

# Imunohistokemijska i histokemijska obilježja izvanstanične tvari hipokampusa osoba s farmakorezistentnom epilepsijom mezijalnoga temporalnoga režnja

---

Sitaš, Barbara

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:584602>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-23**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Barbara Sitaš**

**Imunohistokemijska i histokemijska  
obilježja izvanstanične tvari  
hipokampusa osoba s  
farmakorezistentnom epilepsijom  
mezijalnoga temporalnoga režnja**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2023.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Barbara Sitaš**

**Imunohistokemijska i histokemijska  
obilježja izvanstanične tvari  
hipokampusu osoba s  
farmakorezistentnom epilepsijom  
mezijalnoga temporalnoga režnja**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditeljice rada: prof. dr. sc. Nataša Jovanov Milošević (mentorica) i doc. dr. sc. Danijela Kolenc (komentorica).

Istraživanje je financirano sredstvima projekata:

1. „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi“, ZCI-Neuro (GA KK.01.1.1.01.0007, voditelj projekta prof. dr. sc. Miloš Judaš);
2. „Moždani izvanstanični matriks u razvitku i perinatalnoj hipoksiji“ (BrainECM) Hrvatske zaklade za znanost (IP-2019-04-3182, voditeljica projekta prof. dr. sc. Nataša Jovanov Milošević);
3. „Diferencijacija slojeva moždane kore čeonog režnja u razvitku ljudskog mozga“, Sveučilišna potpora (10106-22-3116, voditeljica projekta prof. dr. sc. Nataša Jovanov Milošević).



**HrZZ**

Hrvatska zaklada  
za znanost

## SADRŽAJ:

1. UVOD I SVRHA RADA .....	1
1.1. Uvod .....	1
1.1.1. Epilepsija.....	1
1.1.2. Hipokampus: anatomska i histološka građa .....	2
1.1.3. Patohistološke značajke hipokampalne skleroze.....	4
1.1.4. Epileptogeneza u hipokampalnoj sklerozi tip 1 .....	4
1.1.5. Interneuroni .....	5
1.1.6. Izvanstanična tvar.....	5
1.1.7. Perineuronske mreže .....	8
1.1.8. Promjene izvanstanične tvari nakon ozljede .....	10
1.2. Svrha rada .....	13
2. HIPOTEZA .....	14
3. CILJEVI RADA .....	15
3.1. Opći cilj .....	15
3.2. Specifični ciljevi .....	15
4. MATERIJALI I METODE .....	16
4.1. Materijali .....	16
4.2. Metode .....	18
4.2.1. Histološke metode .....	18
4.2.2. Svjetlosna indirektna imunohistokemijska metoda bojenja .....	19
4.2.3. Fluorescentna indirektna imunohistokemijska metoda bojenja .....	19
4.3. Analiza histoloških preparata .....	22
4.3.1. Analiza broja parvalbuminskih neurona .....	22
4.3.2. Analiza ekspresije difuznog i lokaliziranog ECM-a .....	22
4.3.3. Imunofluorescentna analiza.....	23
4.4. Statističke metode.....	23
5. REZULTATI.....	24
5.1. Promjene u ekspresiji molekula ECM-a.....	26
5.2. Promjene obrasca glikozilacije ECM-a u u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1 .	39
5.3. Kvantitativne i kvalitativne promjene parvalbuminskih neurona u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1 .....	44
5.4. Gliozia u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1 .....	50
5.5. Klinički podatci .....	52

5.6.	Korelacija WFA-aktivnosti difuznog ECM-a s kliničkim podacima bolesnika operiranih zbog hipokampalne skleroze tip 1.....	53
6.	RASPRAVA.....	58
6.1.	Razlike ekspresije sastavnica difuznog ECM-a u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1 u odnosu na hipokampuse kontrolnih uzoraka.....	58
6.2.	Perineuronske mreže i razlike u glikozilaciji ECM-a uzoraka hipokampusa zahvaćenih hipokampalnom sklerozom tip 1 u odnosu na hipokampuse kontrolnih uzoraka 61	
6.3.	Promjene parvalbuminskih neurona u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1 u odnosu na kontrolne uzorke hipokampusa .....	63
6.4.	Glioza u hipokampalnoj sklerozi .....	64
6.5.	Ograničenja studije .....	65
6.6.	Primjenjivost rezultata za znanost i klinički rad.....	66
7.	ZAKLJUČCI .....	68
8.	SAŽETAK.....	69
9.	SUMMARY .....	70
10.	POPIS LITERATURE .....	71
11.	ŽIVOTOPIS .....	82

## **Popis oznaka i kratica:**

ADAMTS - dezintegrin i metaloproteinaza s trombospondinskim motivima (engl. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*)

AGG - agrekan

alv - *alveus*

AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina

CA - *cornu Ammonis*

CAM - adhezijske molekule stanica (engl. *cell adhesion molecule*)

CBZ - karbamazepin

CBZ-CR - karbamazepin s produljenim oslobađanjem

CLB - klobazam

CNZ - klonazepam

CS - hondroitin-sulfat

CSPG - hondroitin-sulfatni proteoglikani (engl. *chondroitin sulphate proteoglycans*)

DNET - disembrioplastični neuroepitelni tumor (engl. *dysembryoplastic neuroepithelial tumor*)

ECM - izvanstanična tvar (engl. *extracellular matrix*)

EEG - elektroencefalografija

FCD - fokalna kortikalna displazija (engl. *focal cortical dysplasia*)

FN - fibronektin

GABA - gama-aminomaslačna kiselina (engl. *gamma aminobutyric acid*)

GAG - glikozaminoglikan

GD - *gyrus dentatus*

GFAP - glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. *glial fibrillary acidic protein*)

GFAP-vlakna - vlakna pozitivna na glijalni fibrilarni kiseli protein



gran - granularni sloj

HA - hijaluronska kiselina (engl. *hyaluronic acid*)

HAPLN - hijaluronan i proteoglikan vezujući proteini (engl. *hyaluronan and proteoglycan binding link proteins*)

HAS - sintaza hijaluronske kiseline (engl. *hyaluronan synthase*)

HE - hemalaun-eozin

HS - hipokampalna skleroza

HS1 - hipokampalna skleroza tip 1 (ILAE-klasifikacija)

IHK - imunohistokemija

ILAE - Međunarodna liga protiv epilepsije (engl. *International League Against Epilepsy*)

KBC - Klinički bolnički centar

LEV - levetiracetam

LTG - lamotrigin

MMP - metaloproteinaze matriksa (engl. *matrix metalloproteinases*)

mol - molekularni sloj

MPB - metilfenobarbiton

MR - magnetska rezonancija

MTLE - epilepsija mezijalnog temporalnog režnja (engl. *mesial temporal lobe epilepsy*),

NCAN - neurokan

NeuN - specifični biljeg za neuronsku jezgru (engl. *neuron specific nuclear protein*)

NeuN-neuron - neuron imunoreaktivan na NeuN

NMDA - N-metil-D-aspartat

NRK - nurokirurški zahvat

Otx2 - *orthodenticle homeobox protein 2*

OXC - okskarbazepin

PBS - fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*)

PG - proteoglikan

pir - piramidni sloj

PNN - perineuronske mreže (engl. *perineuronal nets*)

poli - polimorfni sloj

PRM - primidon

PV - parvalbumin

PV- prefiks koji označava pozitivnost na parvalbumin u pojedinim strukturama (neuroni, vlakna, neuropil aksoni i sl.)

Sem - semaforini

so - *stratum oriens*

sr - *stratum radiatum*

sub - subikulum (*subiculum*)

SUL - *sultiam*

SŽS - središnji živčani sustav

TIMP - tkivni inhibitori metaloproteinaza (engl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*)

TN - tenascin

TPM - topiramet

VCAN - versikan

VPA - valproat

WFA - aglutinin dobiven od biljke *Wisteria floribunda* (engl. *Wisteria floribunda agglutinin*)

## 1. UVOD I SVRHA RADA

Epilepsija je jedna od najčešćih kroničnih neuroloških bolesti, a farmakološki rezistentni bolesnici čine znatan udio među oboljelima (1). Dvije trećine farmakorezistentnih bolesnika čine oni sa žarišnom epilepsijom temporalnog režnja, osobito mezijalnog dijela (2). U podlozi epileptičnih napadaja mezijalnoga temporalnoga režnja (engl. *mesial temporal lobe epilepsy* - MTL) 80% bolesnika ima hipokampalnu sklerozu (HS) (2). Većina bolesnika rezistentnih na farmakološku terapiju danas se može uspješno liječiti selektivnim neurokirurškim postupcima (postotak uspješnosti za temporalne epilepsije je od 60 do 80% (3)). Epileptogeneza hipokampalne skleroze složen je proces koji u čovjeka još uvijek nije razjašnjen u potpunosti. Većina današnjih spoznaja o procesu epileptogeneze potječe od eksperimentalnih modela (animalnih modela *in vitro* i *in vivo*). Na temelju literature u procesu epileptogeneze važnu ulogu ima i izvanstanična tvar (engl. *extracellular matrix* - ECM). Stoga je cilj ovoga rada istražiti i prikazati ekspresiju sastavnica ECM-a i promjene te ekspresije u hipokampusu pacijenata koji boluju od farmakorezistentne epilepsije uzrokovane hipokampalnom sklerozom, kako bismo doprinijeli spoznajama o samom procesu epileptogeneze. U konačnici, to bi moglo dati temelje za daljnji razvoj lijekova koji bi djelovanjem na ECM utjecali na proces epileptogeneze.

### 1.1. Uvod

#### 1.1.1. Epilepsija

Epilepsija je jedna od najčešćih neuroloških bolesti ljudi u razvijenim zemljama svijeta (1). Procijenjeno je da oko 50 milijuna ljudi u svijetu boluje od epilepsije (1). Dijagnoza epilepsije postavlja se nakon dva neprovocirana epileptična napadaja koji su se dogodili u vremenskom razmaku duljem od 24 sata. Dijagnozu epilepsije može se postaviti i nakon jednog neprovociranog epileptičnog napadaja, međutim, tada je vjerojatnost ponavljanja napadaja slična općem riziku ponavljanja napadaja nakon dva neprovocirana napadaja. Taj je rizik najmanje 60% tijekom sljedećih 10 godina (1). U tu skupinu ubrajaju se bolesnici sa strukturalnim promjenama mozga (preboljeli cerebralni infarkt, infekcija središnjeg živčanog sustava (SŽS), tumor mozga, kongenitalne malformacije korteksa itd.) te oni s dijagnozom epileptičnog sindroma (1). S patofiziološkog stajališta, epilepsija je paroksizmalni poremećaj funkcije SŽS-a, koji je prema svojem karakteru rekurentan, stereotipan i povezan s

ekscitabilnim, sinkronim i, u početku, ograničenim kortikalnim neuronskim izbijanjima (1). Epileptogeneza je proces kojim određena regija mozga tijekom određenog vremenskog perioda postaje hiperekscitabilna i sposobna spontano generirati epileptične napadaje (1). Prema smjernicama Internacionalne lige protiv epilepsije (*International League Against Epilepsy - ILAE*), iz 2017. godine, epilepsije se prema etiologiji dijele na: genetske, strukturalne, metaboličke, imunološki posredovane, epilepsije uzrokovane infekcijama SŽS-a te epilepsije nepoznate etiologije (1,4). U oko 20 - 40% oboljelih (2) nije moguće postići zadovoljavajuću kontrolu napadaja, unatoč primjeni dvaju antiepileptika te se takvi bolesnici ubrajaju u skupinu tzv. farmakološki rezistentnih bolesnika. Prema definiciji ILAE-a, farmakorezistentni bolesnici uzimaju dva antiepileptika (zasebno ili u kombinaciji), a antiepileptici su odabrani ovisno o vrsti napadaja i bolesnici ih dobro podnose, međutim, usprkos tome, ne može se postići zadovoljavajuća kontrola napadaja (5). Farmakološki rezistentne epilepsije često imaju žarišni početak. Epilepsije temporalnog režnja, ponajprije epilepsije MTLE-a, najčešći su tip žarišnih epilepsija i čine dvije trećine farmakološki rezistentnih epilepsija. U podlozi MTLE-a u 80% slučajeva dijagnosticirana je hipokampalna skleroza (2). Farmakološki rezistentni bolesnici mogu se uspješno liječiti neurokirurškim zahvatom, najčešće selektivnom amigdalohipokampektomijom. Uspješnost ovoga zahvata u prevenciji napadaja nakon operacije je 60 do 80% (3,6).

### 1.1.2. Hipokampus: atomska i histološka građa

Tijekom povijesti mijenjali su se atomski i histološki opisi i klasifikacija za pojedina područja i polja hipokampusa, a time i nazivlja za iste. Neuropatolozi najčešće koriste klasifikaciju koju je 1934. godine koncipirao Lorente de Nó (7), a koju su koristili i Duvernoy i sur. (8) pa se to nazivlje koristi i u ovoj disertaciji. Rafael Lorente de Nó osmislio je klasifikaciju (7) prema kojoj postoje tri regije (*subiculum, cornu Ammonis (CA), gyrus dentatus (GD)/fascia dentata*) koje sadrže devet različitih polja (*parasubiculum, presubiculum, subiculum proper, prosubiculum, CA1 - CA4 i fascia dentata*). Hilus (dio *cornu Ammonis* smješten u udubljenju *gyrus dentatus*) izvorno je opisivan drugim terminima: area H5 (9), CA4 (7), ili polimorfna zona i bilo je diskutabilno treba li dio između granularnog sloja *gyrus dentatus* i CA3 biti jedan ili više slojeva, ili polja (za detalje vidjeti (10–12)).

*Cornu Ammonis (CA)* ili Amonov rog čini značajan dio hipokampusa i u njemu se razlikuju sljedeća citoarhitektonska polja (areje) CA1, CA2, CA3 i CA4. Iako je nominalno

hipokampalna kora troslojna, unutar polja CA1 - CA3 razlikuje se šest slojeva: *alveus*, *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum radiatum*, *stratum lacunosum* i *stratum moleculare*. U *stratum oriens* nalaze se košarasti interneuroni (engl. *basket cells*) i bazalni dendriti piramidnih neurona. Piramidni sloj (*stratum pyramidale*) sastoji se od piramidnih neurona koji su bazom okrenuti prema *stratum oriens* i u njega pružaju bazalne dendrite, dok se apikalni dendrit pruža cijelom duljinom sve do *stratum moleculare*. Piramidni neuroni okruženi su aksonima košarastih interneurona, imaju dendritičke trnove, svi su ekscitacijski i njihov je neurotransmitter glutamat. Veličina i oblik piramidnih neurona razlikuju se ovisno o tome kojem polju područja *cornu Ammonis* (CA1 - CA4) pripadaju. Piramidni sloj polja CA1 najširi je, neuroni su tipično piramidnog oblika i raspršeni. Piramidni sloj polja CA2 sastoji se od gušće poredanih piramidnih, iako oblikom često ovalnih, neurona. Piramidni neuroni polja CA3, koje se nalazi na zavoju ili koljenu područja *cornu Ammonis*, slični su onima u polju CA2, ali su manje zbijeni. U polju CA3 kolaterale piramidnih neurona oblikuju značajan sustav intrakortikalnih veza, tzv. Schafferove kolaterale. Polje CA4 smješteno je u hilusu *gyrus dentatus*. Tijela neurona polja CA4 su ovalna, velika i raspršena među mahovinastim vlaknima (engl. *mossy fibers*) znatih stanica *gyrus dentatus* (8).

Zubata vijuga ili *gyrus dentatus* odvojena je od *cornu Ammonis* pukotinom *fissura hippocampi*. Sastoji se od molekularnog sloja (*stratum moleculare*), znatog (granularnog) sloja (*stratum granulosum*) i polimorfnog sloja (*stratum multiforme*). Granularni sloj odgovara piramidnom sloju *cornu Ammonis*, a sastoji se od neurona čija su tijela okrugla i gusto zbijena. Njihovi aksoni su mahovinasta vlakna koja prolaze polimorfni sloj i polje CA4 te završavaju na piramidnim neuronima polja CA3, formirajući u polju CA3 poseban podsloj *stratum lucidum*. Pojedinačni bazalni dendriti neurona znatog sloja *gyrus dentatus* odlaze prema molekularnom sloju koji se, uglavnom, sastoji od vlakana različitih puteva.

Hipokampus je opsežno povezan s ostalim limbičkim i paralimbičkim, kortikalnim i subkortikalnim strukturama te s hipotalamusom. Glavnina veza *cornu Ammonis* i *gyrus dentatus* s kortikalnim strukturama odvija se preko entorinalnog polja parahipokampalne vijuge kao mjestom ulaza veza i subikuluma kao mjestom njihova izlaza. Tijek signala kroz hipokampus odvija se trisinaptičkim putem glavnim unutarnjim neuronskim krugom. Prvi neuroni u tom krugu su piramidni neuroni II. i III. sloja entorinalnog korteksa čiji aksoni oblikuju perforantni put i završavaju na dendritima neurona znatog sloja *gyrus dentatus* (drugi neuron). Aksoni neurona znatog sloja sinaptički završavaju na apikalnim dendritima piramidnih neurona polja CA3. Aksoni piramidnih neurona u polju CA3 daju Schafferove

kolaterale koje završavaju sinapsama na apikalnim dendritima neurona u polju CA1 čiji se aksoni, uglavnom, projiciraju u subikulum. Aksoni neurona subikuluma projiciraju se u entorinalno polje. Glavni regulatorni neuroni hipokampusa su GABA-ergični (gama-aminomaslačna kiselina, engl. *gama-aminobutyric acid* - GABA) inhibicijski interneuroni (košarasti) koji su većim dijelom smješteni u *cornu Ammonis*, ali ih ima i u *gyrus dentatus*. Interneuroni su u *cornu Ammonis* uglavnom smješteni u sloju *stratum oriens*, iako se mogu naći i u ostalim slojevima, dok su u *gyrus dentatus* smješteni u molekularnom i polimorfnom sloju. Interneurone inerviraju piramidni neuroni *cornu Ammonis* na koje djeluju povratnom spregom, formirajući oko njihovih tijela mrežu poput košarice. U *gyrus dentatus* košarasti interneuroni inervaciju primaju od kolaterala mahovinastih vlakana, a povratno djeluju na stanice zrnatog sloja *gyrus dentatus* (13).

#### 1.1.3. Patohistološke značajke hipokampalne skleroze

Glavne patohistološke promjene u hipokampalnoj sklerozi jesu gubitak piramidnih neurona u poljima CA1 - CA4, razvoj glioze te promjene u *gyrus dentatus*: gubitak stanica zrnatog sloja, disperzija zrnatog sloja te aberantno grananje mahovinastih vlakana (14). Sve navedene značajke nisu uvijek uočljive (ili jednako izražene) pa se prema ILAE-klasifikaciji iz 2013. godine (14) razlikuju četiri tipa hipokampalne skleroze. U hipokampalnoj sklerozi tip 1 gubitak piramidnih neurona i gliozna najizraženiji su u poljima CA1 i CA4. Za tip 2 karakterističan je dominantni gubitak piramidnih neurona u polju CA1, dok je za tip 3 karakterističan najveći gubitak piramidnih neurona u polju CA4. Obilježje hipokampalne skleroze tip 4 jest izražena gliozna bez gubitka piramidnih neurona.

#### 1.1.4. Epileptogeneza u hipokampalnoj sklerozi tip 1

U procesu epileptogeneze postoji neravnoteža između ekscitacijskih i inhibicijskih neuronskih krugova. Većina današnjih spoznaja o epileptogenezi potječe iz studija na animalnim modelima. Prema hipotezi rekurentne ekscitabilnosti epileptična izbijanja u HS1 posljedica su hiperekscitabilnosti stanica zrnatog sloja područja *gyrus dentatus*, što je posljedica aberantnog grananja mahovinastih vlakana. U normalnim okolnostima mahovinasta vlakna (ekscitacijska vlakna) stvaraju sinapse sa stanicama u polju CA4 (ekscitacijska vlakna za košaraste interneurone koji su inhibicijski) i piramidnim neuronima polja CA3. U slučaju

aberantnog grananja, mahovinasta vlakna pronađena su u zrnatom i unutarnjem molekularnom sloju, što vodi nastajanju ponavljajućeg ekscitacijskog kruga (15). S druge strane, nastaju promjene u GABA-ergičkim interneuronskim krugovima, što rezultira nedostatnom inhibicijom, poremećenom sinkronizacijom interneuronske inhibicije i prekomjernom ekcitatibilnošću piramidnih neurona (15).

#### 1.1.5. Interneuroni

Interneuroni hipokampusa čine 10 - 15% ukupne populacije neurona (16). Njihov je neurotransmiter GABA i oni imaju važnu funkciju - regulaciju neuronskih krugova. Glavnu ulogu imaju u kontroli aktivnosti piramidnih neurona putem *feedback-* i *feedforward-*inhibicije (17,18), a važni su i za sinkroniziranu aktivnost neuronskih krugova (19–21). Za razliku od glutamatergičnih piramidnih neurona, koji se nalaze samo u piramidnom sloju, interneuroni su rasprostranjeni u gotovo svim slojevima. Njihovi aksoni mogu biti ograničeni na sloj u kojem se nalazi njihovo tijelo i dendriti, ili se mogu pružati do velikih udaljenosti. Aksoni im mogu završavati na točno određenom mjestu, poput tijela ili proksimalnih dendrita neurona koje inerviraju, ili mogu istovremeno inervirati dendrite različitih neurona. Na taj način gotovo svi dijelovi njihovih ciljnih stanica bivaju pokriveni, ali od različite subpopulacije interneurona, što upućuje na njihove različite funkcije: svaka podgrupa interneurona ima drugu funkciju inervirajući različite dijelove ciljnih stanica (16). Veoma značajni za proces epileptogeneze pokazali su se interneuroni koji sadrže parvalbumin (PV-interneuroni) (22–25). Ovisno o tome koju regiju piramidnih neurona inhibiraju, razlikujemo košaraste PV-interneurone (engl. *basket cells*) koji primarno inerviraju tijelo i proksimalne dendrite (akso-somatska inhibicija) i PV-interneurone oblika svijećnjaka (engl. *chandelier cells*) koji inerviraju početne dijelove aksona (akso-aksonska inhibicija) (26). Poznato je da u hipokampusu bolesnika s MTLE-om dolazi do promjene morfologije i gubitka PV-interneurona (22–25,27,28).

#### 1.1.6. Izvanstanična tvar

ECM središnjeg živčanog sustava značajno se razlikuje od ECM-a drugih tkiva, iako se pojedine njegove sastavnice nalaze i u drugim tkivima. ECM središnjeg živčanog sustava pretežno se sastoji od hijaluronske kiseline (engl. *hyaluronic acid*, HA), različitih lektikana, prije svega hondroitin-sulfatnih proteoglikana (engl. *chondroitin sulphate proteoglycans*, CSPG), tzv. veznih proteina i tenascina, dok molekula ECM-a, poput fibronektina i kolagena,

koje su u drugim vrstama tkiva visokozastupljene, ima tek u neznatnoj mjeri (29–34). Komponente ECM-a sintetiziraju i izlučuju neuroni i glijalne stanice (35).

Hijaluronska kiselina središnji je slobodni glikozaminoglikan ECM-a koji se sastoji od ponavljajućih disaharidnih jedinica glukuronske kiseline i N-acetilglukozamina. U usporedbi s drugim glikozaminoglikanima hijaluronska kiselina strukturalno je jednostavnija, nije sulfatirana i glukuronska kiselina nije epimerizirana. Sintetizira je hijaluronan sintaza (HAS), lokalizirana s unutarnje strane stanične membrane (36).

