzsáki, 1996). Synchronizované oscilace neuronální aktivity jsou významné pro různé fáze spánku, pro různé kognitivní procesy a při zpracovávání informací v kortexu (Freund, 2003).

Ostatní třídy interneuronů (exprimující ostatní CaBP a neuropeptidy a neexprimující PV) zajišťují dendritickou inhibici pyramidových buněk (Freund a Buzsáki, 1996; Miles et al., 1996). Například CR+ interneurony, nejčastěji bipolární nebo „bitufted“ somatodendritické morfologie jsou nositeli vertikální inhibice v neokortikálních sloupcích (kolumnách). CR+ interneurony zároveň bohatě inervují i ostatní třídy interneuronů a působí tak jako významný desinhibiční element, zejména v povrchních vrstvách neokortexu (Gabbott et al., 1997a) (obr. 3). Popis exprese CaBP a neuropeptidů v interneuronech konkrétní korové oblasti je proto jedním ze základních „parametrů“ důležitých pro jejich další studium, včetně studia konektivity a funkčního působení v dané oblasti (Benes a Berretta, 2001; Freund a Buzsáki, 1996; Gonchar a Burkhalter, 2003; Gonzalez-Albo et al., 2001; Markram et al., 2004; McBain a Fisahn, 2001; Xu et al., 2003). Ve svojí práci jsem se ve zvýšené míře věnoval calretinin imunoreaktivním interneuronům. Pro další detailní informace o calretininu a calretinin exprimujících neuronech viz náš přehledný článek (Barinka a Druga, 2010), který je součástí této dizertační práce.

1.4 Perirhinální kortex a jeho souvislost s temporální epilepsií

Perirhinální kůra (*perirhinal cortex* – PRC) je mesokortikální oblast ležící mezi entorhinální kůrou a temporálním neokortexem, odpovídající areám 35 a 36 podle Brodmanna (Brodmann, 1909). Area 35 je vlastní area perirhinalis, area 36 je popisována jako area ectorhinalis (v dalším textu pod názvy perirhinální oblast, perirhinální kůra, perirhinální kortex rozumíme arey 35 + 36, tedy včetně area ectorhinalis, kdežto pojmem area perirhinalis bude označována vlastní area 35). Perirhinální kortex se vyznačuje bohatým obousměrným spojením s hipokampální formací prostřednictvím entorhinální kůry (Burwell a Amaral, 1998b; Burwell et al., 1995; Suzuki a Amaral, 1994b) a podobně bohatými aferentacemi z uni- i polymodálních sensorických areí (Suzuki a Amaral, 1994a; Van Hoesen a Pandya, 1975). Mohutné jsou i spoje s amygdalárním komplexem (Burwell et al., 1995). Perirhinální kortex je tedy místem konvergence vstupů z polymodálních

senzorických oblastí a množství subkortikálních struktur a má strategickou polohu pro syntézu různých sensorických informací (Suzuki, 1996). Původně převládající názor, že perirhinální kortex je jednoduchou „přepojovací stanicí“ pro přenos informací mezi neokortexem a hipokampální formací, byl výrazně pozměněn, když bylo zjištěno, že je kriticky důležitý pro různé typy paměti a dále zejména díky objevu mohutného inhibičního systému v této oblasti (Pelletier et al., 2004). Mohutná inhibice neokortikálních vstupů je schopná úplně zablokovat jejich další propagaci do hipokampální formace. Z pozorování pomocí elektrofyziologických a zobrazovacích metod je zřejmé, že tato inhibice může být střídavě aktivována a deaktivována a že perirhinální kůra je místem rozhodujícím o propagaci nebo naopak zamezení propagace neokortikálních vstupů do hipokampální formace (de Curtis a Pare, 2004; Pinto et al., 2006). Obdobným způsobem je pravděpodobně schopná ovlivnit i šíření aktivity v opačném směru. Díky těmto zjištěním je v poslední době v centru zájmu i při výzkumu tvorby a propagace epileptiformní aktivity v temporálním kortexu. Zdá se, že perirhinální kortex je kriticky důležitou oblastí pro šíření a v některých případech pravděpodobně i pro vznik epileptických záchvatů u TLE (Avoli et al., 2002; Benini et al., 2011; de Curtis a Pare, 2004; de Guzman et al., 2004; Fukumoto et al., 2002; Kelly a McIntyre, 1996; Morimoto et al., 2004; Nairismagi et al., 2006). Mediální prefrontální kortex, amygdala a cholinergní subkortikální projekce byly identifikovány jako struktury facilitující přenos informací přes PRC (Apergis-Schoute et al., 2007; Paz et al., 2006; Paz et al., 2007). Strukturální substrát výše popsaného elektrofyziologicky prokázaného masivního inhibičního systému nebyl zatím dostatečně definován, je však možné předpokládat významnou účast korových inhibičních interneuronů. Až dosud chyběla morfologicky orientovaná práce, která by detailně popisovala distribuci jednotlivých skupin inhibičních interneuronů v PRC u potkana, jako základního laboratorního modelu pro výzkum temporální epilepsie. Takový popis je důležitý pro další detailní výzkum inhibičního systému perirhinálního kortexu a jeho funkce, respektive dysfunkce u experimentálních modelů epilepsie i u nemocných s temporální epilepsií.

2. OTÁZKY A CÍLE PRÁCE

Objektem zájmu naší práce byly inhibiční interneurony v extrahipokampálních korových strukturách temporálního a v menší míře i jiných laloků a jejich podíl na epileptogenezi a šíření epileptických záchvatů. Identifikace kvantitativních a kvalitativních změn těchto neuronů u epilepsií je důležitá nejen pro hlubší pochopení mechanismu vzniku a šíření epileptických záchvatů, ale má v budoucnu i potenciální využití ve farmakoterapii těchto onemocnění.

Práci jsme rozdělili do dvou částí.

2.1 Calretinin immunoreaktivní inhibiční interneurony ve fokálních kortikálních dyspláziích a v nemalformovaném temporálním neokortexu u pacientů s farmakorezistentní epilepsií

Naším cílem bylo:

1. Podat podrobný kvantitativní popis změn CR imunoreaktivní interneuronální populace v mozkové kůře u pacientů s farmakorezistentní epilepsií
 - a) v různých podtypech FCD
 - b) v nemalformovaném temporálním neokortexu u temporální epilepsie (nHSTN)
2. Porovnat případné patologické změny CR imunoreaktivní populace s dříve popsáním úbytkem PV imunoreaktivních interneuronů u FCD a nHSTN, a tím získat ucelenější pohled na stav a dysfunkci interneuronů u těchto onemocnění.
3. Ověřit naši hypotézu, podloženou dřívějšími nálezy u jiných onemocnění postihujících neokortex, podle které jsou CR imunoreaktivní interneurony v porovnání s ostatními interneuronálními populacemi (a zejména v porovnání s PV imunoreaktivními interneurony) odolnější vůči různým patologickým vlivům.

2.2 Calretinin, parvalbumin a calbindin imunoreaktivní inhibiční interneurony v perirhinálním kortexu a temporální korové oblasti Te3V u potkana

Naším cílem bylo:

- 1.** provést podrobnou kvalitativní, a zejména kvantitativní analýzu inhibičních interneuronů v perirhinálním kortexu (PRC) a v přilehlé neokortikální oblasti Te3V u potkana
- 2.** Konfrontovat získané výsledky s předpokladem, podle kterého je popsána masivní inhibice v perirhinální kůře podmíněna přímo intrinsickou interneuronální výbavou této oblasti. V tom případě by se interneuronální výbava PRC měla kvalitativně a/nebo kvantitativně lišit od korových oblastí, kde podobně významná inhibiční aktivita nebyla popsána (např. sousední area Te3V).

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Calretinin imunoreaktivní inhibiční interneurony ve fokálních kortikálních dyspláziích a v nemalformovaném temporálním neokortexu u pacientů s farmakorezistentní epilepsií

3.1.1 Materiál

Vzorky mozkové kůry byly získány peroperačně od 24 pacientů s farmakorezistentní epilepsií kteří podstoupili resekční neurochirurgický zákrok (Neurochirurgické kliniky Fakultní nemocnice v Motole a v Ústřední vojenské nemocnici Praha). Věkové rozpětí pacientů bylo 5 až 50 let, medián 21 let, 15 pacientů bylo ženského a 9 mužského pohlaví. Všechny operace byly provedené z terapeutických důvodů. Po potvrzení farmakorezistence byla u všech pacientů v rámci předoperačního programu provedena za účelem přesného stanovení lokalizace a hranic epileptogenní zóny rozsáhlá série vyšetření - klinické vyšetření, analýzy semiologie záchvatů, EEG a zobrazovací metody (magnetická rezonance, MR spektroskopie, FDG-pozitronová emisní tomografie, SPECT). Od všech pacientů resp. jejich zákonných zástupců byl předoperačně získán informovaný souhlas a svolení k použití tkáně, která nebyla spotřebována v rámci patologické diagnostiky, k vědeckým účelům. Protokol pokusů byl schválen etickou komisí Fakultní nemocnice v Motole.

Čtrnáct pacientů podstoupilo anteromediální temporální resekci, u které byl odstraněn amygdalohipokampální komplex a zároveň temporopolární neokortex. U všech těchto pacientů byla následným histopatologickým vyšetřením potvrzená přítomnost hipokampální sklerózy. U sedmi z nich byla současně v resekovaném neokortexu přítomna některá z forem fokální kortikální dysplázie, jednalo se tedy o dvojí patologii. U deseti pacientů byla provedena limitovaná kortikální resekce – selektivní odstranění epileptogenní zóny v mozkové kůře. U pěti z těchto pacientů se jednalo o temporální lokalizaci, u zbývajících pěti o extratemporální – u tří frontální a po jedné v parietální a okcipitální lokalizaci. U všech těchto pacientů byla následně neuropatologicky potvrzena přítomnost některého z typů fokální kortikální dysplázie v resekovaném kortexu. U pacientů, kteří podstoupili resekci temporálního laloku (anteromediální temporální resekce nebo limitovaná kortikální resekce temporálního kortexu) byly pro potřeby naší

studie vyšetřeny 4 tkáňové vzorky: jeden z oblasti temporálního pólu a po jednom z gyrus temporalis superior, medius a inferior z oblasti 2 až 2,5 cm vzdálené od temporálního pólu. U pacientů, kteří podstoupili extratemporální kortikální resekci byly vyšetřeny 4 vzorky z oblasti vykazující změny typické pro některou z forem FCD (tab. 1).

Jako kontroly byly použity vzorky z analogických oblastí získané krátce post mortem od devíti pacientů, kteří zemřeli na onemocnění nepostihující centrální nervový systém. Medián věku těchto pacientů byl 55 let, věkové rozpětí 11 až 69 let. U tří pacientů byly vzorky odebrány ze všech vyšetřovaných oblastí (frontální, parietální, okcipitální a temporální kortex), v případě temporálního kortexu pak ze všech lokalizací analogicky ke vzorkům od pacientů s epilepsií (temporální pól, gyrus temporalis superior, medius a inferior). U zbývajících šesti pacientů byly vzorky odebrány ze všech čtyř lokalizací v temporálním kortexu.

3.1.2 Imunohistochemie

Resekovaná tkáň byla fixována v 10% pufovaném formolu a následně zalita do parafinu. Na rotačním mikrotomu (Leica) byly nakrájeny 4 mikrometry silné řezy. Z každého tkáňového bloku z každé lokalizace byly vybrány 3 řezy, vzdálené od sebe 50 mikrometrů. Tyto tři řezy spolu tvořili jeden „vzorek“. Řezy byly deparafinovány a rehydratovány. Tepelná revitalizace epitopů byla provedena v roztoku citrátového pufru při pH 6,0 zahříváním na teplotu 96°C ve vodní lázni po dobu 40 minut. Po následném ochlazení a zablokování endogenní peroxidázové aktivity byly řezy přes noc inkubovány při teplotě 4 °C s myší monoklonální protilátkou proti calretininu (klon 5A5, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, Velká Británie) v koncentraci 1:100. Komplexy antigen-protilátka byly detekovány pomocí biotin-streptavidin detekčního systému (LSAB2 System, DakoCytomation Co., Glostrup, Dánsko, katalogové číslo K0675). Finální vizualizace byla provedena za pomoci 3,3'-diaminobenzidinu (DAB, Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Německo). Všechny řezy byly zároveň lehce dobarveny hematoxylinem. Pro znázornění histopatologických charakteristik byly další řezy nabarveny hematoxylinem-eozinem a Nisslovým barvením pomocí kresylvioleti. Jednalo se o řezy přímo sousedící s řezy barvenými na calretinin.

3.1.3 Vyhodnocení histopatologických a imunohistochemických vlastností vyšetřované tkáně

Všechny tkáňové vzorky byly nejprve vyšetřeny neuropatologem (doc. MUDr. Josef Zámečník, PhD.), který vyhodnotil patologické změny. V případě průkazu fokální kortikální dysplázie byl určen její typ dle Palminiho klasifikace (Palmini et al., 2004), viz kapitola 1.2.2.3. a (obr. 1).

Následovalo zhodnocení kvality zpracování všech řezů u všech jednotlivých vzorků. Řezy, které nebyly kolmé k rovině povrchu mozkové kůry byly vyřazeny. Stejně tak byly z dalšího hodnocení vyřazeny řezy s nestejnou intenzitou imunoreakce v řezu. Následkem toho bylo u některých pacientů možné pro další hodnocení použít méně než standardní čtyři vzorky.

Každý vzorek byl na základě hodnocení neuropatologa zařazen do jedné z následujících šesti kategorií:

1. **Kontrolní neokortex.** Jak bylo uvedeno v kapitole 3.1.1., u tří z celkem devíti kontrolních pacientů byly vzorky odebrány z více laloků – po jednom vzorku z frontálního, parietálního a okcipitálního laloku a čtyři vzorky z temporálního laloku. U ostatních šesti pacientů bylo odebráno po čtyřech vzorcích z temporálního laloku. Kategorii kontrolní neokortex tak bylo možné ještě rozdělit na frontální, parietální, okcipitální a temporální kontrolní neokortex.
2. **Nemalformovaný temporální neokortex u pacientů s hipokampální sklerózou (*non-malformed hippocampal sclerosis temporal neokortex* - nHSTN)**
3. **FCD typu IA**
4. **FCD typu IB**
5. **FCD typu IIA**
6. **FCD typu IIB**

Protože současná přítomnost různých patologických změn u jednoho pacienta byla běžným nálezem, jako základní jednotku pro kvantitativní analýzu a vzájemné porovnání jsme použili vzorek a nikoli pacienta. Tento přístup nám dále umožnil porovnat nálezy mezi jednotlivými gyry / neokortikálními oblastmi u nHSTN a kontrolního neokortexu.

U všech řezů ze vzorků zachycujících některý z typů FCD jsme se podrobným srovnáním sousedních řezů barvených hematoxylinem-eosinem a kresylvioletí přesvědčili o tom, že příslušný imunohistochemicky barvený řez skutečně zachycuje příslušný typ FCD.

Kvantitativní analýza byla provedena pomocí počítačové obrazové analýzy programem Cell*F od firmy Olympus a digitální kamery Olympus DP 70 připojené k mikroskopu Olympus BX 51. Počítání profilů CR+ neuronů bylo provedeno zaslepeně, tj. bez znalostí konečné neuropatologické diagnózy u jednotlivých vzorků i bez možnosti srovnání se sousedními řezy barvenými hematoxylin-eozinem nebo kresylvioletí. U každého vzorku (tedy soustavy tří řezů z jednoho tkáňového bločku) bylo označeno několik zájmových oblastí (*region of interest* – ROI), průměrně pro jeden vzorek čtyři. Tyto byly vyfotografovány za použití objektivu 10x. Počítací rámečky (typicky jeden nebo dva pro ROI; v průměru 4,2 pro vzorek) byly virtuálně za pomoci programu umístěny v oblastech, ve kterých nebylo detekováno žádné mechanické poškození řezu a ve kterých se nevyskytovaly větší krevní cévy. Průměrná plocha oblastí vyšetřované u jednoho vzorku byla $21,9 \pm 1,7 \text{ mm}^2$ (průměr \pm S.E.M., *standard error of mean*, směrodatná chyba odhadu průměru). Hranice rámečku (*counting frame*) byly dány povrchem kůry, hranicí s bílou hmotou v hloubce a dvěma liniemi kolmými k povrchu kortexu po stranách. Všechny rámečky byly lokalizovány ve střední části boční stěny mozkového závitu nebo na povrchu mozkového závitu, měl-li závit dostatečnou tloušťku, aby umožnil umístění pravoúhlého, nebo téměř pravoúhlého rámečku. Profily CR+ neuronů byly manuálně počítané v každém z rámečků odděleně v jednotlivých korových vrstvách. Počty imunopozitivních neuronů byly vyjádřeny jako neuronální denzita, tedy počet imunopozitivních neuronů na mm^2 kortexu, nejprve pro korové vrstvy I, II, III, IV, společně pro vrstvy V+VI, následně pak jako celková denzita v celé tloušťce kortexu.

Po ukončení vyhodnocování všech vzorků byly řezy s počítacím rámečkem přiřazeny k sousedním řezům barveným hematoxylin-eozinem a Nisslovým barvením s cílem verifikovat stanovení hranic korových vrstev a k rozřídění všech řezů / vzorků do jednotlivých kategorií.

Kvůli výrazné poruše laminace u většiny vzorků FCD typu II nebylo možné spolehlivě stanovit hranice jednotlivých korových vrstev. Z tohoto důvodu byla denzita CR+ neuronů u této kategorie vyjádřena jenom jako celková denzita pro celou tloušťku kortexu.

Na závěr byly hodnoty získané v jednotlivých rámečcích na všech řezech daného vzorku vyjádřeny jako průměrná hodnota pro daný vzorek a tyto hodnoty ze všech vzorků

jednotlivých kategorií byly vyjádřeny jako průměrná hodnota \pm S.E.M. pro jednotlivou kategorii.

3.1.4 Statistické zhodnocení

Následovalo statistické zhodnocení rozdílů hodnot mezi jednotlivými kategoriemi pomocí testu na analýzu rozptylu (ANOVA – *analysis of variance*) a následně mnohonásobného srovnávacího testu Tukey-Kramer. Rozdíly, u kterých byla p-hodnota (*probability value*) $< 0,05$ byly hodnoceny jako statisticky významné.

3.2 Calretinin, parvalbumin a calbindin imunoreaktivní neurony v perirhinálním kortexu a v temporální asociační oblasti Te3V u potkana

3.2.1 Zvířata

Pro tuto studii byly použity mozky osmi potkanů kmene Wistar (samci) o tělesné hmotnosti 350 až 400 gramů.

Zvířata byla chována za standardních podmínek (cyklus 12 hodin světlo / 12 hodin tma, teplota vzduchu $22 \pm 1^\circ\text{C}$, vlhkost vzduchu 50 – 60 %, volný přístup k vodě a potravě). Experimenty byly schváleny Odbornou komisí Fyziologického ústavu AVČR, v.v.i. a byly provedeny v souladu s platnými zákony. Fyziologický ústav AVČR je akreditovaným pracovištěm pro práci s laboratorními zvířaty (Akreditace č.: 36215/2008-10001, platnost do prosince 2013) i pro chov laboratorních zvířat (Akreditace č.: 36215/2008-10001 s platností do prosince 2013).

3.2.2 Příprava materiálu

Potkanům byla podána nadměrná dávka uretanu (2 g/kg intraperitoneálně), po preparaci hrudního koše a zavedení intraaortálního katétru byl cévní systém perfundován 0.01 M fosfátovým pufrem s pH 7,4 a následně 4% paraformaldehydem v roztoku 0,1 M fosfátového pufru s pH 7,4. Mozky byly opatrně v celku vypreparovány z lební dutiny, postfixovány v pufrovaném 4% paraformaldehydu po dobu tří hodin a poté vloženy do

vzestupné řady sacharosy (10%, 20%, 30%) v PBS (fosfátový pufr s chloridem sodným; PBS - *phosphate buffered saline*) při 4°C. Mozky byly následně zamraženy na suchém ledu a nařezány na 50 µm silné koronární řezy na kryostatu Leica CM 1900.

3.2.3 Imunohistochemické barvení

Sousední sériové koronární řezy byly v sériích „jeden z pěti“ nabarveny 1) kresylvioletí podle Nissla, 2) imunohistochemicky na průkaz CR, 3) na průkaz PV a 4) na průkaz CB. Pátý řez z každé série nebyl zpracován a byl archivován pro případné další použití. Vznikly tedy za sebou následující série po pěti 50 µm silných řezech, kdy mezi dvěma za sebou následujícími řezy nabarvenými stejným barvením byla vzdálenost 250 µm. Tímto způsobem byl zpracován vždy celý mozek.

Imunohistochemie na průkaz CaBP byla provedena následujícím způsobem: řezy byly postupně inkubovány metodou free-floating v 0,15% H₂O₂ v PBS po dobu deseti minut, propláchnuty 5 krát v PBS, permeabilizovány s 0,3% Tritonem X100 a následně jednu hodinu inkubovány při pokojové teplotě v blokovacím roztoku obsahujícím 2 % normálního koňského séra (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Řezy byly dále inkubovány s primární protilátkou (myší anti-PV monoklonální protilátka, Millipore, ředění 1:10000, nebo myší anti-CR monoklonální protilátka, Millipore, ředění 1:8000, nebo myší anti-CB monoklonální protilátka, Swant, ředění 1:10000) v PBS obsahujícím 1,5 % normálního koňského séra a 0,1 % Tritonu X100 po dobu 48 hodin při teplotě 4°C a potom propláchnuty pětkrát v PBS. Řezy byly dále inkubovány jednu hodinu při pokojové teplotě se sekundární protilátkou (biotinylovanou koňskou protilátkou proti myším antigenu, Vector), ředěnou 1:50 v PBS obsahujícím 1,5 % normálního koňského séra. Následně byly řezy propláchnuty pětkrát v PBS, inkubovány jednu hodinu při pokojové teplotě s Avidin-Biotin komplexem (Vectastatin Kit, Vector) a po propláchnutí inkubovány 8 minut s roztokem 0,02% diaminobenzidinu a 0,05% H₂O₂ v PBS. Poté byly řezy naneseny na želatinou pokrytá standardní podložní sklíčka, dehydratovány a přikryty krycím sklíčkem.

