

Megállapítottuk, hogy a normális időre született gyermekekben illetve a születés utáni 2-8. években (hasonlóképpen mint felnőttkorban), csak minimális mértékben folyik neuronok képződése az emberi hippokampuszban. Ezért emberi vonatkozásban nehezen értelmezhetőek azok a rágcsálókban nyert adatok, melyek szerint a hippokampusz gyrus dentatusában jelentős születés utáni sejtképződés folyik, mely a késői felnőttkorban is észlelhető. Véleményünk szerint a jelenlegi ismereteink nem elegendőek arra, hogy felnőttkori neuronpusztulás pótlásáról beszéljünk (epilepsziás emberi hippokampuszban ugyancsak nem találtuk nyomát a mások által sokszor publikált fokozott szemcsesejt-képződésnek). Ellenkezőleg, epilepsziás betegekben sejtpusztulást látunk a hippokampusz minden részében.

Tapasztalatunk szerint emberben, a magzat 15-16 hetes kora után az Ammon szarvban már egyáltalán nem képződnek neuronok (sem piramissejtek, sem interneuronok), a hippokampuszal párhuzamosan futó ventrikuláris germinatív zóna gyakorlatilag a 18 hetes korra eltűnik, mégpedig úgy, hogy először a gyrus dentatushoz közelebb eső CA3 területnek megfelelően tűnik el a germinatív zóna. Megállapítottuk, hogy már 14 hetes magzati korban a fejlődő gyrus dentatus hilusában megfigyelhető nagy mértékű sejtosztódás. A gyrus dentatus hilusában a 16-35 hetek között erősen csökkenő mértékben lehet észlelni sejtképződést (ami még végig jelentős). Ugyanakkor fokozatosan nő a szemcsesejtréteg vastagsága és hossza. A születés körül és a születés utáni néhány hónapon belüli egy-egy időpontban szemcsesejtek képződése maximum a teljes szemcsesejtszám 1-2%-ban figyelhető meg. Ugyanakkor, 19 hónapos, 4, 7 éves vagy felnőttkorban egyáltalán nem képződik új szemcsesejt, a hilusban esetlegesen található osztódó sejtek azonosítható módon vagy endothel sejtek vagy gliasejtek voltak. Az agykéregben egyáltalán nincs neuronképződés a születés körüli vagy a születés utáni periódusban, itt legfeljebb gliasejtek és endothelsejtek képződnek. A szubventrikuláris germinatív réteg vékony születéskor. Legfeljebb nagyon kis számban, az I réteg számára képződhetnek még neuronok a születés után a germinatív rétegben, de ennek valószínűsége is csekély. A kisagyban jelentős neuronképződés folyik egészen a 8. hónapig, amikor a külső szemcsés réteg eltűnik. A kisagyi szemcsesejtek jelentős hányada a születés után képződik emberben. Helyi neuronképződés a kisagy külső szemcsés rétege kivételével nincs. Feltételezhető, hogy az agyban folyó neuronképződés erős genetikai kontroll alatt áll és környezeti hatások nagyon kevésbé befolyásolják. Megvizsgáltuk, hogy olyan koraszülöttekben, akik nagyon korán születtek (24-27 hetek); vagy egy későbbi időperiódusban (32-34 hetek) született gyermekekben a sejtképződés mértéke és az agykéreg illetve a hippokampusz cytoarchitektonikája a halál időpontjában megfelelt-e a genetikus kornak, függetlenül a születés időpontjától. Azt találtuk, hogy sem a kisagyban, sem a hippokampuszban vagy az agykéregben nem volt eltérés a normális időre születettektől még akkor sem ha a koraszülöttek a halál előtt jelentős hypoxiás perióduson estek át betegségük következtében. A leghosszabb összehasonlítás 9 hónapos túlélési időt