Proteoglikani su složene molekule koje na središnji protein imaju kovalentno vezan barem jedan glikozaminoglikanski lanac. Glikozaminoglikani su dugi nerazgranati polimeri disaharidnih jedinica (20-200) koji se sastoje od uronske kiseline (glukuronske ili idouronske) ili galaktoze te aminošećera (N-acetilglukozamin ili N-acetilgalaktozamin) (36). Ovisno o kombinaciji šećera razlikujemo heparan-, keratan-, hondroitin- i dermatan- sulfate (29,37,38).

Lektikani su obitelj proteoglikana koji su značajno zastupljeni u mozgu, a zajedničko im je da specifično vežu lektine pa zato i nose naziv lektikani. U mozgu sisavaca najzastupljenija su četiri lektikana: agrekan (39), versikan (40), neurokan (41) i brevikan (42,43). Međusobno se razlikuju po središnjem proteinu i po broju hondroitin-sulfatnih lanaca vezanih na središnji protein. Dok se neurokan i brevikan nalaze isključivo u SŽS-u, ostali lektikani pronađeni su i u drugim tkivima (44). Strukturalnoj raznolikosti dodatno doprinosi i alternativno prekrajanje središnjeg proteina zbog kojeg, na primjer, razlikujemo četiri izoforme versikana (V0 - V3) (36). Lektikani se svojom N-terminalnom domenom vežu za hijaluronsku kiselinu, a O-terminalnom domenom vežu se za ostale molekule ECM-a i molekule na površini stanica te tako povezuju hijaluronsku kiselinu, okosnicu ECM-a, s ostalim molekulama ECM-a i molekulama na površini stanica. Na taj način lektikani služe kao svojevrsan most između ECM-a i stanica, odnosno oni su tzv. organizatori ECM-a (44). Poznato je da neki lektikani, između ostaloga, imaju ulogu u promociji ili inhibiciji rasta neurita i/ili migraciji neurona i glijalnih stanica (44).

Vezni proteini (engl. *link proteins*) bitna su sastavnica ECM-a, budući da pojačavaju vezu između hijaluronske kiseline i proteoglikana. Oni, stoga, i nose zajednički naziv proteini koji vežu hijaluronsku kiselinu i proteoglikane (engl. *hyaluronan and proteoglycan binding link proteins*, HAPLN) (45). U obitelji ovih pomoćnih proteina za sada su poznata četiri člana: HAPLN1/Ctr11, HAPLN2/Bar11, HAPLN3/Lp3, HAPLN4/Bar12. U SŽS-u su izraženi samo HAPLN2 i HAPLN4 (46,47).



Tenascini (TN) su glikoproteini koji se također ubrajaju u značajne sastavnice ECM-a mozga. U sisavaca razlikujemo TN-C, TN-R, TN-X, TN-W(-N) od kojih su TN-C i TN-R eksprimirani u SŽS-u (36). Oni se vežu za proteine na površini stanica (integrini i adhezijske molekule stanica (engl. *cell adhesion molecule*, CAM)), ili za druge molekule ECM-a (lektikani, fosfokan) (36).

U pregradnji ECM-a tijekom razvoja ili nakon ozljede, sudjeluju proteinaze, od kojih su najpoznatije metaloproteinaze matriksa (engl. *matrix metalloproteinases*, MMP) i osobito ADAMTS (dezintegrin i metaloproteinaza s trombospondinskim motivima, engl. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*). Za razgradnju lektikana primarno su zaslužni ADAMTS (36), dok metaloproteinaze matriksa imaju bitnu ulogu u razgradnji tenascina, veznih proteina, faktora rasta, citokina, membranskih receptora, ostalih proteinaza, adhezijske molekule stanica i dr. (48). Sve proteinaze izlučuju se u inaktivnom obliku i za aktivaciju trebaju druge proteinaze. Aktivnost proteinaza strogo je regulirana tkivnim inhibitorima metaloproteinaza (engl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMP), TIMP 1 - 4 za metaloproteinaze matriksa i TIMP-3 za ADAMTS (36).

Metaloproteinaze matriksa su topive ili vezane za membranu (48). U ljudi 23 gena kodiraju za 24 različite metaloproteinaze matriksa, koje nose naziv prema rednim brojevima. U mozgu čovjeka najviše su izražene MMP-2 i MMP-9 (48). Sve metaloproteinaze matriksa posjeduju N-terminalni signalni peptid, autoinhibirajuću predomenu i katalitičku domenu. Većina ih ima terminalnu hemopeksinsku C-domenu koja doprinosi specifičnosti djelovanja zahvaljujući interakciji ove domene sa supstratom (48).

U ADAMTS-skupini razlikujemo 19 različitih proteinaza koje se grupiraju ovisno o supstratu koji kidaju (49–51): proteoglikani (ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15, -20), prokolageni (ADAMTS-2, -3 i -14) i von Willebrandov faktor (ADAMTS-13). Između domene N- i terminalne C-domene imaju sljedeće dijelove: peptidni signal, pro-domenu, metaloproteinaznu domenu koja veže cink, domenu sličnu dezintegrinu, trombospondinsku domenu, domenu bogatu cisteinom, *spacer*-domenu i promjeniv broj trombospondinskih motiva na C-terminalnom kraju (52,53).

Sastav i količina ECM-a u SŽS-u mijenjaju se tijekom razvoja i moždani ECM tek postnatalno doseže maturirani, zreli oblik. Tako ECM čini 60 - 40% volumena prenatalnog moždanog tkiva, dok je to u mozgu odrasle jedinke tek 20% (54). ECM mozga u razvoju (tzv. juvenilni ECM) sastoji se uglavnom od hijaluronske kiseline, neurokana, versikana V0, versikana V1, TN-C i

HAPLN1/Ctrl1 (55–57). U perinatalnom razdoblju počinje značajna reorganizacija ECM-a tijekom koje se ECM zamjenjuje zrelim (57) te od izrazito hidriranog oblika (zbog visokog udjela hijaluronske kiseline) postaje značajno čvršća i organiziranija struktura. Naime, dolazi do izmjene molekula pa sada u zreлом tipu ECM-a prevladavaju versikan V2, agrekan, brevikan, fosfokan, TN-R, HAPLN2/Bar11 i HAPLN4/Bar12 (46,47,56,58,59). Različite kombinacije lektikana i proteina vezanih uz hijaluronsku kiselinu, TN-R i fosfokana, na određenim mjestima, formiraju organizirane kondenzirane strukture poznate kao perineuronske mreže (engl. *perineuronal nets*, PNN) (36). Oblici ECM-a u SŽS-u su: (1) slobodni (difuzni) ECM, (2) perineuronske mreže, (3) perisinaptički ECM u neuropilu, (4) ECM bazalne lamine te (5) perinodalni ECM oko Ranvierovih čvorova (60–62). U ovom radu obratili smo posebnu pažnju i na perineuronske mreže.

#### 1.1.7. Perineuronske mreže

Perineuronske mreže su strukture ECM-a koje poput mreže obuhvaćaju tijela, dendrite i početne dijelove aksona (početni aksonski segment, engl. *axon initial segment*) različitih neurona u SŽS-u. Prvi ih je opisao Camillo Golgi još 1890-ih godina, kao osjetljive pokrivače koji obuhvaćaju tijela i nastavke neurona. No, njegovo je otkriće osporio Santiago Ramon y Cajal nazvavši ih eksperimentalnim artefaktom pa su tako, na neko vrijeme, pale u zaborav. Njihovo postojanje potvrđeno je 1970-ih godina dolaskom suvremenih metoda bojenja tkiva i označavanja molekula. U središtu pozornosti i proučavanja ponovno su tek 2002. godine (63), kao rezultat suradnje dr. Jamesa Fawcetta (koji se bavio oporavkom ozljeda kralježnične moždine) i dr. Tomassa Pizzorussoa (koji je proučavao kritična razdoblja plastičnosti u vidnom sustavu). U tom je radu otkrivena uloga perineuronskih mreža u zatvaranju kritičnog razdoblja plastičnosti koje se u mozgu odraslog čovjeka može reaktivirati enzimskim uklanjanjem perineuronskih mreža (64) Činjenica da perineuronske mreže doprinose plastičnosti tijekom kritičnog razdoblja u vidnom, motoričkom i somatosenzornom sustavu pokazana je u radovima (64–66). Zrele perineuronske mreže pojavljuju se u kasnom prenatalnom i ranom postnatalnom razdoblju u korteksu, kralježničnoj moždini i hipokampusu (67–72). Njihova pojava podudara se sa zatvaranjem kritičnog razdoblja plastičnosti. Kritično razdoblje tijekom razvoja period je u kojem okolišni čimbenici imaju najveći utjecaj na obilježja neurona, anatomiju i fiziologiju. Tijekom kritičnog razdoblja veoma je važna ispravna stimulacija neurona kako bi se stabilizirale sinapse i, u konačnici, nastao funkcionalni SŽS (73–75). Perineuronske mreže

doprinosu zatvaranju kritičnog perioda tako što u mozgu odraslog čovjeka obuhvaćaju zrele sinapse koje dodatno stabiliziraju, zbog čega su one tada podložne vrlo maloj reorganizaciji (64,68,76,77).

Perineuronske mreže u različitim regijama mozga primarno se nalaze oko brzooskidanjućih (*fast-spiking*) GABA-ergičkih interneurona koji proizvode proteine koji vežu kalcij, kao što je parvalbumin (78–80). No, možemo ih naći i oko drugih neurona, npr. glutamatergičnih neurona (81–85), koji mogu biti pozitivni ili negativni na parvalbumin (82,83).

Glavne sastavnice perineuronskih mreža su hijaluronska kiselina, sintaza hijaluronske kiseline (engl. *hyaluronan synthase*, HAS), lektikani, vezni proteini (HAPLN) i TN-R (44). Sastav lektikana perineuronskih mreža razlikuje se unutar pojedine regije i između različitih regija SŽS-a (86,87). Agrekan je gotovo uvijek sastavni dio perineuronskih mreža i smatra se da je upravo on ključan za njihov nastanak i stabilnost (88). Različiti oblici sulfatacije, mijenjajući naboj CS-lanaca, utječu na potencijal vezanja i time na ulogu CSPG-a. Obrasci sulfatacije perineuronskih mreža razlikuju se od onih u difuznom (89–91) ECM-u, a razlike su uočljive i između perineuronskih mreža različitih populacija neurona (92). Za funkciju i sazrijevanje perineuronskih mreža bitnu ulogu imaju molekule iz obitelji Semaforina (Sem) te transkripcijski faktor Otx2 (engl. *orthodenticle homeobox protein 2*). Semaforin 3A veže se za glikozaminoglikanske lance CSPG-a i tako utječe na funkciju, smanjujući sinaptičku plastičnost (35). Otx2 važan je za sazrijevanje i stabilizaciju perineuronskih mreža, ima visok afinitet vezanja za hondroitin-6-sulfate u perineuronskim mrežama (93,94). Otx2 u velikoj mjeri internaliziraju stanice oko kojih se nakon toga stvaraju perineuronske mreže, a njegovo nakupljanje potom dodatno potiče i njihovo sazrijevanje. Blokiranjem ili gubitkom Otx2 destabiliziraju se perineuronske mreže i time se može reaktivirati plastičnost odraslog mozga (93).

Obrasci sulfatacije hondroitin-sulfata mijenjaju se tijekom sazrijevanja SŽS-a. Tijekom razvoja prevladava 6-sulfatni oblik, kojeg po rođenju ima tek 18%, a 4-sulfatnog oblika 60%. Njihov se omjer mijenja i na kraju kritičnog razdoblja kad je 4-sulfatnog oblika 94% (89,95,96).

Sazrijevanjem SŽS-a postupno se mijenjaju pojedine sastavnice i značajke perineuronskih mreža (veličina, obrasci sulfatacije, količina CSPG-a, količina hijaluronske kiseline, kao i količina veznih proteina), što, vjerojatno, utječe na njihovu strukturalnu organizaciju (97). Pri tome se mijenja i morfologija perineuronskih mreža. Iz zrnatog (rahljijeg) uzorka tijekom ranog

postnatalnog razdoblja prelaze u retikularni (mrežasti) oblik (98). Mehanizam kojim promjena strukture utječe na funkciju perineuronskih mreža i dalje nije poznat, međutim, pretpostavlja se da zrnatije perineuronske mreže slabije stabiliziraju sinapse, kontroliraju održavanje ionske ravnoteže te odbijaju dolazeće (nove) sinapse (99).

Točna uloga perineuronskih mreža još uvijek nije dovoljno razjašnjena: u čovjeka se razvijaju kasno tijekom prenatalnog i tijekom postnatalnog razdoblja, dok je u glodavaca njihov razvoj postnatalni. Pretpostavlja se da stabiliziraju sinapse, regulirajući time sinaptičku plastičnost. Membranski receptori za perineuronske mreže povezuju komponente ECM-a sa staničnim citoskeletom i tako utječu na interakcije neurona i astrocita (64,100,101). Na neurone oko kojih se nalaze djeluju protektivno, kontrolirajući difuziju kationa i drugih molekula, čime reguliraju njihov mikrookoliš i osiguravaju njihovu normalnu funkciju (35). Jednom kad su zrele sinapse uspostavljene i okružene perineuronskim mrežama, one su stabilne i manje podložne reorganizaciji u mozgu odrasle jedinke (77,102).

#### 1.1.8. Promjene izvanstanične tvari nakon ozljede

ECM je tijekom razvoja bitan za proliferaciju i migraciju stanica, navođenje aksona, formiranje i stabilizaciju sinapsi. Sazrijevanjem i promjenom sastava ECM inhibira većinu razvojnih procesa i sinaptičku plastičnost (44,103,104). Primijećeno je da u različitim patološkim stanjima dolazi do promjena u sastavu ECM-a: s jedne strane dolazi do reekspresije razvojnih sastavnica ECM-a, dok je s druge strane povećana aktivnost i ekspresija specifičnih proteaza - uslijed čega dolazi do reorganizacije ECM-a. Posljedica toga je nastanak ECM-a koji omogućuje povećanu sinaptičku plastičnost i regeneraciju nakon ozljede (61,105,106).

Poznato je da su u epilepsiji poremećeni odnos i ravnoteža aktivnosti ekscitacijskih i inhibicijskih krugova. Dosadašnje spoznaje o epileptogenezi i ECM-u većim se dijelom temelje na rezultatima dobivenim na eksperimentalnim animalnim modelima epilepsije. U takvih je modela u SŽS-u odrasle jedinke promijenjen sastav ECM-a: povećana je ekspresija neurokana i hijaluronske kiseline, promijenjena je ekspresija fosfokana, a smanjena agrekana. Nadalje, smanjen je i broj perineuronskih mreža i njihovih gradivnih elementa (HAS3 i HAPLN) te je povećana aktivnost i ekspresija proteaza (107) U tabl. 1 prikazan je pregled dosadašnjih spoznaja o promjenama ECM-a u epilepsiji.

**Tablica 1.** Pregled spoznaja o promjenama ECM-a u epileptogenezi

MOLEKULA	PROMJENE U EKSPRESIJI	VRSTA	IZVOR
tenascin C	povećana ekspresija	odrastao miš	Heck i sur. (108)
tenascin R	povećana ekspresija	nije poznato	Dityatev (61)
hijaluronska kiselina	veća količina nevezane, slobodne hijaluronske kiseline	odrastao čovjek	Perosa i sur. (109)
		<i>in vitro</i>	Bausch (108)
Fosfokan	povećana ekspresija u <i>gyrus dentatus</i> , smanjena ekspresija perineuronskih mreža koje ga sadrže	odrastao miš	Heck i sur. (108)
		odrastao štakor	Okamoto i sur. (110)
neurokan	povećana ekspresija, reekspresija	odrastao miš	Heck i sur. (108)
		štakor (od ranog postnatalnog razdoblja do odrasle dobi)	Kurazono i sur. (110)
		odrastao štakor	Matsui i sur. (118)
Agrekan	smanjena ekspresija	odrastao štakor	McRae i sur. (107)
MMP-9	povećana ekspresija	odrastao miš	Wilczynski i sur. (111)
tkivni aktivator plazminogena	povećanje ekspresije	odrastao štakor	Yepes i sur. (112)
HAS, HAPLN	smanjena ekspresija	odrastao štakor	McRae i sur. (107)
perineuronske mreže	povećana razgradnja	odrastao štakor	McRae i sur. (107), Rankin-Gee i sur. (113)
ADAMTS 4	povećana ekspresija	odrastao štakor	Yuan i sur. (114)
CS	povećana količina	odrastao čovjek	Perosa i sur. (109)

Uloga ECM-a u epilepsiji dodatno je potvrđena istraživanjima koja su koristila *knock-out*-modele za pojedine molekule (115,116) ili proteaze (111,112). Pojedini radovi na animalnim modelima glodavaca ukazuju na to da u epilepsiji dolazi i do ponovne ekspresije molekula i obrazaca sulfatacije koji su karakteristični za mozak u razvoju (108,117–119). Veoma značajne pokazale su se upravo perineuronske mreže. Većina studija na odraslim glodavcima pokazala je da nakon induciranja epileptičnih napadaja dolazi do pojačane razgradnje perineuronskih mreža (113) i smanjene ekspresije nekih njihovih gradivnih elemenata (HAS3, HAPLN) (107). *Knock-out*-modeli za specifične proteaze usmjerene na kidanje perineuronskih mreža pokazali su da je u tom slučaju očuvano njihovo postojanje (111). Ueno i sur. (120) uočili su suprotan učinak - nakon induciranja epileptičnih napadaja u hipokampusu odraslog miša došlo je do povećanja broja perineuronskih mreža. Rankin-Gee i sur. (113) pokazali su da razgradnja perineuronskih mreža u odraslih štakora različito utječe na učestalost i težinu epileptičnih napadaja, ovisno o njihovoj semiologiji (perineuronske mreže nemaju jednak utjecaj na sve epileptične napadaje). Iz svega navedenoga može se zaključiti da spoznaje o ulozi perineuronskih mreža u procesu epileptogeneze nisu potpune ni jednoznačne, no sve govore o složenoj ulozi ECM-a, koja je i dalje nedovoljno razjašnjena. Radova koji su ispitivali ECM na humanom materijalu tek je nekoliko. Tako su Perosa i sur. u svojim radovima (109,121) u hipokampusima bolesnika s MTLE-om pokazali povećanu koncentraciju hijaluronske kiseline i hondroitin-sulfata, dok su Cudna i sur. (122) utvrdili porast razine MMP-9 u serumu bolesnika nakon generaliziranih toničko-kloničkih napadaja. Nadalje, Rogers i sur. (123) nisu našli smanjenje ni druge promjene perineuronskih mreža u uzorcima bolesnika operiranih zbog epilepsije različite etiologije u odnosu na kontrolne uzorke.

## 1.2. Svrha rada

Uzevši u obzir sve navedeno, ECM je uključen u proces epileptogeneze. S obzirom na to da se većina naših spoznaja o ulozi ECM-a u epileptogenezi temelji na eksperimentalnim modelima, koji ponekad pokazuju i oprečne rezultate i prema kojima se modulacija aktivnosti proteaza pokazala kao potencijalni izvor novih terapijskih opcija, svrha ovoga rada je prikazati obrazac ECM-a na humanom uzorku s ciljem pružanja boljeg uvida u ovu problematiku te kao temelj i mogući poticaj za razvoj budućih terapijskih postupaka.

## 2. HIPOTEZA

Sastav izvanstanične tvari hipokampusa osoba s farmakorezistentnom epilepsijom promijenjen je u smjeru intenzivnije ekspresije juvenilnih oblika molekula ECM-a.



### 3. CILJEVI RADA

#### 3.1. Opći cilj

Utvrđiti značajne razlike u ekspresiji molekula ECM-a u uzorcima hipokampusa osoba s farmakorezistentnom epilepsijom u odnosu na kontrolne uzorke histološki urednog hipokampusa osoba bez poznatih neuroloških ili psihijatrijskih poremećaja.

#### 3.2. Specifični ciljevi

1. Prikazati ekspresiju te analizirati arealnu i laminarnu raspodjelu proteoglikana (neurokana, brevikana, versikana, agrekana, fosfokana) i glikoproteina hipokampusa (TN-C, TN-R) osoba s farmakorezistentnom epilepsijom u odnosu na neuropatološki nepromijenjeni hipokampus čovjeka.

2. Prikazati ekspresiju te analizirati arealnu i laminarnu raspodjelu perineuronskih mreža hipokampusa osoba s farmakorezistentnom epilepsijom u odnosu na neuropatološki nepromijenjen hipokampus čovjeka.

3. Prikazati koekspresiju glikoproteina i proteoglikana s biljezima različitih staničnih populacija.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Materijali

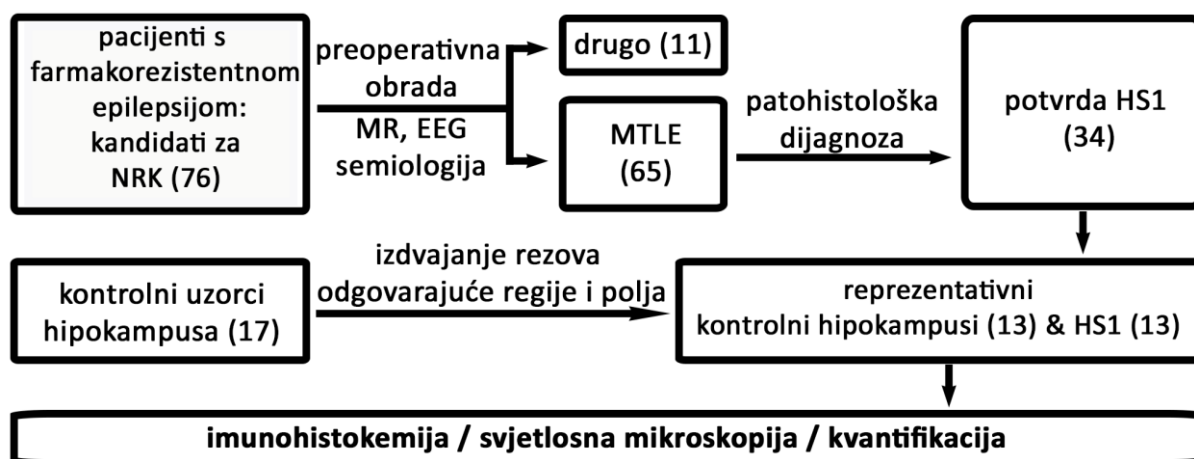
Za histokemijsku i imunohistokemijsku analizu korišten je arhivski materijal Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Zagreb. Korištenje navedenih arhivskih uzoraka, kao i cijelo istraživanje, odobrilo je Etičko povjerenstvo KBC-a Zagreb (12. 7. 2017.; KLASA: 8.1-17/142-2 broj 02/21AG) i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (MFSZ 380-59-1016-19-111/210). Svi bolesnici preoperativno su obrađeni u Referentnom centru Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske za epilepsiju, na Odjelu za epilepsije i paroksizmalne poremećaje svijesti Klinike za neurologiju KBC-a Zagreb, prema standardnom protokolu (124). U periodu od 2011. do 2018. godine zbog farmakološki rezistentne epilepsije sa žarišnim početkom operirano je ukupno 76 bolesnika (tabl. 2, sl. 1). Svi su operirani u Klinici za neurokirurgiju KBC-a Zagreb. Na temelju preoperativne obrade (semiologija, EEG, MR) i postoperativnog nalaza patohistološke analize isključeni su pacijenti u kojih je verificirana fokalna kortikalna displazija i druge malformacije korteksta te pacijenti s tumorom, encefalitisom, ishemijskom, traumom ili vaskularnim oštećenjima (tabl. 2, sl. 1). Od ukupnog broja pacijenata, 65 pacijenata imalo je dijagnosticiran MTLE te su podvrgnuti selektivnoj amigdalohipokampektomiji. Postoperativno su, na temelju patohistološkog nalaza, uzorci 34 pacijenta klasificirani prema ILAE-klasifikaciji kao hipokampalna skleroza tip 1 (HS1). Navedeni uzroci HS1 obrađeni su standardnim postupkom za fiksaciju tkiva (v. poglavlje 4.2) i rezani u koronarnoj ravnini. Nadalje, obojeni su hemalaun-eozinom (HE) i dvama imunohistokemijskim biljezima - specifičnim biljekom za neuronsku jezgru (engl. *neuron specific nuclear protein* - NeuN) i glijalnim fibrilarnim kiselim proteinom (engl. *glial fibrillary acidic protein* - GFAP), nakon čega su prema sljedećim kriterijima odabrani reprezentativni uzorci koji su dalje analizirani: i) orijentacija u koronarnoj ravnini, ii) postojanje područja *gyrus dentatus* i polja CA1 - CA4 te susjednih polja subikuluma; iii) kvaliteta i cjelovitost tkiva. Nakon inicijalnog odabira, u postupak daljnje analize uključeno je 13 uzoraka za ekspresiju imunohistokemijskih biljega ECM-a (tabl. 3) i specifičnih biljega neurona (parvalbumin, PV) (tabl. 3). Sl. 1 prikazuje dizajn studije s naznačenim brojem uzoraka u svim fazama istraživanja. Klinički podatci o pacijentima prikupljeni su iz povijesti bolesti i obrađeni anonimno.