Barvení řezů Nisslovým barvením a imunohistochemické barvení na CR, PV a CB je znázorněno na (obr. 4).

3.2.4 Ohraničení korových oblastí a vrstev

Cytoarchitektonické charakteristiky vyšetřované oblasti potřebné pro stanovení hranic perirhinálních korových polí 35 a 36 byly podrobně popsány v práci R. Burwell a spolupracovníků (Burwell, 2001). Většinu jimi popsanych detailů bylo možné na řezech barvených Nisslovým barvením spolehlivě detekovat. Na řezech barvených na průkaz CaBP a zvláště na řezech imunoreaktivních na CR a PV jsme identifikovali další strukturální charakteristiky umožňující přesnější stanovení hranic jednotlivých oblastí, které budou popsány ve výsledcích.

V rostrokaudálním směru byla kvantitativní analýza provedena v rozsahu od přibližně -2,75 mm po přibližně -7,0 mm AP (anteroposteriorně) od Bregmatu, stanoveno podle atlasu (Paxinos a Watson, 2007). Vyšetřován byl tedy téměř celý PRC, tak jak byl definován v uvedené studii (Burwell, 2001).

Hranice temporální neokortikální oblasti Te3V byly stanoveny na základě popisu podaného v práci (Zilles a Wree 1995). Tato area je součástí pásu asociačního kortexu, který je rozprostřen kolem primární sluchové kortikální oblasti Te1. V jeho nejrostrálnější části přechází ventrálně uložená area Te3V bez jasně viditelné cytoarchitektonické hranice do dorzálně od ní lokalizované oblasti Te3R. Tato malá část oblasti Te3V byla vyňata z kvantitativního hodnocení neuronální denzity. Vyšetřovaná část oblasti Te3V byla tedy omezena na rostrokaudální interval od AP -3,5 mm do AP -6,0 mm.

Pro názorné zobrazení hranic vyšetřovaných oblastí na řezech různých rostrokaudálních úrovní viz (obr. 5).

Alternativní členění vyšetřovaného korového regionu bylo popsáno v (Palomero-Gallagher a Zilles, 2004). Podle tohoto členění může být oblast Te3V dále rozdělená na ventrálně uloženou multimodální asociační oblast TeV (alternativně nazývána TEv) a dorzálně od ní ležící unimodální auditorní asociační oblast Te3V. Toto členění je založeno primárně na výsledcích elektrofyziologických studií a protože nemělo morfologický korelát na námi použitým materiálu, nebylo ho možné zohlednit. V naší práci popisovaná oblast Te3V tedy zahrnovala unimodální i multimodální asociační kortex.

3.2.5 Kvalitativní analýza

Kvalitativní analýza – hodnocení cytoarchitektoniky a imunoreaktivity v jednotlivých areách a vrstvách a nakonec hodnocení somatodendritické morfologie imunoreaktivních

neuronů – byla provedena na řezech barvených Nisslovým barvením a na řezech imunoreaktivních na CR, PV a CB za pomoci programu pro analýzu obrazu (Cell*F, Olympus) a digitální kamery Olympus DP 70 připojené k mikroskopu Olympus BX 51. Kvalitativní analýza byla provedena na obou hemisférách.

3.2.6 Kvantitativní analýza

3.2.6.1 Denzitometrické hodnocení

Denzitometrická analýza imunoreaktivity neuropilu na CR, PV a CB v korových oblastech 35, 36 a Te3V byla provedena na koronárních řezech ze tří rovnoměrně vzdálených rostrokaudálních úrovní (AP -3,96 mm, AP -5,04 mm a AP -6,00 mm od Bregmatu). Snímky byly zhotoveny za pomoci programu na zpracování obrazu QuickPHOTO MICRO 2.3., Promicra) a digitální kamery DP 72 připojené na mikroskop Olympus BX 51. Pro tento účel byl použit objektiv s 10x zvětšením. Abychom zabránili rozdílům v intenzitě osvětlení, všechny snímky byly pořízeny při stejném nastavení intenzity osvětlení na mikroskopu a při manuálně nastavené fixní expoziční době kamery. Snímky byly následně konvertovány na snímky v odstínech šedé.

Denzitometrické hodnocení bylo provedeno za pomoci programu pro kvantitativní analýzu optické denzity v biologické tkáni (Denzita, MBF Bioscience -MicroBrightField, Inc.).

Pro kalibraci hodnot luminance (úrovně jasu) a pro umožnění výpočtu relativní optické denzity (ROD) byly použity snímky kalibračního proužku s oblastmi s definovanou hodnotou odstínu šedé. Relativní optická denzita byl vypočtena pomocí vzorce:

$$ROD_{AVG} = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^n \log_{10} \left(\frac{F}{P_i} \right)$$

kde F je hodnota odstínu šedé na pozadí ($F = 255$), P_i je hodnota odstínu šedé daného pixelu / pixelů a N vyjadřuje počet pixelů. Nízké hodnoty ROD znamenají, že přes tkáň prochází více světla a vysoké hodnoty naopak, že je víc světla pohlceno v tkáni a tudíž není zachyceno kamerou.

Za použití regresní přímky byla vypočtena ROD pro každou zkoumanou oblast na všech pro tento účel použitých řezech. Korová vrstva I byla vyloučená z denzitometrické analýzy. Abychom eliminovali možný vliv případné mírně odlišné intenzity imunobarvení

mezi jednotlivými řezy a mezi jednotlivými zvířaty, ROD byla korigována vydělením hodnot naměřených v jednotlivých vyšetřovaných oblastech hodnotou naměřenou v corpus callosum na stejném řezu. Tato korigovaná relativní optická denzita (cROD) umožnila porovnání naměřených hodnot mezi jednotlivými řezy a zvířaty. Corpus callosum bylo vybráno jako referenční struktura, protože vykazuje jenom velmi nízkou intenzitu imunobarvení na CR, PV a CB a protože má dobře definované ohraničení.

3.2.6.2 Stereologická analýza

Pro stanovení interneuronální a celkové neuronální denzity byla použita stereologická analýza, umožňující přesný výpočet počtu objektů (v tomto případě neuronů) v daném objemu tkáně při analýze omezené části celkového objemu. Principy, ze kterých tato komplexní metodika vychází a detailní popis s vysvětlením výpočtů uvádí West et al. (1991).

Použit byl mikroskop Olympus BX 50 vybavený motorizovaným stolcem a stereologickým systémem CAST Grid verze 2.1.5.8 (Olympus, 1999). Celková neuronální denzita byla měřena na řezech barvených podle Nissla. V případě perirhinálního kortexu bylo u každého zvířete (6 zvířat) použito 17 až 18 koronárních řezů, vzdálených od sebe vždy 250 μm , ve výše zmíněném rostrokaudálním intervalu AP -2,75 mm až AP -7,0 mm. Neurony byly počítány na každém druhém z těchto řezů, kdy jako první vyhodnocený řez byl vždy po náhodném výběru použit první nebo druhý řez z rostrálního konce vyšetřovaného AP intervalu. Celkem tedy bylo u každého zvířete vyhodnoceno 8 nebo 9 řezů barvených podle Nissla. V případě arei Te3V byla použita identická metoda s jediným rozdílem: vzhledem k menšímu rostrokaudálnímu rozsahu vyšetřované oblasti bylo vyhodnoceno celkem 5 až 6 řezů u každého zvířete.

Rozměry pomocné mřížky a optického disektoru byly přizpůsobeny zvláště pro každou z vyšetřovaných oblastí, aby bylo dosaženo relativně konstantního počtu počítaných neuronů a koeficientu chyby $< 0,1$ (*coefficient of error* – CE) (Gundersen and Jensen, 1987). Rozměry pomocné mřížky byly 133,2 x 133,2 μm pro areu 35 a 172 x 172 μm pro arey 36 a Te3V. V rámci každého posuvu záběru mikroskopu po pomocné mřížce byly spočítány neurony (přesněji jádra neuronů) ve výřezu o rozměrech 25,79 x 34,4 μm (optický disektor). Neuronální jádra byla počítána v celé tloušťce řezu za použití imerzního objektivu o zvětšení 100x (numerická apertura 1,35). Vyloučena byla jenom ta jádra, která byla při postupném přeostrřování podél osy z zaostřena již na horním povrchu daného řezu.

Neuroglie a endoteliální buňky nebyly počítány. V perirhinálním kortexu nebylo možné na námi použitým materiálu identifikovat s jistotou hranice mezi korovými vrstvami II a III a stejně i mezi korovými vrstvami V a VI. Proto byly neurony počítány pro vrstvy II+III (II až IV v oblasti Te3V) a pro vrstvy V+VI a nakonec sumárně ve všech vrstvách (II až VI). Kortikální vrstva I nebyla hodnocena vzhledem k velmi nízkému počtu interneuronů imunopozitivních na CR, PV a CB. Především PV+ a CB+ interneurony ve vrstvě I prakticky nejsou přítomny (obr. 8).

Celkový počet neuronů v každé z vyšetřovaných oblastí – N (přesněji ve frakci každé oblasti, zavzaté do kvantitativního hodnocení) byl vypočten podle vzorce :

$$N = \Sigma Q \times 1/ssf \times 1/asf \times 1/tsf$$

kde *section sampling fraction* (*ssf*, podíl řezů zavzatých do hodnocení z celkového počtu řezů obsahujících průřez danou oblastí) byla 1/10, *area sampling fraction* (*asf*, povrch optického disektoru v rovinách xy / povrch jednoho čtverce pomocné mřížky) byla 0,05 v případě arey 35 a 0,03 v případě areí 36 a Te3V a nakonec *tissue sampling fraction* (*tsf*, tloušťka řezu / výška optického disektoru v rovině z) byla 1. ΣQ označuje součet neuronů přímo počítaných v jednotlivých optických disektorech. Celková neuronální denzita byla následně vypočtena vydělením celkového počtu neuronů vypočteného dle popsaného vzorce celkovým objemem tkáně ve kterém byly tyto neurony počítány. Celkový objem tkáně byl vypočten podle vzorce:

Σ povrchů všech vyznačených oblastí zájmu v každém řezu (tedy povrchu dané oblasti na konkrétním řezu) \times interval mezi jednotlivými řezy \times tloušťka řezů

Pro počítání interneuronů byla použita mírně pozměněná metoda. Byl použit stejný počet řezů jako při hodnocení celkové neuronální denzity, *ssf* se tedy rovnala 1/10. Imunoreaktivita cytoplasmu v neuronech imunoreaktivních na CR a PV byla obecně vysoká a neřídka i vyšší než imunoreaktivita jádra. Z tohoto důvodu byla při počítání detekována celá neuronální somata a ne pouze jádra. Opět byla proostřena celá tloušťka řezu ($tsf = 1$) a neurony, jejichž soma bylo zaostřeno již na horním povrchu daného řezu byly vyloučeny z hodnocení. Vzhledem k relativně malému počtu imunoreaktivních neuronů ve vyšetřovaných oblastech byly započítány všechny imunoreaktivní neurony v hodnocené oblasti na každém hodnoceném řezu, při použití 40x imerzního objektivu

(numerická apertura 1,0), tedy $asf = 1$ (myšleno vzhledem k malému počtu imunoreaktivních neuronů ne oproti jiným korovým oblastem, ale malému pro uplatnění běžného stereologického postupu, kdy je při celkově velkém počtu počítaných objektů za pomoci optického disektoru přímo hodnocena jenom malá část z celkové zájmové oblasti, viz výše – hodnocení celkové neuronální denzity). Interneuronální denzita byla vypočtena stejným postupem jako celková neuronální denzita.

Kvantitativní analýza (denzitometrická a stereologická analýza) byla provedena na pravé mozkové hemisféře.

3.2.6.3 Statistické hodnocení

Analýza variance (ANOVA) následovaná Tukey-Kramer multiple comparison testem byla použita pro vyhodnocení statistické významnosti rozdílů v korigované relativní optické denzitě, celkové neuronální i interneuronální denzitě a procentuálních podílů interneuronů. P hodnoty $< 0,05$ byly hodnoceny jako statisticky významné.

4. VÝSLEDKY

4.1 Calretinin imunoreaktivní inhibiční interneurony ve fokálních kortikálních dyspláziích a v nemalformovaném temporálním neokortexu u pacientů s farmakorezistentní epilepsií

Jako kontrolní materiál bylo v této studii použito a vyhodnoceno 28 vzorků temporálního, 3 vzorky frontálního, 3 vzorky parietálního a 3 vzorky okcipitálního kontrolního neokortexu. Dále bylo vyhodnoceno 30 vzorků nemalformovaného temporálního neokortexu pacientů s hipokampální sklerózou (nHSTN), 21 vzorků FCD typu I (10 typu IA a 11 typu IB) a 22 vzorků FCD typu II (8 typu IIA a 14 typu IIB). Celkově bylo analyzováno 110 tkáňových vzorků. (tab. 1.)

4.1.1 Distribuce imunoreaktivity calretininu

4.1.1.1 Kontrolní neokortex

CR imunoreaktivní neurony byly lokalizovány převážně v korových vrstvách II a III. Všechny imunoreaktivní neurony vykazovaly jinou než pyramidovou morfolologii, nejčastěji se jednalo o vertikálně orientované fusiformní buňky s bipolární nebo „bitufted“ dendritickou morfologií (obr. 6A, D, obr. 7A). Méně početné byly multipolární neurony (obr. 7B). V první korové vrstvě bylo možné morfolologicky rozlišit dva typy CR+ neuronů: prvním typem byly vertikálně orientované bipolární nebo „bitufted“ neurony (obr. 7D). Tyto neurony se nacházely převážně v hlubší části první kortikální vrstvy a morfologií se nelišily od CR+ neuronů ve druhé vrstvě. Druhá populace obsahovala větší buňky uložené subpiálně. Somatodendritická morfologie těchto neuronů byla pozorovatelná jenom u malé části z nich, převládaly buňky s bipolárními, horizontálně orientovanými dendrity, v menší míře byly zastoupeny jiné morfologické typy (obr. 7E, F). Tento buněčný typ pravděpodobně reprezentuje Cajal – Retziusovy neurony, kterých většina vymizí v časném postnatálním období a jen malá část persistuje do dospělosti (Belichenko et al., 1995). Tyto neurony byly v námi vyhodnocovaném materiálu sice pravidelným, ale málo častým nálezem.

Výskyt CR+ neuronů v hlubších korových vrstvách byl celkově nízký. Podobně jako v supragranulárních vrstvách, převládaly vertikálně orientované bipolární a „bitufted“ neurony i v infragranulárních vrstvách kontrolního neokortexu (obr. 7C). Občasným nálezem byly horizontálně orientované bipolární CR+ neurony v subkortikální bílé hmotě (obr. 7G).

Imunoreaktivita neuropilu byla nejvýraznější v supragranulárních vrstvách a zejména ve vrstvě I, kde bylo možné pozorovat četné drobné granulace (puncta) CR imunoreaktivity, které jsou ztotožňovány s terminálními boutonny nebo s preterminálními axonálními zakončeními. Početná vertikálně orientovaná CR+ vlákna byla přítomna ve vrstvách II až IV a někdy vybíhala do infragranulárních vrstev.

Mezi vzorky z jednotlivých mozkových laloků, respektive z jednotlivých gyrů temporálního laloku, nebyl prokázán žádný zásadní kvalitativní rozdíl v korové distribuci CR+ neuronů a v imunoreaktivitě neuropilu.

4.1.1.2 Nemalformovaný temporální neokortex u pacientů s hipokampální sklerózou

Celkové rozložení imunoreaktivity calretininu bylo ve vzorcích nHSTN identické s již popsaným nálezem v kontrolním neokortexu. Celková distribuce CR+ interneuronů a jejich morfologie byly shodné se situací u kontrol. Nicméně jsme prokázali jeden rozdíl. U některých nHSTN vzorků jsme pozorovali slabě se barvící pyramidové neurony ve vrstvách III až V (obr. 7H). Stejně neurony bylo možné vzácně najít i v několika málo vzorcích FCD typu I, ale nikdy u kontrolního neokortexu ani ve vzorcích FCD typu II. Protože tyto neurony morfologií neodpovídaly interneuronům a jejich počet byl zanedbatelný, nebyly zavzaty do kvantitativního hodnocení CR+ interneuronů.

4.1.1.3 Fokální kortikální dysplázie

Charakteristická distribuce CR+ neuronů s nejvyšší denzitou ve vrstvách II a III pozorovaná v kontrolním neokortexu i ve vzorcích nHSTN byla zachována i ve vzorcích FCD (FCD IA: obr. 6B; FCD IIB: obr. 2C). Dokonce i ve vzorcích FCD typu II s významně narušenou laminární organizací kůry na morfologické úrovni byla nejvyšší denzita CR+ neuronů pozorována v povrchní části kortexu, která by za normálních okolností přibližně odpovídala supragranulárním vrstvám II a III (obr. 6C).

Intenzita zbarvení neuropilu i neuronálních perikaryí byla v porovnání s kontrolními vzorky a s nHSTN vzorky nápadně nižší a to jak u FCD typu I, tak ještě výrazněji u vzorků FCD typu II (FCD IA: obr. 6E; FCD IIB: obr. 6F). Nepozorovali jsme žádné rozdíly v CR imunoreaktivitě mezi A a B podtypy obou typů FCD (typ I a typ II). Podobně jako u nHSTN byly velké CR+ neurony v povrchní části vrstvy I (pravděpodobně odpovídající Cajal-Retziusovým buňkám) u vzorků FCD typu I častější než v kontrolním neokortexu. Aberantní buňky charakteristické pro FCD (nezralé a obrovské neurony u FCD typu I – obr. 1A, D, a navíc dysmorfnní neurony a balónovité buňky u FCD typu II – obr. 1E, F) nebyly v žádném z vyšetřovaných případů CR imunoreaktivní.

4.1.2 Denzita CR+ neuronů

Denzita CR+ neuronů byla měřena u všech typů vzorků (s výjimkou vzorků FCD typu II) zvláště v jednotlivých korových vrstvách (I, II, III, IV, V+VI) a následně sumárně pro celou tloušťku kůry. Hodnoty naměřené v celé tloušťce kůry budou diskutovány v následujícím textu, hodnoty z jednotlivých vrstev jsou uvedeny v tabulce 2. Procentuální vyjádření hodnot získaných v jednotlivých typech vzorků (při porovnání s kontrolním neokortexem) je uvedeno v grafu 1.

4.1.2.1 Kontrolní neokortex

Nejvyšší denzita CR+ neuronů byla změřena v kontrolním neokortexu ($34,3 \pm 0,9$ neuronů na mm^2 ; $n = 37$, $n =$ počet vyšetřených vzorků). Neprokázali jsme žádný signifikantní rozdíl v celkové denzitě CR+ neuronů mezi parietálním ($32,4 \pm 1,8$; $n = 3$), okcipitálním ($33,5 \pm 0,9$; $n = 3$) a temporálním ($35,5 \pm 1,0$; $n = 28$) neokortexem. Ve frontálním kortexu byla ale naměřená denzita CR+ neuronů ($26,4 \pm 1,2$; $n = 3$) významně nižší oproti zbývajícím třem vyšetřovaným lalokům ($p < 0,01$ při porovnání s parietálním a okcipitálním, a $p < 0,0001$ při porovnání s temporálním neokortexem). Abychom vyloučili možný vliv rozdílů v barvení, věku pacientů, intervalu zpracování post mortem apod., provedli jsme separátní porovnání celkové denzity CR+ neuronů ve vzorcích z frontálního, parietálního, okcipitálního a temporálního neokortexu od tří kontrolních subjektů, u kterých byly k dispozici vzorky ze všech čtyř vyšetřovaných laloků. I toto měření potvrdilo, že mezi temporálním kortexem ($33,5 \pm 0,8$; $n = 3$) a parietálním a okcipitálním kortexem nejsou signifikantní rozdíly v denzitě CR+ neuronů, kdežto hodnoty ve

frontálním laloku byly nižší než ve třech zbývajících lalocích ($p < 0,0001$). V temporálním laloku nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly v hodnotách naměřených v gyrus temporalis superior, medius a inferior.

4.1.2.2 Nemalformovaný temporální neokortex u pacientů s hipokampální sklerózou

Celková denzita CR+ neuronů v celé tloušťce nHSTN kortexu byla $34,0 \pm 1,8$ ($n = 30$) a nelišila se tedy významně od hodnot v kontrolním temporálním neokortexu. Vzhledem k variabilitě denzity CR+ neuronů mezi jednotlivými laloky u kontrol jsme pro srovnání s nHSTN použili pouze kontrolní vzorky z temporálního laloku.

Stejně jako u kontrol, ani u nHSTN jsme nepozorovali statisticky významné rozdíly v CR+ neuronální denzitě mezi vzorky z gyrus temporalis superior, medius a inferior.

4.1.2.3 Fokální kortikální dysplázie typu I

Průměrná denzita CR+ neuronů ($25,1 \pm 1,3$; $n = 21$), měřeno v celé tloušťce kortexu, představovala 73,2 % z hodnot získaných v kontrolním materiálu. Pokles byl statisticky významný ($p < 0,0001$). Po rozdělení na podtypy FCD IA a IB (rozdíl v denzitě mezi nimi nebyl statisticky významný) se ukázalo, že denzita CR+ neuronů ve vzorcích FCD IA ($26,1 \pm 2,4$; $n = 10$) i FCD IB ($24,2 \pm 1,4$; $n = 11$) se statisticky významně liší od kontrol ($p < 0,0001$ u obou podtypů).

Dále byly hodnoceny zvlášť vzorky FCD typu I z jednotlivých laloků. Průměrná denzita CR+ neuronů v temporálních FCD typu I ($25,2 \pm 1,4$; $n = 19$) reprezentovala 70,1 % z hodnot v temporálním kontrolním kortexu, pokles byl statisticky významný ($p < 0,0001$). U parietálních FCD typu I vzorků reprezentovala změřená CR+ neuronální denzita ($21,7 \pm 1,7$; $n = 2$) 66,9 % z hodnot získaných v kontrolním parietálním kortexu. Vzhledem k malému počtu vzorků parietálních FCD typu I nebylo možné provést statistické zhodnocení.