jelentett, amikor a gyermek 27 hétre született, tehát ha normális időre születik, akkor 6 hónapos lett volna (a mindennapi gyakorlat nem jegyzi, hogy a születés normális időre történt-e, ezért a 9 hónapos gyermek, valójában csak 6 hónapos, ha 3 hónappal korábban született). Ezt a megfigyelésünket az utóbbi 1-2 évben számos közlemény erősítette meg, igaz más módszerekkel. Enyhe különbséget láttunk a hippokampuszon belül a gyrus dentatus hilusában, ahol kettős festéssel igazolható volt, hogy a kapilláris falát alkotó endothel sejtek képződése a koraszülöttekben fokozódott, de ennek magyarázatát vagy jelentőségét nem tudjuk. Feltehető, hogy a hypoxia hatására nőtt a kapillarizáció. Ugyanakkor a gliaképződésben nem volt különbség. A myelinizáció mértékében ugyancsak nem találtunk különbséget (MBP-t használva). Nem találtunk különbséget az agykéregben és a kisagyban sem. Az adatok arra hívják fel a figyelmet, hogy még a kis súllyal és korán született (24 – 27 hetek) csecsemők esetében sem magyarázható a szellemi elmaradás jelensége a neuronok képződésének csökkenésével. Valószínű finomabb, esetlegesen a szinaptikus kapcsolatokat érintő morfológiai változások lehetnek a később kialakuló mentális tünetek és tanulási zavarok mögött.

Megvizsgáltuk a neuronok vándorlásában és irányításában szerepet játszó Cajal-Retzius sejtek eloszlását, gyakoriságát kontroll magzatokban és gyermekekben. A Cajal-Retzius sejtek a fejlődő agykéreg I. rétegének, a marginális zónának jellegzetes morfológiájú sejtjei. Emberben magzati korban nagy számban találhatóak a neocortexben és az archicortexben is. Számuk a születés után fokozatosan csökken és felnőttkorban csak elvétve találhatóak meg. A Cajal-Retzius sejtek egy extracelluláris matrix glikoproteint, reelin, termelnek. A reelin irányítja a posztmitotikus idegsejtek (prekursorok) vándorlását, többek között azáltal, hogy a radiális glia nyúlványok morfológiáját határozza meg. Reelin hiányában a neuronális vándorlás zavart szenved, ahogy ezt egy természetesen előforduló mutáns egértörzsben, a reeler egerekben, leírták. Emberben a reelin gén mutációja lissencephaliával jár. A reelin mellett a Cajal-Retzius sejtek egy kalcium kötő fehérjét, a calretinint, és a p53 családba tartozó nucleáris proteint, a p73-t tartalmazzák. Ez utóbbi a sejtek azonosítását teszi egyértelművé, a sejt vándorlásban szerepe ismeretlen. A Cajal-Retzius sejteket vizsgálva megállapítottuk, hogy perinatalis korban sokkal nagyobb számban van jelen a neocortexben, mint ahogy az ma általában ismert. Emellett megállapítottuk, hogy koraszülöttekben a Cajal-Retzius sejtek sokkal nagyobb számban maradnak meg, mint terminusra született csecsemőkben. Ez különösen az igen korán, a 27. héten vagy az előtt születettekre jellemző, akiknek a neocortexében 1,5-3-szor annyi Cajal-Retzius sejt figyelhető meg, mint a velük azonos korú terminusra született kontrollokban. Emellett koraszülöttekben megfigyelhető, a szintén magzati korra jellemző subpiális granuláris réteg és a subplate sejtjeinek megmaradása. A dorzális és ventrális hippocampus esetében jelentős különbséget láttunk mind a sejtosztódás, mind a kalcium kötő fehérje tartalmú sejtek száma és megoszlása tekintetében a 15-19 hetes magzati periódusban. Az a véleményünk, hogy a dorzális hippokampusz