Uzorci hipokampalnog tkiva korišteni za usporedbu s uzorcima HS1 (kontrolni uzorci) prikupljeni su tijekom rutinskih obdukcijskih postupaka u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb. Kontrolnu skupinu uzoraka činilo je 17 hipokampusu s postmortalnim vremenom (od smrti do uranjanja uzorka hipokampalnog tkiva u fiksativ) kraćim od 48 sati.

Da bi se određeni uzorak razmatrao i odabrao kao kontrolni uzorak trebali su biti zadovoljeni sljedeći uvjeti: i) da nema vidljivih histoloških promjena (HE-bojenje) koje bi bile posljedica druge bolesti SŽS-a ili stanja (npr. ishemija) koje mogu uzrokovati promjene u hipokampusu, ii) da lokacijom i orijentacijom odgovara uzorcima HS1 iii) da su polja CA1 - CA4, područje *gyrus dentatus* te susjedno polje *subiculum* cjeloviti u koronarnom presjeku i jasno prepoznatljivi (sl. 1). U konačnu komparativnu analizu ekspresije biljega ECM-a, specifičnih neuronskih biljega (NeuN, PV) i biljega glijalnih stanica uključeno je 13 uzoraka (sl. 1).

**Tablica 2.** Postoperativni patohistološki nalazi i njihova zastupljenost u istraživanoj skupini (ukupno 76 slučajeva)

Postoperativna patohistološka dijagnoza	Broj slučajeva
hipokampalna skleroza tip 1 (ILAE-klasifikacija)	34
ostali tipovi hipokampalne skleroze	16
fokalna kortikalna displazija + temporalna skleroza (FCD tip III)	11
temporalna skleroza + disembrioplastični tumor	1
temporalna skleroza + gangliogliom druge lokacije	1
hipokampalna skleroza + heterotopija	1
fokalna kortikalna displazija + fokalna kortikalna displazija + gangliogliom	1
gangliogliom temporalno	3
disembrioplastični tumor temporalno	2
malformacije kortikalnog razvoja temporalno	3
fokalna kortikalna displazija (frontalno)	3



Slika 1. Shematski prikaz dizajna studije.

U razdoblju od 2011. do 2018. godine 76 bolesnika operirano je zbog farmakorezistentne epilepsije. Nakon preoperativne obrade prema standardnom protokolu, za 65 bolesnika utvrđena je dijagnoza MTLE-a. Postoperativnom patohistološkom analizom 34 bolesnika klasificirana su prema ILAE-klasifikaciji kao hipokampalna skleroza tip 1 (HS1). Od ukupno 34 uzorka HS1, 13 uzoraka odabrano je za konačnu analizu ekspresije biljega ECM-a (tabl. 3), specifičnih neuronskih biljega (NeuN, PV) i biljega glijalnih stanica (GFAP) na temelju HE-bojenja i histoloških kriterija kako je navedeno u tekstu. Kontrolni uzorci potječu od hipokampusa uzetih tijekom rutinskih obdukcija s postmortalnim vremenom kraćim od 48 sati i bez poznate neurološke bolesti ili drugih stanja koje bi mogle uzrokovati histološki vidljive promjene prilikom HE-bojenja.

(NRK - neurokirurški zahvat, MR - magnetska rezonancija, EEG - elektroencefalografija, MTLE - mezijalna temporalna epilepsija, HS1 - hipokampalna skleroza tip 1)

## 4.2. Metode

### 4.2.1. Histološke metode

Patohistološki uzorci bili su fiksirani 24 sata u 10%-tnom puferiranom formalinu. Slijedila je dehidracija u etanolu postupno rastućih koncentracija (70%, 80%, 96% i 100%) te provlačenje kroz ksilol i prožimanje u tekućem parafinu na temperaturi od 60 °C. Po uklapanju u parafin uzorci su se ohladili na 4 °C i rezali serijski na kliznom mikrotomu na rezove debljine 4 µm i 10 µm. Nakon deparafiniranja u ksilolu i dehidracije u opadajućem nizu koncentracija etanola

(100%, 96%, 80% i 70%), tanji rezovi bojeni su hemalaun-eozinom, dok je na debljim rezovima učinjeno indirektno imunohistokemijsko bojenje.

#### 4.2.2. Svjetlosna indirektna imunohistokemijska metoda bojenja

Za analizu ekspresije proteina korištena je svjetlosna indirektna imunohistokemijska metoda modificirana prema ranije opisanim protokolima (125, 126) koji se koriste u Laboratoriju za imunohistokemiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Nakon deparafinizacije ksilolom, rehidracije rezova u seriji alkohola i ispiranja fosfatnim puferom (engl. *phosphate buffered saline*, PBS), rezovi su 20 minuta bili u predtretmanu u 0,3%-tnom vodikovom peroksidu (u smjesi metanola i redestilirane vode, u omjeru 3:1), zatim ispirani 3 puta po 10 minuta u PBS-u i potom uronjeni na 2 sata u otopinu za blokiranje (PBS koji sadrži 3% goveđeg serumskog albumina i 0,5%-tnu otopinu Tritona X-100) na sobnoj temperaturi. Rezovi su zatim inkubirani u otopini primarnih protutijela (tabl. 3) tijekom 48 do 72 sata na 4 °C (prilikom WFA-bojenja umjesto primarnog protutijela koristio se lektin – aglutinin biljke *Wisterija floribunda*), zatim su ponovno isprani u PBS-u i dalje inkubirani sekundarnim antitijelima tijekom jednog sata na sobnoj temperaturi. Za obilježavanje specifične imunoreaktivnosti koristila su se biotinizirana anti-zečja i anti-mišja antitijela iz kompleta Vectastain ABC (kompleks streptavidin-peroksidaza, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, SAD), tijekom jednog sata na sobnoj temperaturi, a zatim su ispirani u PBS-u tijekom 10 minuta, dok se aktivnost peroksidaze vizualizirala kompleksom DAB (Ni-3,3-diaminobenzidin, Sigma-Aldrich). Nakon ispiranja u PBS-u i sušenja na sobnoj temperaturi, preparati su pokriveni sredstvom Histamount (National Diagnostics, Atlanta, GA, SAD). Negativne i pozitivne kontrole napravljene su za svako primarno i sekundarno protutijelo.

#### 4.2.3. Fluorescentna indirektna imunohistokemijska metoda bojenja

Za detekciju kolokalizacije specifičnih neuronskih proteina i perineuronskih mreža metodom indirektno imunofluorescencije korištena su primarna protutijela na NeuN i PV te sekundarna protutijela (tabl. 3) i WFA. Stupanj preklapanja između PV-interneurona (interneuroni imunoreaktivni na PV) i NeuN-neurona (neuroni imunoreaktivni na NeuN) s WFA-om određen je dvostrukim obilježavanjem (*double labelling*), pri čemu su na istim rezovima kombinirana primarna protutijela na PV i NeuN te WFA-bojenje.

Ukratko, rezovi su najprije izloženi jakom izvoru svjetlosti (6.000 lumena) tijekom 48 h s ciljem smanjivanja lipofuscinske autofluorescencije (127,128). Nakon deparafinizacije i

dehidracije, prema standardnom protokolu, rezovi su isprani u fosfatnom puferu (1x PBS), nakon čega je proveden postupak povratka antigena (*antigen retrieval*) u citratnom puferu (pH = 6,0). Rezovi su potom tri puta isprani u PBS-u i proveden je postupak blokiranja proteina (engl. *protein blocking*) otopinom normalnog seruma magarca (engl. *normal donkey serum*, NDS, Chemicon, SAD), u koncentraciji 5% (razrijeđenim 0,5%-tnim Tritonom X-100 u 1x PBS-u, Sigma-Aldrich, SAD) tijekom jednog sata na sobnoj temperaturi. Inkubacija primarnim protutijelima i WFA-om (tabl. 3) trajala je 48 sati na 4°C. Nakon inkubacije primarnim protutijelima i WFA-om, rezovi su tri puta isprani u PBS-u i potom inkubirani 2h na sobnoj temperaturi sekundarnim protutijelima razrijeđenima u PBS-u (magareće, anti-zečje 546, Thermo Fisher, Scientific, Waltham, MA, SAD). Rezovi su zatim ponovno isprani tri puta u PBS-u te na 2 minute prekriveni sredstvom za smanjivanje autofluorescencije (TrueBlack Lipofuscin Autofluorescence Quencher, Biotium, SAD) razrijeđenim u 70%-tnom etanolu. Nakon trostrukog ispiranja u PBS-u rezovi su pokriveni sredstvom za pokrivanje fluorescentnih histoloških rezova bez DAPI-ja (VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium, Vector Laboratories, SAD).

**Tablica 3.** Popis protutijela korištenih za imunohistokemijsku analizu

<b>Primarno protutijelo</b>	<b>Kataloški broj</b>	<b>Domaćin, izotip</b>	<b>Razrjeđenje</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Sekundarno protutijelo</b>
<i>Anti-Neuron specific Nuclear protein</i> (NeuN)	ab104225	poliklonalno zečje polyclonal IgG	1:1 000	Abcam, Cambridge, UK	IHC: zečje, Vectastain ABC kit, PK 4001, SAD  IF: magareće Anti-zečje 546, A10040, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)</i>	GFAP (Z0334)	poliklonalno zečje, pročišćeni imunoglobulin	1:1 000	Dako, Glostrup, Danska	zečje, Vectastain ABC kit, PK 4001, SAD

<i>Anti-Parvalbumin</i> (PV)	Ab11427	poliklonalno zečje	1 : 3 000	Abcam, Cambridge, UK	IHC: zečje, Vectastain ABC kit, PK 4001, SAD  IF: magareće Anti-Zečje 546, A10040, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>biotinylated Wisteria floribunda agglutinin (WFA)</i>	L1516	N/A	6µg/ml	Sigma Aldrich, Missouri, SAD	N/A
<i>Wisteria Floribunda Lectin (WFA, WFL), Fluorescein</i>	FL-1351-2	N/A	10 µg/ml	Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD	N/A
<i>Anti-CS-56 Anti chondroitin sulfate</i>	C8035	monoklonalno mišje, IgM,	1 : 1 000	SIGMA, St. Louis, MO, SAD	mišje, Vectastain ABC kit, PK 4010, SAD
<i>Anti-Fibronectin</i>	FN (F3648)	poliklonalno zečje	1 : 400	SIGMA, St. Louis, MO, SAD	zečje, Vectastain ABC kit, PK 4001, SAD
<i>Anti-Neurocan (NCAN)</i>	HPA03681 4	poliklonalno zečje	1 : 1 000	SIGMA, St. Louis, MO, SAD	zečje, Vectastain ABC kit, PK 4001, SAD
<i>Anti-Versican</i>	AF 3054	poliklonalno kozje	2,5 µg/ml	Biotechne R&D Systems, Minneapolis, SAD	kozje, Vectastain ABC kit, PK 4005, SAD

<i>Anti-Agrecan</i>	SAB45006 62	poliklonalno zečje	1:200	SIGMA- Aldrich, St. Louis, MO, SAD	IHC: zečje, Vectastain ABC kit, PK 4001, SAD  IF: magareće, Anti-zečje 546, A10040, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD
---------------------	----------------	--------------------	-------	---	---

#### 4.3. Analiza histoloških preparata

Za kvalitativni, kvantitativni i semikvantitativni uvid u ekspresiju sastavnica ECM-a, histološki preparati analizirani su korištenjem mikroskopa Olympus-IX83. Histološki preparati zatim su snimljeni kamerom Olympus UC-90, automatiziranim sustavom Olympus-IX83, svjetlosnim mikroskopom Olympus BX53 te skenerom Epson V860Pro. Prikazi su izrađeni programom Adobe Photoshop CS6.

##### 4.3.1. Analiza broja parvalbuminskih neurona

Prije same analize na svakom su uzorku određene granice polja hipokampusa CA1 - CA4 prema klasifikaciji koju je osmislio Lorente de Nó (7), a koju su koristili Duvernoy i sur. (8) i koje su kasnije preuzete i u ILAE-klasifikaciji. Tom podjelom razlikuju se: *cornu Ammonis*, *gyrus dentatus (fascia dentata)* i *subiculum*. U svakom pojedinom polju te slojevima područja *gyrus dentatus* brojeni su PV-neuroni. Zbog metodoloških poteškoća uzrokovanih necjelovitošću tkiva, broj stakala prikladnih za analizu razlikovao se među pacijentima. Statistički su (primjenom t-testa) uspoređeni ukupni brojevi PV-neurona za pojedinog pacijenta i kontrolni uzorak te ukupni brojevi PV-neurona po polju za pojedinog pacijenta ili kontrolni uzorak.

##### 4.3.2. Analiza ekspresije difuznog i lokaliziranog ECM-a

Postotak WFA-pozitivnih perineuronskih mreža u pojedinom polju *cornu Ammonis* (CA1 - CA4) i području *gyrus dentatus* uzoraka HS1 određen je u odnosu na NeuN-neurone u susjednom histološkom rezu u tim poljima/području i u odnosu na NeuN- i WFA-pozitivne perineuronske mreže u kontrolnim uzorcima. Temeljem pilot-studije, kojom je utvrđena izrazita



WFA-specifična glikozilacija difuznog ECM-a u uzorcima HS1, odlučili smo analizirati intenzitet WFA-bojenja na svim dostupnim uzorcima: (i) semikvantitativno (ocjenama '0' - bez aktivnosti, '1' - slabo, '2' - srednje, '3' - umjereno, '4' - izraženo, '5' - intenzivno) te (ii) programom FIJI (129). Analiza programom FIJI učinjena je tako da su mikroskopske slike (dobivene na mikroskopu Olympus BX53) podvrgnute automatiziranom stupnjevanju (engl. *automated thresholding*) intenziteta piksela, nakon čega su pretvorene u binarne slike. Grafički prikazi izrađeni su programom GraphPad Prism 9. Dobivene mjere dalje su analizirane primjenom programa GraphPad Prism9 te su izražene kao medijan vrijednosti.

Za ostale imunohistokemijske biljege ECM-a (neurokan, versikan, agrekan, CS-56 i fibronektin) razlike između kontrolnih uzoraka i uzoraka HS1 opisane su kvalitativno u poljima CA4 - CA1 i području *gyrus dentatus*.

#### 4.3.3. Imunofluorescentna analiza

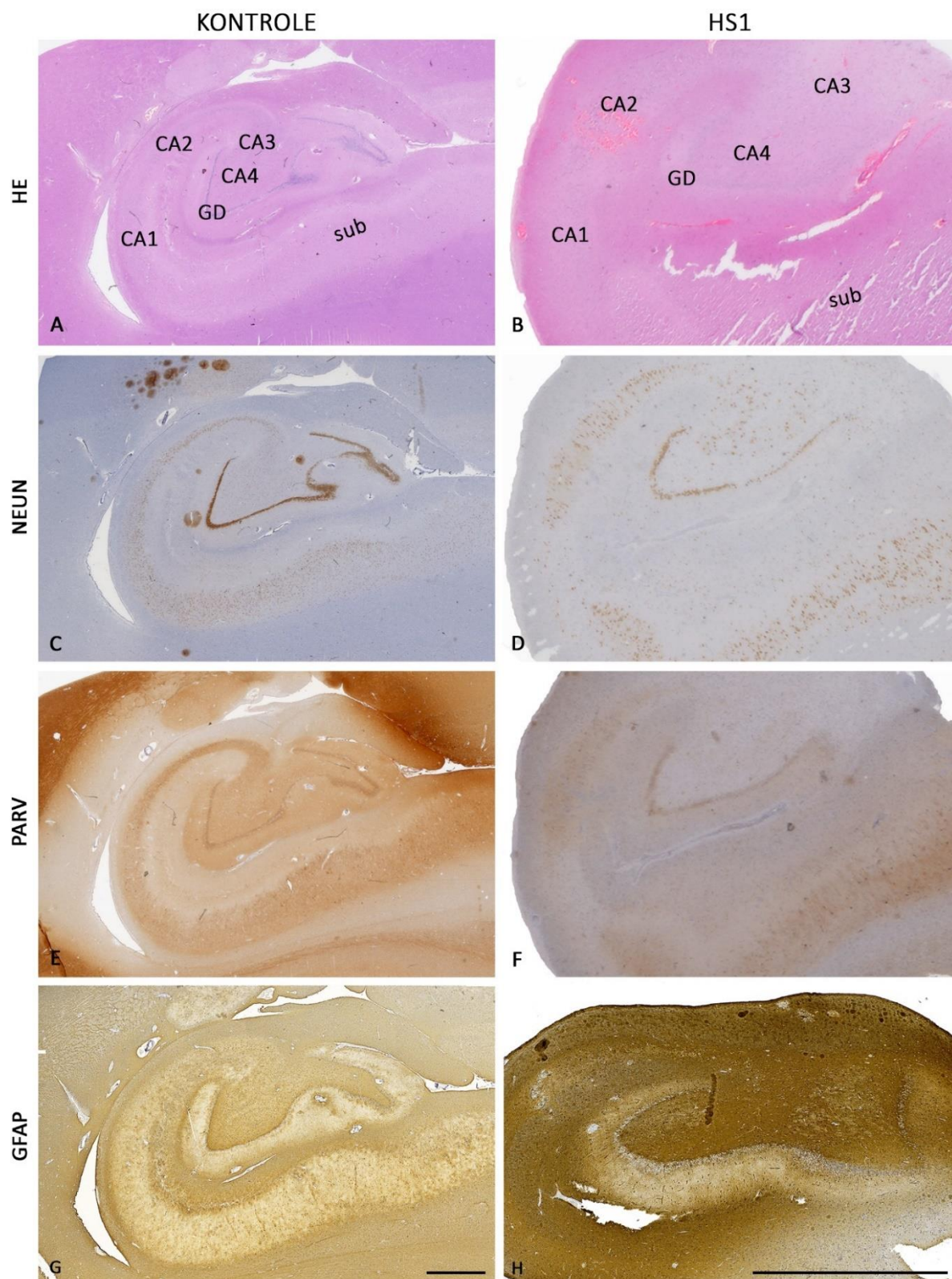
Analiza fluorescentno obilježenih proteina je učinjena nakon konfokalnog snimanja. Preparati obojeni indirektnom imunofluorescencijom snimljeni su laserskim konfokalnim mikroskopom Olympus FLUOVIEW FV3000RS, Japan. Hipokampalna područja koja su se pokazala značajna za ovaj rad snimljena su povećanjem 20 x. U svakom vidnom polju preparat je snimljen u četiri konfokalne ravnine.

#### 4.4. Statističke metode

Statistička analiza učinjena je softverom IBM SPSS v25. Za razlike između kvantitativnih varijabli korišten je neparametrijski Mann-Whitneyjev test. Povezanost između varijabli ispitana je Spearmanovim koeficijentom korelacije. P-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su značajnima. Za korelaciju broja PV-neurona između uzoraka korišten je t-test.

## 5. REZULTATI

Histološke promjene uzoraka analiziranih u ovom radu odgovaraju promjenama prema ILAE-klasifikaciji HS1. Uočava se smanjena ukupna veličina hipokampusa uz jasan gubitak NeuN-imunoreaktivnih neurona (sl. 2D) koji je najizraženiji u poljima CA1 i CA4 te disperzija granularnog sloja područja *gyrus dentatus* (sl. 2D, sl. 3B), a sve popraćeno izraženom gliozom (sl. 2H, sl. 14). S obzirom na navedene promjene, u uzorcima HS1 precizno diferenciranje pojedinih slojeva područja *cornu Ammonis* izrazito je otežano i moguće je jedino za slojeve područja *gyrus dentatus*.



Slika 2. Histološke promjene u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1.

Panel prikazuje histološke promjene u uzorcima HS1 (desni stupac) u odnosu na zdrave kontrolne uzorke (lijevi stupac) vidljive nakon histološkog (HE) i imunohistokemijskih bojenja

(NeuN - C, D, parvalbumin - E, F, GFAP - G, H). Vidi se smanjena ukupna veličina hipokampusa (mjerka u oba stupca odgovara istoj dužini). Kao glavno obilježje ističe se gubitak piramidnih NeuN- obilježenih neurona (D), najizraženiji u poljima CA1 i CA4, popraćen pojačanom difuznom gliozom (H) koja je najizraženija u području *cornu Ammonis* i najmanje izražena u području *gyrus dentatus*. Osim gubitka neurona (NeuN) u HS1 dolazi i do gubitka specifično imunoreaktivnih PV-neurona i neuropila (F). Sve navedene promjene odgovaraju kriterijima za HS1 prema ILAE-klasifikaciji.

(CA - *cornu Ammonis*, GD - *gyrus dentatus*, sub – *subiculum*, mjerke u G i H: 2mm)

### 5.1. Promjene u ekspresiji molekula ECM-a

U uzorcima HS1 postoji razlika u ekspresiji svih analiziranih molekula ECM-a (sl. 3). Proteoglikan versikan (VCAN) dolazi u tri izoforme. Dvije izoforme (V0, V1) tipične su za razvojni, (juvenilni) ECM, dok je izoforma V2 karakteristična za ECM mozga odrasle jedinke. U radu je korištena juvenilna izoforma V0 koja je pokazala izraženu razliku u ekspresiji u usporedbi s ostalim analiziranim molekulama ECM-a (sl. 3D, sl. 4D). U kontrolnim uzorcima difuzna ekspresija versikana zabilježena je samo u području *gyrus dentatus* (sl. 3C), a unutar toga područja uočene su razlike u imunoreaktivnosti među pojedinim slojevima. Najizraženija je u polimorfnom sloju, dok se intenzitet smanjuje prelaskom prema polju CA4 (sl. 4C). Granularni sloj područja *gyrus dentatus* gotovo da i nije imunoreaktivan, dok je u molekularnom sloju imunoreaktivnost jasno izražena, ali nešto manjim intenzitetom u odnosu na imunoreaktivnost u polimorfnom sloju (sl. 4C). U uzorcima HS1 vidljiva je difuzna intenzivna, homogena reaktivnost versikana bez uočljivih razlika povezanih s poljem ili slojem pojedinog polja (sl. 3D, sl. 4D).