4.1.2.4 Fokální kortikální dysplázie typu II

Denzita CR+ neuronů v FCD typu II ($16,7 \pm 1,0$; $n = 22$) byla v porovnání s kontrolním materiálem statisticky významně snížena ($p < 0,0001$) a představovala 48,7 % z hodnoty naměřené v kontrolním neokortexu. Rozdíl mezi hodnotami ve vzorcích FCD typu I a FCD

typu II byl rovněž statisticky významný ($p = 0,011$). Stejně jako u FCD typu I, ani u vzorků FCD typu II jsme nepozorovali významný rozdíl mezi hodnotami v podtypech IIA ($17,5 \pm 2,2$; $n = 8$) a IIB ($16,2 \pm 1,0$; $n = 14$).

Následovalo selektivní porovnání vzorků FCD II z jednotlivých laloků. Průměrná denzita CR+ neuronů v temporálních FCD typu II ($17,9 \pm 0,8$; $n = 8$) tvořila 50,4 % z hodnot v temporálním kontrolním kortexu, pokles byl statisticky významný ($p < 0,0001$). Podobně i průměrná denzita ve frontálních FCD typu II ($14,3 \pm 1,1$; $n = 12$) představovala 54,2 % z hodnot ve frontálním kontrolním kortexu (signifikantní rozdíl, $p < 0,001$). Pokles denzity v okcipitálních FCD typu II ($26,1 \pm 3,6$; $n = 2$) byl nižší, denzita dosahovala 77,9 % z hodnot získaných v okcipitálním kontrolním kortexu. Malý počet vzorků neumožnil statistické zhodnocení.

4.1.3 Denzita CR+ neuronů – SOUHRN

Ukázali jsme, že zatímco v nHSTN vzorcích se denzita CR+ neuronů nelišila od hodnot naměřených v kontrolním materiálu, u vzorků fokálních kortikálních dysplázií byla denzita CR+ neuronů signifikantně nižší (73,2 % u FCD typu I a 48,7 % u FCD typu II) oproti kontrolnímu neokortexu ze stejné lokality (graf 1).

4.2 Calretinin, parvalbumin a calbindin imunoreaktivní neurony v perirhinálním kortexu a v temporální asociační oblasti Te3V u potkana

4.2.1 Obecná charakteristika imunoreaktivity calretininu, parvalbuminu a calbindinu

Hranice kortikálních oblastí, tak jak jsme je na použitém materiálu stanovili na základě charakteristik popsaných ve studii Burwell-ové (2001) a také na základě rozdílů v imunohistochemickém barvení (popsaných níže), jsou znázorněny na (obr. 5). Obecné charakteristiky imunohistochemického barvení, tak jak budou popsány v následujícím oddílu, jsou znázorněny na (obr. 4 a 8).

4.2.1.1 Calretinin

Celková intenzita imunoreaktivity calretininu v PRC byla značně vyšší než v sousedním entorhinálním kortexu. Výrazný a náhlý pokles CR imunoreaktivity na hranici mezi entorhinální a perirhinální kůrou spolehlivě vymezuje ventrální hranici perirhinální kůry. Vyšší intenzita CR barvení v korové vrstvě I charakteristická pro všechny korové oblasti byla v PRC a obzvláště v arei 35 ještě nápadnější než v sousedním temporálním neokortexu. V arei 35 byla intenzita barvení ve vrstvách II, III, V a VI (area 35 nemá vyvinutou zřetelnou korovou vrstvu IV) relativně homogenní s jenom lehce výraznější imunoreaktivitou neuropilu ve spodní části vrstvy III a ve spodní části vrstvy VI. V arei 36 vykazovala imunoreaktivita trilaminární uspořádání se značně vyšší intenzitou ve vrstvách I, spodní vrstvě III a vrstvě IV a spodní části vrstvy VI a nižší intenzitou ve vrstvách II, povrchní části vrstvy III a ve vrstvě V. Temporální area Te3V vykazovala obdobné trilaminární uspořádání CR imunoreaktivity, ale s nižší intenzitou ve všech korových vrstvách. Pokles imunoreaktivity na hranici oblastí 36 a Te3V byl méně výrazný než výše popsaný pokles na hranici entorhinálního kortexu a arey 35. Hranice mezi areou Te3V a dále dorzálně uloženou primární sluchovou kůrou (area Te1) byla nápadná dalším poklesem CR imunoreaktivity a především vymizením pruhu vyšší imunoreaktivity v hlubší části vrstvy III a ve vrstvě IV.

Nepozorovali jsme signifikantní rozdíl v charakteru a v intenzitě CR imunoreaktivity podél rostrokaudální osy PRC (obr. 9). Rostrálněji uložená inzulární kůra se odlišovala od PRC nižší intenzitou zbarvení (jenom lehce vyšší než v sousední entorhinální kůře a v sousedním neokortexu), a také přítomností claustra, nacházejícího se pod vrstvou VI inzulárního kortexu. Hranici PRC s kaudálněji uloženým postrhinálním kortexem nebylo spolehlivě možné určit na CR imunoreaktivních řezech, vzhledem k tomu, že postrhinální kortex vykazoval podobně vysokou úroveň imunopozitivity jako sousední PRC. Dále, stejně jako v arei 36 v něm byl pozorován pruh vysoké intenzity barvení v hluboké části vrstvy III a ve vrstvě IV.

4.2.1.2 Parvalbumin

Na rozdíl od řezů barvených na průkaz CR byla na materiálu barveném na průkaz PV v PRC pozorována výrazně nižší intenzita zbarvení v porovnání se sousední entorhinální kůrou a sousedním temporálním neokortexem. Korová vrstva I v PRC a v arei Te3V

vykazovala jenom velmi slabou PV imunoreakci. V arei 35 byla přítomná jenom nízká intenzita barvení ve vrstvách II a III, čímž se tato area výrazně odlišovala od sousední laterální entorhinální kůry, pro kterou je typická vysoká intenzita barvení na průkaz PV v povrchních vrstvách. Tenký pruh vysoké intenzity byl konstantně přítomen ve vrstvě V (v její povrchnější části). V hluboké vrstvě V a ve vrstvě VI byla intenzita PV barvení nízká, obdobně jako ve vrstvách II a III. V arei 36 intenzita imunopozitivity oproti arei 35 mírně stoupala ve vrstvách II-IV (obzvláště ve vrstvě II) a méně výrazně i ve vrstvě VI. Se zvyšující se tloušťkou kůry (ve směru od arey 35 k temporálnímu neokortexu) se pruh vysoké intenzity barvení ve vrstvě V postupně rozšiřoval. V oblasti Te3V jsme pozorovali další postupný vzestup imunopozitivity v hluboké vrstvě III a ve vrstvě IV a méně výrazný, ale poměrně náhlý vzestup ve vrstvě VI. Hranici mezi areou Te3V a primární sluchovou kůrou nebylo možné na řezech barvených na průkaz PV rozlišit.

Podobně jako u materiálu barveném na průkaz CR, nebyl zaznamenán výraznější rozdíl v PV imunoreaktivitě podél rostrokaudální osy PRC (obr. 9). Intenzita barvení v rostrálnější uložené inzulární kůře byla lehce vyšší než v navazujícím PRC. Distribuce PV imunoreaktivity byla ale velice podobná a neumožňovala spolehlivé stanovení hranice mezi inzulární kůrou a PRC. Stejně nebylo možné určit hranici PRC s kaudálně navazujícím postrhinálním kortexem, ve kterém byl přítomen podobný vzor PV imunoreaktivity jako v PRC.

4.2.1.3 Calbindin

Ve vrstvě I byla nalezena středně vysoká intenzita barvení na průkaz CB. Nejvyšší intenzitu imunoreaktivity vykazovala vrstva II, od ní směrem do hloubky kortexu se intenzita postupně snižovala s nejnižší hodnotou ve vrstvě VI. Podobný vzor byl nalezen i v sousední entorhinální kůře a v neokortexu. Hranice mezi areou 35 a entorhinální kůrou byla viditelná díky náhlému poklesu CB imunoreaktivity ve vrstvě I v entorhinální kůře a vzhledem k méně výraznému poklesu v ostatních vrstvách entorhinální kůry v porovnání s PRC. Na hranici mezi areami 35 a 36 se objevil pruh výraznějšího barvení ve vrstvě V, který z arey 36 plynule přecházel i do arey Te3V a primárního sluchového kortexu. Tento pruh vysoké intenzity byl ale přítomen jenom ve střední a hlubší části vrstvy V a nezahrnoval nejvšchnější část vrstvy, ve které byla intenzita barvení podobně nízká jako v sousední vrstvě IV. Hranice mezi entorhinální kůrou a areou 35 podobně jako mezi areou

Te3V a primárním sluchovým kortexem nebylo na CB imunoreaktivních řezech možné spolehlivě určit.

Stejně jako v případě materiálu imunoreaktivního na průkaz PV nebylo možné stanovit přesně rostrální a kaudální hranici PRC na řezech barvených na průkaz CB. V rozsahu PRC nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl v imunoreaktivitě podél rostrokaudální osy (obr. 9).

U všech tří použitých imunobarvení jsme nepozorovali žádný rozdíl mezi levou a pravou mozkovou hemisférou.

4.2.2 Denzitometrická analýza imunoreaktivity calretininu, parvalbuminu a calbindinu

Pro kvantifikaci možných rozdílů v intenzitě imunoreaktivity v neuropilu mezi areami 35, 36 a Te3V byla u CR, PV a CB barvených řezů provedena denzitometrická analýza. Ve všech třech vyšetřovaných areách byla změřena korigovaná relativní optická denzita (cROD). Hodnoty cROD získané v areách 35, 36 a Te3V byly pak porovnány mezi sebou. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Na řezech barvených na průkaz CR byly nejvyšší hodnoty cROD naměřeny v arei 35 ($4,7 \pm 0,5$; hodnota \pm S.E.M.). Nesignifikantně nižší hodnoty byly naměřeny v arei 36 ($4,4 \pm 0,6$), ale výrazně nižší denzita byla naměřena v oblasti Te3V ($2,9 \pm 0,3$). Rozdíl mezi hodnotami v arei 35 a v arei Te3V byl statisticky významný ($p < 0,05$). Na řezech barvených na průkaz PV a CB byly pozorovány jenom statisticky nevýznamné rozdíly v cROD mezi jednotlivými oblastmi, v případě PV+ materiálu byl ale pozorovatelný jasný trend stoupajících hodnot cROD od oblasti 35 po oblast Te3V.

4.2.3 Neuronální morfologie

Somatodendritická morfologie CR+, PV+ a CB+ neuronů ve studované oblasti a obzvláště v PRC byla na našem materiálu hůře rozlišitelná než v sousedních neokortikálních polích. U značné části studovaných neuronů bylo dostatečně nabarveno jen soma a odstupy dendritů. Ve všech případech a speciálně u materiálu barveného na průkaz CB byla dendritická arborizace neuronů ve vrstvách V a VI obecně lépe nabarvena než u neuronů ve vrstvách II-IV. U těch neuronů, u kterých byl dendritický „strom“ dostatečně znázorněn, bylo možné rozlišit tři morfologické typy neuronů: 1. vertikálně orientované

bipolární / „bitufted“ neurony, 2. multipolární neurony a 3. horizontálně orientované bipolární / „bitufted“ neurony. Velmi nízký počet imunohistochemicky značených neuronů ve vrstvě I (u všech tří barvení) neumožnil provést podrobnější analýzu morfologie těchto neuronů.

CR+, PV+ a CB+ neurony ve všech tří studovaných oblastech měly zřetelně nepyramidovou morfologii. Tenká imunopozitivní vlákna s malými varikozitami, odpovídající pravděpodobně axonům, bylo možné najít v neuropilu u všech tří barvení a ve všech oblastech, ale iniciální segment axonu odstupující ze somatu neuronu nebo z proximálního dendritu byl rozlišitelný jenom výjimečně.

4.2.3.1 Calretinin

1. Vertikálně orientované bipolární / „bitufted“ neurony (obr. 10A)

Tato morfologie byla u CR+ neuronů ve všech studovaných oblastech, v povrchních (II-IV) i v hlubokých (V-VI) vrstvách nejčastější. Dva dendrity (bipolární) nebo méně často dva svazky dendritů („bitufted“) u těchto buněk odstupovaly z protilehlých pólů oválného nebo vřetenovitého (fusiformního) perikarya. Oba dendritické stromy se dále větvily v sousedních vrstvách.

2. Buněčná těla multipolárních CR+ neuronů byla převážně multiangulární (obr. 10D), méně často byly pozorovány neurony s invertovanou pyramidovou morfologií, které ale nedosahovaly velikosti typických pyramidových neuronů. Tři nebo čtyři dendrity (vzácně více) odstupovaly z těla neuronu, jejich větve se dále radiálně rozbíhaly bez jasné směrové preference.

3. Vzácně se nacházející horizontálně orientované CR+ neurony (obr. 10G) měly většinou fusiformní somata se dvěma dendritickými trsy nebo méně často se dvěma primárními dendrity odstupujícími z protilehlých pólů buňky. Na rozdíl od vertikálně orientovaných bipolárních / „bitufted“ CR+ neuronů, u kterých si dendrity i po rozvětvení zachovávaly vertikální orientaci, se u horizontálně orientovaných neuronů primárně horizontální orientace dendritů distálněji často měnila na šikmou, nebo dokonce vertikální.

4.2.3.2 Parvalbumin

1. Vertikálně orientované bipolární / „bitufted“ PV+ neurony (obr. 10B) se ve vyšetřovaných areách nacházely jenom vzácně. Obvykle měly oválné perikaryon

s dendrity vycházejícími z horního a z dolního pólu těla neuronu. Proximální dendrity byly často silnější než tomu bylo v případě CR+ vertikálních bipolárních neuronů. Až na malé výjimky bylo možné pozorovat jenom proximální úsek dendritů, distálnější segmenty nebyly dostatečně znázorněny.

2. Multipolární PV+ neurony (obr. 10E) byly jednoznačně nejčastějším morfologickým typem PV+ neuronů ve všech vyšetřovaných oblastech a vrstvách. Těla neuronů byla typicky okrouhlá nebo oválná, často se čtyřmi i více primárními dendrity, které se větvaly ve všech směrech. Dendrity byly často tenké a jenom lehce nabarvené, obvykle mohl být pozorován jenom relativně krátký proximální úsek dendritické arborizace.

3. Vzácné horizontálně orientované PV+ neurony s fusiformním nebo oválným somatem (obr. 10H) byly častěji nalézány v hlubších korových vrstvách. Tak jako u ostatních morfologických typů PV+ neuronů byly obvykle dostatečně nabarvené jenom proximální segmenty dendritického stromu.

4.2.3.3 Calbindin

Ve všech vyšetřovaných areách bylo možné pozorovat dvě skupiny CB+ neuronů: středně až silně imunopozitivní neurony, přítomné ve všech korových vrstvách na jedné straně a dále velký počet velmi slabě pozitivních neuronů ve vrstvách II a III na straně druhé. U této druhé skupiny bylo v některých případech obtížné odlišit soma neuronu od pozadí okolního neuropilu. Z tohoto důvodu byly morfologické vlastnosti hodnoceny jenom u první, dostatečně imunohistochemicky značené skupiny CB+ neuronů.

1. Vertikálně orientované bipolární / „bitufted“ CB+ neurony (obr. 10C) byly svou somatodendritickou morfologií velmi podobné CR+ neuronům: dva relativně tenké dendrity / svazky dendritů odstupovaly z horního a dolního pólu fusiformního nebo oválného somatu. Tyto dendrity ve svém dalším vertikálním průběhu oběma směry procházely značnou částí z celkové tloušťky kortexu. Buňky tohoto typu byly časté ve všech studovaných oblastech a vrstvách.

2. Multipolární CB+ neurony (obr. 10F) byly přibližně stejně početné jako vertikálně orientované neurony. Svou morfologií se opět podobaly obdobné CR+ populaci. Měly zpravidla multiangulární somata, ze kterých odstupovaly a do všech směrů se větvaly tři nebo čtyři primární dendrity.

3. Horizontálně orientované CB+ neurony s většinou fusiformním buněčným tělem (obr. 10I) se nacházely především v hlubokých vrstvách, zvláště v hluboké části vrstvy VI. Ve

většinou případů nebylo možné sledovat větvení dendritů na vzdálenost větší než 20 – 30 μm od somatu a nebylo tedy možné posoudit jejich další orientaci.

Grafické znázornění podílů jednotlivých morfologických typů CR+, PV+ a CB+ neuronů ve studovaných oblastech a vrstvách je znázorněno na (obr. 11). Nepozorovali jsme žádný signifikantní rozdíl v morfologii studovaných neuronů mezi jednotlivými oblastmi, mezi různými rostrokaudálními úrovněmi těchto oblastí a ani mezi levou a pravou mozkovou hemisférou.

4.2.4 Denzita CR+ a PV+ neuronů

Neuronální denzita CR+ a PV+ neuronů v perirhinálním kortexu (v areách 35 a 36) jakož i v sousední neokortikální arei Te3V byla stanovena stereologicky a vyjádřena jako počet neuronů na 1 mm^3 mozkové kůry \pm S.E.M., zvlášť pro korové vrstvy II-IV, V-VI a nakonec souhrnně pro vrstvy II-VI. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4. Kvůli malému počtu CR+ neuronů a prakticky chybějícím PV+ neuronům nebyla vrstva I zahrnuta do hodnocení.

4.2.4.1 Calretinin

Rozložení denzity CR+ neuronů v jednotlivých vrstvách bylo velmi podobné ve všech studovaných oblastech. Vysoká denzita CR+ neuronů byla pozorována v povrchových vrstvách a naopak značně nižší v hlubokých vrstvách. Kromě toho se denzita CR+ neuronů mezi studovanými areami výrazně lišila. Neuronální denzita klesala postupně podél ventro-dorsální osy, s nejvyššími hodnotami celkové denzity (vrstvy II-VI) v arei 35 (3194 ± 211 neuronů / mm^3), nižšími v arei 36 (2520 ± 363 neuronů / mm^3) a nejnižšími v neokortikální oblasti Te3V (1512 ± 153 neuronů / mm^3), dosahujícími tady méně než polovinu hodnoty z arey 35. Tento ventro-dorsální pokles byl obzvláště výrazný v povrchových vrstvách II-III (II-IV). V tabulce 4 jsou uvedeny jednotlivé numerické hodnoty.

4.2.4.2 Parvalbumin

Ve všech studovaných oblastech byly PV+ neurony, obdobně jako CR+ neurony, početnější v povrchových korových vrstvách než v hlubokých. Rozdíl mezi vrstvami nebyl

ale tak výrazný jako u CR+ neuronů. PV+ neurony byly dále mnohem rovnoměrněji zastoupeny ve všech třech studovaných oblastech, s téměř stejnou denzitou v arei 35 (3805 ± 120 neuronů / mm^3 , vrstvy II-VI) a v arei Te3V (3951 ± 193 neuronů / mm^3) a s nesignifikantně vyšší denzitou v arei 36 (4336 ± 223 neuronů / mm^3) (tab. 4).

4.2.5 Celková neuronální denzita a procentuální zastoupení CR+ a PV+ neuronů

Abychom vyloučili možné zkreslení (*bias*) v porovnání interneuronálních denzit mezi jednotlivými areami, které by mohlo být způsobeno rozdílnou hustotou uložení neuronů („*neuronal packing density*“) v sulcus rhinalis (tedy v areách 35 a 36) a na konvexitě hemisféry (area Te3V), změřili jsme celkovou denzitu všech neuronů ve všech oblastech na řezech barvených podle Nissla. Podíl interneuronů na celkové populaci neuronů jsme následně vyjádřili jako procentuální zastoupení z celkového počtu neuronů a tyto procentuální podíly jsme porovnali mezi jednotlivými studovanými areami.

4.2.5.1 Celková neuronální denzita

Celková neuronální denzita byla u všech studovaných oblastí vyšší v povrchových korových vrstvách. Nejvyšší denzita (ve vrstvách II-IV, V+VI i II-VI) byla nalezena v arei 35, nižší v arei 36 a nejnižší v arei Te3V. Individuální hodnoty a hladiny statistické významnosti jsou uvedené v tabulce 4.

4.2.5.2 Procentuální zastoupení calretinin imunoreaktivních neuronů

Výše zmíněný výrazný pokles CR+ neuronální denzity podél ventro-dorsální osy studovaného regionu byl zachován i při procentuálním vyjádření poměru CR+ neuronů k celkové neuronální populaci. CR+ neurony tvořily 6,4 % v arei 35, 5,5 % v arei 36 a 3,6 % z celkové neuronální populace v arei Te3V. Rozdíl mezi oblastmi 35 a Te3V byl statisticky významný ($p < 0,05$), (tab.4).

4.2.5.3 Procentuální zastoupení parvalbumin imunoreaktivních neuronů

Na rozdíl od CR+ neuronů jsme zaznamenali jenom nesignifikantní rozdíly v procentuálním zastoupení PV+ neuronů mezi jednotlivými studovanými oblastmi (tab. 4).

5. DISKUZE

5.1 Calretinin imunoreaktivní inhibiční interneurony ve fokálních kortikálních dyspláziích a v nemalformovaném temporálním neokortexu u pacientů s farmakorezistentní epilepsií

Přesná úloha cytoplazmatického kalcium-vážícího proteinu calretininu v neuronech centrálního nervového systému nebyla dosud objasněna, na základě výsledků řady autorů je ale možné předpokládat jeho neuroprotektivní roli proti cytotoxickému efektu excesivně zvýšené nebo snížené koncentrace volných kalciových iontů v cytozolu a účast na přesunech kalciových iontů mezi jednotlivými kompartmenty neuronu (D'Orlando et al., 2002; D'Orlando et al., 2001; Lukas a Jones, 1994; Turner et al., 2007). Calretinin-imunoreaktivní neurony v lidském neokortexu představují zvláštní skupinu GABAergních inhibičních neuronů, která vykazuje jenom minimální překryv se skupinou calbindin-imunoreaktivních neuronů a žádné překrytí se skupinou inhibičních neuronů exprimujících parvalbumin. Calretinin exprimující interneurony se od PV+ neuronů liší v mnoha aspektech – morfologicky (převážně fusiformní s vertikálně orientovanými dendrity), v konektivitě (na rozdíl od PV+ neuronů, které často tvoří axo-somatické a axo-axonální spoje, vytváří CR+ neurony především spojení s dendrity cílových neuronů, viz níže) a minimálně u hlodavců i místem vzniku (CR+ neurony jsou generovány a migrují do vyvíjejícího se kortexu převážně z kaudální gangliové eminence zatímco PV+ neurony z mediální gangliové eminence). Detailní charakteristika CR+ neuronů je uvedena v naší přehledové práci (Barinka a Druga, 2010) a v přehledných člancích jiných autorů (DeFelipe, 1997; Markram et al., 2004; Wonders a Anderson, 2006).