visszafejlődése fejlődéstani jelenség, a proliferáció fokozatos csökkenése következménye és nemcsak a corpus callosum kifejlődésével magyarázható. Időben párhuzamosan futó jelenségekről van szó. Könyvfejezetben már részletesen le is írtuk, folyóiratban még nem jelent meg. Miután kiderült, hogy calretininen kívül elérhető olyan calbindin és parvalbumin ellenes antitest is, mely működik paraffinba ágyazott emberi postmortem anyagon, ezért vizsgáltuk ezeket is, hiszen más-más interneuron csoportra jellemzőek. Azt találtuk, hogy a calbindin és calretinin nagyon hamar, már a 14. héten megjelenik a kéreg és a hippocampus interneuronjaiban és újszülöttkorra gyakorlatilag kialakul a késői gyermekkorban is észlelhető megoszlás. Mind a calretinin, mind a calbindin tartalmú sejtek az archicortex területén expresszálnak először, ezt követően jelenik meg a neocortexben. Mindez összhangban van az archicortex gyorsabb differenciálódásával, amelyben már a 15. héten meg lehet különböztetni a CA1-3 régiókat, stb., míg a neocortexben az első kérgi specializáció jelei a 19. hét körül jelennek meg. A calretinin megtalálható a Cajal-Retzius sejtekben is, tehát amellett, hogy interneuron marker, a kéregfejlődésben szerepet játszó sejteket is vizsgálni lehet vele, pl. Cajal-Retzius sejteket, vagy a subpialis szemcsesejteket. A parvalbumin azonban később jelenik meg az interneuronokban. A magzati korban elvétve van 1-1 sejt a hippocampusban vagy a primér érző vagy mozgató neocortexben. Még a születéskor is csak egyes kéregterületeken, pl. a primér látókéregben található meg nagy számban. Ezzel ellentétben, a neocortikális asszociációs kéregterületeken, mint pl. a temporális kéreg, valamint az Ammon szarv csak 1-2 nagy gátló parvalbumin pozitív neuron figyelhető meg többnyire a sejtestre lokalizálódó festődéssel. A többi kéregterületen és pl. a gyrus dentatusban csak 3 hónapos korban jelennek meg a parvalbumin pozitív sejtek és a felnőtthez hasonló megoszlás, dendritikus és axonális arborizáció csak relatíve később, 7-11 éves gyermekekben észlelhető. A calretinin, calbindin és parvalbumin pozitív sejtek érését összehasonlítva nem találtunk különbséget koraszülött és terminusra született csecsemők között. Az emberi kisagykéregben, a calretinin-pozitív un. unipoláris ecset vagy brush-sejtek megjelenését és fejlődését írtuk le kollaborációban.

Az astrocyták vimentin és GFAP tartalmának vizsgálata során megállapítottuk, hogy az archicortex területén korábban (16-17. gesztációs hét) végbemegy a radiális glia astrocytává történő átalakulása, mint a neocortexben, amely az archicortex gyorsabb differenciálódását jelzi. Szintén az archicortex gyorsabb fejlődésére utal kollaborációban végzett az aquaporinok megjelenésére irányuló vizsgálatunk a fetális agyban. A kamra fal endoteliális sejteiben és az astrogliaon expresszálnak aquaporin-4 sokkal hamarabb jelenik meg a dorzális hippocampusban és az archicortex területén (14. hét), mint a neocortexben (17-18. hét). Míg a dorzális hippocampusban a 14. héten már jelentős aquaporin-4 expresszió figyelhető meg, a ventralis hippocampusban még csak az astrocyta végtalpak pozitívak. Az elkövetkezendő hetekben aquaporin-4-et tartalmazó astrocyták figyelhetők meg. A neocortexben a 17-18. héten

figyelhető meg az aquaporin-4-et tartalmazó gliavégtalpak. Ez arra utal, hogy az agyi vízháztartás (és természetesen az extracelluláris tér összetétele) párhuzamosan változik azzal, ahogy a kérgi specializáció megjelenik. Az aquaporin-1 a plexus chorioideusban jelenik meg már a 14. héten és a chorioideus sejtek egyre erősebb immunreakciót adnak a későbbi hetekben, míg a 18-24. hetekben eléri a születés után tapasztalható aktivitást.

Miután mi írtuk le először, fontosnak tartjuk, hogy a CART-peptid emberben kizárólag a hippokampusz egyetlen neuron-típusát jelöli meg aminek eddig nem volt specifikus markere. Nevezetesen a hilus mohasejtjeiben jelenik meg. Ennek egyelőre az epilepsziás károsodások leírásában láttuk hasznát, annak ellenére, hogy a moha sejtek születés utáni fejlődése, ami csak Golgi módszerrel volt eddig vizsgálható, jól korrelál a kognitív képességek fejlődésével. Annak érdekében, hogy az antitestek specifikusságáról meggyőződjünk majmokban is elvégeztük a CART-pozitív sejtek azonosítását. Itt ugyanazt kaptuk, mint emberben. Hátránya az antitestnek, hogy nagyon érzékeny a szöveti károsodásokra (postmortem elváltozások), ezért gyakorlatilag csak az epilepsziás vagy tumoros műtétilag eltávolított emberi agyon tudjuk vizsgálni. Patkány modellben a fejlődés nem vizsgálható, mert a CART rágcsálókban nem a mohasejteket, hanem a szemcsesejteket jelöli. Azt pedig korábban Golgi módszerrel leírtuk, hogy a moha sejtek az embernél jóval érettebben jelennek meg újszülött majmokban, tehát a majom sem használható modellként.