U odnosu na versikan, razlika u ekspresiji proteoglikana neurokana (NCAN) između kontrolnih uzoraka i uzoraka HS1 znatno je manje uočljiva (sl. 3E i F, sl. 4A i B). U području *cornu Ammonis* kontrolnih uzoraka uočen je postupni porast jačine difuzne ekspresije neurokana od polja CA4 prema piramidnom sloju polja CA2 i CA1 (sl. 3E). U uzorcima HS1 održana je imunoreaktivnost u piramidnom sloju CA2, dok je u ostalim poljima područja *cornu Ammonis*, a osobito u polju CA4, ona slabija (sl. 3F). U uzorcima HS1 dolazi do značajno povećane ekspresije neurokana u molekularnom sloju područja *gyrus dentatus* (sl. 4B). Granularni sloj u uzorcima HS1 nije imunoreaktivan, kao ni u kontrolnim uzorcima. U

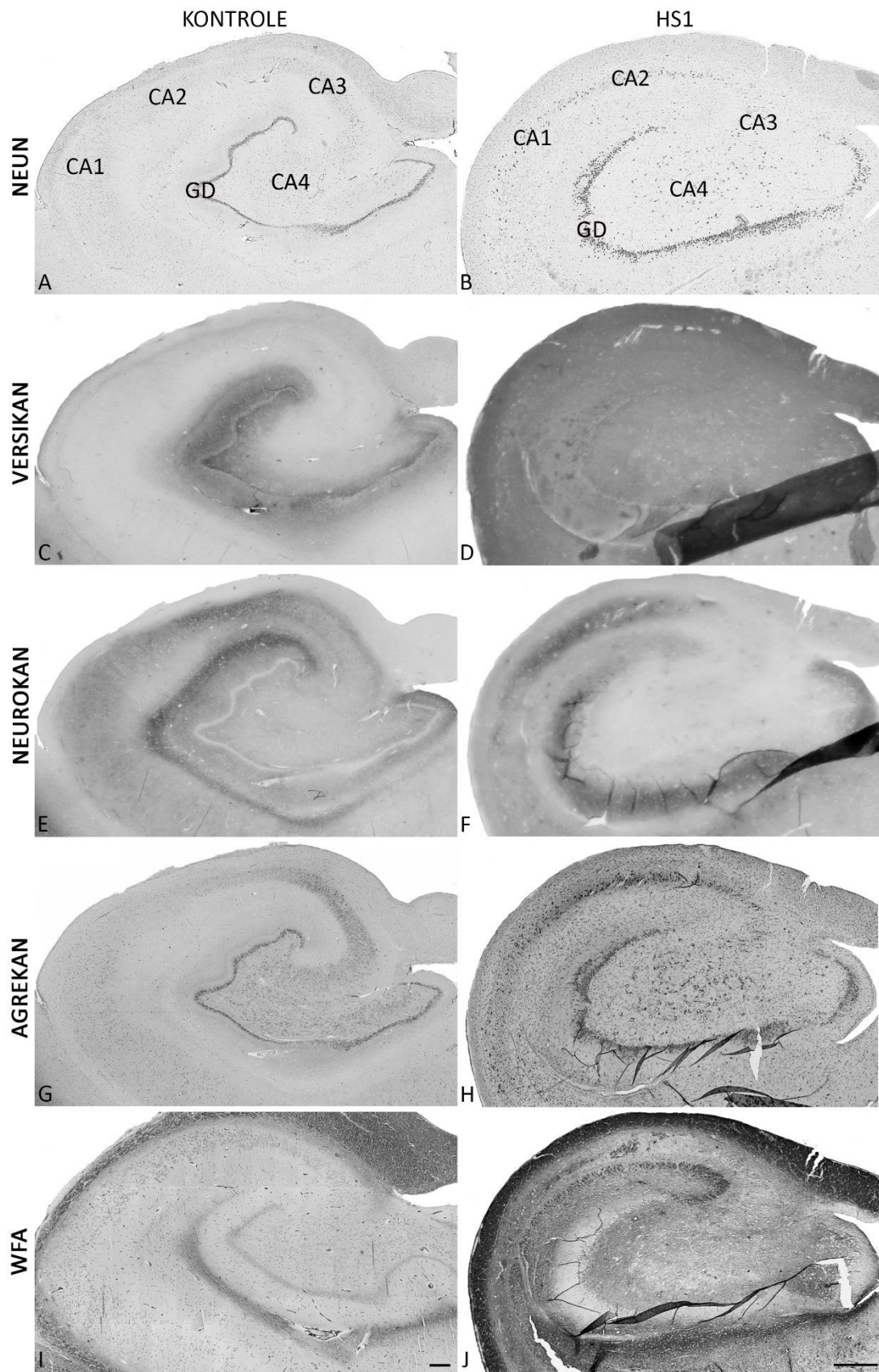
kontrolnim uzorcima imunoreaktivnost neurokana najintenzivnija je u molekularnom sloju CA1 (sl. 3E i F, sl. 4A i B).

Dok versikan i neurokan pokazuju difuznu reaktivnost, proteoglikan agrekan (AGG) eksprimiran je ili u stanicama ili perisomatski u kondenziranom obliku ECM-a, perineuronskim mrežama (sl. 3G i H, sl. 5, sl. 6). Perineuronske mreže pozitivne na agrekan vide se kao jasno formirane strukture oko neurona u području *cornu Ammonis* te tijela granularnih neurona u području *gyrus dentatus* (sl. 3G, sl. 5A i C, sl. 6A, C i E). U hipokampalnoj sklerozi tip 1 perineuronske mreže pozitivne na agrekan lokalizirane su tek oko nekolicine neurona (sl. 3H, sl. 5B i D). Osim smanjenog broja u HS1 opaža se i promijenjena morfologija perineuronskih mreža pozitivnih na agrekan (sl. 5B i D, sl. 6B, D i F).

Uz pojedinačne lektikane (neurokan, versikan, agrekan) analiziran je i hondroitin-sulfatni proteoglikan CS-56, sastavni dio svih proteoglikana iz grupe lektikana korištenih u ovom radu. U kontrolnim uzorcima, osim difuzne reaktivnosti, CS-56 izražen je i u kondenziranom obliku perineuronskih mreža koje se jasno uočavaju oko neurona u području *cornu Ammonis* (sl. 7C), dok je u području *gyrus dentatus* lociran intracelularno (sl. 7A). U uzorcima HS1 imunoreaktivnost za CS-56 nije zabilježena ni u granularnom sloju područja *gyrus dentatus*, niti u području *cornu Ammonis* (sl. 7B i D).

Shematski prikaz promjena u ekspresiji proteoglikana ECM-a prikazan je na sl. 8.

Uz proteoglikane analiziran je i glikoprotein fibronektin (FN). U području *cornu Ammonis* kontrolnih uzoraka eksprimiran je unutarstanično i perisomatski, a u granularnom sloju područja *gyrus dentatus* tek je u pojedinim neuronima vidljiva unutarstanična reaktivnost (sl. 9 uokvireni panel - stupac lijevo). U uzorcima HS1 dolazi do potpunog nestanka ekspresije fibronektina u području *gyrus dentatus* (sl. 9B - GD), a u neuronima područja *cornu Ammonis* zamjetna je unutarstanična imunoreaktivnost slabijeg intenziteta (sl. 9B - CA) u usporedbi s pozitivnom kontrolom, neuronima subikuluma (sl. 9, izdvojeni kvadrat).



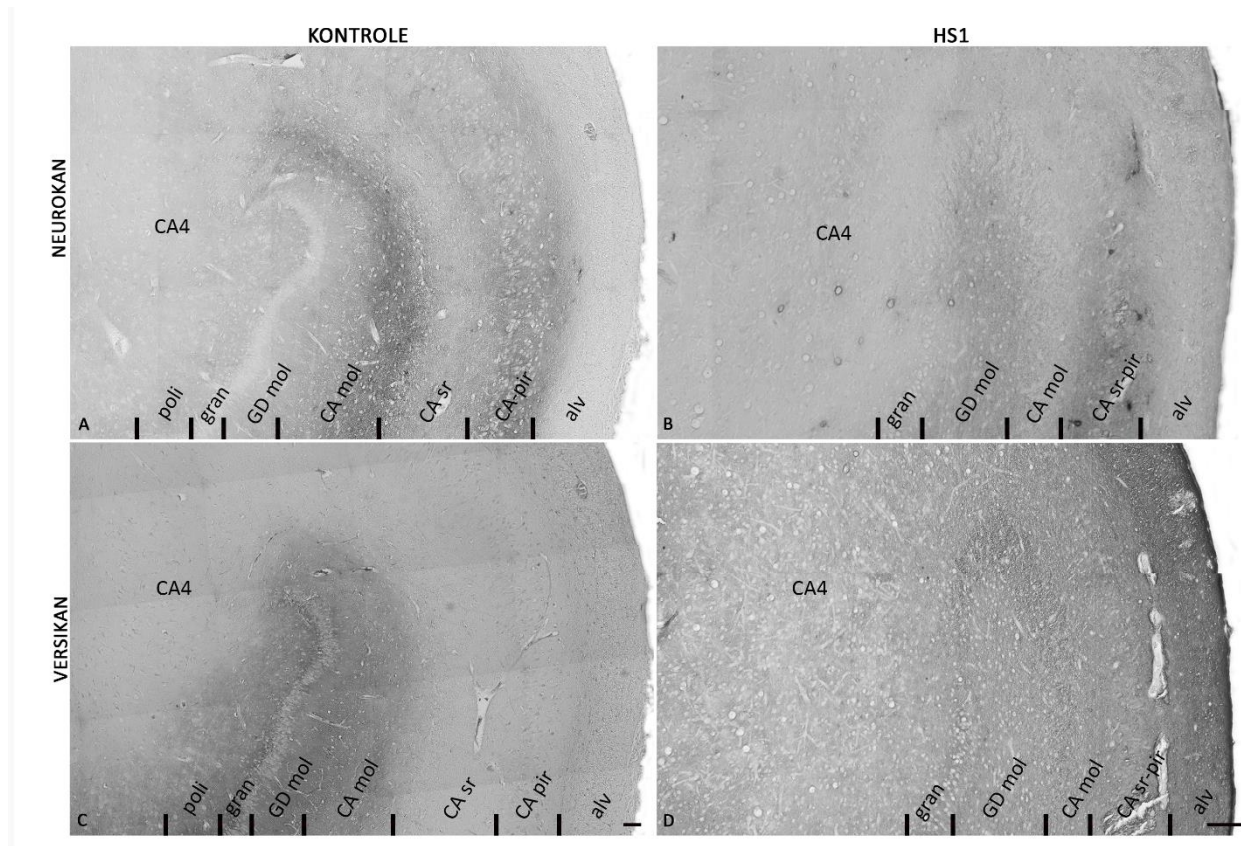
Slika 3. Promjene u ekspresiji molekula izvanstanične tvari u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1.

Na panelu su prikazane promjene ekspresije molekula ECM-a (lijevi stupac prikazuje kontrolne uzorke, a desni stupac prikazuje uzorke HS1). U prvom redu prikazano je imunohistokemijsko bojenje biljegom NeuN (A, B), radi lakšeg određivanja pojedinih polja hipokampusu i njihovih slojeva. Versikan u kontrolnim uzorcima (C) pokazuje difuznu reaktivnost samo u području *gyrus dentatus* i to u njegovom polimorfnom i molekularnom sloju, dok granularni sloj ne pokazuje reaktivnost. Reaktivnost je najintenzivnija u polimorfnom sloju i postupno se smanjuje prelaskom prema polju CA4 (C). U uzorcima HS1 (D) dolazi do izražene homogene ekspresije versikana u svim hipokampalnim poljima, bez mogućnosti razlikovanja polja ili slojeva. Neurokan također pokazuje difuznu ekspresiju u ECM-u (E, F). U kontrolnim uzorcima (E) vidi se ekspresija neurokana u molekularnom sloju područja *cornu Ammonis* te u piramidnom sloju polja CA1 i CA2, a intenzitet ekspresije se postupno smanjuje prelaskom prema polju CA4, gdje je najmanji. U području *gyrus dentatus* kontrolnih uzoraka u granularnom sloju indirektnom imunohistokemijskom metodom nije detektiran neurokan, dok je u polimorfnom i molekularnom sloju vidljiva difuzna reaktivnost. U uzorcima HS1 (F) imunoreaktivnost na neurokan je najizraženija u molekularnom sloju područja *gyrus dentatus*, a u odnosu na kontrolne uzorke slabija je u molekularnom sloju područja *cornu Ammonis*. Ekspresija je također slabija u poljima CA4 i CA3, u odnosu na kontrolne uzorke, dok je u piramidnom sloju polja CA2 i CA1 održana. Za razliku od proteoglikana neurokana i versikana koji u HS1 pokazuju difuznu ekspresiju, agrekan pokazuje ekspresiju samo u lokaliziranom kondenziranom obliku ECM-a (G i H). U kontrolnim uzorcima agrekan (G) je vidljiv intracelularno i eksprimiran u obliku perineuronskih mreža oko piramidnih neurona područja *cornu Ammonis*, a vidljiva je njegova ekspresija i oko tijela granularnih neurona područja *gyrus dentatus*. U uzorcima HS1 (H) dolazi do smanjenja broja perineuronskih mreža, ali i promjena u njihovom obliku. Kondenzirani oblik ECM-a, perineuronske mreže, prikazane su i histokemijskim WFA-bojenjem. U kontrolnim uzorcima WFA (I) pokazuje specifičnu glikozilaciju oko svih neurona granularnog sloja područja *gyrus dentatus* te u perineuronskim mrežama oko piramidnih neurona područja *cornu Ammonis*, bez značajne difuzne reaktivnosti. U uzorcima HS1 (J) dolazi do potpunog gubitka reaktivnosti u granularnom sloju područja *gyrus dentatus* te se gube perineuronske mreže u području *cornu Ammonis*. Dolazi do izrazitog

povećanja WFA-speifičnog glikozilacijskog obrasca difuznog ECM-a koji izostaje samo u molekularnom sloju područja *gyrus dentatus*.

(NCAN - neurokan, VCAN - versikan, AGG - agrekan, CA - *cornu Ammonis*, GD - *gyrus dentatus*, mjerke u I i J: 500  $\mu\text{m}$ )



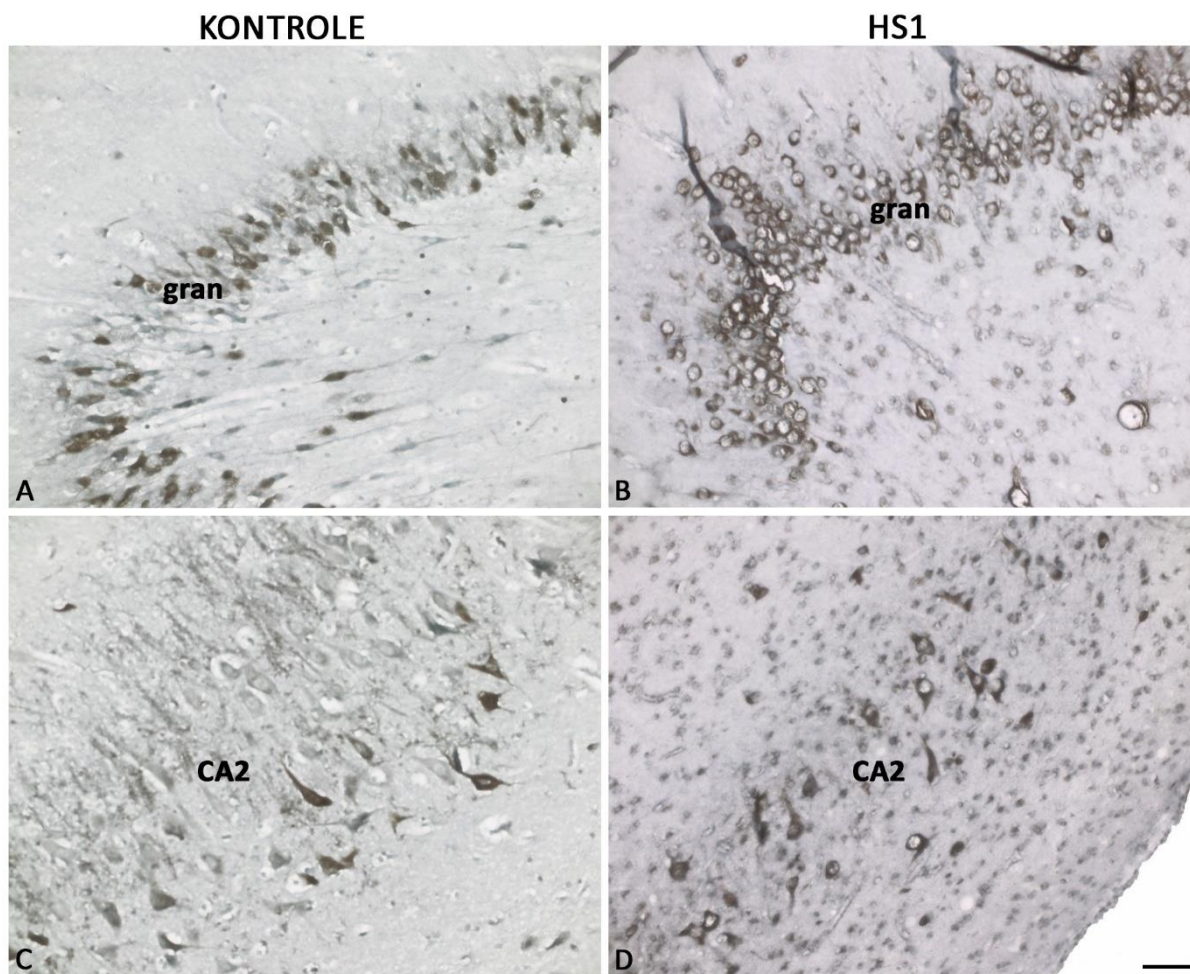


Slika 4. Promjene u ekspresiji neurokana i versikana u područjima *gyrus dentatus* i *cornu Ammonis*.

Panel prikazuje raspodjelu imunoreaktivnosti za neurokan (gore) i versikan (dolje) po slojevima u područjima *gyrus dentatus* i *cornu Ammonis* u kontrolnih uzoraka i uzoraka HS1. Oba biljega pokazuju difuznu imunoreaktivnost i u kontrolnim uzorcima i u uzorcima HS1. Neurokan u kontrolnim uzorcima hipokampusa pokazuje najvišu razinu ekspresije u molekularnom i piramidnom sloju područja *cornu Ammonis* (A). Unutar područja *gyrus dentatus* vidljiva je ekspresija u polimorfnom i molekularnom sloju, dok u granularnom sloju ona u potpunosti izostaje (A). U uzorcima HS1, posljedično promjenama u citoarhitektonici (i gliozii), znatno je teže razlikovati pojedine slojeve. No, i usprkos tome jasno je uočljiv porast ekspresije neurokana u molekularnom sloju područja *gyrus dentatus*, dok je sada u molekularnom sloju područja *cornu Ammonis* ekspresija znatno manja (B). Ekspresija versikana je u kontrolnih uzoraka hipokampusa ograničena na područje *gyrus dentatus* (C). Unutar toga područja ekspresija izostaje samo u granularnom sloju, dok je u molekularnom i polimorfonom sloju

podjednako izražena (C). Zamjećuje se i postupno opadanje intenziteta ekspresije prelaskom od polimorfnog sloja prema polju CA4 (C). U uzorcima HS1 ekspresija versikana homogeno je raspoređena kroza sve regije i slojeve (D).

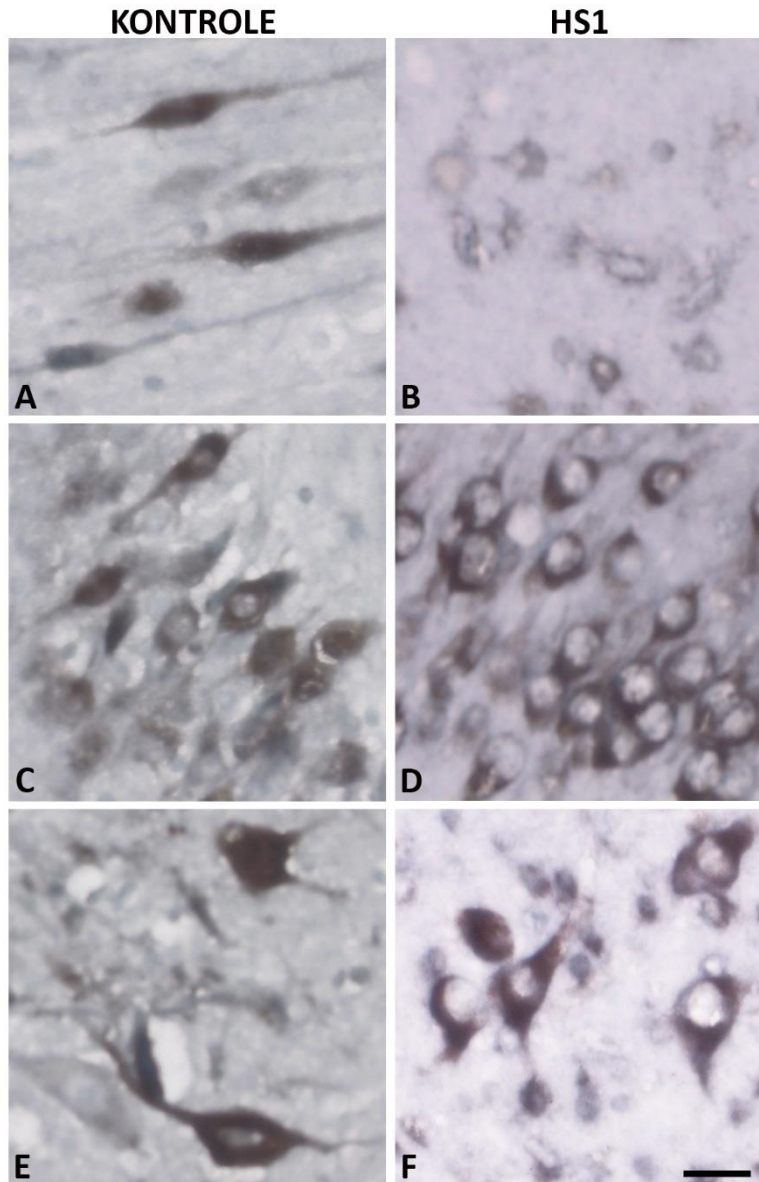
(poli - polimorfni sloj, gran - granularni sloj, GD - *gyrus dentatus*, mol - molekularni sloj, sr - *stratum radiatum*, pir - piramidni sloj, alv - *alveus*, CA - *cornu Ammonis*; mjerka u C odnosi se i na A, a ona u D odnosi se i na B te označavaju duljinu od 100  $\mu\text{m}$ )



Slika 5. Ekspresija agrekana u kontrolnim uzorcima hipokampusa i u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1.

Panel prikazuje promjene u ekspresiji agrekana. U kontrolnim uzorcima (A, C) agrekan je vidljiv u sklopu perineuronskih mreža oko piramidnih neurona područja *cornu Ammonis* i oko neurona granularnog sloja područja *gyrus dentatus*. U uzorcima HS1 (B, D) dolazi do promjena: osim smanjenog broja samih perineuronskih mreža primjećuje se i promjena njihova oblika, a osobito se mijenja oblik perisomatske ekspresije u granularnom sloju područja *gyrus dentatus* (B) koja djeluje stanjeno oko okruglih soma neurona pa je sukladno tome promjenjen i obrazac ekspresije agrekana.