CR+ neurony jsou značně heterogenní co se týče konektivity, ale jejich značná část tvoří axo-dendritické synaptické kontakty (del Rio a DeFelipe, 1997; Melchitzky et al., 2005; Meskenaite, 1997). Přestože byly ve spojitosti s epileptogenezí většinou diskutovány poruchy somatické inhibice, situace je mnohem komplexnější a ukazuje se, že porucha dendritické inhibice hraje rovněž významnou úlohu (Cossart et al., 2001). Důležitost dalšího studia CR+ interneuronů dále podtrhuje skutečnost, že v neokortexu u potkana jsou CR+ neurony mnohem méně početné (absolutně, ale i relativně ve srovnání s PV+ a CB+ interneuronálními populacemi) než v lidském neokortexu (Gabbott et al., 1997a; Gabbott

et al., 1997b). Jejich podstatně rozdílné zastoupení v neokortexu rodentů a primátů proto může vést k chybným interpretacím při přenášení výsledků získaných studiem experimentálních modelů do konceptů lidské epileptogeneze.

U různých patologických stavů, resp. nemocí byl nalezen pokles počtu PV+ interneuronů nebo pokles PV mRNA v těchto neuronech mozkové kůry, zároveň se ale ukázalo, že CR+ neurony ani CR exprese nebyly změněny oproti normě. Toto bylo prokázáno u schizofrenie (Hashimoto et al., 2003; Lewis et al., 2005) a roztroušené sklerózy (Clements et al., 2008). U Alzheimerovy nemoci se PV ani CR imunoreaktivita v kortexu v porovnání s kontrolami nemění (Hof et al., 1991; Hof et al., 1993), byl ale prokázán úbytek interneuronů exprimujících calbindin (Ichimiya et al., 1988). Také u pacientů se symptomatickou epilepsií asociovanou s gangliogliomem byl v kortexu v okolí tumoru prokázán pokles počtu PV+ a CB+ interneuronů ale normální počet CR+ interneuronů (Aronica et al., 2007). V naší práci jsme chtěli zodpovědět otázku, zda je takovou „rezistencí“ CR+ neuronů možné najít i u pacientů s TLE s HS a obzvláště v malformovaném kortexu pacientů s FCD.

Před porovnáním CR+ neuronální denzity v patologických vzorcích jsme analyzovali kontrolní materiál získaný z různých laloků lidského mozku (frontální, parietální, okcipitální a temporální). Zjistili jsme, že denzita CR+ neuronů v neokortexu frontálního laloku byla signifikantně nižší než v ostatních lalocích. Tento výsledek je v souladu s dřívějším nálezem (Hof et al., 1993), kde byl popsán podobný, statisticky významný rozdíl v denzitě CR+ neuronů mezi frontálním a temporálním asociačním kortexem. Obecně je možno říct, že naše pozorování v kontrolním neokortexu jsou ve shodě se studii jiných autorů popisujících CR imunoreaktivitu v normálním lidském temporálním (del Rio a DeFelipe, 1996; Fonseca a Soriano, 1995; Hof et al., 1993), frontálním (Gabbott et al., 1997b; Hof et al., 1993) a okcipitálním neokortexu (Glezer et al., 1992).

V cytoarchitektonicky normálním temporálním neokortexu u pacientů s HS-TLE byl již dříve prokázán pokles denzity PV+ neuronů ve srovnání s normálním neokortexem (Zámečník et al., 2006). My jsme v předkládané práci prokázali odlišnou situaci v případě CR+ neuronů. Jejich celková denzita, distribuce, morfologie a intenzita imunoreaktivity se nelišily od situace v kontrolním neokortexu. Vyšetřovaná oblast (temporální pól a sousední okrsky gyrus temporalis superior, medius a inferior) se přímo podílí na šíření, a v některých případech i na iniciaci záchvatů u TLE (Chabardès et al., 2005). V této oblasti

morfologicky normálního neokortexu se tedy CR+ neurony, na rozdíl od PV+ neuronů, zdají být rezistentní vůči probíhajícím patologickým procesům.

Na druhé straně jsme prokázali změny v denzitě CR+ neuronů u fokálních kortikálních dysplázií. Mírný pokles CR+ neuronální denzity ve vzorcích FCD typu I dosahoval 70 % kontrolních hodnot. U FCD typu II ve frontálním i temporálním laloku jsme zaznamenali výrazný pokles denzity na úroveň přibližně 50 až 55 % hodnot naměřených v kontrolním kortexu stejné lokalizace. Je tedy zřejmé, že populace CR+ neuronů je postižena patologickými procesy způsobujícími vznik fokální kortikální dysplázie nebo probíhající epileptickou aktivitou. Toto postižení je ale pravděpodobně méně výrazné než u populace PV+ interneuronů: pokles denzity PV+ neuronů v jednotlivých typech FCD (Zámečník et al., 2006) je výraznější, než námi zjištěný pokles denzity CR+ neuronů (graf 2). Úbytek CR+ neuronů je dále do jisté míry relativizován mírným poklesem celkové neuronální denzity ve fokálních kortikálních dyspláziích, popsáným ve studii (Thom et al., 2005). Kvantitativní poměr CR+ interneuronů k počtu principálních glutamatergických neuronů je tedy méně alterován, než by napovídala samotná snížená denzita CR+ interneuronální populace.

Na rozdíl od denzity CR+ neuronů nebyla jejich morfologie a jejich distribuce v korových vrstvách v žádném ze dvou typů FCD změněna oproti fyziologické situaci v kontrolním kortexu. Podobně jako (André et al., 2007) jsme nepozorovali žádné CR+ imunoreaktivní dysmorfnní neurony ani balónovité buňky. Ve zmíněné publikaci autoři popsali přítomnost dysmorfnních neuronů a balónovitých buněk exprimujících PV a CB, ale ne CR.

Je tedy možné uzavřít, že CR+ interneurony přes (do jisté míry relativní) kvantitativní pokles ve fokálních kortikálních dyspláziích jsou pravděpodobně rezistentnější vůči přítomným patologickým procesům než PV+ interneuronální populace. Příčina této jejich odolnosti, popisované i u jiných patologických procesů, je zatím neznáma. Poznání tohoto mechanismu by mohlo mít v budoucnu velký význam při vývoji neuroprotektivních substancí u epilepsie i jiných onemocnění.

Nerovnováha mezi excitací a inhibicí v kortexu byla opakovaně označena jako jedna z příčin rozvoje a šíření epileptické aktivity. Většina dnes používaných antikonvulziv působí na principu potlačení této nerovnováhy (podporou intrinsické inhibiční aktivity nebo potlačením excitace). Výsledky naší i dalších prací ukazují, že jedním z patogenetických mechanismů u epilepsie je funkční nerovnováha mezi jednotlivými inhibičními interneuronálními populacemi. Další výzkum v této oblasti je proto důležitý

pro umožnění budoucího vývoje farmak, která by místo „paušálního“ posílení inhibice v kortexu selektivně ovlivňovala jednotlivé populace inhibičních interneuronů a jednotlivé inhibiční mechanizmy. Základním předpokladem je proto získání přesného popisu inhibičních interneuronálních populací v relevantních oblastech (což bylo cílem druhé části našeho projektu popisující inhibiční interneurony v perirhinálním kortexu) a pochopení funkčních vztahů mezi těmito populacemi.

Nezodpovězenou otázkou zůstává, zda pozorovaný pokles denzity CR+ neuronů koresponduje se skutečným úbytkem CR+ neuronů, nebo jestli se jedná „jen“ o ztrátu exprese calretininu v těchto neuronech. Tato nejistota je častá v podobných imunohistochemických studiích (Garbelli et al., 2006). Na základě výsledků jiných autorů (Gall et al., 2003; Schwaller et al., 2004) je ale možné předpokládat, že i ztráta exprese CR event. exprese dalších kalcium vázících proteinů může vést k poruše funkce postižených neuronů a tím k dysfunkci celého systému korových inhibičních interneuronů.

5.1.1 Nová ILAE klasifikace fokálních kortikálních dysplázií

V roce 2011 byl skupinou expertů ILAE na základě zkušeností s používáním Palminího klasifikace FCD podán návrh na upravenou, novou klasifikaci fokálních kortikálních dysplázií (Blümcke a Spreafico, 2011; Blümcke et al., 2011). Důvody podmiňující nutnost nové klasifikace jsou podle jejich autorů zejména následující:

- a) Nízká interpersonální a intrapersonální reproducibilita diagnózy FCD typu I (Chamberlain et al., 2009).
- b) FCD typu I je heterogenní skupinou onemocnění s rozdílnou prognózou i klinickým průběhem (Blümcke et al., 2009; Lerner et al., 2009).
- c) Skupinu FCD typu I lze rozdělit na tzv. izolovanou FCD (bez nálezu jiné patologie mozku) a na tzv. asociovanou FCD (s přítomností jiné závažné patologické léze CNS). Mezi těmito dvěma skupinami byly prokázány signifikantní rozdíly v začátku záchvatů a jejich frekvenci (Tassi et al., 2010), ale jenom minimální rozdíly v elektrofyziologických nálezech a prognóze (Marusič et al., 2007).

Skupina FCD typu I tak byla rozdělena na podskupiny IA až IC – podle nové klasifikace se jedná výlučně o izolované léze. Nově byla zavedena skupina FCD typu III (A až D) – léze histologicky odpovídající FCD typu I podle Palminího klasifikace, ale asociované s jinou patologickou entitou zasahující mozkovou kůru. Skupina FCD typu II zůstala beze změn zachována. Porovnání Palminího klasifikace s novou klasifikací a souhrn znaků

podstatných pro zařazení FCD do jednotlivých skupin je uveden v tabulce 5. Přes probíhající diskuzi nedořešených a sporných otázek v souvislosti s novou ILAE klasifikací (Zámečník, 2012) se tato klasifikace zdá být (alespoň co do inter- a intrapersonální reproducibility diagnózy) přínosná (Coras et al, 2012).

Naše analýza interneuronů exprimujících CR ve fokálních kortikálních dyspláziích byla prováděna v době před zveřejněním návrhu nové klasifikace. Při zpětném překlasifikování námi hodnocených patologických FCD vzorků podle nové ILAE klasifikace je zřejmé, že převážná většina vzorků FCD typu I (podle námi použité Palminiho klasifikace) použitých v naší práci (vzorky od sedmi pacientů, pacienti 8 až 14, tab. 1.) by byla zařazena do skupiny FCD IIIA - asociovaných s hipokampální sklerózou. Jenom vzorky od dvou pacientů (pacienti 15 a 20, tab. 1.) by byly klasifikovány jako vzorky FCD typu IA. Výrazný nepoměr mezi počtem námi hodnocených případů spadajících do těchto dvou, podle nové klasifikace rozdílných skupin, jako i celkově nízký počet vzorků druhé z těchto skupin (FCD IA podle nové klasifikace), neumožnily reprezentativní porovnání údajů mezi těmito typy FCD. Zároveň se ale zřetelně ukazuje jeden ze zásadních nedostatků nově navrhovaného dělení FCD: U našich pacientů č. 15 a 20 (viz tabulka 1) se podle nové klasifikace jedná o FCD typ IA, ale vzhledem k tomu, že se jednalo o limitovanou kortikální resekci, není možné vyloučit asociovanou hipokampální sklerózu. Tato je sice v dnešní době s poměrně vysokou spolehlivostí rozlišitelná na vyšetření magnetickou rezonancí, přesto není docela možné vyloučit její přítomnost, případně její teprve pozdější rozvoj.

5.2 Calretinin, parvalbumin a calbindin imunoreaktivní neurony v perirhinálním kortexu a v temporální asociační oblasti Te3V u potkana

Inhibice v mozkové kůře je zprostředkována heterogenní skupinou GABAergních inhibičních interneuronů. Expresí kalcium-vážících proteinů calretininu, parvalbuminu a calbindinu v těchto buňkách se ukázala být užitečným parametrem pro rozdělení skupiny GABAergních neuronů do tří populací, které se od sebe liší v morfologických i funkčních vlastnostech (DeFelipe, 1997). V předkládané práci jsme použili imunohistochemického barvení na průkaz calretininu, parvalbuminu a calbindinu pro studium distribuce a denzity individuálních interneuronálních populací v perirhinálním kortexu.

Perirhinální kůra je tvořena dvěma samostatnými oblastmi, areou 35 a areou 36 podle Brodmanna. Hranice se sousedními oblastmi, cytoarchitektonické vlastnosti a konektivita PRC byly již podrobně popsány (Agster a Burwell, 2009; Burwell, 2001; Burwell a Amaral, 1998a; Burwell a Amaral, 1998b). Imunohistochemie na průkaz CaBP ukázala velmi specifické charakteristiky imunoreaktivity neuropilu v PRC s vysokou intenzitou CR barvení a velmi nízkou intenzitou PV barvení. Tento vzor byl nejvýraznější v arei 35 a jasně ohraničoval PRC od přilehlých neokortikálních oblastí s nižší CR a vyšší PV imunopositivitou neuropilu. Imunohistochemické barvení na průkaz CB bylo v PRC velmi podobné jako v sousedním neokortexu. Denzitometrická analýza CR, PV a CB imunoreaktivity neuropilu potvrdila kvalitativní výsledky, kde korigovaná relativní optická denzita v arei 35 na řezech barvených na průkaz CR byla signifikantně vyšší v porovnání s oblastí Te3V. Naopak cROD v arei 35 na PV+ řezech byla nižší než v arei 36 a zejména v oblasti Te3V, i když rozdíl nedosahoval statistické významnosti.

Vzhledem k často nedostatečné imunoreaktivitě neuronálních výběžků v řezech barvených na průkaz CaBP bylo možné provést jen hrubou morfologickou analýzu barvených interneuronů. Základní morfologické vlastnosti CR+, PV+ a CB+ interneuronů v PRC byly velmi podobné analogickým neuronům v neokortikálních oblastech. Vertikálně orientované bipolární a „bitufted“ neurony byly nejčastěji nacházenými typy na CR+ řezech v PRC i v neokortikální oblasti Te3V. U PV+ neuronů ve všech vyšetřovaných oblastech jasně převažovaly multipolární buňky. V případě CB+ neuronů byly přibližně stejným dílem zastoupeny vertikálně orientované bipolární neurony a multipolární neurony. U všech tří barvení a ve všech studovaných oblastech byly nejméně početným morfologickým typem bipolární, horizontálně orientované neurony.

Dále jsme studovali numerickou denzitu CR+ a PV+ interneuronů v areách 35 a 36 mesokortikálního perirhinálního kortexu a v sousední neokortikální arei Te3V. Zatímco v denzitě PV+ neuronů nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl mezi třemi studovanými areami, denzita CR+ neuronů byla v PRC výrazně a statisticky významně vyšší než v neokortikální Te3V. V arei 35 byla denzita CR+ neuronů dokonce přibližně dvakrát vyšší oproti Te3V. Absolutní interneuronální denzita vyjádřena jako počet neuronů na mm³ by ale mohla být zavádějícím parametrem při porovnání dvou nebo více korových oblastí. Pravděpodobně důležitějším údajem je relativní interneuronální denzita, neboli kvantitativní poměr jednotlivých interneuronálních populací k celkové populaci všech neuronů dané oblasti. To je možné vyjádřit jako procentuální podíl jednotlivých interneuronálních tříd vůči celkovému množství neuronů v oblasti. Pro získání těchto

hodnot bylo nutné změřit celkovou neuronální denzitu v každé ze tří studovaných areí. Podobně jako interneuronální denzita, i celková neuronální denzita se ukázala být v perirhinálním kortexu vyšší (v arei 35 statisticky významně vyšší) než v arei Te3V. Denzitu CR+ a PV+ interneuronů v jednotlivých areách jsme následně vyjádřili jako procentuální podíly z celkové neuronální denzity. Signifikantní rozdíl v denzitě CR+ neuronů mezi areami 35 a Te3V zůstal zachován i u jejich procentuálního podílu z celkového počtu všech neuronů, kdy CR+ neurony tvořili 6,4 % z celkové neuronální populace ve vrstvách II-VI v arei 35 ale jenom 3,6 % v arei Te3V. Výsledky naší práce ukazují, že perirhinální kortex a obzvláště area 35 má výrazně odlišnou interneuronální výbavu než sousední neokortex, s vyšším podílem CR+ neuronů, bohatším dendritickým (a eventuelně i axonálním) větvením CR+ neuronů a méně bohatou arborizací PV+ neuronů než area Te3V.

5.2.1 Funkční význam

V perirhinálním kortexu byl popsán masivní inhibiční systém s vrátkovým mechanismem selektivně ovlivňujícím přenos impulzů mezi neokortexem a hipokampální formací (de Curtis a Pare, 2004; Pinto et al., 2006). V souladu s tímto konceptem byl v PRC nalezen výjimečně vysoký podíl ne-pyramidových neuronů (přibližně 50 %) a značná morfologická a funkční rozmanitost těchto buněk (Faulkner a Brown, 1999; Furtak et al., 2007). Tato bohatá interneuronální výbava by mohla být vlastním substrátem předpokládané inhibiční bariéry mezi neokortexem a hipokampem („wall of the inhibition between the neocortex and the hippocampus“)(de Curtis a Pare, 2004). CR+ interneurony v různých korových oblastech inervují ostatní inhibiční interneuronální populace, čímž nakonec desinhibují pyramidové glutamatergní projekční neurony (Barinka a Druga, 2010; Gonchar a Burkhalter, 2003; Meskenaite, 1997). Na základě těchto pozorování v neokortexu byla postulována hypotéza „vrátkových buněk“ – CR+ interneuronů, které jsou schopné přepínat tok informací mezi dvěma dráhami inhibováním jedné z nich a desinhibicí druhé (Callaway, 2004). Na základě našich výsledků se můžeme domnívat, že bohaté zastoupení CR+ interneuronů v PRC představuje speciální adaptaci neuronální výbavy, která může být podkladem popsaného vrátkového mechanismu v PRC. Pro studium této hypotézy je nutný další výzkum kombinující elektrofyziologický a ultrastrukturální přístup.

Kvantitativní a morfologické alterace CaBP imunoreaktivních neuronů v různých korových oblastech byly zdokumentovány u rozličných neuropatologických stavů včetně

Alzheimerovy nemoci, schizofrenie a epilepsie – viz náš přehledový článek (Barinka a Druga, 2010). Selektivní úbytek CB+ neuronů v PRC u stárnoucích potkanů, který by mohl přispívat k paměťovým deficitům ve stáří, byl popsán v recentní studii (Moyer et al., 2011). Kvůli odlišné metodice nemohou být bohužel kvantitativní výsledky přímo porovnány s našimi. Perirhinální kortex je jedním z korových regionů přímo se podílejících na iniciaci a šíření epileptické aktivity. Signifikantní úbytek PV+ interneuronů byl nalezen v PRC u pilokarpinového modelu epilepsie u potkana (Benini et al., 2011). Náš detailní popis CaBP imunoreaktivity a stereologicky změřená celková neuronální denzita a interneuronální denzita tvoří důležitý předpoklad a základ pro další výzkum možných alterací CaBP imunoreaktivních neuronů v PRC a jejich podílu na etiopatogenezi epilepsie a jiných patologických stavů.

6. ZÁVĚRY

V obou částech mé práce jsem se věnoval studiu inhibičních interneuronů v neokortexu a mesokortexu s cílem přispět k objasnění jejich podílu na etiopatogenezi epilepsie a šíření epileptické aktivity. Z mých studií vplynuly tyto závěry:

6.1 Calretinin imunoreaktivní inhibiční interneurony ve fokálních kortikálních dyspláziích a v nemalformovaném temporálním neokortexu u pacientů s farmakorezistentní epilepsií

1. a) Ve fokálních kortikálních dyspláziích pacientů s farmakorezistentní epilepsií dochází k úbytku calretinin imunoreaktivních interneuronů v malformovaném kortexu, kdy tento úbytek je mírnější v FCD typu I a výraznější v FCD typu II.
b) U nHSTN vzorků nebyl zaznamenán žádný úbytek CR imunoreaktivních neuronů.
2. V porovnání s dříve popsáním úbytkem PV+ neuronů je úbytek CR+ neuronů v obou typech FCD méně výrazný. U nHSTN je rozdíl ještě výraznější: denzita PV+ neuronů byla na rozdíl od CR+ neuronů signifikantně snížena.
3. CR+ neurony se zdají být rezistentnější vůči patologickým vlivům u epilepsie spojené s FCD. Na vzniku a šíření epileptické aktivity (jak u fokálních kortikálních dysplázií, tak i u epilepsie spojené s hipokampální sklerózou) má pravděpodobně podíl nejenom nerovnováha mezi excitací a inhibicí, ale i funkční dysbalance mezi různými populacemi inhibičních interneuronů.

6.2 Calretinin, parvalbumin a calbindin imunoreaktivní inhibiční interneurony v perirhinálním kortexu a temporální korové oblasti Te3V u potkana

1. Podrobná analýza interneuronální výbavy v perirhinálním kortexu ukázala:
a) CR+, PV+ a CB+ neurony se somatodendritickou morfologií neliší od neuronů v neokortikální oblasti Te3V a v jiných neokortikálních polích.

b) PRC disponuje atypicky vysokým podílem CR+ inhibičních interneuronů (myšleno vzhledem k ostatním interneuronálním populacím i vzhledem k celkovému počtu všech neuronů dané oblasti) a nižším podílem PV+ interneuronů v porovnání s Te3V a s jinými neokortikálními oblastmi. V souladu s tím byla i optická denzita neuropilu u řezů barvených na průkaz calretininu v arei 35 signifikantně vyšší než v arei Te3V.