Azonosított Down szindrómás magzatok esetében a művi terhességmegszakítást általában a 19-20 hetes korokban végzik, ezért ebben a korcsoportban tudtuk elsősorban vizsgálni a sejt képződést, sejt vándorlást illetve a kéreg cytoarchitektónikai elváltozásait. Eddigi eredményeink 5 Down szindrómás és két hasonló korú „kontroll” agyból származnak. A Ki-67 jelölt sejtek számát vizsgáltuk az agykéreg alatti szubventrikuláris zónában, a hippocampus ventrikuláris zónájában, magában a hippokampuszban és a gyrus dentatus hilusában. A normálisan fejlődő agyban, a 19-20 hetes korban még jelentős a sejt képződés úgy az agykérgi germinatív zónában, mint a hippocampusban, ahogy erről korábban már közleményekben beszámoltunk. A Down szindrómás agyban a hilusban és a hippocampus különböző rétegeiben a sejt képződés 20-50%-os csökkenését tapasztaltuk, jelentős szórással. A nagy szórás összhangban van azzal, hogy a Down szindrómás károsodások mértéke igen eltérő lehet. A hippocampus melletti ventrikuláris zónában jóval nagyobb a sejt képződés csökkenése, mintegy 50-60%, és a szórás kicsi. Hasonlóképpen jelentős, de a hippocampusnál kisebb a csökkenés (30-40%) az agykérgi szubventrikuláris zónában. A csökkenés mértéke egyértelműen arra utal, hogy a neuron és gliaképződés a Down szindrómás agyban csökkent. Ennek mértéke azonban nehezen megítélhető, mert a kifejlődött (2-23 éves) Down szindrómás agyak súlya, volumene, valamint a hippocampus sejtszáma mérhetően nem tér el a normálistól. Itt azonban figyelembe kell venni, hogy még a modern stereológiai módszerrel végzett vizsgálatok eredményei is akár 50%

eltérést mutatnak a hippocampus sejtszámában a kontroll agyak esetében!

Vizsgálatainkban 16-20 hetes Down szindrómás és hasonló korú kontroll magzatok (spontán abortusz és művi terhességmegszakítás anyai betegségek miatt) agyát vizsgáltuk, reelin, calretinin, p73, valamint GFAP és vimentin alkalmazásával cresyl viola ellenfestéssel.

A 19-20 hetes Down szindrómás magzatokban az agykéreg körülírt területén durva egyenetlenséget, rendellenes cytoarchitekronikát találtunk a marginális zónában, a későbbi I és II réteg határán. A kéreg sejtjei mélyen benyomulnak a marginális zónába és olyan képződményeket hoznak létre, melyek felnőtt kontroll agyban csak az entorhinális kéregben illetve a presubiculumban található. Emellett a normális fejlődésre nem jellemző sekély sulcusok és polymicrogyriára emlékeztető kis gyrusok megjelenését figyeltük meg. Az eltérések nem az egész neocortex területén láthatóak, hanem többnyire csak a későbbi temporális és parietalis lebenyek területén.

A hippocampusban, az Ammon szarvban és a gyrus dentatusban is láthatóak izolált sejtszigetek, ami sejt-vándorlási zavarra utal. Az érintett területeken az azonosított Cajal-Retzius sejtek szabálytalan eloszlást mutattak. A kontrolltól eltérő gyrusok és sulcusok területén a Cajal-Retzius sejtek száma kevesebb és a radiális glia nyúlványok a normálistól eltérő morfológiát és lefutást mutatnak. Az eredmények arra mutatnak, hogy Down szindróma esetén a sejt-képződés csökkenése mellett a Cajal-Retzius sejtek által irányított idegsejt vándorlási zavar található. Érett Down szindrómás agyban sajnos nem sikerült mindeddig azonosítani a magzati elváltozásoknak megfelelő morfológiai eltéréseket, ezért fel kell tételezni azt is, hogy relatíve kicsi (ezért rejtett) vagy átmeneti, csak korai embrionális korra jellemző elváltozásról van szó.