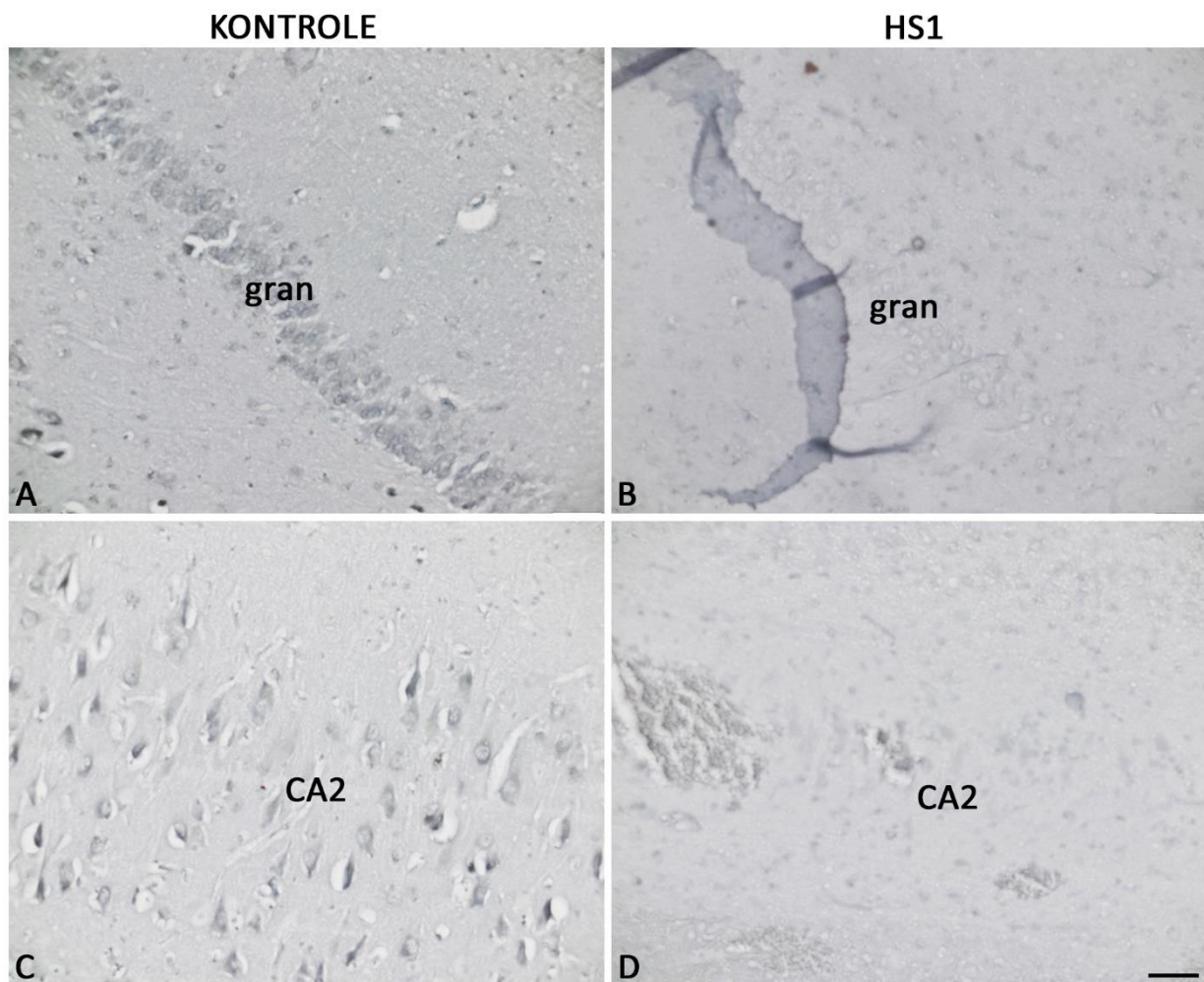
(gran - granularni sloj, CA - *cornu Ammonis*, mjerka: 50  $\mu\text{m}$ )



Slika 6. Ekspresija agrekana oko neurona u kontrolnim uzorcima hipokampusa i uzorcima hipokampalne skleroze tip 1.

Panel prikazuje ekspresiju agrekana intracelularno i perisomatski u obliku lokaliziranog oblika ECM-a u kontrolnih uzoraka (lijevi stupac) i uzoraka HS1 (desni stupac). Na većem povećanju prikazani su neuroni polimorfnog sloja područja *gyrus dentatus* (A, B), njegova granularnog sloja (C, D) i piramidnog sloja područja *cornu Ammonis* (E, F). U kontrola je agrekan izražen u perineuronskim mrežama oko neurona u polimorfnom sloju područja *gyrus dentatus* (A) i piramidnom sloju područja *cornu Ammonis* (E), a u granularnom sloju područja *gyrus dentatus* (C) nalazi se oko tijela neurona. U uzorcima HS1 zamjetne su kvalitativne promjene u ekspresiji agrekana (B, D, F). U granularnom (D) i piramidnom (F) sloju u uzorcima HS1

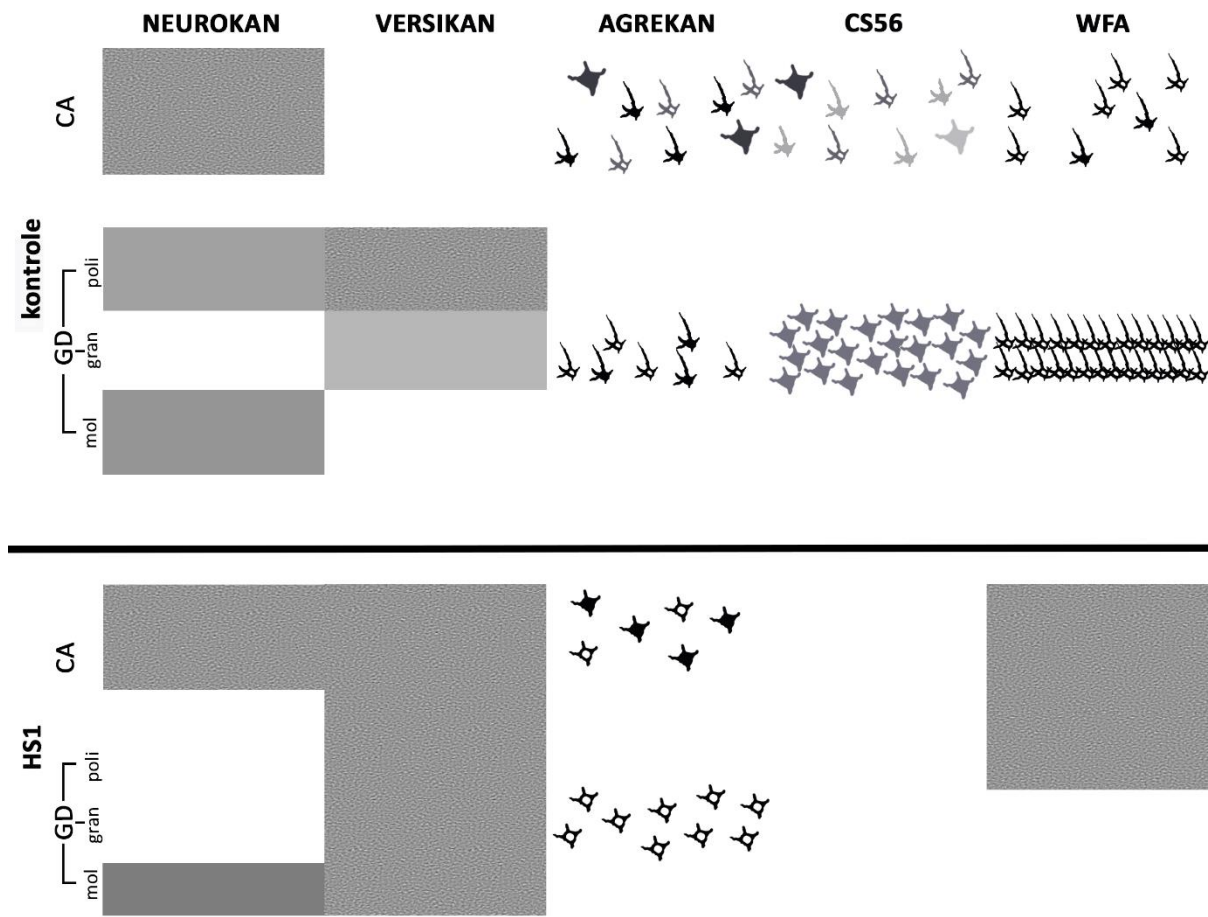
imunoreaktivnost agregata ne ocrta jasne perineuronske mreže već intracelularna ekspresija odražava oblik stanica i promjenu njihova oblika, gdje one postaju "okruglije". Mjerka: 20  $\mu\text{m}$ .



Slika 7. Ekspresija CS-56 u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1 i u kontrolnim uzorcima hipokampusa.

Panel prikazuje reaktivnost na hondroitin-sulfatni proteoglikan (CS-56) u kontrolnim uzorcima (A, C) i uzorcima HS1 (B, D). U granularnom sloju područja *gyrus dentatus* kontrolnih uzoraka (A) reaktivnost je uočljiva unutar stanica, dok u uzorcima HS1 (B) ona nije vidljiva. U području *cornu Ammonis* kontrolnih uzoraka CS-56 uočljiv je u sastavu perineuronskih mreža (C) koje u uzorcima HS1 (D) nisu vidljive. U kontrolnim uzorcima, osim kondenzirane forme, CS-56 pokazuje i difuznu imunoreaktivnost u ECM-u u područjima *gyrus dentatus* i *cornu Ammonis*.

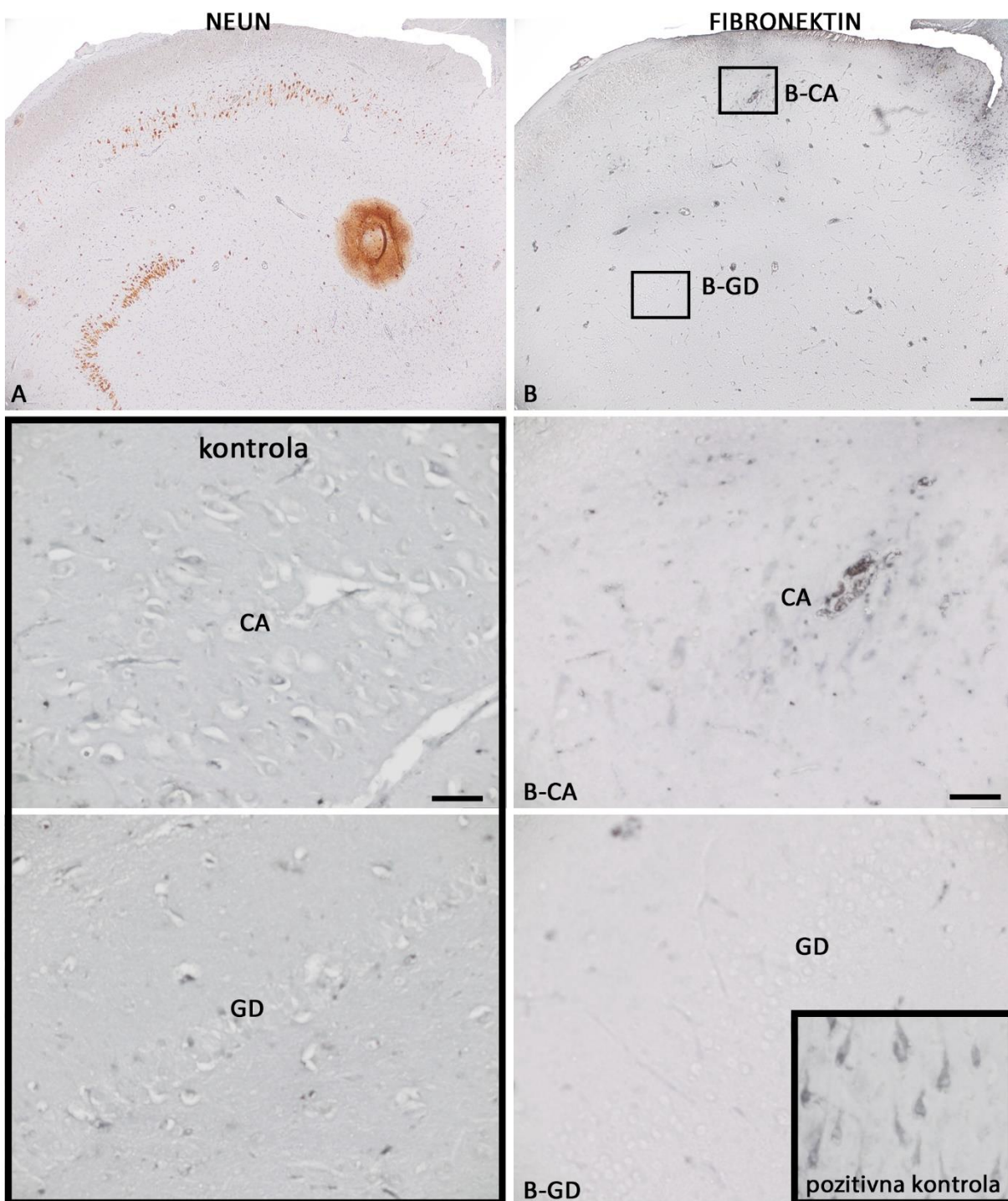
(gran - granularni sloj, CA - *cornu Ammonis*, mjerka: 50  $\mu\text{m}$ )



Slika 8. Shematski prikaz promjena ekspresije molekula ECM-a.

Shema prikazuje promjene u ekspresiji pojedinih molekula ECM-a. Gornji dio sheme prikazuje kontrolne hipokampusne uzorke, a donji uzorke HS1. Difuzni ECM pokazuje imunoreaktivnost za neurokan, versikan i WFA. Neurokan se u kontrolnim uzorcima prikazan indirektnom imunohistokemijom nalazi u području *cornu Ammonis* i u polimorfnom i molekularnom sloju područja *gyrus dentatus*, dok je versikan eksprimiran samo u polimorfnom i granularnom sloju područja *gyrus dentatus*. U uzorcima HS1 dolazi do preraspodjele reaktivnosti neurokana među pojedinim slojevima, što je dominantno izraženo u području *gyrus dentatus*, dok se za versikan prati homogeni porast ekspresije u cijelom hipokampusu. U području *gyrus dentatus* WFA i agrekan pokazuju lokaliziranu reaktivnost i oko tijela granularnih neurona, dok je u granularnom sloju CS-56 eksprimiran unutarstanično. U uzorcima HS1 dolazi do potpunog (CS-56, WFA) ili značajnog (agrekan) gubitka reaktivnosti koja se tiče perineuronskih mreža, ali nalazimo izrazit porast intenziteta WFA-bojenja u difuznom obliku ECM-a u gotovo svim poljima.

(poli - polimorfni sloj, gran - granularni sloj, mol - molekularni sloj, CA - *cornu Ammonis*, GD - *gyrus dentatus*)



Slika 9. Ekspresija fibronektina u kontrolnim uzorcima hipokampusa i u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1.

Panel prikazuje uzorke HS1 nakon imunohistokemijskog bojenja za NeuN (A) i glikoprotein fibronektin (B). Razina ekspresije fibronektina je izrazito niska. Prikazani su usporedno radi lakše analize preparata. Područja obuhvaćena kvadratima na sl. B odgovaraju područjima *cornu Ammonis* i *gyrus dentatus*, uvećano prikazanima u okomitom panelu ispod sl. B. Lijevi uokvireni panel (ispod sl. A) prikazuje korespondirajuća područja u kontrolnim uzorcima. U području *cornu Ammonis* kontrolnih uzoraka fibronektin se nalazi oko piramidnih neurona u perineuronskim mrežama, a u pojedinim neuronima uočljiv je i unutarstanično (uokvireni panel, gore). U području *gyrus dentatus* kontrolnih uzoraka (uokvireni panel, dolje), vidljiv je tek u pojedinim neuronima. U uzorcima HS1 dolazi do potpunog gubitka fibronektina u području *gyrus dentatus* (B - GD), a u području *cornu Ammonis* zaostaje znatno slabija unutarstanična imunoreaktivnost na fibronektin u pojedinačnim neuronima (B - CA). U desnom panelu u izdvojenom kvadratu prikazana je ekspresija fibronektina u području subikuluma na istom uzorku, u svrhu pozitivne kontrole indirektnog imunohistokemijskog bojenja.

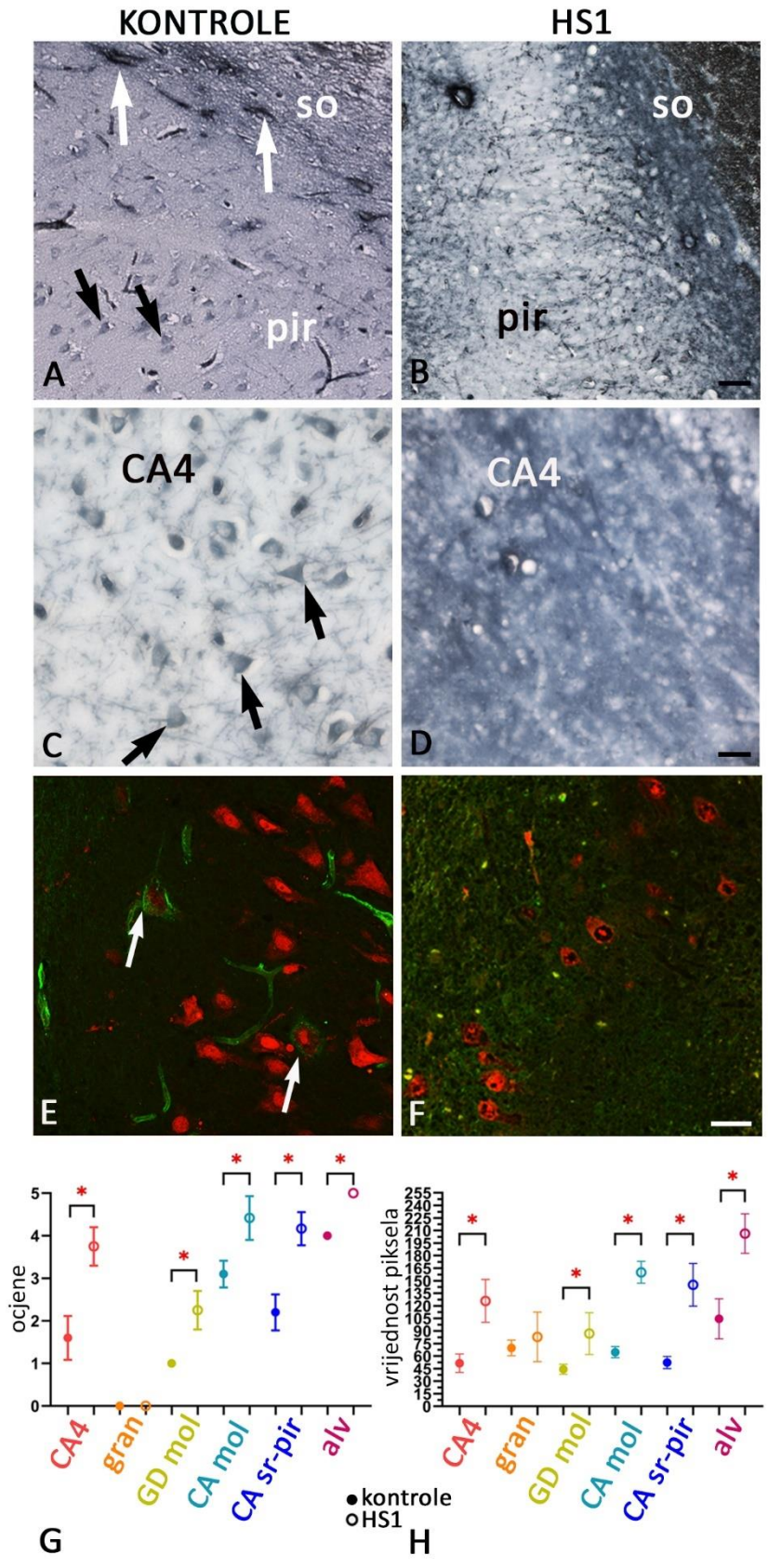
(CA - *cornu Ammonis*, GD - *gyrus dentatus*. Mjerka na slici B je 500  $\mu\text{m}$  i odnosi se i na sliku A. Mjerka na slici kontrolnog uzorka je 50  $\mu\text{m}$ . Mjerka na slici B - CA je 50  $\mu\text{m}$  te se odnosi i na B - GD.)



## 5.2. Promjene obrasca glikozilacije ECM-a u u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1

U uzorcima HS, uz promjene u ekspresiji pojedinih sastavnica ECM-a, prati se i značajna promjena obrasca glikozilacije ECM-a. Navedeno je prikazano primjenom lektina aglutinina biljke *Wisteria floribunda* (WFA) koji se veže za terminalni N-acetilgalaktozamin hodroitin-sulfatnih proteoglikana.

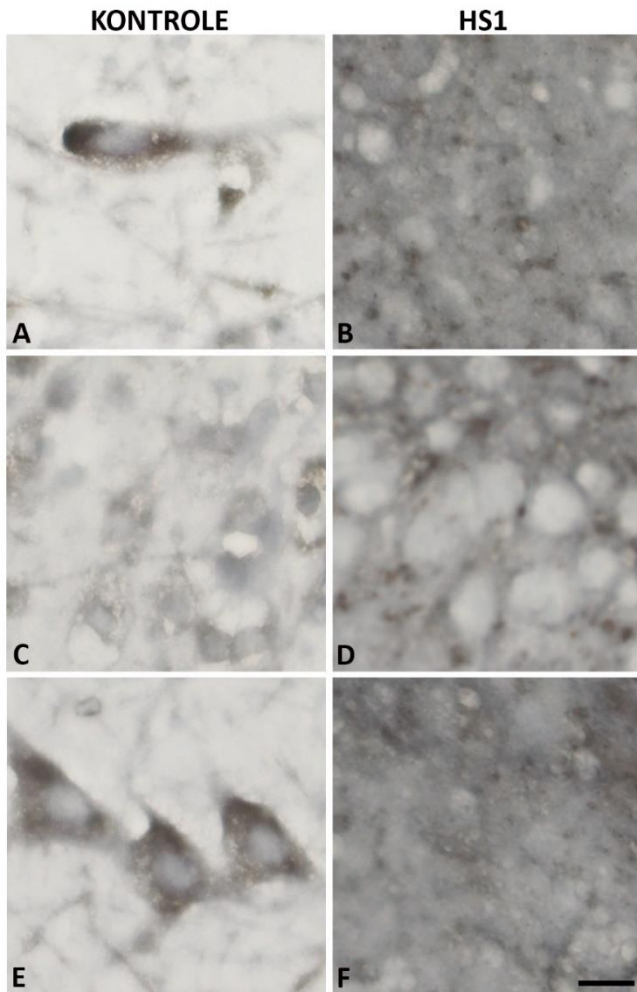
U kontrolnim uzorcima hipokampusu bojenje WFA-om pokazuje kondenzirani oblik ECM-a oko neurona u području *cornu Ammonis* (perineuronske mreže) (sl. 3I, sl. 10A i C, sl. 11E) i području *gyrus dentatus* (sl. 3I, sl. 11A i C). U području *cornu Ammonis* kontrolnih uzoraka perineuronske mreže pozitivne na WFA mogu se uočiti oko piramidnih neurona (sl. 10A i C crne strelice, sl. 10E bijele strelice, sl. 11E) i interneurona (sl. 10A, bijele strelice). Intenzitet lokalizirane pozitivnosti najmanji je oko granularnih neurona. U kontrolnim uzorcima difuzni ECM pokazuje značajnu WFA-specifičnu glikozilaciju u molekularnom sloju područja *cornu Ammonis* i području alveusa (sl. 3I, sl. 10G i H). U uzorcima HS1 dolazi do potpunog gubitka WFA- specifično glikoziliranog ECM-a oko neurona u području *gyrus dentatus* (sl. 3J, sl. 11B i D), a u području *cornu Ammonis* perineuronske mreže gotovo u potpunosti nestaju pa tako i za njih karakteristično bojenje sa WFA-om (sl. 3J, sl. 10B, D i F, sl. 11F). Perineuronske mreže se u području *cornu Ammonis* vide samo u nekoliko promatranih uzoraka HS1 i to tek oko pojedinih neurona u poljima CA 3 ili CA1 (nije prikazano). Uz gubitak perineuronskih mreža, u HS1 dolazi do značajnog porasta bojenja difuznog ECM-a sa WFA-om u svim regijama (sl. 3J, sl. 10B, D, G i H, sl. 11B, D i F). Intenzitet bojenja najmanji je u molekularnom sloju područja *gyrus dentatus* i u kontrolnim uzorcima i u uzorcima HS1 (sl. 10 G i H). Promjena intenziteta bojenja difuznog ECM-a neznatna je i za alveus (sl. 3I i J, sl. 10G i H). U tabl. 4 prikazan je semikvantitativno određen intenzitet WFA-bojenja difuznog ECM-a u kontrolnih uzoraka i uzoraka HS1.