2. Interneuronální výbava perirhinální kůry se v souladu s naší hypotézou o jejím přímém podílu na popsané masivní inhibiční funkci této oblasti výrazně liší od výbavy známých neokortikálních oblastí. Na základě našich výsledků je možné vyslovit předpoklad, že bohatě zastoupené CR+ interneurony by mohly být vlastním substrátem dříve popsaného vrátkového mechanismu v PRC (Diskuze, kap. 5.2.1.)

Tyto nové poznatky jsou důležité nejen pro hlubší pochopení patogeneze epilepsie, ale mohou být do budoucna významné i pro vývoj nové farmakoterapie, které by mohla efektivněji potlačit epileptogenezu a šíření epileptické aktivity u pacientů s temporální epilepsií.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 1981; 22(4): 489-501.
- Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 1989; 30(4): 389-99.
- Agster KL, Burwell RD. Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Hippocampus* 2009; 19 (12): 1159-86.
- André VM, Wu N, Yamazaki I, Nguyen ST, Fisher RS, Vinters HV, Mathern GW, Levine MS, Cepeda C. Cytomegalic interneurons: a new abnormal cell type in severe pediatric cortical dysplasia. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66(6): 491-504.
- Apergis-Schoute J, Pinto A, Pare D. Muscarinic control of long-range GABAergic inhibition within the rhinal cortices. *J Neurosci* 2007; 27(15): 4061-71.
- Aronica E, Redeker S, Boer K, Spliet WG, van Rijen PC, Gorter JA, Troost D. Inhibitory networks in epilepsy-associated gangliogliomas and in the perilesional epileptic cortex. *Epilepsy Res* 2007; 74(1): 33-44.
- Avoli M, D'Antuono M, Louvel J, Kohling R, Biagini G, Pumain R, D'Arcangelo G, Tancredi V. Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Prog Neurobiol* 2002; 68(3): 167-207.
- Barinka F, Druga R. Calretinin expression in the mammalian neocortex: a review. *Physiol Res* 2010; 59(5): 665-77.
- Barinka F, Salaj M, Rybář J, Krajčovičová E, Kubová H, Druga R. Calretinin, parvalbumin and calbindin immunoreactive interneurons in perirhinal cortex and temporal area te3V of the rat brain: qualitative and quantitative analysis. *Brain Research* 2012; 1436: 68-80.
- Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Dobyns WB, Jackson GD, Becker LE, Evrard P. A classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics* 1996; 27(2): 59-63.
- Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. Classification system for malformations of cortical development: update 2001. *Neurology* 2001; 57(12): 2168-78.

- Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology* 2005; 65(12): 1873-87.
- Bartolomei F, Khalil M, Wendling F, Sontheimer A, Regis J, Ranjeva JP, Guye M, Chauvel P. Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. *Epilepsia* 2005; 46(5): 677-87.
- Belichenko PV, Vogt Weisenhorn DM, Myklossy J, Celio MR. Calretinin-positive Cajal-Retzius cells persist in the adult human neocortex. *Neuroreport* 1995; 6(14): 1869-74.
- Benes FM, Berretta S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25(1): 1-27.
- Benini R, Longo D, Biagini G, Avoli M. Perirhinal cortex hyperexcitability in pilocarpine-treated epileptic rats. *Hippocampus* 2011; 21(7): 702-13.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010; 51(4):676-85.
- Bernasconi N, Bernasconi A, Caramanos Z, Antel SB, Andermann F, Arnold DL. Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: a volumetric MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region. *Brain* 2003; 126(2): 462-9.
- Billing-Marczak K, Kuznicki J. Calretinin--sensor or buffer--function still unclear. *Pol J Pharmacol* 1999; 51(2): 173-8.
- Blümcke I, Spreafico R. An international consensus classification for focal cortical dysplasias. *Lancet Neurol* 2011; 10(1): 26-7.
- Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Vinters HV, Palmini A, Jacques TS, Avanzini G, Barkovich AJ, Battaglia G, Becker A, Cepeda C, Cendes F, Colombo N, Crino P, Cross JH, Delalande O, Dubeau F, Duncan J, Guerrini R, Kahane P, Mathern G, Najm I, Ozkara C, Raybaud C, Represa A, Roper SN, Salamon N, Schulze-Bonhage A, Tassi L, Vezzani A, Spreafico R. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia* 2011; 52(1): 158-74.
- Blümcke I, Vinters HV, Armstrong D, Aronica E, Thom M, Spreafico R. Malformations of cortical development and epilepsies: neuropathological findings with emphasis on focal cortical dysplasia. *Epileptic Disord* 2009; 11(3): 181-93.

- Bratz E. Ammonshornbefunde bei epileptikern. Arch Psychiatr Nervenkr 1899; 32: 820-835.
- Briellmann RS, Syngienotis A, Fleming S, Kalnins RM, Abbott DF, Jackson GD. Increased anterior temporal lobe T2 times in cases of hippocampal sclerosis: a multi-echo T2 relaxometry study at 3 T. AJNR Am J Neuroradiol 2004; 25(3): 389-94.
- Brodmann K. Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. Leipzig: Barth, 1909.
- Burwell RD. Borders and cytoarchitecture of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. J Comp Neurol 2001; 437(1): 17-41.
- Burwell RD, Amaral DG. Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. J Comp Neurol 1998a; 398(2): 179-205.
- Burwell RD, Amaral DG. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. J Comp Neurol 1998b; 391(3): 293-321.
- Burwell RD, Witter MP, Amaral DG. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. Hippocampus 1995; 5(5): 390-408.
- Buzsáki G, Draguhn A. Neuronal oscillations in cortical networks. Science 2004; 304(5679): 1926-9.
- Buzsáki G, Chrobak JJ. Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. Curr Opin Neurobiol 1995; 5(4): 504-10.
- Callaway EM. Feedforward, feedback and inhibitory connections in primate visual cortex. Neural Netw 2004; 17(5-6): 625-32.
- Cepeda C, André VM, Levine MS, Salamon N, Miyata H, Vinters HV, Mathern GW. Epileptogenesis in pediatric cortical dysplasia: the dysmature cerebral developmental hypothesis. Epilepsy Behav 2006; 9(2): 219-35.
- Cepeda C, André VM, Vinters HV, Levine MS, Mathern GW. Are cytomegalic neurons and balloon cells generators of epileptic activity in pediatric cortical dysplasia? Epilepsia 2005; 46 Suppl 5: 82-8.
- Cepeda C, André VM, Wu N, Yamazaki I, Uzgil B, Vinters HV, Levine MS, Mathern GW. Immature neurons and GABA networks may contribute to epileptogenesis in pediatric cortical dysplasia. Epilepsia 2007; 48 Suppl 5: 79-85.
- Cepeda C, Hurst RS, Flores-Hernandez J, Hernandez-Echeagaray E, Klapstein GJ, Boylan MK, Calvert CR, Jocoy EL, Nguyen OK, André VM, Vinters HV, Ariano MA, Levine

- MS, Mathern GW. Morphological and electrophysiological characterization of abnormal cell types in pediatric cortical dysplasia. *J Neurosci Res* 2003; 72(4): 472-86.
- Clements RJ, McDonough J, Freeman EJ. Distribution of parvalbumin and calretinin immunoreactive interneurons in motor cortex from multiple sclerosis post-mortem tissue. *Exp Brain Res* 2008; 187(3): 459-65.
- Coras R, de Boer OJ, Armstrong D, Becker A, Jacques TS, Miyata H, Thom M, Vinters HV, Spreafico R, Oz B, Marucci G, Pimentel J, Mühlebner A, Zámečník J, Buccoliero AM, Rogerio F, Streichenberger N, Arai N, Bugiani M, Vogelgesang S, Macaulay R, Salon C, Hans V, Polivka M, Giangaspero F, Fauziah D, Kim JH, Liu L, Dandan W, Gao J, Lindeboom B, Blümcke I, Aronica E. Good interobserver and intraobserver agreement in the evaluation of the new ILAE classification of focal cortical dysplasias. *Epilepsia*. 2012; 53(8):1341-8.
- Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchan-Perez A, De Felipe J, Ben-Ari Y, Esclapez M, Bernard C. Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci* 2001; 4(1): 52-62.
- Coste S, Ryvlin P, Hermier M, Ostrowsky K, Adeleine P, Froment JC, Mauguière F. Temporopolar changes in temporal lobe epilepsy: a quantitative MRI-based study. *Neurology* 2002; 59(6): 855-61.
- Dbalý V. Temporální epilepsie. In: Dbalý V. *Epileptochirurgie dospělých*. Praha: Grada, 2004. 90-112.
- D'Orlando C, Celio MR, Schwaller B. Calretinin and calbindin D-28k, but not parvalbumin protect against glutamate-induced delayed excitotoxicity in transfected N18-RE 105 neuroblastoma-retina hybrid cells. *Brain Res* 2002; 945(2): 181-90.
- D'Orlando C, Fellay B, Schwaller B, Salicio V, Bloc A, Gotzos V, Celio MR. Calretinin and calbindin D-28k delay the onset of cell death after excitotoxic stimulation in transfected P19 cells. *Brain Res* 2001; 909(1-2): 145-58.
- de Curtis M, Pare D. The rhinal cortices: a wall of inhibition between the neocortex and the hippocampus. *Prog Neurobiol* 2004; 74(2): 101-10.
- de Guzman P, D'Antuono M, Avoli M. Initiation of electrographic seizures by neuronal networks in entorhinal and perirhinal cortices in vitro. *Neuroscience* 2004; 123(4): 875-86.
- DeFelipe J. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* 1997; 14(1): 1-19.

- DeFelipe J. Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res* 2002; 136: 215-38.
- del Rio MR, DeFelipe J. Colocalization of calbindin D-28k, calretinin, and GABA immunoreactivities in neurons of the human temporal cortex. *J Comp Neurol* 1996; 369(3): 472-82.
- del Rio MR, DeFelipe J. Synaptic connections of calretinin-immunoreactive neurons in the human neocortex. *J Neurosci* 1997; 17(13): 5143-54.
- Demeulemeester H, Vandesande F, Orban GA, Heizmann CW, Pochet R. Calbindin D-28K and parvalbumin immunoreactivity is confined to two separate neuronal subpopulations in the cat visual cortex, whereas partial coexistence is shown in the dorsal lateral geniculate nucleus. *Neurosci Lett* 1989; 99(1-2): 6-11.
- Druga R. Neocortical inhibitory system. *Folia Biol. (Praha)* 2009; 55: 201 – 217.
- Engel J, Jr. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 2001; 42(6): 796-803.
- Engel J, Jr. Report of the ILAE classification core group. *Epilepsia* 2006; 47(9): 1558-68.
- Engel J, Jr., Pedley TA. Introduction: What is epilepsy? In: Engel J, Pedley TA. Eds. *Epilepsy : a comprehensive textbook*. Philadelphia ; London: Walters Kluwer/Lippincott-Williams & Wilkins, 2008. 1-7.
- Engel J, Jr., Williamson PD. Limbic seizures. In: Engel J, Pedley TA. Eds. *Epilepsy : a comprehensive textbook*. Philadelphia ; London: Walters Kluwer/Lippincott-Williams & Wilkins, 2008. 541-552.
- Engel J, Jr., Williamson PD, Wiesner HG. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. In: Engel J, Pedley TA. Eds. *Epilepsy : a comprehensive textbook*. Philadelphia ; London: Walters Kluwer/Lippincott-Williams & Wilkins, 2008. 2479-2486.
- Falconer MA, Serafetinides EA, Corsellis JA. Etiology and Pathogenesis of Temporal Lobe Epilepsy. *Arch Neurol* 1964; 10: 233-48.
- Faulkner B, Brown TH. Morphology and physiology of neurons in the rat perirhinal-lateral amygdala area. *J Comp Neurol* 1999; 411(4): 613-42.
- Ferrer I, Oliver B, Russi A, Casas R, Rivera R. Parvalbumin and calbindin-D28k immunocytochemistry in human neocortical epileptic foci. *J Neurol Sci* 1994; 123(1-2): 18-25.
- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against

- Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005; 46(4): 470-2.
- Fonseca M, Soriano E. Calretinin-immunoreactive neurons in the normal human temporal cortex and in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1995; 691(1-2): 83-91.
- Freund TF. Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci* 2003; 26(9): 489-95.
- Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 1996; 6(4): 347-470.
- Fukumoto S, Tanaka S, Tojo H, Akaike K, Takigawa M. Perirhinal cortical lesion suppresses the secondary generalization in kainic acid-induced limbic seizure. *Psychiatry Clin Neurosci* 2002; 56(5): 561-7.
- Furtak SC, Moyer JR, Jr., Brown TH. Morphology and ontogeny of rat perirhinal cortical neurons. *J Comp Neurol* 2007; 505(5): 493-510.
- Gabbott PL, Dickie BG, Vaid RR, Headlam AJ, Bacon SJ. Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. *J Comp Neurol* 1997a; 377(4): 465-99.
- Gabbott PL, Jays PR, Bacon SJ. Calretinin neurons in human medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 32', and 25). *J Comp Neurol* 1997b; 381(4): 389-410.
- Gall D, Roussel C, Susa I, D'Angelo E, Rossi P, Bearzatto B, Galas MC, Blum D, Schurmans S, Schiffmann SN. Altered neuronal excitability in cerebellar granule cells of mice lacking calretinin. *J Neurosci* 2003; 23(28): 9320-7.
- Garbelli R, Meroni A, Magnaghi G, Beolchi MS, Ferrario A, Tassi L, Bramerio M, Spreafico R. Architectural (Type IA) focal cortical dysplasia and parvalbumin immunostaining in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2006; 47(6): 1074-8.
- Garbelli R, Munari C, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L, Galli C, Bramerio M, Mai R, Battaglia G, Spreafico R. Taylor's cortical dysplasia: a confocal and ultrastructural immunohistochemical study. *Brain Pathol* 1999; 9(3): 445-61.
- Gibbs FA, Gibbs EL, Lennox WG. Epilepsy: a paroxysmal cerebral dysrhythmia. *Epilepsy Behav* 2002; 3(4): 395-401.
- Gieson I, van. A case of psychomotor epilepsy. In: Semicentennial volume of the American Neurological Association (1924-1975). New York: Boyd, 1924. 345.
- Glezer, II, Hof PR, Morgane PJ. Calretinin-immunoreactive neurons in the primary visual cortex of dolphin and human brains. *Brain Res* 1992; 595(2): 181-8.

- Gonchar Y, Burkhalter A. Distinct GABAergic targets of feedforward and feedback connections between lower and higher areas of rat visual cortex. *J Neurosci* 2003; 23(34): 10904-12.
- Gonzalez-Albo MC, Elston GN, DeFelipe J. The human temporal cortex: characterization of neurons expressing nitric oxide synthase, neuropeptides and calcium-binding proteins, and their glutamate receptor subunit profiles. *Cereb Cortex* 2001; 11(12): 1170-81.
- Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147(Pt 3): 229-63.
- Gupta A, Wang Y, Markram H. Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* 2000; 287(5451): 273-8.
- Hashimoto T, Volk DW, Eggan SM, Mirnics K, Pierri JN, Sun Z, Sampson AR, Lewis DA. Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J Neurosci* 2003; 23(15): 6315-26.
- Hof PR, Cox K, Young WG, Celio MR, Rogers J, Morrison JH. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the neocortex are resistant to degeneration in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991; 50(4): 451-62.
- Hof PR, Nimchinsky EA, Celio MR, Bouras C, Morrison JH. Calretinin-immunoreactive neocortical interneurons are unaffected in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1993; 152(1-2): 145-8.
- Houser CR. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 1990; 535(2): 195-204.
- Chabardès S, Kahane P, Minotti L, Hoffmann D, Benabid AL. Anatomy of the temporal pole region. *Epileptic Disord* 2002; 4 Suppl 1: S9-15.
- Chabardès S, Kahane P, Minotti L, Tassi L, Grand S, Hoffmann D, Benabid AL. The temporopolar cortex plays a pivotal role in temporal lobe seizures. *Brain* 2005; 128(Pt 8): 1818-31.
- Chamberlain WA, Cohen ML, Gyure KA, Kleinschmidt-DeMasters BK, Perry A, Powell SZ, Qian J, Staugaitis SM, Prayson RA. Interobserver and intraobserver reproducibility in focal cortical dysplasia (malformations of cortical development). *Epilepsia* 2009; 50(12): 2593-8.
- Ichimiya Y, Emson PC, Mountjoy CQ, Lawson DE, Heizmann CW. Loss of calbindin-28K immunoreactive neurones from the cortex in Alzheimer-type dementia. *Brain Res* 1988; 475(1): 156-9.

- Jiruška P, Tomášek M, Netuka D, Otáhal J, Jefferys JG, Li X, Marusič P. Clinical impact of a high-frequency seizure onset zone in a case of bitemporal epilepsy. *Epileptic Disord* 2008; 10(3): 231-8.
- Kahane P, Chabardès S, Minotti L, Hoffmann D, Benabid AL, Munari C. The role of the temporal pole in the genesis of temporal lobe seizures. *Epileptic Disord* 2002; 4 Suppl 1: S51-8.
- Kawaguchi Y, Kondo S. Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol* 2002; 31(3-5): 277-87.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 1997; 7(6): 476-86.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience* 1998; 85(3): 677-701.
- Kelly ME, McIntyre DC. Perirhinal cortex involvement in limbic kindled seizures. *Epilepsy Res* 1996; 26(1): 233-43.
- Komárek V. Syndrom mesiotemporální-limbické epilepsie. *Cesk Slov Neurol N* 1995; 58/91(3): 123-128.
- Komárek V. Léčba epileptických syndromů u dětí. *Cesk Slov Neurol N* 2007; 70/103(5): 473-487.
- Kršek P, Maton B, Korman B, Pacheco-Jacome E, Jayakar P, Dunoyer C, Rey G, Morrison G, Ragheb J, Vinters HV, Resnick T, Duchowny M. Different features of histopathological subtypes of pediatric focal cortical dysplasia. *Ann Neurol* 2008; 63(6): 758-69.
- Kubota Y, Hattori R, Yui Y. Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res* 1994; 649(1-2): 159-73.
- Lüders H, Comair YG. *Epilepsy surgery*. Philadelphia ; London: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- Lerner JT, Salamon N, Hauptman JS, Velasco TR, Hemb M, Wu JY, Sankar R, Donald Shields W, Engel J Jr, Fried I, Cepeda C, André VM, Levine MS, Miyata H, Yong WH, Vinters HV, Mathern GW. Assessment and surgical outcomes for mild type I and severe type II cortical dysplasia: a critical review and the UCLA experience. *Epilepsia* 2009; 50(6): 1310-35.

- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(4): 312-24.
- Lorente de Nó R. Architecture and structure of the cerebral cortex. Oxford: Oxford University Press, 1938.
- Lukas W, Jones KA. Cortical neurons containing calretinin are selectively resistant to calcium overload and excitotoxicity in vitro. *Neuroscience* 1994; 61(2): 307-16.
- Margerison JH, Corsellis JA. Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain* 1966; 89(3): 499-530.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5(10): 793-807.
- Marusič P, Najm IM, Ying Z, Prayson R, Rona S, Nair D, Hadar E, Kotagal P, Bej MD, Wyllie E, Bingaman W, Lüders H. Focal cortical dysplasias in eloquent cortex: functional characteristics and correlation with MRI and histopathologic changes. *Epilepsia* 2002; 43(1): 27-32.
- Marusič P, Tomášek M, Kršek P, Krijtová H, Zárubová J, Zámečník J, Mohapl M, Beneš V, Tichý M, Komárek V. Clinical characteristics in patients with hippocampal sclerosis with or without cortical dysplasia. *Epileptic Disord* 2007; 9 Suppl 1: S75-82.
- Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK, Melendez M, Levesque MF. The pathophysiologic relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1995a; 21(2): 133-47.
- Mathern GW, Babb TL, Vickrey BG, Melendez M, Pretorius JK. The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain* 1995b; 118 (Pt 1): 105-18.
- Mathern GW, Pretorius JK, Babb TL. Quantified patterns of mossy fiber sprouting and neuron densities in hippocampal and lesional seizures. *J Neurosurg* 1995c; 82(2): 211-9.
- Mathern GW, Wilson CL, Beck H. Hippocampal sclerosis. In: Engel J, Pedley TA. *Epilepsy : a comprehensive textbook*. Philadelphia ; London: Walters Kluwer/Lippincott-Williams & Wilkins, 2008. 121-136.
- McBain CJ, Fisahn A. Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(1): 11-23.
- Melchitzky DS, Eggan SM, Lewis DA. Synaptic targets of calretinin-containing axon terminals in macaque monkey prefrontal cortex. *Neuroscience* 2005; 130(1): 185-95.
- Meskenaite V. Calretinin-immunoreactive local circuit neurons in area 17 of the cynomolgus monkey, *Macaca fascicularis*. *J Comp Neurol* 1997; 379(1): 113-32.

- Meyer A, Beck E. The hippocampal formation in temporal lobe epilepsy. *Proc R Soc Med* 1955; 48(6): 457-62.
- Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 1996; 16(4): 815-23.
- Mitchell LA, Harvey AS, Coleman LT, Mandelstam SA, Jackson GD. Anterior temporal changes on MR images of children with hippocampal sclerosis: an effect of seizures on the immature brain? *AJNR Am J Neuroradiol* 2003; 24(8): 1670-7.
- Mitchell LA, Jackson GD, Kalnins RM, Saling MM, Fitt GJ, Ashpole RD, Berkovic SF. Anterior temporal abnormality in temporal lobe epilepsy: a quantitative MRI and histopathologic study. *Neurology* 1999; 52(2): 327-36.
- Moran NF, Lemieux L, Kitchen ND, Fish DR, Shorvon SD. Extrahippocampal temporal lobe atrophy in temporal lobe epilepsy and mesial temporal sclerosis. *Brain* 2001; 124(Pt 1): 167-75.
- Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* 2004; 73(1): 1-60.
- Mott DD, Dingledine R. Interneuron Diversity series: Interneuron research--challenges and strategies. *Trends Neurosci* 2003; 26(9): 484-8.
- Moyer JR, Jr., Furtak SC, McGann JP, Brown TH. Aging-related changes in calcium-binding proteins in rat perirhinal cortex. *Neurobiol Aging* 2011; 32(9): 1693-706.
- Nairismagi J, Pitkänen A, Kettunen MI, Kauppinen RA, Kubová H. Status epilepticus in 12-day-old rats leads to temporal lobe neurodegeneration and volume reduction: a histologic and MRI study. *Epilepsia* 2006; 47(3): 479-88.
- Palmini A, Najm I, Avanzini G, Babb T, Guerrini R, Foldvary-Schaefer N, Jackson G, Lüders HO, Prayson R, Spreafico R, Vinters HV. Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology* 2004; 62(6 Supp 3): S2-8.
- Palomero-Gallagher N, Zilles K. Isocortex. In: Paxinos G. ed. *The Rat Nervous System*. Third edition. San Diego; London: Elsevier Academic Press, 2004. 729-757.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam ; Oxford: Elsevier Academic, 2007.
- Paz R, Bauer EP, Pare D. Learning-related facilitation of rhinal interactions by medial prefrontal inputs. *J Neurosci* 2007; 27(24): 6542-51.
- Paz R, Pelletier JG, Bauer EP, Pare D. Emotional enhancement of memory via amygdala-driven facilitation of rhinal interactions. *Nat Neurosci* 2006; 9(10): 1321-9.