Megállapítottuk, hogy az emberi agyban a myelinizáció viszonylag későn kezdődik, az első myelinizált axon-kötegek a 35-37. hetekben jelennek meg. A myelinizáció nem egyenletes, leghamarabb a kisagyban, valamint a primér érző és mozgató területeken jelenik meg a myelin, sokkal később a frontális-prefrontális területen. A hippocampusban a myelinizáció a születés körül (38-40 hét) kezdődik, tehát az általunk vizsgálható korai magzati korban a Down szindrómás és kontroll agyakban még nincs myelin, legfeljebb 1-2 jelölt oligodendroglia-sejt. Érdekes módon az interneuronok elhelyezkedésében, számában a jelenleg általunk használt markerekkel nem találtunk különbséget Down szindrómás és azonos korú kontroll agyak között.

További érdekes megfigyelés, ami magzati korban, újszülött korban és felnőtt Down szindrómásokban egyaránt megtalálható, hogy az Ammon szarv CA3 területének piramis-sejt rétege elveszti normális rendezettségét, szinte ektopiás sejtcsoport jellegűt ölt, a dendritek a legkülönbözőbb irányban állnak, tehát feltételezhető, hogy a gyrus dentatus és az Ammon szarv közötti kapcsolatot létrehozó moharost-köteg végződése nem normális. Korábbi patkánykísérleteink (és másoké is) egyértelműen igazolták, hogy a gyrus dentatus és az Ammon szarv kapcsolatának súlyos sérülése (pl. szemcsesejtek hiánya) egyértelmű tanulási zavarral jár.

Feltételezzük tehát, hogy a Down szindrómában talált jelenségnek funkcionális következménye szerepet játszik a szindrómára minden esetben jellemző szellemi retardációnak. Jelenleg vizsgáljuk, hogy a Down szindróma nagyon eltérő funkcionális (mentális zavar) zavar mögött nem állhat-e mozaicizmus, egyes agyterületek épsége, mások betegsége?! Hasonlóképpen mozaicizmus lehet a nagyon eltérő fokú szervi elváltozások és szellemi retardáció oka is. Ezt a kutatást már nem a beszámoló tárgyát képező OTKA grant támogatja.

A Down szindrómára vonatkozó megfigyelések még sehol nem jelentek meg nyomtatásban, legfeljebb abstract formában.

Edward szindrómás esetünk mintegy tíz, Patau szindrómás mindösszesen négy volt az 5 év alatt. Sajnos ezek egy része sem volt eredményes feldolgozható szövettani módszerekkel. Volt néhány fragile-X szindrómás, gyűrűkromozómás, sőt egy 14 kromoszóma triszómiás esetünk is, ami nagyon ritka. Az esetek kis száma miatt ezek közül semmi nem került még közlésre, részben a klinikusokkal történő egyeztetések (estleírás) lassúsága miatt, részben mert a kis esetszám nem engedi meg egy átfogó közlés megjelentetését. Ennek ellenére, leírható, hogy a szövettani eredmények jelentős része újdonság, a nemzetközi irodalomban sem található meg, mert általában a neuropathológiai leírások a szövettani részletekre nem terjednek ki. Érdekes, hogy ebben a csoportban az elváltozások nagyon súlyosak, pl. Patau szindrómában szinte a teljes hippocampus nem ismerhető fel, a neokortex rétegezettsége néhol teljesen eltűnt és sok esetben nincs corpus callosum. Edwards szindrómában az elváltozások ugyancsak súlyosak, valamennyi esetben deformált a hippocampus, erősen csökkent a glutamaterg sejtek száma (szemcses sejtek, piramis-sejtek). A fejlődés során jelentkező Cajal-Retzius sejtek száma és eloszlása is sok helyen mutat jelentős eltérést a kontrolltól. A 14 triszómiás eset is számos szövettani eltérést mutat az archicortexben és neocortexben egyaránt, amiket dokumentálni könnyen lehet. Általában jellemző a neuronszám csökkenése, a normálistól eltérő szöveti rétegezetség, egyes területek komplett hiánya (pl. gyrus dentatus) és a sejt-vándorlás zavarára utaló jelek. Érdekes, hogy a fragile-X szindrómás vagy gyűrűkromozómás esetben is több és jelentősebb szöveti eltérés, mint Down szindróma esetében.