Slika 10. Promjena obrasca glikozilacije izvanstanične tvari.

Panel prikazuje promjene obrasca glikozilacije različitim metodama: WFA-bojenjem (A, B, C, D), fluorescentnim imunohistokemijskim bojenjem (E, F), grafički semikvantitativno (G) i grafički nakon analize intenziteta slike programom FIJI (H). U kontrolnih uzoraka vide se WFA-pozitivne perineuronske mreže oko neurona u piramidnom sloju (crne strelice A i C) i u sloju *stratum oriens* (bijele strelice u A) područja *cornu Ammonis*. U uzorcima HS1 (B, D) dolazi do gubitka perineuronskih mreža i porasta WFA-specifične glikozilacije difuznog ECM-a, što je osobito vidljivo na sl. D. Ekspresija i gubitak perineuronskih mreža oko piramidnih NeuN-neurona prikazani su i *double labeling*-imunofluorescencijom (E - bijele strelice i F). WFA-specifična glikozilacija difuznog ECM-a analizirana je i semikvantitativno (G) i programom za automatsku analizu slike (H) te prikazuje statistički značajan porast glikozilacije difuznog ECM-a za gotovo sva analizirana polja. Kvalitativne ocjene intenziteta glikozilacije za kontrolne uzorke prikazane su točkama (medijani) i rasponom vrijednosti, dok su ocjene za uzorke HS1 prikazane kružićima (medijani) s rasponom vrijednosti (G, H). Statistički značajne razlike označene su crvenim zvjezdicama. Na apscisi su naznačena pojedina polja i slojevi, a na ordinati ocjene intenziteta WFA-specifične glikozilacije semikvantitativno (G) i u vrijednostima piksela (H).

(CA - *cornu Ammonis*, so - *stratum oriens*, pir - piramidni sloj, gran - granularni sloj, GD - *gyrus dentatus*, mol - molekularni sloj, sr - *stratum radiatum*, alv - *alveus*, mjerka: 50 µm na slikama A i B, 20 µm na slikama C i D, 10 µm na slikama E i F.)



Slika 11. WFA-bojenje perineuronskih mreža, proteoglikana i glikoproteina difuznog ECM-a u kontrolnim uzorcima i u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1.

Panel prikazuje polimorfni sloj (A, B), granularni sloj (C, D) područja *gyrus dentatus* i piramidni sloj područja *cornu Ammonis* (E, F) u kontrolnim uzorcima (lijevi stupac) i u uzorcima HS1 (desni stupac). U piramidnom sloju područja *cornu Ammonis* (E) i polimorfnom sloju područja *gyrus dentatus* (A) u kontrolnim uzorcima vide se WFA-pozitivne perineuronske mreže kojih u uzorcima HS1 (B, F) nema. U uzorcima HS1 prati se pojačano bojenje difuznog ECM-a (B, D, F), što nije vidljivo u kontrolnim uzorcima (A, C, E).

Mjerka: 20  $\mu$ m.

**Tablica 4.** Semikvantitativna analiza intenziteta WFA-aktivnosti difuznog ECM-a

U svakom redu navedeni su podatci dobiveni analizom jednog mikroskopskog reza navedenog uzorka. Intenzitet WFA-bojenja za određenu regiju određen je semikvantitativno korištenjem sljedećih kriterija: '0' - bez aktivnosti, '1'- slabo, '2' - srednje, '3' - umjereno, '4' - izraženo, '5' - intenzivno.

(CA - *cornu Ammonis*, GD - *gyrus dentatus*, mol - molekularni sloj, sr - *stratum radiatum*, pir - piramidni sloj, alv - *alveus*)

	CA4	GD mol	CA mol	CA sr - pir	alv
<b>KONTROLNI UZORCI</b>					
<b>1.</b>	2	1	3	2	4
<b>2.</b>	2	1	2	2	4
<b>3.</b>	2	1	3	2	4
<b>4.</b>	2	1	3	2	4
<b>5.</b>	1	1	3	1	4
<b>6.</b>	2	1	3	2	4
<b>7.</b>	1	1	3	2	4
<b>8.</b>	1	1	2	3	4
<b>9.</b>	1	1	3	2	4
<b>10.</b>	2	1	3	2	4
<b>UZORCI HS1</b>					
<b>1.</b>	3	2	4	3	5
<b>2.</b>	4	2	4	4	5
<b>3.</b>	4	3	4	3	5
<b>4.</b>	4	2	5	4	5
<b>5.</b>	3	2	4	3	5
<b>6.</b>	4	2	5	4	5
<b>7.</b>	3	2	5	4	5
<b>8.</b>	4	2	5	4	5
<b>9.</b>	4	3	5	4	5
<b>10.</b>	4	3	5	4	5
<b>11.</b>	4	2	4	2	5
<b>12.</b>	4	2	4	4	5

### 5.3. Kvantitativne i kvalitativne promjene parvalbuminskih neurona u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1

U uzorcima HS1 registriran je smanjen broj PV-neurona u odnosu na kontrolne uzorke hipokampusa. Kontrolni uzorci prosječno sadrže 5 puta više PV-neurona po analiziranom uzorku (srednja vrijednost 36,6 po uzorku za kontrolne uzorke, dok je srednja vrijednost za uzorke HS1 7.1 po uzorku, t-test  $P= 1.3 \times 10^{-13}$ ). Četvrtina uzoraka HS1 ima potpuni gubitak PV-neurona. Gubitak PV-neurona najizraženiji je u polju CA1 u kojoj 60% uzoraka HS1 uopće nema registrirane PV-neurone (srednja vrijednost 0.7 po uzorku HS1, dok je u kontrolnih uzoraka utvrđeno u prosjeku 5 neurona po uzorku u toj regiji). U uzorcima HS1 PV-neuroni su najbrojniji u polju CA 4. Analiza istih po pojedinom sloju u području *cornu Ammonis* HS1 nije bila moguća, s obzirom na to da je diferenciranje pojedinih slojeva otežano zbog patohistoloških promjena (gubitak piramidnih neurona, gliosa). U području *gyrus dentatus* kontrolnih uzoraka hipokampusa PV-neuroni najbrojniji su u granularnom sloju, dok uzorci HS1 sadrže značajno manje PV-neurona: vide se tek pojedinačni PV-neuroni, dok ih u ostalim slojevima područja *gyrus dentatus* nema. Broj PV-neurona po pojedinom uzorku i regiji prikazan je u tabl. 5.

Morfologija PV-neurona jasno se razlikuje između uzoraka kontrolnih hipokampusa i uzoraka HS1. PV-neuroni kontrolnih uzoraka su veći, raznolikog (fuziformnog, bipolarnog, multipolarnog) oblika i bogato razgranatih dendrita (sl. 12, lijevi stupac). Oblikom se u području *cornu Ammonis* izdvajaju PV-neuroni izrazito razgranate mreže nastavaka (sl. 12A), dok su u uzorcima HS1 oni znatno manji, uniformnijeg, uglavnom okruglog, oblika i manje imunoreaktivni (sl. 12 desni stupac). U usporedbi s kontrolama, dendriti PV-neurona u uzorcima HS1 gotovo se ne uočavaju (sl. 12 desni stupac).

Osim gubitka PV-neurona u uzorcima HS1 u cijelom hipokampusu prati se i izraženi gubitak PV-neuropila (vlakana) (sl. 13). Neuropil imunoreaktivan na parvalbumin u području *cornu Ammonis* kontrolnih uzoraka hipokampusa (sl. 13A) čini bogatu mrežu oko piramidnih neurona koje u uzorcima HS1 gotovo da i nema (sl. 13B). U uzorcima HS1 PV-vlakna izostaju i u ostalim slojevima *cornu Ammonis* (sl. 13B), a u kontrolnim uzorcima vlakna se radijalno pružaju kroza sloj *stratum radiatum* (sl. 13A strelice). PV-neuropil reduciran je i u granularnom sloju područja *gyrus dentatus* u HS1 (sl. 13D), ali su vlakna koja su preostala jasno uočljiva, radijalno usmjerena čemu, najvjerojatnije, doprinosi i disperzija samog granularnog sloja (sl. 13D strelice).

**Tablica 5.** Broj parvalbuminskih neurona po regijama kontrolnih uzoraka hipokampusa i uzoraka hipokampalne skleroze tip 1

A Kontrolni uzorci hipokampusa (označeni debelo otisnutim rednim brojevima) korišteni za kvantifikaciju PV-neurona u pojedinim hipokampalnim poljima. Ispod rednog broja kontrolnog uzorka, u svakom redu navedeni su podatci dobiveni analizom jednog mikroskopskog reza navedenog uzorka. Brojevi u poljima tablice označavaju broj PV-neurona u različitim hipokampalnim poljima (stupci) pojedinog reza.

(N/P - nije primjenjivo, CA - *cornu Ammonis*, gran - granularni sloj, GD - *gyrus dentataus*, mol - molekularni sloj, poli - polimorfni sloj, pir - piramidni sloj)

Broj PV - pozitivnih neurona	CA4	gran	GD - mol	GD - poli	CA3 – pir	CA2 pir	CA1 - pir
<b>1.</b>							
<i>A1-2</i>	3	0	1	6	1	2	4
<i>A1-6</i>	3	3	0	16	0	1	2
<i>A1-10</i>	3	3	3	6	2	2	7
<b>2.</b>							
<i>A7-3</i>	1	0	1	4	0	2	3
<i>A7-7</i>	3	3	2	5	3	4	5
<i>A7-11</i>	3	1	5	7	4	2	3
<b>3.</b>							
<i>A1-3</i>	3	2	3	14	2	6	7
<i>A1-7</i>	3	5	0	13	2	2	6
<i>A1-11</i>	4	0	4	14	4	5	4
<b>4.</b>							
<i>A2-2</i>	7	2	5	20	2	2	16
<i>A2-6</i>	5	8	3	19	4	2	12
<i>A2-10</i>	9	10	6	20	4	4	9
<b>5.</b>							
<i>A18-12</i>	0	0	0	4	1	4	5
<i>A18-11</i>	0	1	0	2	1	3	4
<b>6.</b>							
<i>B1-2</i>	10	5	5	6	3	5	9
<i>B1-6</i>	5	4	1	6	3	1	12
<i>B1-10</i>	8	5	2	11	2	3	15
<b>7.</b>							
<i>A15-2</i>	6	2	5	28	6	1	17
<i>A15-6</i>	14	0	7	22	5	8	13
<i>A15-10</i>	10	0	5	40	6	3	13
<b>8.</b>							

A4-3	0	2	0	6	1	3	13
A4-7	1	1	0	11	5	6	12
A4-11	3	0	1	11	2	2	20
<b>9.</b>							
B1-2	0	1	0	14	N/P	N/P	2
B1-6	3	0	1	8	4	0	0
B1-10	5	0	1	11	2	2	2
<b>10.</b>							
B6-2	2	1	2	4	1	1	4

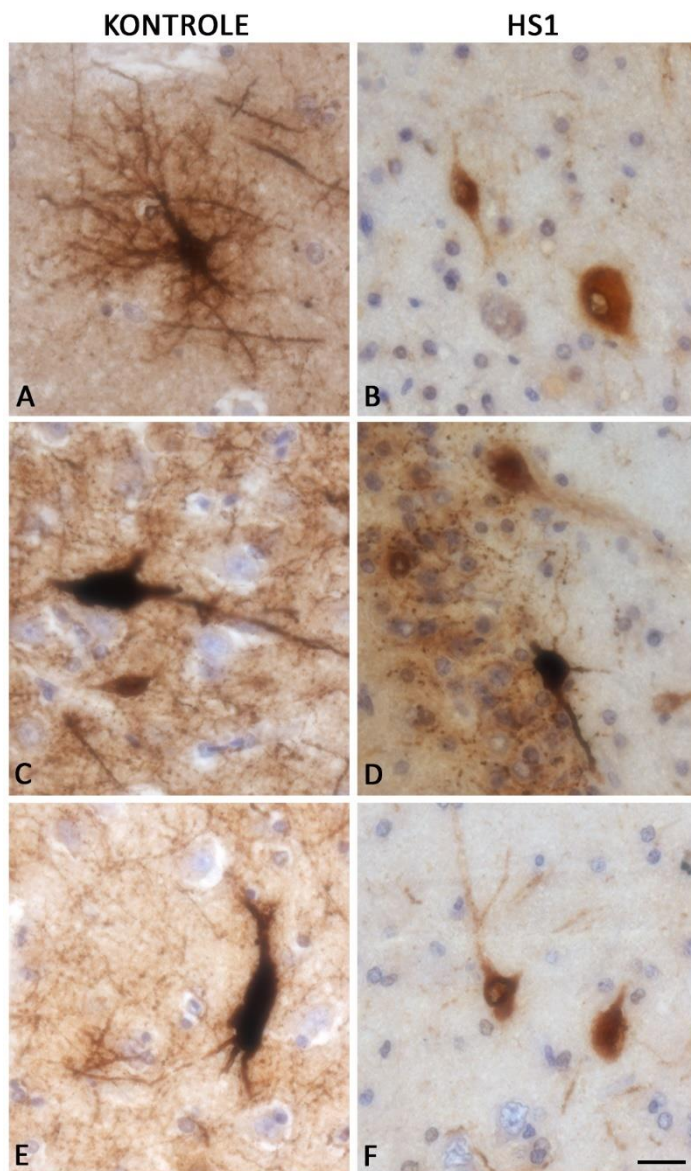
**B** Uzorci HS1 (označeni debelo otisnutim rednim brojevima) korišteni za kvantifikaciju PV-neurona u pojedinim hipokampalnim poljima. Ispod rednog broja uzorka, u svakom redu navedeni su podatci dobiveni analizom jednog mikroskopskog reza navedenog uzorka. Brojevi u poljima tablice označavaju broj PV-neurona različitim hipokampalnim poljima (stupci) pojedinog reza.

(N/P - nije primjenjivo, CA - *cornu Ammonis*, gran - granularni sloj, GD - *gyrus dentatus*, mol - molekularni sloj, poli - polimorfni sloj, pir - piramidni sloj)

Broj PV- pozitivnih neurona	CA4	gran	GD - mol	GD - poli	CA3 – pir	CA 2- pir	CA1 - pir
<b>1.</b>							
7	5	0	0	0	3	0	0
11	5	3	0	0	1	0	0
15	3	0	0	0	0	0	0
<b>2.</b>							
1	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	1	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0
<b>3.</b>							
13	7	10	8	0	3	1	3
17	15	5	6	0	3	5	7
7	7	0	6	0	0	0	3
11	8	2	3	0	N/P	N/P	4
15	7	2	4	1	3	3	5
19	8	1	6	0	0	0	0
<b>4.</b>							
7	5	1	0	0	0	0	0
8	2	1	0	0	0	0	1
20	1	1	0	0	0	0	1



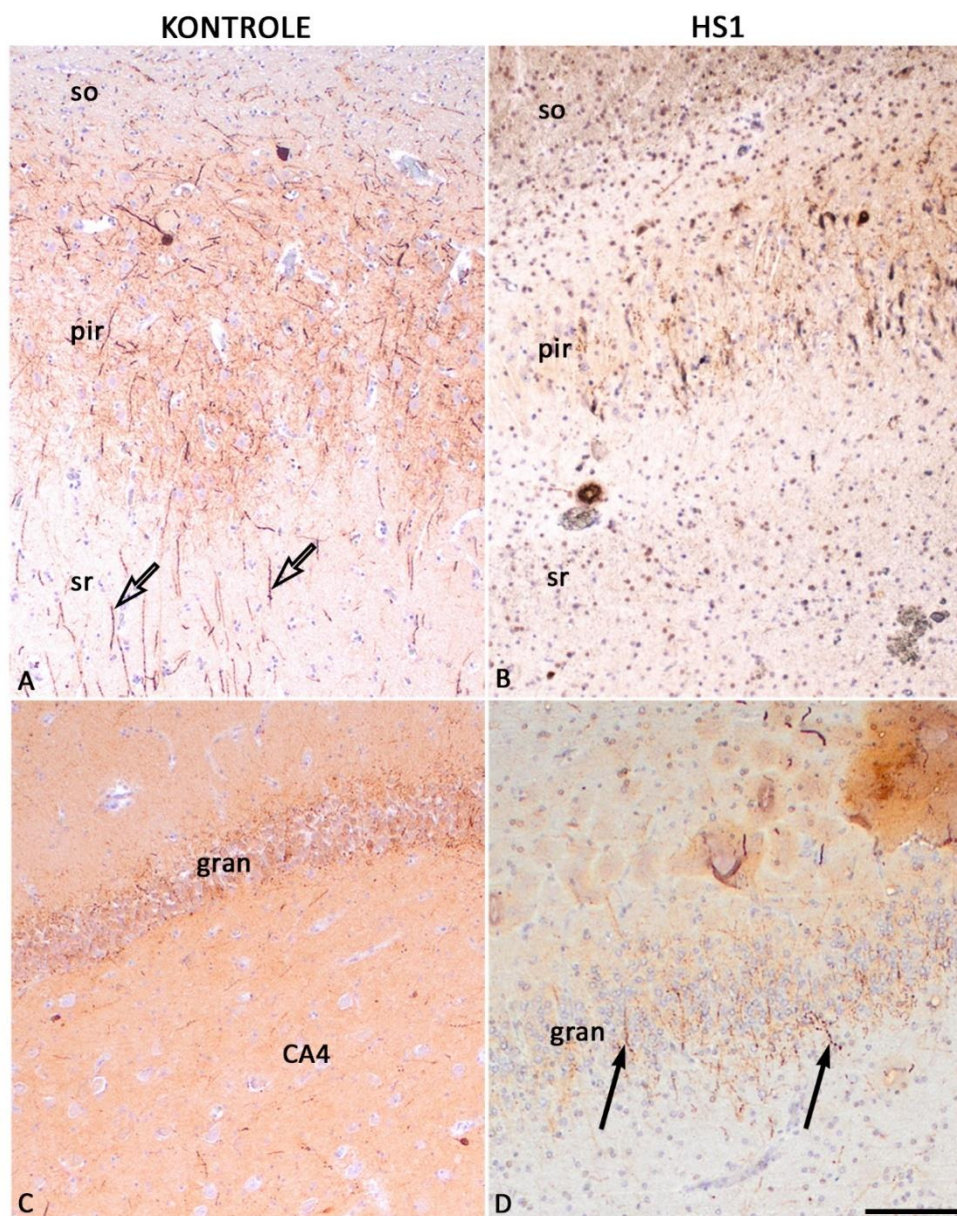
<b>5.</b>							
<i>1</i>	1	2	0	0	0	0	1
<i>9</i>	0	4	0	0	0	6	0
<i>8</i>	0	1	0	0	3	N/P	0
<i>19</i>	0	3	0	0	0	0	0
<b>6.</b>							
<i>1</i>	5	0	0	0	0	2	0
<i>5</i>	10	0	0	0	0	0	0
<i>9</i>	6	1	0	0	0	2	1
<i>13</i>	4	0	0	0	0	0	0
<i>17</i>	4	2	0	0	0	0	0
<b>7.</b>							
<i>1</i>	3	0	0	0	N/P	N/P	N/P
<i>9</i>	1	0	0	0	2	N/P	N/P
<i>17</i>	0	0	0	0	N/P	N/P	N/P
<i>8</i>	N/P	N/P	N/P	N/P	N/P	N/P	N/P
<b>8.</b>							
<i>9</i>	0	0	1	0	3	0	1
<i>7</i>	4	1	0	0	0	0	1
<i>15</i>	5	2	0	0	1	0	0
<b>9.</b>							
<i>1</i>	4	3	2	2	1	1	1
<i>5</i>	3	1	0	0	N/P	N/P	N/P
<i>13</i>	5	9	0	0	N/P	N/P	5
<i>17</i>	1	4	0	0	N/P	N/P	2
<i>11</i>	N/P	N/P	N/P	N/P	N/P	N/P	N/P
<b>10.</b>							
<i>1</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>17</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>16</i>	0	1	0	0	0	0	0
<b>11.</b>							
<i>1</i>	4	3	1	0	0	0	0
<i>5</i>	3	0	0	0	1	0	1
<i>13</i>	0	1	0	0	0	0	0
<i>17</i>	2	0	0	0	1	N/P	N/P
<b>12.</b>							
<i>7</i>	2	0	0	0	8	10	0



Slika 12. Morfologija parvalbuminskih neurona.

Panel prikazuje raznolikost morfologije PV-neurona u kontrolnim uzorcima (lijevi stupac) i u uzorcima HS1 (desni stupac). PV-neuroni u kontrolnim su uzorcima veći, razgranatiji, imaju više dendrita i raznolikih su oblika (A, C, E), dok su u uzorcima HS1 značajno manji, uniformnijeg oblika, rijetko imaju dendrite, a pojedini su manje PV-imunoreaktivni (B, D, F).

Mjerka: 20  $\mu\text{m}$ .



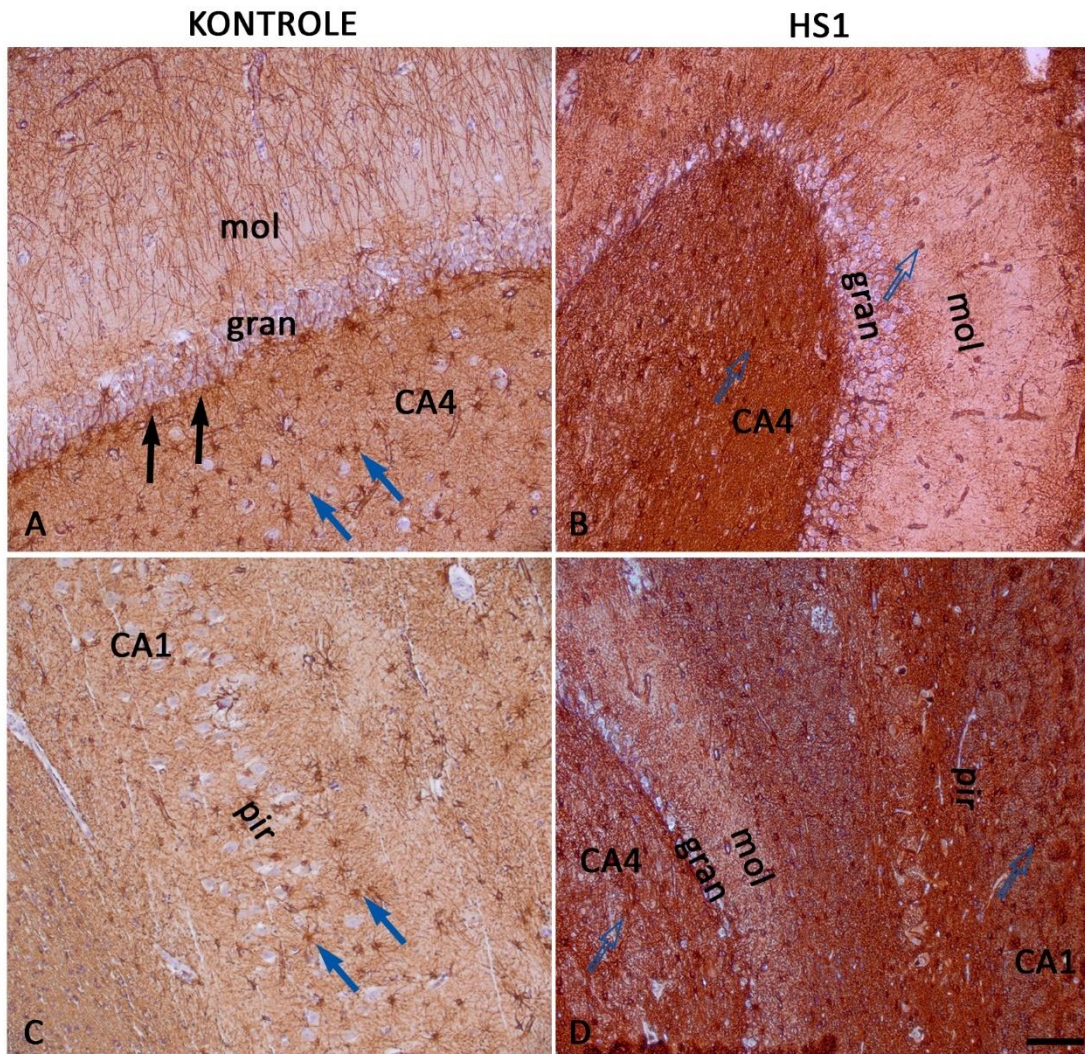
Slika 13. Promjene parvalbuminskog neuropila u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1.