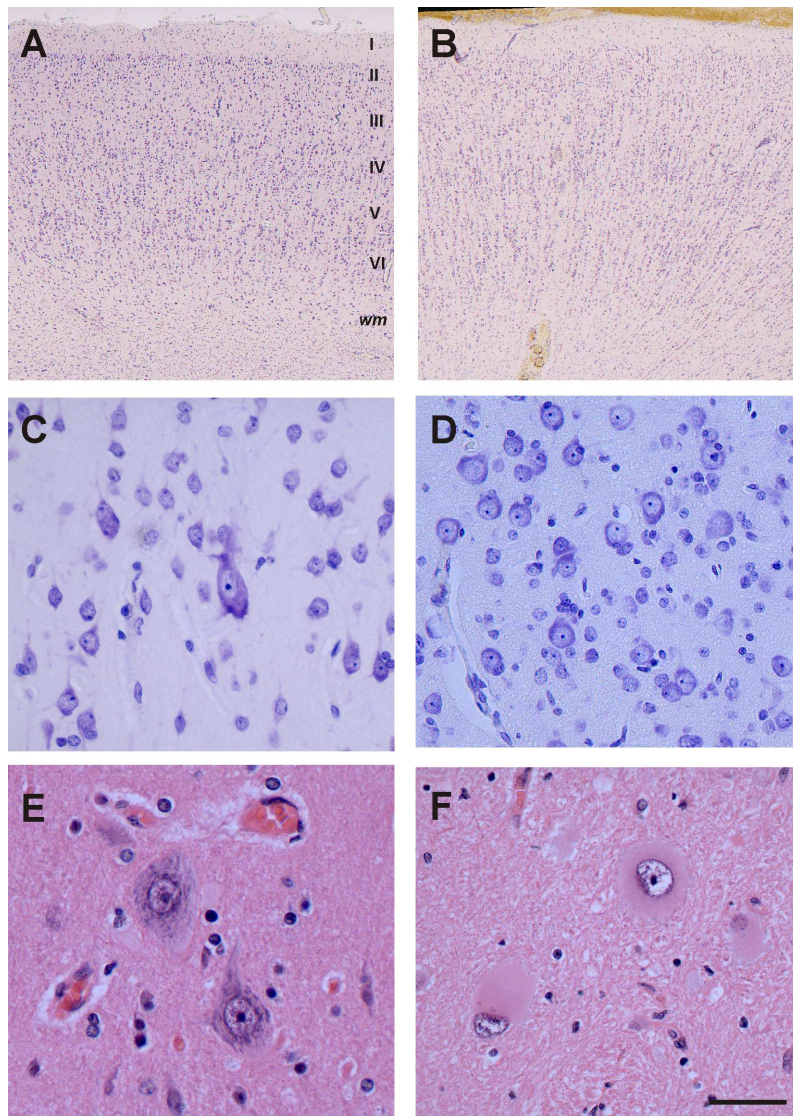
- Pelletier JG, Apergis J, Pare D. Low-probability transmission of neocortical and entorhinal impulses through the perirhinal cortex. *J Neurophysiol* 2004; 91(5): 2079-89.
- Pinto A, Fuentes C, Pare D. Feedforward inhibition regulates perirhinal transmission of neocortical inputs to the entorhinal cortex: ultrastructural study in guinea pigs. *J Comp Neurol* 2006; 495(6): 722-34.
- Ramón y Cajal S. The structure of Ammon's horn. Springfield, Ill: Charles C. Thomas, 1968.
- Rogers JH, Resibois A. Calretinin and calbindin-D28k in rat brain: patterns of partial co-localization. *Neuroscience* 1992; 51(4): 843-65.
- Ryvlin P, Coste S, Hermier M, Mauguiere F. Temporal pole MRI abnormalities in temporal lobe epilepsy. *Epileptic Disord* 2002; 4 Suppl 1: S33-9.
- Sankar T, Bernasconi N, Kim H, Bernasconi A. Temporal lobe epilepsy: differential pattern of damage in temporopolar cortex and white matter. *Hum Brain Mapp* 2008; 29(8): 931-44.
- Saygi S, Spencer SS, Scheyer R, Katz A, Mattson R, Spencer DD. Differentiation of temporal lobe ictal behavior associated with hippocampal sclerosis and tumors of temporal lobe. *Epilepsia* 1994; 35(4): 737-42.
- Schwaller B, Tetko IV, Tandon P, Silveira DC, Vreugdenhil M, Henzi T, Potier MC, Celio MR, Villa AE. Parvalbumin deficiency affects network properties resulting in increased susceptibility to epileptic seizures. *Mol Cell Neurosci* 2004; 25(4): 650-63.
- Schwartzkroin PA, Walsh CA. Cortical malformations and epilepsy. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2000; 6(4): 268-80.
- Sommer W. Erkrankung des Ammonshorns als ätiologisches Moment der Epilepsie. *Arch Psychiatr Nervenkr* 1880; 10: 631-675.
- Spreafico R, Battaglia G, Arcelli P, Andermann F, Dubeau F, Palmini A, Olivier A, Villemure JG, Tampieri D, Avanzini G, Avoli M. Cortical dysplasia: an immunocytochemical study of three patients. *Neurology* 1998; 50(1): 27-36.
- Spreafico R, Blümcke I. Focal Cortical Dysplasias: clinical implication of neuropathological classification systems. *Acta Neuropathol* 2010; 120(3): 359-67.
- Spreafico R, Tassi L, Colombo N, Brammerio M, Galli C, Garbelli R, Ferrario A, Lo Russo G, Munari C. Inhibitory circuits in human dysplastic tissue. *Epilepsia* 2000; 41 Suppl 6: S168-73.
- Suzuki WA. The anatomy, physiology and functions of the perirhinal cortex. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6(2): 179-86.

- Suzuki WA, Amaral DG. Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: cortical afferents. *J Comp Neurol* 1994a; 350(4): 497-533.
- Suzuki WA, Amaral DG. Topographic organization of the reciprocal connections between the monkey entorhinal cortex and the perirhinal and parahippocampal cortices. *J Neurosci* 1994b; 14(3 Pt 2): 1856-77.
- Tassi L, Garbelli R, Colombo N, Brammerio M, Lo Russo G, Deleo F, Milesi G, Spreafico R. Type I focal cortical dysplasia: surgical outcome is related to histopathology. *Epileptic Disord* 2010; 12(3): 181-91.
- Taylor DC, Falconer MA, Bruton CJ, Corsellis JA. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1971; 34(4): 369-87.
- Thom M, Harding BN, Lin WR, Martinian L, Cross H, Sisodiya SM. Cajal-Retzius cells, inhibitory interneuronal populations and neuropeptide Y expression in focal cortical dysplasia and microdysgenesis. *Acta Neuropathol* 2003; 105(6): 561-9.
- Thom M, Martinian L, Sen A, Cross JH, Harding BN, Sisodiya SM. Cortical neuronal densities and lamination in focal cortical dysplasia. *Acta Neuropathol* 2005; 110(4): 383-92.
- Turner CP, Connell J, Blackstone K, Ringler SL. Loss of calcium and increased apoptosis within the same neuron. *Brain Res* 2007; 1128(1): 50-60.
- Van Hoesen G, Pandya DN. Some connections of the entorhinal (area 28) and perirhinal (area 35) cortices of the rhesus monkey. I. Temporal lobe afferents. *Brain Res* 1975; 95(1): 1-24.
- Weder BJ, Schindler K, Loher TJ, Wiest R, Wissmeyer M, Ritter P, Lovblad K, Donati F, Missimer J. Brain areas involved in medial temporal lobe seizures: a principal component analysis of ictal SPECT data. *Hum Brain Mapp* 2006; 27(6): 520-34.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991; 231(4): 482-97.
- Wieser HG. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 2004; 45(6): 695-714.
- Williamson PD, Engel J, Jr. Anatomic classification of focal epilepsie. In: Engel J, Pedley TA. *Epilepsy : a comprehensive textbook*. Philadelphia ; London: Walters Kluwer/Lippincott-Williams & Wilkins, 2008. 2465-2477.
- Wonders CP, Anderson SA. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(9): 687-96.

- Xu Q, de la Cruz E, Anderson SA. Cortical interneuron fate determination: diverse sources for distinct subtypes? *Cereb Cortex* 2003; 13(6): 670-6.
- Yilmazer-Hanke DM, Wolf HK, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD, Blümcke I. Subregional pathology of the amygdala complex and entorhinal region in surgical specimens from patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59(10): 907-20.
- Zámečník J. [Neuropathology of refractory epilepsy: the structural basis and mechanisms of epileptogenesis]. *Cesk Patol* 2012; 48(2): 76-82.
- Zámečník J, Hermanová M. Neuropatologické nálezy u pacientů s farmakorezistentní epilepsií. In: Brázdil M., Hadač J., Marusič P. (eds.) *Farmakorezistentní epilepsie*, 2. doplněné a aktualizované vydání. Praha: Triton, 2011. 244-251
- Zámečník J, Kršek P, Druga R, Marusič P, Beneš V, Tichý M, Komárek V. Densities of parvalbumin-immunoreactive neurons in non-malformed hippocampal sclerosis-temporal neocortex and in cortical dysplasias. *Brain Res Bull* 2006; 68(6): 474-81.
- Zilles K, Wree A. *Cortex: Areal and Laminar Structure*. In: Paxinos G. ed.: *The Rat Nervous System*. Second edition. Academic Press, 1995. 649-685.

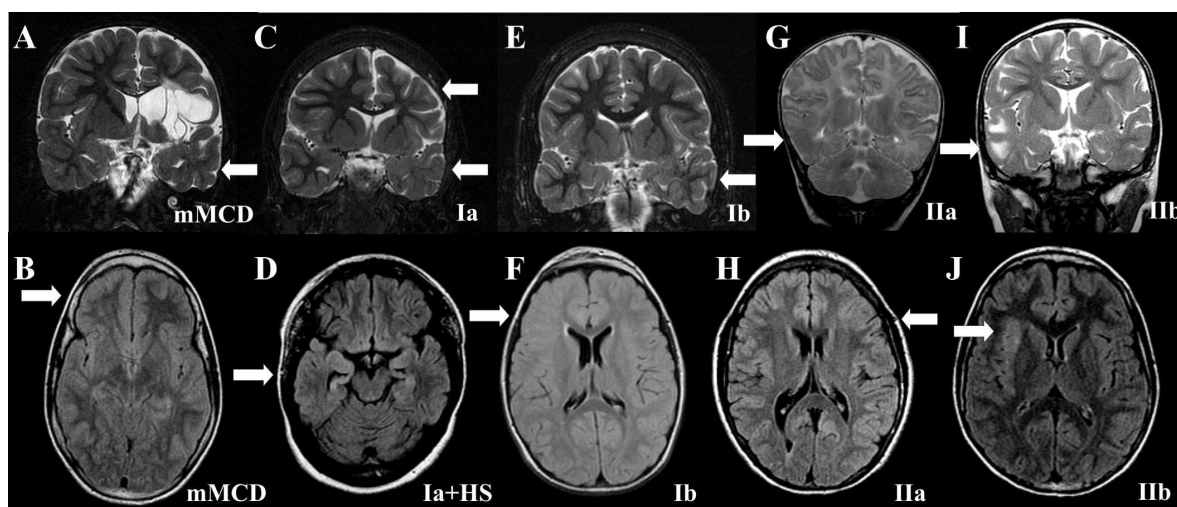
8. OBRÁZKY, TABULKY A GRAFY

Obr. 1



Obr. 1.: Neuropatologické nálezy u fokálních kortikálních dysplázií. Na rozdíl od kontrolního neokortexu (A) je pro FCD typu IA charakteristická porucha laminace a kolumnární desorganizace neokortexu (B). U FCD typu IB je dále možné pozorovat obrovské neurony (C) a okrouhlé nezralé neurony s velkým jádrem a tenkým lemem cytoplazmy (D). U FCD typu IIA jsou výrazné cytoarchitektonické abnormality doprovázeny přítomností abnormálně orientovaných dysmorfních neuronů s výrazně porušenou morfologií buněčného těla (E). U FCD typu IIB se k nim dále přidávají balónovité buňky s eozinofilní cytoplazmou a excentricky uloženým jádrem (F). A-D: Barvení kresylvioletí, E-F: barvení hematoxylinem-eozinem. Měřítko: 600 μm (A a B), 50 μm (C a D) a 40 μm (E a F). I-VI: Korové vrstvy, WM: Bílá hmota.

Obr. 2

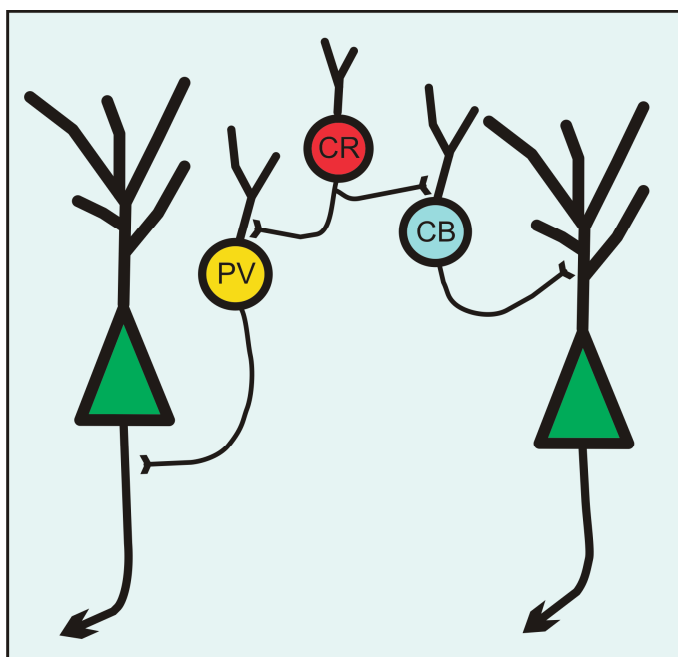


Obr. 2.: Nález u vyšetření magnetickou rezonancí typické pro jednotlivé typy mMCD / FCD. Koronální T2-vážená sekvence (A, C, E, G, I). Axiální FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) sekvence (B, D, F, H, J). Abnormality jsou označeny pomocí šipek. (A) mMCD u dvouletého pacienta s encefalomalatickou lézí v povodí arteria cerebri media. Viditelné je rozestření hranice mezi šedou a bílou hmotou jako i změna signálu v bílé hmotě levého spánkového laloku. (B) mMCD v pravém frontálním laloku projevující se mírným rozestřením hranice mezi kůrou a bílou hmotou a změnou signálu bílé hmoty. (C) Hemisferální FCD typu IA se zřetelným rozestřením hranice mezi kůrou a bílou hmotou a změnou signálu bílé hmoty. Změny jsou nejvýraznější v temporálním laloku, je přítomna atrofie celé levé hemisféry. (D) FCD typu IA v pravém temporálním laloku asociovaná se sklerózou hipokampu. Viditelné je mírné rozestření hranice mezi šedou a bílou hmotou jako i změna signálu v bílé hmotě. (E) FCD typu IB v přední části levého temporálního laloku s rozestřením hranice mezi kůrou a bílou hmotou a změnami signálu bílé hmoty nejlépe viditelnými v mediální části laloku. (F) FCD typu IB v pravém frontálním laloku charakterizovaná masivním rozestřením hranice mezi kůrou a bílou hmotou a výraznými změnami signálu bílé hmoty. (G) Temporoparietookcipitální FCD typu IIA u dvouměsíčního pacienta s výrazným rozestřením hranice kůry s bílou hmotou, abnormální gyrifikací postižené kůry a změnami signálu kůry i bílé hmoty. (H) FCD typu IIA v levém frontálním laloku se zvýšenou tloušťkou kůry, hyperintenzitou podléhající bílé hmoty v její celé tloušťce („transmantle sign“), abnormální gyrifikací, výrazným rozestřením hranice kůry s bílou hmotou a změnami signálu v kůře i bílé hmotě. (I) FCD typu IIB s vzezřením připomínajícím tuberózní sklerózu, se zvýšenou tloušťkou kůry, rozestřením hranice kůry a

bílé hmoty a výraznými změnami signálu bílé hmoty i mozkové kůry. (J) Operkulární / inzulární FCD typu IIB se zvýšenou tloušťkou kůry, abnormální gyrifikací a výraznou změnou signálu šedé hmoty.

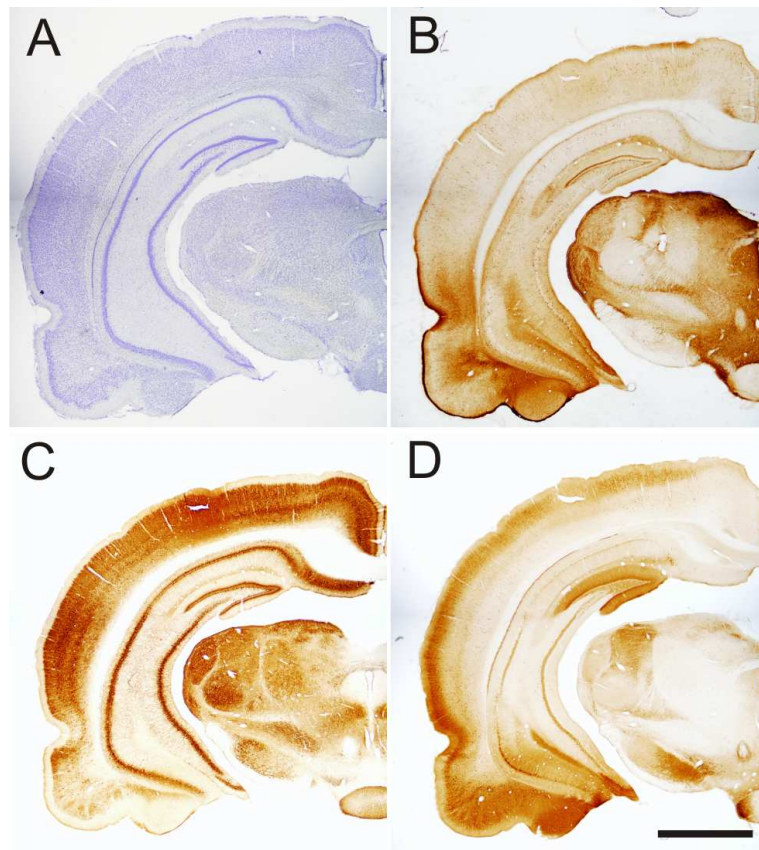
Obrázek převzat z (Kršek et al., 2008) s laskavým svolením doc. MUDr. Pavla Krška, PhD.

Obr. 3



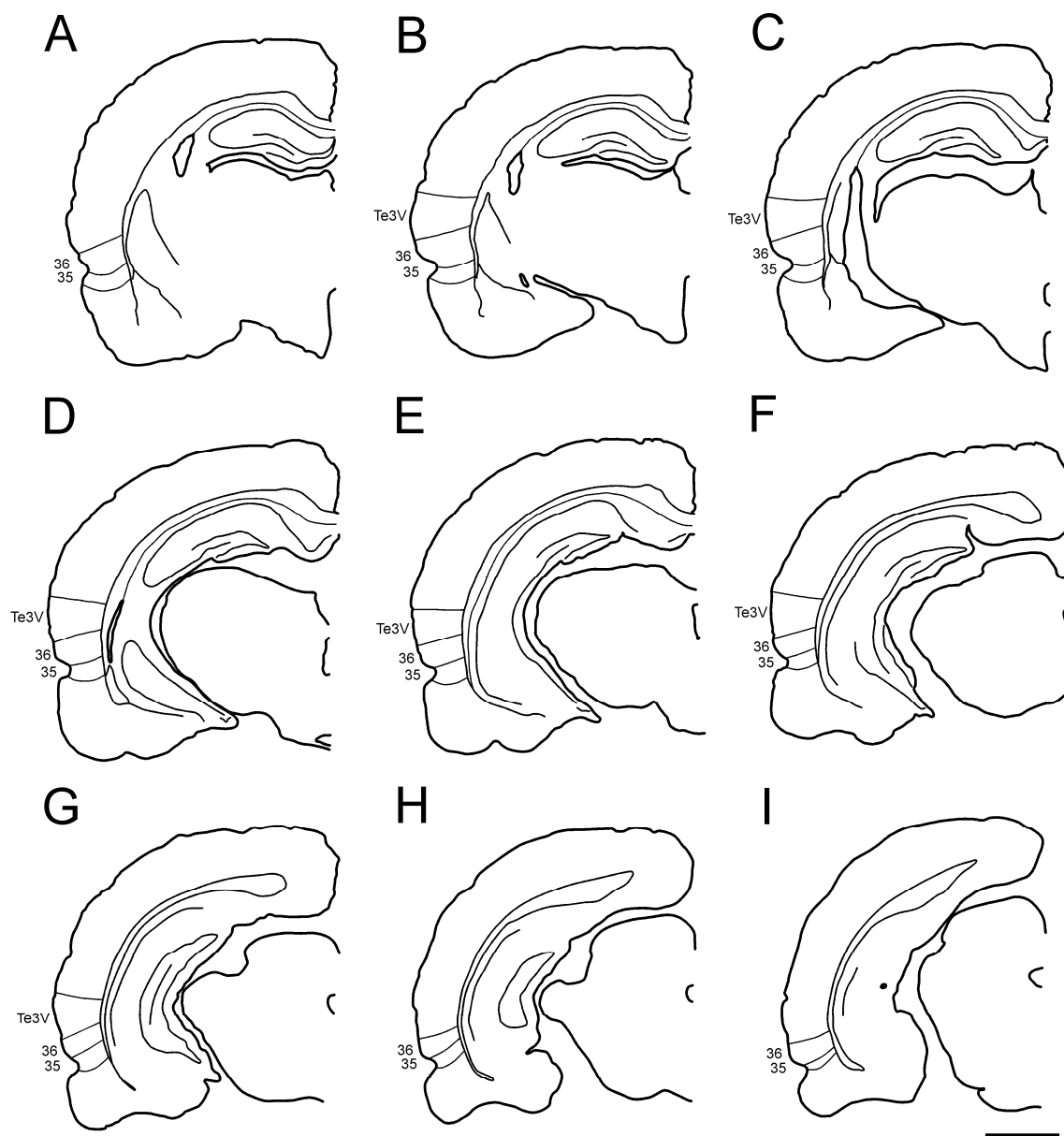
Obr. 3.: Schematické znázornění nejdůležitějších rozdílů v zapojení jednotlivých GABAergních interneuronálních populací do korových okruhů. PV exprimující interneurony inervují zejména těla a iniciální porce axonů pyramidových neuronů. CB exprimující interneurony inervují především dendritický strom pyramidových neuronů. CR exprimující interneurony jako jediné z interneuronálních populací inervují kromě dendritů pyramidových neuronů (není znázorněno) i dendrity ostatních tříd korových interneuronů, a jsou tudíž schopné působit i desinhibičně na populace pyramidových neuronů. CR – interneurony exprimující calretinin, PV – interneurony exprimující parvalbumin, CB – interneurony exprimující calbindin.