Panel prikazuje *gyrus dentatus* (C, D), CA1 (A, B) hipokampusa koji su imunohistokemijski obojeni na parvalbumin. U kontrolnim uzorcima PV-neuropil tvori mrežu oko piramidnih neurona, što je posebno izraženo u polju CA1 (A) gdje se vidi i radijalna usmjerenost PV-vlakana u sloju *stratum radiatum* (A strelice). U uzorcima HS1 navedeno gotovo u potpunosti izostaje (B). U granularnom sloju područja *gyrus dentatus* kontrolnih uzoraka vidljiv je PV-neuropil (C) koji je u uzorcima HS1 blijed, slabo vidljiv, raspršen i radijalno usmjeren (strelice D). U piramidnom sloju opaža se i manji broj PV-neurona.

(so - *stratum oriens*, pir - piramidni sloj, sr - *stratum radiatum*, gran - granularni sloj, CA4 - *cornu Ammonis*, mjerka: 200  $\mu\text{m}$ )

#### 5.4. Gliozna u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1

Manji broj piramidnih neurona i izražena difuzna gliozna glavna su obilježja uzoraka HS1, prikazana na sl. 2H. Zbog toga je razlikovanje pojedinih polja i slojeva u uzorcima HS1 dodatno otežano (sl. 14D). Difuzna imunoreaktivnost na GFAP najmanje je izražena u molekularnom i granularnom sloju područja *gyrus dentatus*, što je, osim u uzorcima HS1, vidljivo i u kontrolnim uzorcima (sl. 2G i H, sl. 14A i B). U molekularnom sloju kontrolnih uzoraka vidi se razvijena mreža GFAP-pozitivnih vlakana (sl. 14A), što izostaje u uzorcima HS1 (sl. 14B). Astrociti je u kontrolnim uzorcima najmanje u molekularnom sloju područja *gyrus dentatus* (sl. 14A), ali su veći i razgranatiji (sl. 14A i C plave strelice), u odnosu na one u uzorcima HS1 (sl. 14B i D prazne plave strelice). U polimorfnom sloju područja *gyrus dentatus* kontrolnih uzoraka astrociti tvore pravilan niz uza sam granularni sloj (sl. 14A, crne strelice), dok navedeno izostaje u uzorcima HS1 (sl. 14B). Astrociti je više u molekularnom sloju područja *gyrus dentatus* u uzorcima HS1 nego u kontrolnim uzorcima. Difuzna GFAP-imunoreaktivnost u uzorcima HS1 najintenzivnija je u poljima CA4 i CA1, ujedno mjestima najvećeg gubitka neurona.



Slika 14. Gliozu u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1.

Panel prikazuje područje *gyrus dentatus*, polja hipokampusa CA1 i CA4 kontrolnih uzoraka i uzoraka HS1 imunohistokemijski obojena glijalnim fibrilarnim kiselim proteinom (GFAP). Ekspresija GFAP je jače izražena u uzorcima HS1 nego u kontrolnim uzorcima u svim poljima hipokampusa, osim u molekularnom i granularnom sloju područja *gyrus dentatus*, gdje ona gotovo izostaje ne samo u uzorcima HS1 (B) nego i u kontrolnim uzorcima (A). Astroцити су већи и разгранатији у контролним uzorcima (A, C plave strelice) u odnosu na uzorke HS1 (B, D prazne plave strelice), ali su brojniji u molekularnom sloju područja *gyrus dentatus* uzoraka HS1 nego u kontrolnim uzorcima. U polimorfnom sloju područja *gyrus dentatus* kontrolnih uzorka astroцити tvore niz uz sam granularni sloj (A crne strelice), a u molekularnom sloju vide se brojna usmjerena GFAP-pozitivna vlakna (A). Navedene promjene izostaju u uzorcima HS1 (B).

(mol - molekularni sloj, gran - granularni sloj, pir - piramidni sloj, CA - *cornu Ammonis*, mjerka: 100  $\mu\text{m}$ )

### 5.5. Klinički podatci

U razdoblju između 2011. i 2018. godine 34 pacijenta operirana su zbog MTLE-a, koji su postoperativno patohistološki klasificirani kao HS1. Među njima bilo je 16 žena i 18 muškaraca. Prosječna dob u vrijeme početka napadaja bila je 13,6 godina, dok je prosječno trajanje bolesti do operacije 26,7 godina. Postoperativno su 32 pacijenta imala *Engel outcome* 1, odnosno uopće nisu imali napadaja, dok je u 2 pacijenta zabilježen *Engel outcome* 2 (gotovo bez napadaja). U razdoblju od godinu dana prije operacije bolesnici su prosječno imali 2 - 3 napadaja mjesečno, a uzimali su prosječno 3 antiepileptika. Godinu dana nakon operacije i dalje prosječno uzimaju 3 antiepileptika. Tijekom trajanja bolesti, u 27 pacijenata žarišni napadaji prešli su u bilateralne toničko-kloničke napadaje, a 10 pacijenata imalo je uz semiologiju MTLE-a i napadaje druge semiologije. Febrilne konvulzije u anamnezi imalo je 12 bolesnika od čega je 4 bolesnika uz febrilne konvulzije imalo i jedan od drugih čimbenika, kao što su meningitis, perinatalne ozljede mozga ili druge traume mozga. Ukupno 9 bolesnika imalo je jedan od ostalih čimbenika (meningitis, perinatalne i druge traume mozga). Pozitivnu obiteljsku anamnezu epilepsije imala su 4 bolesnika. Pregled navedenih podataka prikazan je u tabl. 6. U tabl. 7 prikazana je detaljnija klinička semiologija epileptičnih napadaja i ostali značajni klinički podatci pacijenata na uzorcima kojih je učinjena imunohistokemija.

**Tablica 6.** Prikaz kliničkih podataka bolesnika operiranih radi MTLE-a (patohistološki utvrđena hipokampalna skleroza tip 1)

\* u tablici je prikazana srednja vrijednost

\*\* ostali faktori obuhvaćaju ozljedu mozga, upalne bolesti SŽS-a, perinatalne ozljede mozga

<b>Broj operiranih zbog MTLE-a (patohistološki utvrđena hipokampalna skleroza tip 1) 2011. - 2018. godine</b>	<b>34</b>
Spol	18 M 16 Ž

dob bolesnika u vrijeme početka napadaja *	13,6 godina
trajanje bolesti do operacije *	26,7 godina
prelazak u bilateralne toničko-kloničke napadaje	27
pridružena ostala semiologija napadaja	10
broj napadaja mjesečno godinu dana prije operacije	2 - 3
broj antiepileptika godinu dana prije operacije *	3,32
broj antiepileptika godinu dana poslije operacije *	3,16
ishod (Engel)	1
febrilne konvulzije u anamnezi	12
febrilne konvulzije + ostali **	4
ostali faktori **	9
pozitivna obiteljska anamneza	4

#### 5.6. Korelacija WFA-aktivnosti difuznog ECM-a s kliničkim podacima bolesnika operiranih zbog hipokampalne skleroze tip 1

Klinički podatci bolesnika operiranih zbog MTLE-a (dob bolesnika u vrijeme početka epileptičnih napadaja (MTLE), trajanje bolesti do operacije, broj antiepileptika koje je bolesnik uzimao tijekom godine dana prije operacije, učestalost napadaja godinu dana prije operacije, postoperativni ishod), korelirani su s intenzitetom WFA-pozitivnosti difuznog ECM-a. Statistički značajna povezanost nije utvrđena, ali vidljiv je jasan trend da bolesnici s manjim brojem napadaja imaju manji intenzitet WFA-bojenja difuznog ECM-a u sloju *stratum pyramidale radiatum* (sl. 8G i H).

**Tablica 7.** Klinički podatci pacijenata s hipokampalnom sklerozom tip 1 čiji su uzorci obrađeni imunohistokemijom

Klinička semiologija napadaja: svi pacijenti imali su tipičnu kliničku semiologiju napadaja mezijalnog temporalnog režnja (MTLE) - žarišni nemotorički napadaji s poremećajem svjesnosti i prelaskom u bilateralne toničko-kloničke napadaje. Deset pacijenata imalo je žarišne autonomne napadaje s poremećajem svjesnosti, dva pacijenta imala su žarišne kognitivne napadaje s poremećajem svjesnosti, a jedan je pacijent mao žarišne senzoričke napadaje s poremećajem svjesnosti.

CBZ-CR - karbamazepin s produljenim oslobađanjem, LEV - levetiracetam, LTG - lamotrigin, CBZ - karbamazepin, OXC - okskarbazepin, VPA - valproat, MPB - metilfenobarbiton, CLB - klobazam, PRM - primidon, SUL - sultiam, TPM - topiramet, CNZ - klonazepam

SPOL	Dob u vrijeme operacije (godine)	Strana	Trajanje epilepsije (godine)	Febrilne konvulzije	Komorbiditeti	Klinička semiologija	Broj antiepileptika tijekom bolesti	Stari antiepileptici godinu dana prije operacije	Novi antiepileptici godinu dana prije operacije	Broj napadaja godinu dana prije operacije	Post-operativni ishod - Engel
ženski	37	lijevo	21	NE	Depresija	epigastrična aura nakon koje slijedi poremećaj svijesti praćen nefluentnom motornom disfazijom, postiktalnom smetenosti	7	CBZ-CR	LEV, LTG	1 mjesečno	1
muški	64	lijevo	58	N/P	teškoće s učenjem u školi, Parkinsonova bolest	epigastrična aura nakon koje slijedi poremećaj svijesti praćen oroalimentarnim automatizmima, nefluentnom motornom disfazijom, postiktalnom smetenosti	6	CBZ, VPA	OXC, LTG	nekoliko tjedno	1
muški	42	lijevo	37	N/P	depresija	epigastrična aura nakon koje slijedi	4	VPA, MPB	LTG, OXC	nekoliko tjedno	2



						poremećaj svijesti praćen oroalimentarnim automatizmima, nefluentnom motornom disfazijom, postiktalnom smetenosti					
muški	25	lijevo	18	NE	NE	epigastrična aura nakon koje slijedi poremećaj svijesti praćen oroalimentarnim automatizmima nefluentnom motornom disfazijom	N/P	CLB, PRM, VPA	OXC	1 mjesečno	1
ženski	42	desno	32	N/P	NE	olfaktorna aura (halucinacije) nakon koje slijedi poremećaj svijesti praćen gesturalnim automatizmima gornjih ekstremiteta	N/P	SUL	OXC	2 - 3 mjesečno	1
ženski	38	lijevo	33	DA	NE	epigastrična aura nakon koje slijedi poremećaj svijesti praćen nefluentnom motornom disfazijom	7	CBZ-CR, CLB	LTG, LEV	2 - 3 mjesečno	1
ženski	57	desno	45	NE	NE	žarišni kognitivni ( <i>déjà-vu</i> ) napadaji s poremećajem	9	MPB	OXC	više od 1 tjedno	1

						svjesnosti, gesturalnim automatizmima gornjih ekstremiteta					
ženski	32	desno	22	NE	perinatalna asfiksija, teškoće govora u djetinjstvu, depresija	epigastrična aura nakon koje slijedi poremećaj svijesti praćen oroalimentarnim automatizmima	6	MPB, CLB	LTG, OXC	svaki dan	2
muški	42	lijevo	10	DA	psihomotorna retardacija, poremećaj iz spektra autizma	epigastrična aura nakon koje slijedi poremećaj svijesti praćen oroalimentarnim automatizmima, nefluentnom motornom disfazijom, postiktalnom smetenosti	7	MPB, VPA	LEV, TPM	2 - 3 mjesečno	1
muški	49	desno	24	NE	NE	epigastrična aura nakon koje slijedi poremećaj svijesti praćen oroalimentarnim automatizmima, postiktalnom smetenosti	5	VPA	OXC, LTG	1 tjedno	1
ženski	34	lijevo	32	DA	NE	epigastrična aura nakon koje slijedi poremećaj svijesti praćen oroalimentarnim automatizmima nefluentnom motornom	6	MPB, CNZ	OXC, LTG	1 - 2 tjedno	1

						disfazijom, postiktalnom smetenosti					
muški	24	lijevo	22	NE	NE	epigastrična aura praćena poremećajem svijesti, oralnim automatizmima, postiktalnom smetenosti	6	-	LEV, LTG, OXC	1 u nekoliko mjeseci	1
muški	45	lijevo	37	NE	NE	žarišni kognitivni ( <i>déjà-vu</i> ) napadaji s poremećajem svjesnosti s oralnim automatizmima i nefluentnom motornom disfazijom	6	MPB	LEV, OXC, LTG	2 - 3 mjesečno	1

## 6. RASPRAVA

Prema dosadašnjim istraživanjima, u najvećem broju izrađenim na eksperimentalnim modelima glodavaca, u epilepsiji se bilježe promjene ECM-a koje doprinose procesu epileptogeneze. Radova na humanim uzorcima hipokampusa tek je nekolicina i uglavnom su bazirani na malom broju uzoraka. Ovaj rad daje pregled sastavnica ECM-a u farmakorezistentnoj epilepsiji u uzorcima HS1 i u kontrolnim (obdukcijским) uzorcima hipokampusa. U uzorcima HS1 utvrđene su jasne razlike u ekspresiji svih analiziranih (osnovnih) sastavnica ECM-a, ali i promjene obrasca glikozilacije u odnosu na ekspresiju ovih molekula u kontrolnim uzorcima. Perineuronske mreže (kondenzirani oblik ECM-a) su manje, dezintegrirane, nemaju tako tipičnu morfologiju i/ili brojčano ih je značajno manje. Pojedine sastavnice ECM-a ekspimiraju se intenzivno, homogeno, difuzno specifično za polje ili sloj hipokampusa, ili pak generalizirano u svim poljima i slojevima.

### 6.1. Razlike ekspresije sastavnica difuznog ECM-a u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1 u odnosu na hipokampuse kontrolnih uzoraka

ECM je bitan regulator tijekom razvoja SŽS-a. Njegov sastav i količina značajno se mijenjaju tijekom razvoja: u mozgu odrasle jedinke obujmom je manji, mijenja mu se sastav, kao i obrasci sulfatacije lanaca njegovih sastavnica te u konačnici oko nekih populacija neurona nastaju kondenzirani djelovi ECM-a - perineuronske mreže (35). Osim što je u mozgu odraslog čovjeka značajno manje zastupljen nego što je tu u mozgu tijekom razvitka, bitna značajka ECM-a mozga odrasle jedinke je minimalna pregradnja (*turnover*) njegovih sastavnica koje gotovo da i nema, što ograničava strukturnu i funkcionalnu plastičnost mozga. Eksperimentalnim modelima pokazano je da se manipulacijom ECM-a plastičnost može reaktivirati (130). Prilikom ozljede perifernog ili središnjeg živčanog sustava dolazi do značajne pregradnje ECM-a, uz pojačanu ekspresiju različitih molekula ECM-a i njihovog odlaganja na i oko samoga mjesta ozljede što je, zasad, najbolje proučeno prilikom formiranja glijalnog ožiljka (105,106,131–133). Novosintetizirani ECM, u ovom slučaju, sintetiziraju reaktivni astrociti, mikroglia, makrofagi i prekursori oligodendrocita (36). U moždanoj ozljedi nakon epileptičnog napadaja do sada nisu proučene promjene u sastavu ECM-a na humanom

materijalu u ovom opsegu, već su sve dosadašnje spoznaje rezultat istraživanja na modelima glodavaca.

Najzastupljenija grupa proteoglikana u ECM-u središnjem živčanom sustavu su CSPG-i (134), a glavninu ECM-a mozga čine lektikani (versikan, agrekan, neurokan, brevikan), podskupina CSPG-a (29,105,135). S obzirom na navedeno, u ovom je radu fokus usmjeren upravo na lektikane.

Od ispitanih lektikana najupečatljiviju razliku u ekspresiji pokazao je versikan. Korišteno je protutijelo na juvenilni oblik (V0) koje, prema studijama na animalnim modelima, ne bi trebalo biti izraženo u mozgu odrasle jedinke (36). U našim kontrolnim uzorcima utvrđena je ekspresija V0, ali samo u području *gyrus dentatus*. Ograničena ekspresija razvojne izoforme V0 na područje *gyrus dentatus*, je najvjerojatnije povezana sa procesima neuritogeneze u hipokampusu odrasle jedinke. Prema nekim autorima moguće je da se u ovom sloju u maturiranom mozgu odrasla čovjeka odvija i neurogeneza (136), proces u kojem značajnu ulogu igra i ECM. U uzorcima HS1 zabilježen je intenzivan porast imunoreaktivnosti u cijelom hipokampusu, neovisno o polju ili sloju. Imunoreaktivnost za versikan povezana je s difuznim ECM-om, dok lokalizirani obrasci, poput perineuronskih mreža, nisu zapaženi. U literaturi, za sada, nema zapisa o ekspresiji versikana u mozgu čovjeka nakon epileptičnog napadaja.

Neurokan je izražen u hipokampusu tijekom razvoja kada utječe na mnoge procese kao što je neuritogeneza, elongacija i navođenje aksona, grananje aksona te stvaranje sinapsi i njihova reorganizacija pri plastičnom odgovoru (137–144). Tijekom razvoja izražen je oko mahovinastih vlakana te služi kao barijera koja usmjerava njihovu ekstenziju (143,145). Dok je ekspresija neurokana tijekom razvoja obilna, u mozgu odrasle jedinke ima ga vrlo malo (146). No, u odraslih glodavaca nakon indukcije epileptičnih napadaja dolazi do njegove pojačane ekspresije (108,117,118). U dosadašnjoj literaturi, podataka o ekspresiji neurokana na histološkoj razini u hipokampusu čovjeka tijekom razvoja i u odrasloj dobi gotovo da i nema. U našim kontrolnim uzorcima mozga odraslog čovjeka imunoreaktivnost na neurokan najintenzivnija je u molekularnom i piramidnom sloju područja *cornu Ammonis*. U uzorcima HS1 vidi se pomak najintenzivnije imunoreaktivnosti u molekularni sloj područja *gyrus dentatus*, mjesto intenzivnog grananja mahovinastih vlakana, što je u skladu s nalazima na animalnim modelima gdje je zapažen porast ekspresije neurokana u području *gyrus dentatus* (108) što se, također, povezuje s izrastanjem mahovinastih vlakana (61). Sljedeća razlika u odnosu na animalne modele koja je opažena jest da je imunoreaktivnost neurokana zamijećena

samo u difuznom ECM-u, dok ga u životinja ima i u obliku kondenzirane forme - perineuronskim mrežama (44).

Za razliku od prethodna dva lektikana, agrekan je u uzorcima korištenim u ovom istraživanju pokazao ekspresiju samo u lokaliziranoj formi i to u i oko nekih neurona u poljima CA1 - CA4 te oko granularnih stanica područja *gyrus dentatus*. Agrekan je prema animalnim modelima karakterističan za ECM odrasle jedinke (36) te se, prema literaturi, u SŽS-u nalazi isključivo u obliku perineuronskih mreža (87,147,148), što ga razlikuje od ostalih lektikana. U uzorcima HS1 registriran je smanjen broj perineuronskih mreža pozitivnih na agrekan, a pojedine preostale perineuronske mreže promijenjene su morfologije ("okruglije"), što može upućivati na promjenjen oblik stanica koje obuhvaćaju. U eksperimentalnim (animalnim) modelima nakon induciranja epileptičnog statusa dolazi do smanjenja ekspresije agrekana u perineuronskim mrežama, a narušena je i njihova struktura (107). Narušena struktura perineuronskih mreža djelomično je posljedica smanjenja gradivnih elemenata (HAS 3 i HAPLN1), dok je drugi razlog povećana aktivnost proteaza (107,113).

U uzorcima HS1 nije zabilježena imunoreaktivnost proteoglikana CS56, dok je u kontrolnim uzorcima njegova imunoreaktivnost, osim difuzno, zabilježena i u kondenziranom obliku perineuronskih mreža oko neurona u području *cornu Ammonis* te intracitoplazmatski u granularnim stanicama u području *gyrus dentatus*. Prema navedenom, vidljivo je da specifični glikozilacijski i sulfatacijski epitop koji prepoznaje ovo monoklonsko protutijelo ne prati ekspresiju ni jednog od lektikana korištenih u ovom radu. Tijekom razvoja u ljudi epitop CS-56 obilno je eksprimiran, a njegova se ekspresija smanjuje u kasnom fetalnom i ranom postnatalnom periodu (55). Usporedivši to s našim nalazima čini se da juvenilni epitop CS-56 ne pokazuje značajnu ekspresiju u mozgu odrasle jedinke, niti da dolazi do njegove ponovne ekspresije u farmakorezistentnim epilepsijama povezanim s HS1, za razliku od ekspresije neurokana i versikana V0.

Od glikoproteina je analiziran fibronektin, glikoprotein obilno izražen u različitim vrstama ECM-a. Fibronektin se povezuje s regeneracijom i oporavkom nakon ozljede tkiva, no nije karakterističan za ECM maturiranog SŽS-a (44), što je potvrđeno i u našem radu. Naime, u odnosu na ostala analizirana protutijela, imunoreaktivnost fibronektina značajno je manje izražena, međutim, vide se razlike između kontrolnih uzoraka i uzoraka HS1. U području *cornu Ammonis* kontrolnih uzoraka fibronektin je eksprimiran unutarstanično i perisomatski, a u u pojedinim neuronima granularnog sloja vidljiva je unutarstanična reaktivnost, dok u uzorcima

HS1 dolazi do potpunog gubitka ekspresije. Navedeno je sukladno nalazima na animalnim modelima gdje nije uočena značajna promjena u ekspresiji fibronektina (108). Ipak, u ljudi su utvrđene povišene vrijednosti fibronektina u serumu i likvoru bolesnika nakon epileptičnih napadaja (149). Pretpostavlja se da je uzrok povišenih vrijednosti fibronektina u likvoru oslobađanje fibronektina iz neurona, s obzirom na to da tijekom epileptičnog napadaja dolazi do oštećenja neurona (150), što se djelomično prati i u rezultatima ove studije, budući da je u kontrolnim uzorcima ekspresiran intracelularno, a u uzorcima HS1 to više nije vidljivo. Ipak, ispitanici su u spomenutom radu imali različitu semiologiju napadaja; u najvećoj mjeri radilo se o generaliziranim napadajima bez supstrata na MR-u, što sugerira heterogenost bolesnika s epilepsijom, kao i to da pacijenti sa strukturalnom epilepsijom mogu imati različit obrazac ECM-a.