Obr. 4



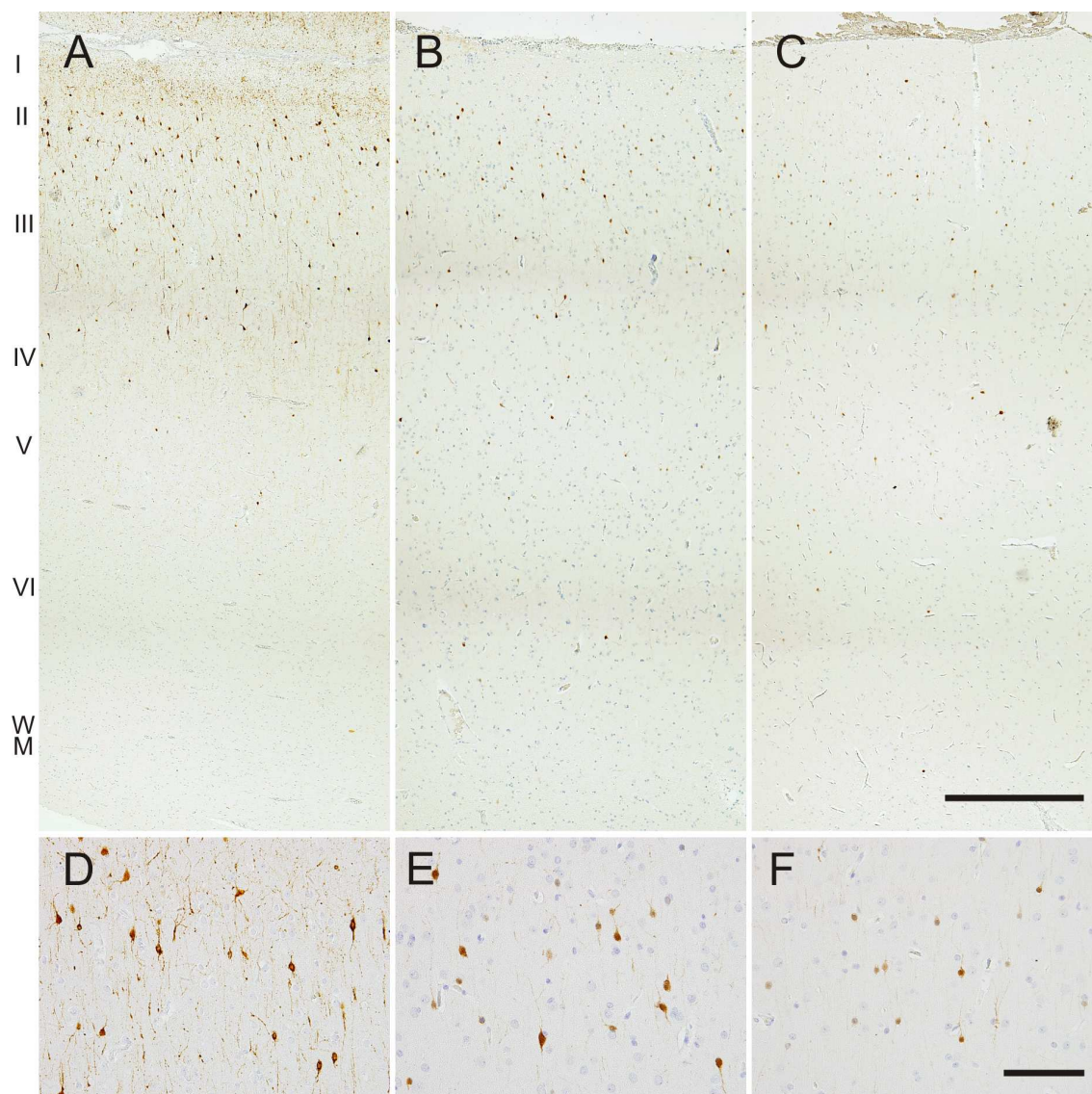
Obr. 4.: Reprezentativní mikrofotografie demonstrující barvení celé hemisféry potkaního mozku barvením podle Nissla (A) a pomocí imunohistochemického průkazu calretininu (B), parvalbuminu (C) a calbindinu (D). Znárodněné jsou za sebou následující koronární řezy, v rozmezí přibližně -5,0 až -5,2 mm AP (anteroposteriorně) od Bregmy (podle atlasu Paxinos a Watson, 2007). Měřítko = 2 mm.

Obr. 5



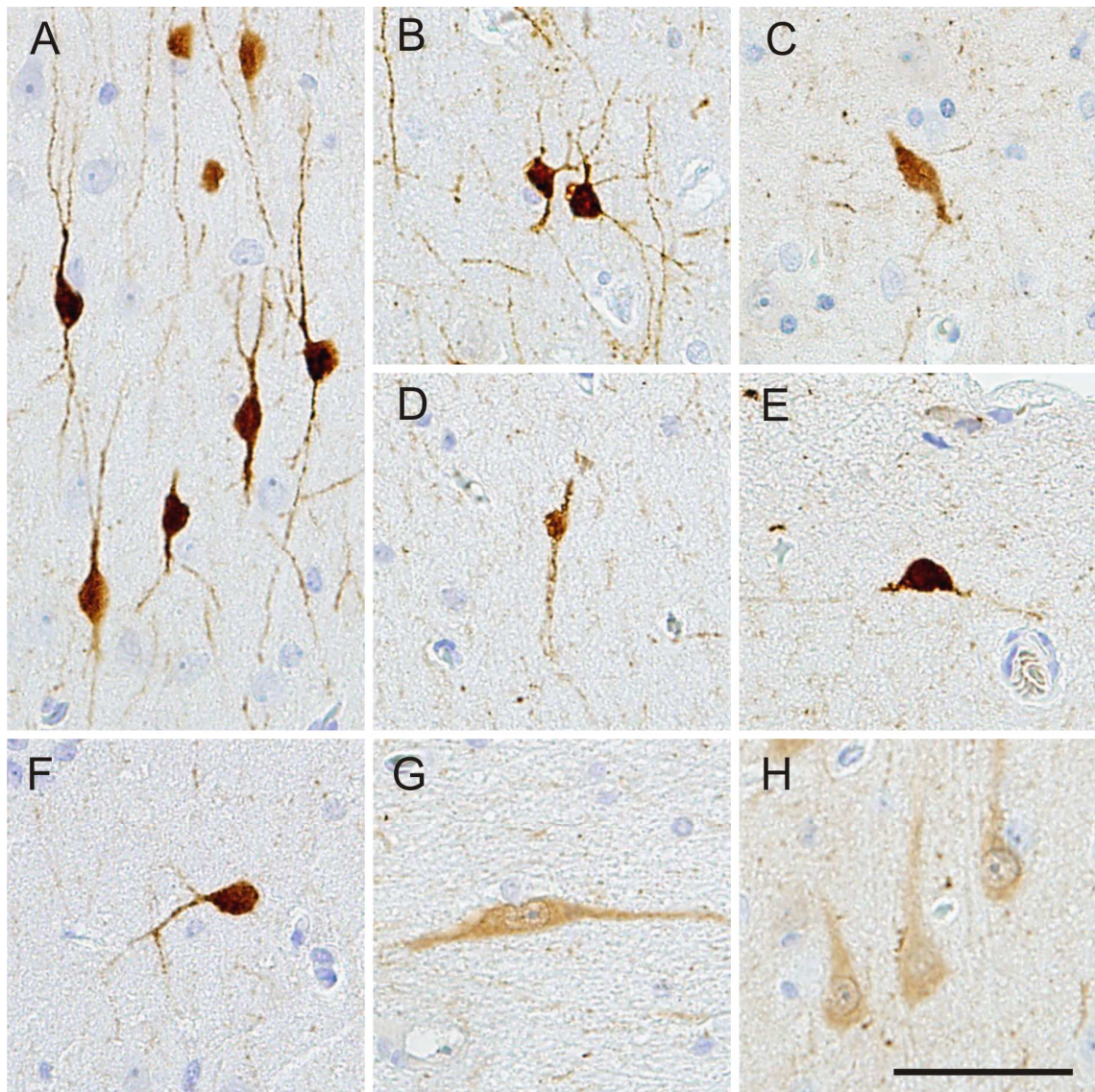
Obr. 5.: Schematický nákras koronálních řezů potkaním mozkiem v devíti rostrokaudálních úrovních s vyznačením hranic areí 35, 36 a Te3V. Rostrokaudální lokalizace jednotlivých řezů (anteroposteriorně od Bregmy) byla určena na základě atlasu Paxinos a Watson, (2007). (A) -3,00 mm. (B) -3,48 mm. (C) -3,96 mm. (D) -4,56 mm. (E) -5,04 mm. (F) -5,52 mm. (G) -6,00 mm. (H) -6,48 mm. (I) -6,72 mm. Měřítka = 2 mm.

Obr. 6



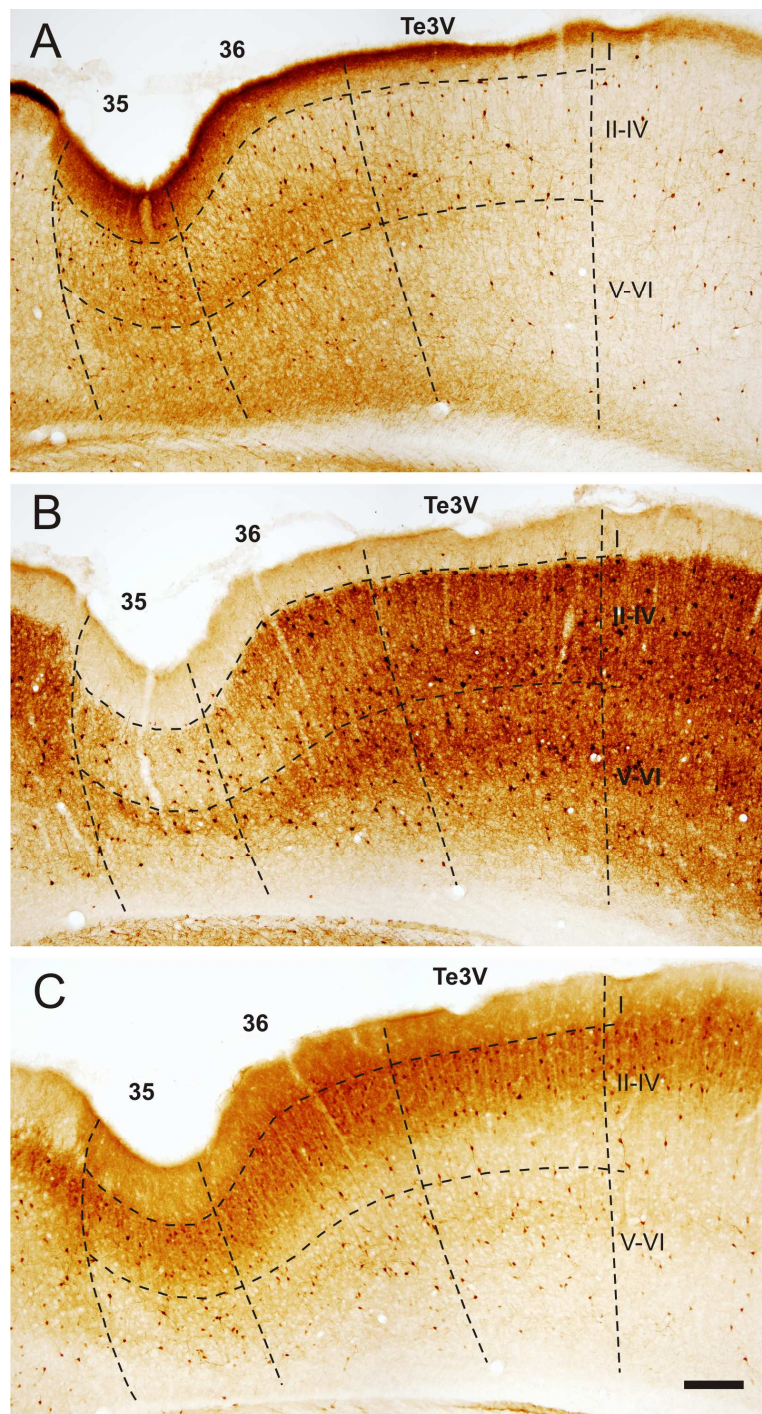
Obr. 6.: Reprezentativní mikrofotografie ilustrující distribuci calretinin imunoreaktivních (CR+) neuronů v kontrolním temporálním neokortexu (A) a ve fokálních kortikálních dyspláziích (FCD) typu IA (B) a typu IIB (C). V korových vrstvách II + III byl při vysokém zvětšení (D: kontrolní temporální neokortex) patrný výrazný pokles denzity CR+ neuronů i intenzity imunohistochemického barvení na průkaz CR u vzorků z fokálních kortikálních dysplázií (E: FCD IA, F: FCD IIB). Imunoperoxidázová metoda, lehce dobarveno hematoxylinem. Měřítka = 500 μm v (A-C), = 100 μm v (D-E). I-VI: korové vrstvy, WM: bílá hmota.

Obr. 7



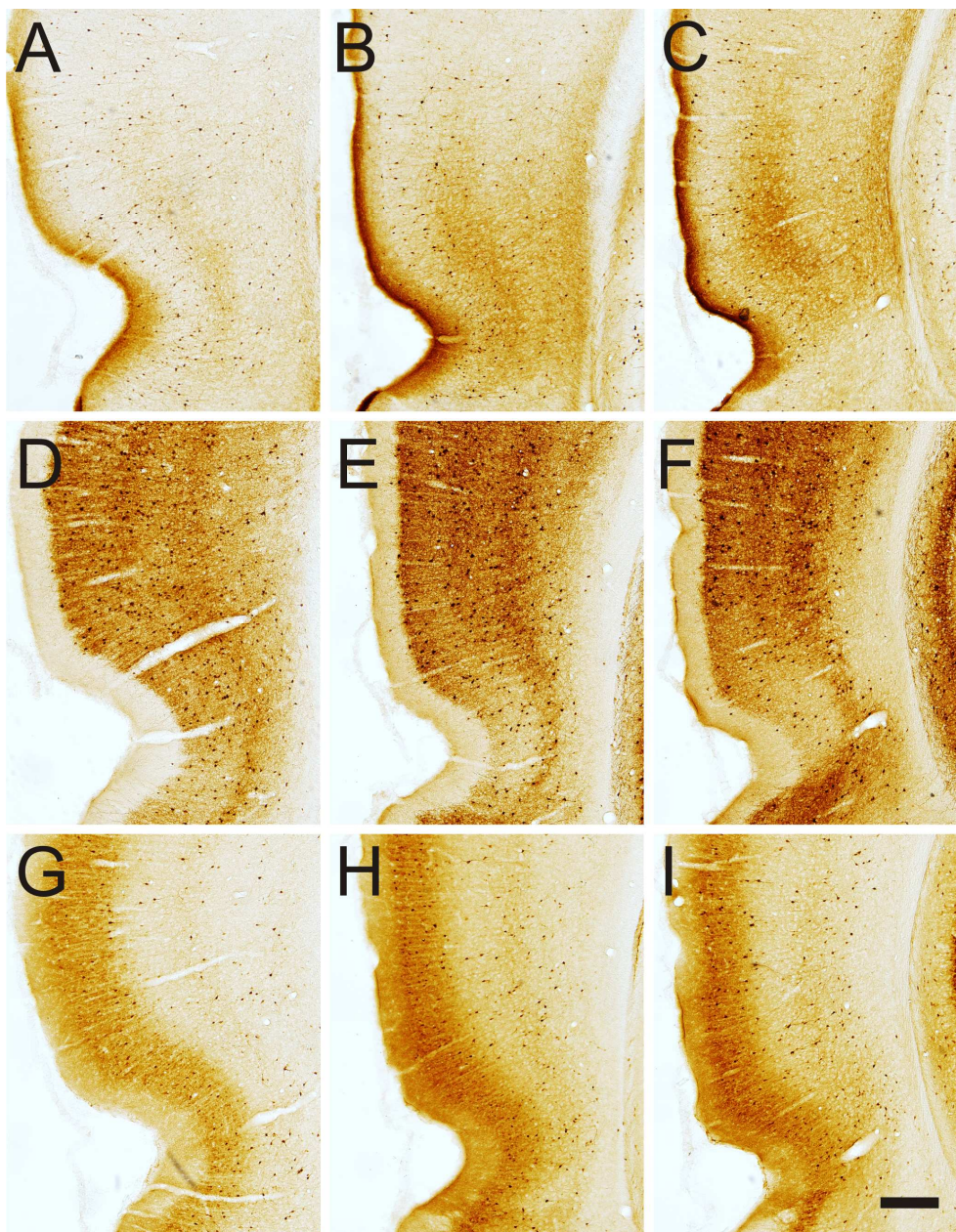
Obr. 7.: Příklady různých morfologických typů calretinin imunoreaktivních (CR+) neuronů ve studovaných vzorcích. (A) Typické bipolární / „bitufted“ neurony v korových vrstvách II + III. (B) Multipolární neurony ve vrstvě III. (C) Bipolární neuron ve vrstvě V. (D-F) Různé morfologické typy CR+ neuronů v korové vrstvě I. (G) Horizontálně orientovaný bipolární neuron v bílé hmotě. (H) Pyramidové neurony lehce imunoreaktivní pro CR ve vrstvě III. Imonoperoxidázová metoda, lehce dobarveno hematoxylinem. Měřítka = 50 μ m.

Obr. 8



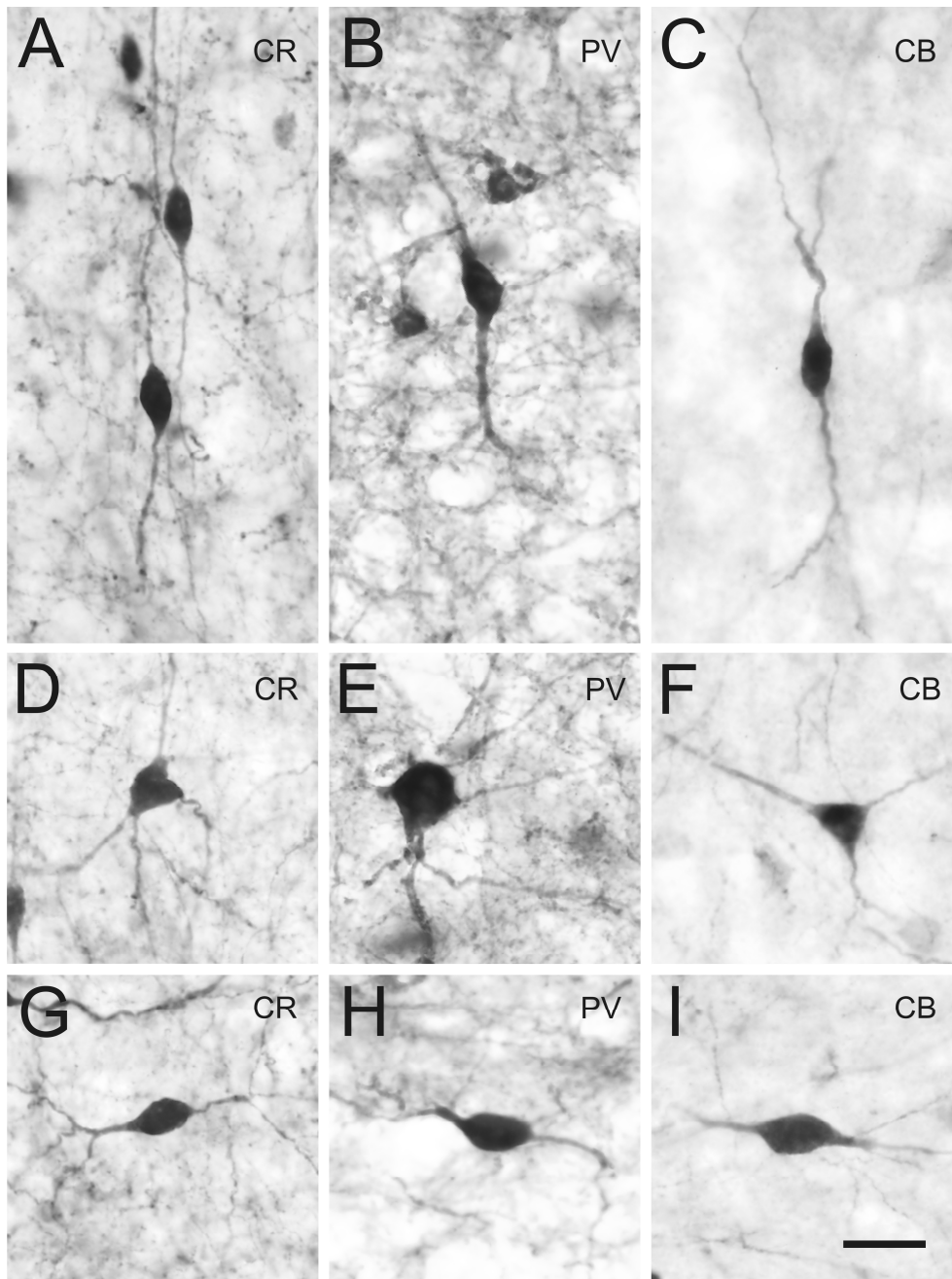
Obr. 8.: Reprezentativní mikrofotografie ilustrující rozložení imunoreaktivity calretininu (A), parvalbuminu (B) a calbindinu (C) v korových areách 35, 36 a Te3V s vyznačením hranic oblastí a korových vrstev. Lokalizováno na úrovni -5,05 až -5,20 mm anteroposteriorně od Bregmy. Měřítko = 200 μ m.

Obr. 9



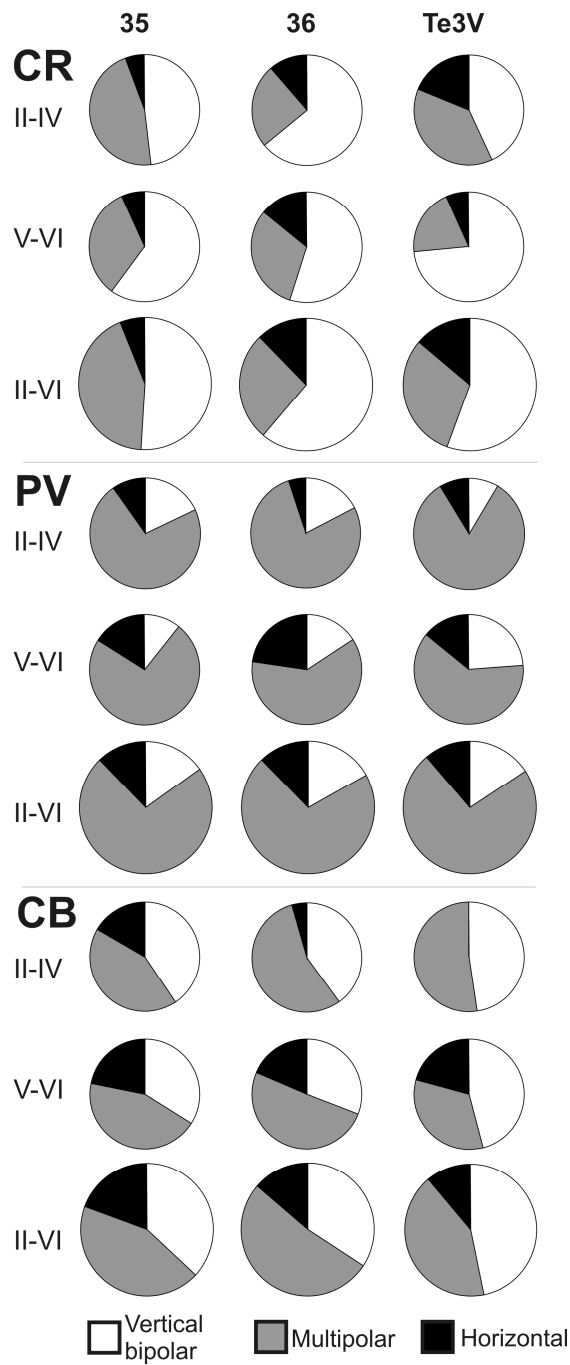
Obr. 9.: Reprezentativní mikrofotografie ilustrující rozložení imunoreaktivity calretininu (A, B, C), parvalbuminu (D, E, F) a calbindinu (G, H, I) ve studovaných oblastech v různých rostrokaudálních úrovních. Lokalizace přibližně -3,96 mm (A, D, G), -5,04 mm (B, E, H) a -6,00 mm (C, F, I) anteroposteriorně od Bregmy (Paxinos a Watson, 2007). Měřítka = 100 μ m. Mírně vyšší intenzita imunoreaktivity u všech tří barvení v kaudálních úrovních vyšetřovaných oblastí nedosahovala statisticky významného rozdílu při denzitometrické analýze imunoreaktivity neuropilu.

Obr. 10



Obr. 10.: Příklady různých morfologických typů imunoreaktivních neuronů ve studovaných oblastech. (A, B a C) vertikálně orientované bipolární CR+, PV+ a CB+ neurony, (D, E, F) multipolární CR+, PV+ a CB+ neurony a (G, H a I) horizontálně orientované bipolární / „bitufted“ CR+, PV+ a CB+ neurony. Měřítka = 20 μ m.

Obr. 11



Obr. 11.: Výšečové grafy ilustrující zastoupení jednotlivých morfologických typů studovaných CR+, PV+ a CB+ neuronů ve vyšetřovaných oblastech a vrstvách. II-VI: korové vrstvy.

Tabulka 1

Klinické údaje o pacientech a vzorcích tkáně použitých v naší práci

No.	Pohl.	Věk (roky)	Trvání epilepsie (roky)	Lokalizace /strana	HS	Počet neokortikálních vzorků				
						nHSTN	FCD IA	FCD IB	FCD IIA	FCD IIB
(A) Anteriomediální temporální resekce – izolovaná skleróza hipokampu										
1	f	44	44	T/R	+	4	–	–	–	–
2	f	19	1	T/L	+	4	–	–	–	–
3	f	17	9	T/L	+	2	–	–	–	–
4	f	37	25	T/L	+	4	–	–	–	–
5	f	35	27	T/R	+	3	–	–	–	–
6	f	31	14	T/R	+	4	–	–	–	–
7	f	21	20	T/L	+	1	–	–	–	–
(B) Anteriomediální temporální resekce - duální patologie										
8	f	21	15	T/L	+	2	2	–	–	–
9	f	50	35	T/R	+	1	2	–	–	–
10	f	16	8	T/L	+	2	2	–	–	–
11	m	16	14	T/L	+	–	3	–	–	–
12	m	20	8	T/R	+	2	1	1	–	–
13	m	12	11	T/L	+	1	–	1	–	–
14	f	32	29	T/L	+	–	–	4	–	–
(C) Limitovaná kortikální resekce – temporální lalok										
15	m	9	4	T/L	NP	–	–	3	–	–
16	m	39	27	T/R	NP	–	–	–	1	–
17	m	14	10	T/R	NP	–	–	–	1	2
18	f	24	16	T/R	NP	–	–	–	1	2
19	m	21	11	T/R	NP	–	–	–	–	1
(D) Limitovaná kortikální resekce – extratemporálně										
20	f	5	2	P/L	NP	–	–	2	–	–
21	m	8	6	F/R	NP	–	–	–	4	–
22	f	12	11	O/L	NP	–	–	–	1	1
23	m	29	28	F/R	NP	–	–	–	–	4
24	f	9	3	F/L	NP	–	–	–	–	4

HS: hipokampální skleróza potvrzena histopatologickým vyšetřením; nHSTN:

nemalformovaný temporální neokortex resekovaný spolu se sklerotickým hipokampem;

FCD IA: fokální kortikální dysplázie typu IA; FCD IB: fokální kortikální dysplázie typu IB;

FCD IIA: fokální kortikální dysplázie typu IIA; FCD IIB: fokální kortikální dysplázie typu

IIB; f: ženské pohlaví; m: mužské pohlaví; T: temporální lalok, F: frontální lalok; P:

parietální lalok; O: okcipitální lalok; R: vpravo; L: vlevo; NP: nevyšetřen

Tabulka 2

Průměrná denzita CR+ buněk na mm² (\pm S.E.M.) v jednotlivých korových vrstvách a v celkové tloušťce (I-VI) studovaného kortexu

	n	I	II	III	IV	V+VI	I-VI
A. Rozdělení vzorků podle typu¹							
Kontroly	37	25.6 \pm 1.7	129.2 \pm 5.3	48.8 \pm 0.2	20.2 \pm 1.4	5.3 \pm 0.5	34.3 \pm 0.9
nHSTN	30	38.1 \pm 2.6 ^Y	167.3 \pm 7.9 ^Y	51.7 \pm 3.0	16.8 \pm 1.7	3.8 \pm 0.4	34.3 \pm 1.8
FCD typ I	21	27.8 \pm 2.5	106.8 \pm 7.0 ^X	35.7 \pm 2.5 ^Y	10.3 \pm 1.4 ^Y	2.8 \pm 0.5 ^Y	25.1 \pm 1.3^Y
FCD typ IA	10	33.6 \pm 3.5 ^X	124.7 \pm 10.7	36.5 \pm 5.1 ^X	12.6 \pm 2.5 ^Y	3.5 \pm 0.9 ^X	26.1 \pm 2.4^Y
FCD typ IB	11	22.5 \pm 2.7	90.5 \pm 6.3 ^Y	35.0 \pm 1.7 ^Y	8.3 \pm 1.3 ^Y	2.1 \pm 0.4 ^Y	24.2 \pm 1.4^Y
FCD typ II	22	-	-	-	-	-	16.7 \pm 1.0^Y
FCD typ IIA	8	-	-	-	-	-	17.5 \pm 2.2^Y
FCD typ IIB	14	-	-	-	-	-	16.2 \pm 1.0^Y
B. Rozdělení vzorků podle laloků²							
Kontroly	37						
Temporální	28	27.6 \pm 2.1	137.4 \pm 6.0	52.7 \pm 2.7	19.1 \pm 1.6	4.7 \pm 0.9	35.5 \pm 1.0
Frontální	3	16.3 \pm 3.4	116.4 \pm 13.5	34.3 \pm 4.0	16.9 \pm 3.1	6.9 \pm 0.8	26.4 \pm 1.2
Parietální	3	20.0 \pm 1.8	94.4 \pm 1.8	45.7 \pm 3.3	27.1 \pm 4.0	6.9 \pm 2.3	32.4 \pm 1.8
Okcipitální	3	21.8 \pm 4.0	99.9 \pm 10.8	29.9 \pm 15.6	26.2 \pm 3.9	8.3 \pm 3.3	33.5 \pm 0.9
nHSTN	30	38.1 \pm 2.6 ^X	167.3 \pm 7.9 ^X	51.7 \pm 3.0	16.8 \pm 1.7	3.8 \pm 0.4	34.3 \pm 1.8
FCD typ I	21						
FCD I temporální	19	29.1 \pm 2.6	110.6 \pm 7.2 ^X	36.2 \pm 2.8 ^Y	10.9 \pm 1.5 ^Y	2.9 \pm 0.5 ^X	25.2 \pm 1.4^Y
FCD I parietální ³	2	14.8 \pm 0.6	71.2 \pm 10.4	30.8 \pm 3.1	4.5 \pm 1.2	1.4 \pm 0.4	21.7 \pm 1.7
FCD type II	22						
FCD II temporální	8	-	-	-	-	-	17.9 \pm 0.8^Y
FCD II frontální	12	-	-	-	-	-	14.3 \pm 1.1^Y
FCD II okcipitální	2	-	-	-	-	-	26.1 \pm 3.6

n: počet studovaných kortikálních vzorků; I-VI: korové vrstvy; nHSTN: nemalformovaný temporální neokortex resekovaný spolu se sklerotickým hipokampem; FCD: fokální kortikální dysplázie; ¹: patologické vzorky v tabulce 2 A. jsou porovnány s kontrolami bez rozlišení původu z jednotlivých laloků; ²: patologické vzorky v tabulce 2 B. jsou porovnány s kontrolami z korespondujících oblastí; ³: statistické vyhodnocení neprovedeno z důvodu nízkého počtu vzorků; ^X: statisticky významný rozdíl, $P < 0.05$; ^Y: statisticky významný rozdíl, $P < 0.005$

Tabulka 3

Korigovaná relativní optická denzita neuropilu \pm S.E.M. u CR, PV a CB imunoreaktivity

	Area 35	Area 36	Area Te3V
CR	4,7 \pm 0,5 ^x	4,4 \pm 0,6	2,9 \pm 0,3
PV	3,7 \pm 0,4	5,1 \pm 0,7	5,7 \pm 0,7
CB	5,1 \pm 0,3	4,4 \pm 0,6	4,1 \pm 0,7

^x Statisticky významný rozdíl v porovnání s areou Te3V, $p < 0,05$

Tabulka 4

(A) Absolutní neuronální denzita na mm³ kortexu ± S.E.M.

	Area 35			Area 36			Area Te3v		
	II.-IV.	V.-VI.	II.-VI.	II.-IV.	V.-VI.	II.-VI.	II.-IV.	V.-VI.	II.-VI.
NISSL	53803 ± 842 ^{XY}	47716 ± 2359 ^Y	50365 ± 1257^Y	47926 ± 863	45442 ± 1286	46500 ± 1053	46661 ± 1764	39364 ± 2023	42565 ± 1793
CR	4967 ± 423 ^{XY}	1439 ± 90 ^Y	3194 ± 211^Y	3617 ± 298 ^Y	1143 ± 85	2520 ± 363^Y	2304 ± 297	891 ± 73	1512 ± 153
PV	4805 ± 202	2930 ± 150	3805 ± 120	5240 ± 297	3555 ± 210	4336 ± 223	4943 ± 223	3132 ± 203	3951 ± 193

(B) Procentuální podíly CaBP imunoreaktivních neuronů z celkové neuronální populace ± S.E.M.

	Area 35			Area 36			Area Te3v		
	II.-IV.	V.-VI.	II.-VI.	II.-IV.	V.-VI.	II.-VI.	II.-IV.	V.-VI.	II.-VI.
CR	9,2 ± 0,7 ^Y	3 ± 0,2	6,4 ± 0,4^Y	7,6 ± 0,7	2,5 ± 0,2	5,5 ± 0,9	5 ± 0,7	2,3 ± 0,2	3,6 ± 0,4
PV	8,9 ± 0,4	6,2 ± 0,2	7,6 ± 0,2	11 ± 0,8	7,9 ± 0,7	9,4 ± 0,7	10,7 ± 0,8	8,1 ± 0,8	9,4 ± 0,8

^X Statisticky významný rozdíl v porovnání s areou 36, p < 0,05

^Y Statisticky významný rozdíl v porovnání s areou Te3V, p < 0,05

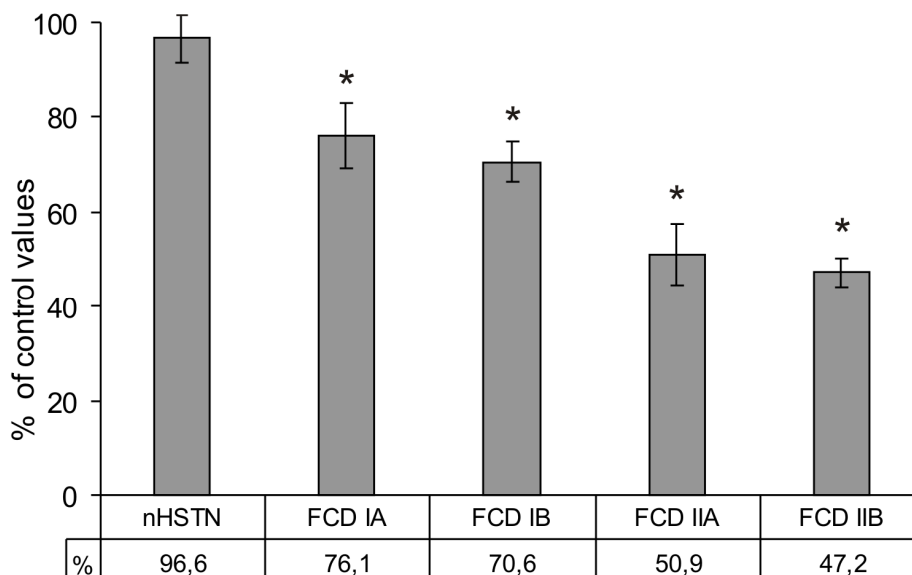
Tabulka 5

Definice jednotlivých typů fokálních kortikálních dysplazií (FCD) podle Palminiho klasifikace z roku 2004 v porovnání s novou klasifikací ILAE 2011.

Fokální kortikální dysplazie	Palminiho klasifikace (2004)	Klasifikace ILAE (2011)
FCD typu I		Izolované FCD
FCD IA	Porucha laminární cytoarchitektoniky	Radiální porucha laminární cytoarchitektoniky
FCD IB	Porucha laminární cytoarchitektoniky + přítomnost nezralých / obrovských neuronů	Tangenciální porucha laminární cytoarchitektoniky
FCD IC	-	Kombinace FCD IA + FCD IB
FCD typu II		
FCD IIA	Porucha laminární cytoarchitektoniky + dysmorfní neurony	Porucha laminární cytoarchitektoniky + dysmorfní neurony
FCD IIB	Porucha laminární cytoarchitektoniky + dysmorfní neurony + balónovité buňky	Porucha laminární cytoarchitektoniky + dysmorfní neurony + balónovité buňky
FCD typu III		Asociace poruchy cytoarchitektoniky
FCD IIIA	-	FCD s hipokampální sklerózou
FCD IIIB	-	FCD s glioneuronálním tumorem
FCD IIIC	-	FCD s cévní malformací
FCD IIID	-	FCD s posttraumatickými, postischemickými a pozánětlivými změnami

Graf 1

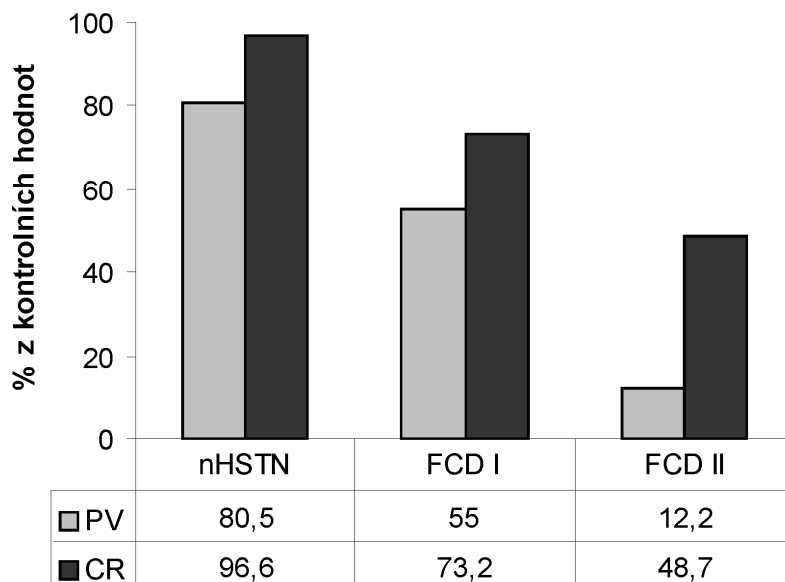
Procentuální hodnoty (\pm S.E.M.) denzity calretinin-imunoreaktivních interneuronů dosažené ve vyšetřovaných neokortikálních vzorcích v celé tloušťce kortexu. nHSTN byly zde porovnány výlučně s kontrolami z temporálního laloku.



*nHSTN: nemalformovaný temporální neokortex resekováný spolu se sklerotickým hipokampem; FCD IA: fokální kortikální dysplázie typu IA; FCD IB: fokální kortikální dysplázie typu IB; FCD IIA: fokální kortikální dysplázie typu IIA; FCD IIB: fokální kortikální dysplázie typu IIB. *: signifikantní rozdíl oproti hodnotám v kontrolním neokortexu ($p < 0,005$).*

Graf 2

Porovnání poklesu denzity parvalbumin- a calretinin-imunoreaktivních interneuronů ve vzorcích nHSTN, FCD I a FCD II. *



nHSTN: nemalformovaný temporální neokortex resekovaný spolu se sklerotickým hipokampem; FCD I: fokální kortikální dysplázie typu I; FCD II: fokální kortikální dysplázie typu II; PV: parvalbumin imunoreaktivní interneurony; CR: calretinin imunoreaktivní interneurony.

* Porovnávány jsou výsledky dvou samostatných prací, (Zámečník et al., 2006) pro PV+ interneurony, a (Barinka et al., 2012, resp. předkládaná dizertace) pro CR+ interneurony. Porovnání je proto nutno posuzovat jako orientační. Z tohoto důvodu nebylo možné validní statistické vyhodnocení.

9. PŘÍLOHY

9.1 Seznam publikací autora ve vztahu k tématu práce

1. Barinka F, Druga R, Marusič P, Kršek P, Zámečník J. Calretinin immunoreactivity in focal cortical dysplasias and in non-malformed epileptic cortex.

Epilepsy Res 2010;88(1):76-86. **IF 2,479**

2. Barinka F, Druga R. Calretinin expression in the mammalian neocortex: a review.

Physiol Res 2010; 59(5): 665-77. **IF 1,43** (Přehledná práce)

3. Barinka F, Salaj M, Rybář J, Kubová H, Druga R. Calretinin, parvalbumin and calbindin immunoreactive interneurons in perirhinal cortex and temporal area Te3V of the rat brain: qualitative and quantitative analysis.

Brain res 2012; 1436: 68-80. **IF 2,665**

9.2 Seznam ostatních publikací autora

1. Lahtinen L, Ndoe-Ekane XE, **Barinka F**, Akamine Y, Esmaili MH, Rantala J, Pitkänen A. Urokinase-type plasminogen activator regulates neurodegeneration and neurogenesis but not vascular changes in the mouse hippocampus after status epilepticus.

Neurobiol Dis 2010; 37(3):692-703. **IF 4,518**

2. Salaj M, Malíková H, Drugová B, **Barinka F**, Druga R. Two cases of the retroaortic left renal vein. An anatomical and MRI study.

Plzeň lék Sborn 2009; Suppl. 82:115-119.