Prema navedenom, u uzorcima HS1 prati se porast i/ili promjena u ekspresiji juvenilnih oblika molekula i organizaciji ECM-a u odnosu na kontrolne uzorke u kojima je zabilježena ekspresija razvojnih oblika vrlo ograničena. Paralelno s porastom ekspresije razvojnih oblika prati se razgradnja perineuronskih mreža. Iz navedenoga i do sada pokazanog u ovoj i prijašnjim studijama na animalnim modelima proizlazi da razvojni ECM i razgradnja perineuronskih mreža doprinose plastičnosti, ali i procesima epileptogeneze u HS1.

## 6.2. Perineuronske mreže i razlike u glikozilaciji ECM-a uzoraka hipokampusa zahvaćenih hipokampalnom sklerozom tip 1 u odnosu na hipokampuse kontrolnih uzoraka

U uzorcima HS1 prati se, uz promjene u ekspresiji pojedinih sastavnica ECM-a, značajna promjena obrasca glikozilacije sastavnica ECM-a. Navedeno je prikazano primjenom lektina aglutinina biljke *Wisteria floribunda* (WFA) koji se veže za terminalni N-acetilgalaktozamin hondroitin-sulfatiranih proteoglikana. U kontrolnim uzorcima hipokampusa WFA-bojenje pokazuje kondenzirani oblik ECM-a oko piramidnih neurona i interneurona u području *cornu Ammonis* (perineuronske mreže) i oko granularnih neurona područja *gyrus dentatus*, što se razlikuje od dosadašnjih spoznaja da je WFA pozitivni kondenzirani ECM ponajprije lokaliziran oko GABA-ergičkih interneurona (60,62). U uzorcima HS1 dolazi do potpunog gubitka WFA-pozitivne lokalizirane aktivnosti u području *gyrus dentatus*, dok u području *cornu Ammonis* WFA-pozitivne perineuronske mreže ostaju vidljive tek oko nekolicine neurona. S obzirom na to da perineuronske mreže stabiliziraju sinapse i neurone, njihovom razgradnjom narušena je funkcija inhibicijskih GABA-ergičkih krugova (smanjena inhibicijska

aktivnost PV-neurona) i omogućena je povećana ekscitabilnost ne samo piramidnih neurona već i granularnih neurona područja *gyrus dentatus* (polazišne stanice mahovinastih vlakana), što može doprinijeti nastanku epileptičnih napadaja, odnosno epileptogenezi.

Jedini dosadašnji rad na humanim uzorcima koji je analizirao ekspresiju perineuronskih mreža u epilepsiji rad je Rogersa i sur. (123) koji nisu pronašli razlike u ekspresiji perineuronskih mreža između kontrolnih uzoraka i uzoraka bolesnika s epilepsijom. U odnosu na njihov rad u ovom je radu analiziran veći broj uzoraka i homogenija skupina bolesnika (svi HS1). Analizirane su i sve regije hipokampusa, a korištena je i drugačija metodologija što je, najvjerojatnije, i uzrok različitih rezultata. Na mogućnost da perineuronske mreže imaju različitu ulogu ovisno o semiologiji napadaja upućuje i rad u kojem su u odraslih štakora perineuronske mreže razgrađene proteazama, što je uzrokovalo razlike u podložnosti razvoju epileptičnih napadaja različite semiologije (113). Na primjerima učenja i pamćenja pokazano je da su perineuronske mreže dinamičke strukture i u mozgu odrasle jedinke (99). Nakon inicijalne razgradnje koja omogućuje plastičnost i stvaranje novih sinapsi, perineuronske mreže ponovno se stvore kako bi stabilizirale novonastale promjene. Prema tome, slično bi se moglo očekivati i u procesu epileptogeneze. Uzroci HS1 korišteni u ovom radu intraoperativno su uzeti od bolesnika s dugogodišnjom epilepsijom i u njih je zabilježen smanjen broj perineuronskih mreža. U prilog razgradnji perineuronskih mreža u epilepsiji govore i nalazi povećane aktivnosti proteaza, metaloproteinaza matriksa (111) i ADAMTS-a (114), kao i povećana aktivnost tkivnog aktivatora plazminogena (tPA - engl. *tissue plasminogen activator*), koji je aktivator metaloproteinaza matriksa (112,151). Posebno se izdvaja MMP-9 čiju su ulogu u procesu epileptogeneze prvi opisali Wilczinsky i sur. (111). Do danas je povećana aktivnost MMP-9 potvrđena i na humanom materijalu (152), a utvrđene su i povišene vrijednosti MMP-9 u serumu ljudi nakon epileptičnih napadaja (122). Osim razgradnje protezama, smanjenje perineuronskih mreža u epilepsiji uzrokovano je i smanjenom sintezom ili razgradnjom njihovih građivnih elementa (107), a sami neuroni internaliziraju pojedine sastavnice perineuronskih mreža koje ih okružuju (62).

Nestanak, smanjenje perineuronskih mreža, kao i promjene u ekspresiji pojedinih CSPG-a, doprinose relativno većoj količini slobodne hijaluronske kiseline oko neurona što dodatno omogućava reorganizaciju i sinaptičku plastičnost (113). Povećanje ekspresije slobodne hijaluronske kiseline, osim u animalnim modelima (153), pokazano je i u ljudi, ali uz korištenje različite metodologije (109,121). U našim uzorcima HS1 zabilježeno je statistički značajno povećanje WFA-pozitivnosti difuznog ECM-a u svim regijama. U kontrolnim uzorcima difuzna



WFA-pozitivnost zabilježena je samo u molekularnom sloju područja *cornu Ammonis* i području *alveusa* (područja bogata vlaknima). Navedeno govori u prilog promjeni obrasca glikozilacije proteoglikana i glikoproteina difuznog ECM-a. U normalnim okolnostima samo 2% CSPG-a je lokaliziranog u kondenziranom ECM-u (perineuronske mreže i perinodalni ECM), dok 98% pripada difuznom ECM-u (62). Već je poznato da se promjene u glikozilaciji nalaze u različitim neurološkim bolestima (154). Naši rezultati dodatno upućuju na to da promjene glikozilacije CSPG-a također imaju ulogu u procesu epileptogeneze, a ne samo promjene u obrascima sulfatacije CSPG-a (119). Važno je napomenuti da se obrasci sulfatacije CSPG-a u sastavu perineuronskih mreža razlikuju od onih u difuznom ECM-u (62,89).

### 6.3. Promjene parvalbuminskih neurona u uzorcima hipokampalne skleroze tip 1 u odnosu na kontrolne uzorke hipokampusa

U uzorcima HS1 zabilježen je statistički značajno manji broj PV-neurona u odnosu na kontrolne uzorke hipokampusa. Gubitak PV-neurona najizraženiji je u polju CA1, a najmanji u polju CA4. Osim kvantitativnih, u našim su uzorcima utvrđene i izražene kvalitativne promjene PV-neurona. Promjene u broju i morfologiji PV-neurona već su opisane na humanom materijalu (22,23,26,27) i uvelike su u skladu s rezultatima ovoga istraživanja.

Gubitak PV-neurona neupitno doprinosi samom procesu epileptogeneze, međutim, točan mehanizam i dalje nije u potpunosti razjašnjen. S jedne strane, gubitkom neurona gubi se njihova inhibicijska aktivnost zbog čega se očekuje prevaga pretjerane (neinhibirane, nekontrolirane) aktivnosti ekscitacijskih neurona. Prema pojedinim eksperimentalnim modelima lokalizirano nestajanje PV-neurona uzrokovalo je epileptične napadaje, ali ne i (dugotrajnu) epilepsiju (155). U ljudi se, pak, prati gubitak PV-neurona koji nije strogo lokaliziran, već obuhvaća sve regije hipokampusa, kao što je prikazano i u ovom radu. Osim samog gubitka PV-neurona Abraham i sur. (28) pronašli su i više PV-aksona u molekularnom sloju područja *gyrus dentatus* uz ektopične PV-neurone. Navedeno nije potvrđeno u našim uzorcima. Disfunkciji interneuronske inhibicije, zasigurno, doprinosi i gubitak perineuronskih mreža oko PV-neurona. Ne smijemo zaboraviti da su PV-neuroni, osim s piramidnim neuronima, veoma povezani i međusobno te na taj način osim što pružaju *feedforward*-inhibiciju piramidnim neuronima imaju i ulogu u sinkronizaciji neuronskih krugova (150). Stoga, gubitkom PV-neurona i perineuronskih mreža koje ih okružuju, stabiliziraju i moduliraju, nastaju znatno složenije promjene u neuronskim krugovima osim samog gubitka

inhibicije piramidnih (primarno ekscitacijskih neurona). Na kompleksnost i međusobnu isprepletenost ekscitacijskih i inhibicijskih neuronskih krugova dodatno ukazuje i činjenica da se, prema nekim istraživanjima (156), GABA-ergična inhibicija, ako je prekomjerno potaknuta, može pretvoriti u depolarizirajuću silu koja može olakšati i potaknuti ekscitaciju te nastanak epileptičnih napadaja (157,158).

#### 6.4. Gliozna u hipokampalnoj sklerozi

U uzorcima HS1 prati se izrazito povećanje difuzne imunoreaktivnosti na GFAP uz kvalitativne i kvantitativne promjene astrocita i njihovih vlakana. U uzorcima HS1 astrociti su manji, manje razgranati, a u pojedinim poljima gubi se njihova organiziranost. Gliozna se kao sastavni dio hipokampalne skleroze ubraja u najranije patohistološke promjene (159). Obrazac difuzne ekspresije GFAP-a u skladu je s difuznom WFA-ekspresijom. U oba slučaja molekularni sloj područja *gyrus dentatus* nije reaktivan. Navedeno upućuje na činjenicu da su upravo astrociti jedan od glavnih izvora (sinteze) brojnih molekula u sastavu ECM-a te na taj način neizravno utječu i na sve procese u koje su molekule ECM-a uključene, a s time i na epileptogenezu. Povezanost glioze i HS1 pronašli su Perosa i sur. (107), koji sugeriraju da su povišene vrijednosti hondroitin-sulfatiranih proteoglikana u bolesnika s MTLE-om odraz glijalnog odgovora na stimulaciju glutamatergičnih N-metil-D-aspartatnih (NMDA) receptora. Intenzivno grananje mahovinastih vlakana u molekularnom sloju područja *gyrus dentatus* je, prema našim nalazima vjerojatno potpomognuto specifičnim proteoglikanima versikanom i neurokanom, dok je difuzni obrazac glikozilacije ECM-a, za ovaj proces manje značajan, na što upućuje izostanak WFA-pozitivnosti i imunoreaktivnosti na GFAP u ovom području. Rezultati, također, upućuju na činjenicu da versikan i neurokan sintetiziraju i neuroni, a ne samo astrociti, s obzirom na to da izostaje potpuno preklapanje njihove imunoreaktivnosti u pojedinim slojevima i poljima hipokampusa. Ne smijemo zaboraviti da je za nastanak i stabilizaciju sinapsi bitan ECM podrijetlom iz neurona i iz glijalnih stanica (116). Osim neposredno, putem sinteze sastavnica ECM-a, glijalne stanice su i same proekscitabilne (160) te na taj način mogu dodatno doprinijeti procesu epileptogeneze. One, s druge strane pomažu i održavanju ravnoteže u području sinapsi, tako da služe kao pufer za izvanstanične ione i razine neurotransmitera (161).

## 6.5. Ograničenja studije

U usporedbi sa drugim studijama (107,120,122), ova studija obuhvaća značajno veći broj ispitanika, ne samo što se tiče uzoraka tkiva HS1 nego i kontrolnih uzoraka hipokampusa. Ipak, djelomično ograničenje ove studije relativno je mali broj ispitanika nakon selekcije tkivnih uzoraka za komparaciju. S druge strane, inicijalni ukupni broj ispitanika koji je bio znatno veći, omogućio nam je da budemo veoma kritični u odabiru uzoraka za imunohistokemijsku komparaciju ECM-a, što je značajna prednost ove studije u odnosu na druge studije hipokampalne skleroze i prijašnja istraživanja. S obzirom na to da je riječ o tkivu uzetom tijekom operativnog zahvata, nerijetko su oštećenja i necjelovitost regija imali važnu ulogu pri odabiru uzoraka, jer je za analizu bilo važno imati anatomske usporedive uzorke kako bi se jasno mogle zamijetiti razlike u ekspresiji sastavnica ECM-a i drugih molekula između kontrolnih uzoraka i uzoraka HS1. Osim cjelovitosti područja *cornu Ammonis* i *gyrus dentatus* važna je bila odgovarajuća orijentacija rezova. Zbog ograničenog broja uzoraka, pojedini biljezi molekula ECM-a, koji u pilot-studiji nisu pokazali značajnu ekspresiju, ili razlike, nisu dalje ispitivani na cijeloj grupi uzoraka.

Osim toga, uz napore da ispitivana skupina uzoraka u ovoj studiji bude što je više moguće homogena, ispitanici su imali različit broj napadaja, različito trajanje bolesti i bili su različite dobi što je u odnosu na animalne modele kvalitativno različito, ali se, pak, prilikom korelacije tih podataka s imunohistokemijom opazio trend povezanosti (WFA-aktivnost i broj napadaja). Mogućnost metodološki uzrokovane varijacije u intenzitetu imunoreaktivnosti između pojedinih uzoraka otklonjena je tako što su svi uzorci za određeni biljeg obrađeni u istom eksperimentu.

## 6.6. Primjenjivost rezultata za znanost i klinički rad

Patofiziologija hipokampalne skleroze do danas nije u potpunosti razjašnjena, međutim, neupitno je da u procesu epileptogeneze ulogu ima ECM, što potvrđuju i rezultati ovoga rada. Glavno pitanje koje se nameće i koje još uvijek nije u potpunosti odgovoreno jest: jesu li zabilježene promjene ECM-a uzrok ili posljedica refraktornih epileptičnih napadaja? Poznato je da velika većina bolesnika s HS1 ima jedan od tzv. incijalnih precipitirajućih čimbenika (engl. *initial precipitating incidents*), a najčešće su to febrilne konvulzije, trauma glave i infekcija SŽS-a. Oni se smatraju prvim okidačem promjena nakon čega slijedi tzv. latentni period u kojem se događaju prve strukturalne i molekularne promjene koje vode nastanku spontanih epileptičnih napadaja. Nakon pojave epileptičnih napadaja oni su u početku dobro kontrolirani antiepileptičnom terapijom i to je tzv. *silent period*, nakon kojeg prelaze u napadaje refraktorne na terapiju kada je jedina terapijska opcija kirurška resekcija. Dostupni humani materijal za analizu strukturalnih, patohistoloških promjena prema tome potječe od bolesnika s dugogodišnjim trajanjem bolesti i time uznapredovalim promjenama tkiva, što je slučaj i u ovom radu. Zbog toga su animalni modeli još uvijek jedini izvor informacija o tome što se događa u ranijim stadijima epileptogeneze. Prema trenutno dostupnim podacima čini se da se promjene na početku i kasnije tijekom bolesti razlikuju te bi se, stoga, trebali razlikovati i terapijski pristupi.

Navedenome u prilog govore i rezultati ove studije, ali i prethodnih studija drugih autora koji su pokušali korelirati patohistološke promjene s kliničkim podacima bolesnika. Abraham i sur. (28) u svom su radu kliničke podatke korelirali s promjenama PV-neurona i PV-aksona u području *gyrus dentatus* bolesnika s hipokampalnom sklerozom te su pronašli statistički značajnu povezanost s trajanjem bolesti. U ovom je radu intenzitet difuzne WFA-aktivnosti koreliran s kliničkim podacima (trajanje bolesti, broj epileptičnih napadaja, broj lijekova). Iako nije utvrđena statistički značajna povezanost (što je dijelom moguće i zbog malog broja uzoraka), uočava se trend da bolesnici s manjim brojem napadaja imaju manji intenzitet WFA-aktivnosti difuznog ECM-a. Sve navedeno upućuje na činjenicu da dulja i uznapredovala bolest (česti napadaji) uzrokuje uznapredovale promjene te da su promjene koje su zabilježene ovom studijom vjerojatnije posljedica napadaja, a ne uzrok samim napadajima odnosno bolesti. Abraham i sur. (28) u istoj su studiji korelirali i febrilne konvulzije s patohistološkim promjenama te su pronašli povezanost između postojanja febrilnih konvulzija i izraženijih patohistoloških promjena, iako povezanost nije bila statistički značajna. Navedeno govori u prilog tome da do promjena ipak dolazi vrlo rano u tijeku bolesti (latentni period), a tijekom

vremena promjene se samo nadograđuju, ili su postojane i održavaju postojanje nekontroliranih epileptičnih napadaja kada oni jednom nastanu.

Rezultati ovog rada upotpunili su spoznaje o promjenama ECM-a u uznapredovaloj HS1 i na taj su način otvorili vrata daljnjem istraživanju selektivnijih modulatora ECM-a kao potencijalnih novih lijekova za liječenje ne nužno samih epileptičnih napadaja (simptomatsko liječenje), nego lijekova kojima je cilj prekidanje ili moduliranje promjena koje su u podlozi procesa epileptogeneze i vode nastanku farmakološki rezistentnih epileptičnih napadaja (prevencija).

Iz svega navedenog i činjenice da postoje modulatori ECM-a (sustav proteaza) proizlazi da se moduliranjem ECM-a (ovisno o periodu intervencije) može utjecati na nastanak epileptičnih napadaja ili spriječiti njihov prelazak u napadaje refraktorne na terapiju.

S obzirom na povećanu količinu slobodne hijaluronske kiseline u ECM-u epileptičnih uzoraka HS1, što je pokazano i u ovom radu, postoje terapijski modeli s hijaluronidazom, međutim, njihov je glavni nedostatak neselektivnost, budući da se hijaluronska kiselina nalazi u svim tkivima, a ne samo u SZS-u. Prema nekim autorima problem je i mali radijus djelovanja, kao i dugo zadržavanje u tkivima (162). Ostala istraživačka nastojanja usmjerena su prema razvoju protutijela koja bi blokirala određene sulfatne motive na postraničnim glikozaminoglikanskim lancima CSPG-a, inhibitorima sinteze hijaluronske kiseline, kao i blokatorima veznih mjesta za glikozaminoglikan (163).

Jedna od ključnih metaloproteinaza matriksa u procesu epileptogeneze zasigurno je MMP-9. Povećana aktivnost MMP-9 pokazana je ne samo na animalnim modelima, već i u serumu bolesnika, ali i na humanom materijalu. Također MMP-9 djeluje na nekoliko razina: aktivacijom NMDA-a i AMPA-receptora ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina) utječe na krvno-moždanu barijeru i tako uzrokuje upalnu reakciju, modulira ECM i utječe na reorganizaciju sinapsi (za pregled v. (164)). S obzirom na sve navedeno ECM se čini idealnim potencijalnim kandidatom u liječenju odnosno prevenciji epilepsije. Dosadašnji pokušaji liječenja inhibitorima MMP-9 naišli su na problem prolaska krvno-moždane barijere, kao i na neselektivnost u procesu inhibicije. U epilepsiji je zabilježena pretjerana aktivnost MMP-9, dok je umjerena aktivnost ovog enzima neuroprotektivna pa bi njegova potpuna inhibicija mogla biti i štetna.

S obzirom na to da je proces epileptogeneze izuzetno složen, čini se da će pri pokušajima modulacije i prevencije ipak biti potrebno kombinirati više metoda tj. molekularnih ciljeva.

## 7. ZAKLJUČCI

1. U uzorcima hipokampusa osoba s farmakorezistentnom epilepsijom postoje značajne razlike u regionalnoj, arealnoj i laminarnoj ekspresiji sastavnica ECM-a (proteoglikana i glikoproteina) u usporedbi s hipokampusima izoliranim tijekom obdukcija (kontrolni uzorci u kojih nema poznatih neuroloških ili neuroanatomskih promjena).
2. Ekspresija perineuronskih mreža u uzorcima hipokampusa osoba s farmakorezistentnom epilepsijom značajno je manja u odnosu na kontrolne uzorke hipokampusa bez patoloških promjena.
3. Smanjena ekspresija perineuronskih mreža odnosi se na značajno smanjenje broja, veličine i raznolikosti morfologije, što ukazuje na dezintegraciju perineuronskih mreža u uzorcima HS1.
4. U hipokampusima osoba s farmakorezistentnom epilepsijom dolazi do promjene obrasca glikozilacije difuznog ECM-a u odnosu na kontrolne uzorke bez patoloških promjena.
5. Ekspresija juvenilnih oblika molekula ECM-a u uzorcima hipokampalne skleroze povećana je ili je obrazac distribucije promijenjen u odnosu na hipokampuse bez patoloških promjena.
6. Juvenilni oblik versikana u hipokampusima osoba s farmakorezistentnom epilepsijom pokazuje pojačanu uniformnu, difuznu distribuciju kroza sve slojeve i areje, u odnosu na kontrolne uzorke gdje je eksprimiran samo u području *gyrus dentatus*.
7. Neurokan pokazuje regionalnu i laminarnu promjenu obrasca ekspresije u difuzno organiziranom ECM-u.
8. Agrekan je u hipokampusu osoba s farmakorezistentnom epilepsijom smanjeno izražen u odnosu na kontrolne hipokampuse koji nemaju patoloških promjena.
9. U hipokampusu osoba s farmakorezistentnom epilepsijom gubi se ekspresija fibronektina i CS-56 u perineuronskim mrežama.

## 8. SAŽETAK

Izvanstanična tvar (engl. *extracellular matrix*, ECM) važan je regulator ekscitabilnosti i sinaptičke plastičnosti, posebice u svom kondenziranom obliku, perineuronskim mrežama (PNN). Hipokampalna skleroza tip 1 (HS1) najčešća je patohistološka dijagnoza u bolesnika s farmakorezistentnom epilepsijom mezijalnoga temporalnoga režnja (MTLE). Cilj ovoga rada bio je analizirati sastav ECM-a i njegove promjene u bolesnika koji su kirurški liječeni zbog farmakorezistentne epilepsije mezijalnoga temporalnoga režnja. Uzorci hipokampusu imunohistokemijski su obilježeni i analizirani na sljedeće biljege: agrekan, neurokan, versikan, hondroitin-sulfatne proteoglikane (CS-56), fibronektin, aglutinin biljke *Wisteria Floribunda*, NeuN, parvalbumin i glijalni fibrilarni kiseli protein. U uzorcima HS1, osim gubitka neurona i izražene glioze utvrđene su i značajne razlike u ekspresiji versikana, neurokana, agrekana i WFA-specifične glikozilacije ECM-a uz smanjenje broja perineuronskih mreža. Pacijenti s manjim brojem epileptičnih napadaja imali su manji intenzitet WFA-bojenja u poljima *cornu Ammonis* (CA). Naši rezultati upućuju na to da razgradanja perineuronskih mreža, zajedno s promjenama u ekspresiji proteina i obrascu glikozilacije ECM-a doprinosi povećanoj ekscitabilnosti piramidnih neurona područja *cornu Ammonis* i na taj način patofiziologiji i perzistiranju epileptičnih napadaja u farmakorezistentnoj epilepsiji mezijalnoga temporalnoga režnja. Ovo istraživanje implicira da su molekule ECM-a i njihovi modulatori dobri kandidati u razvoju terapijskih pristupa liječenju farmakorezistentne epilepsije.

## 9. SUMMARY

*Immunohistochemical and histochemical features of hippocampal extracellular matrix in patients with drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy*

Barbara Sitaš, MD

2023.

The extracellular matrix (ECM) is an important regulator of excitability and synaptic plasticity, especially in its highly condensed form, the perineuronal nets (PNN). In patients with drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy (MTLE), hippocampal sclerosis type 1 (HS1) is the most common histopathological finding. This study aimed to evaluate the ECM profile of HS1 in surgically treated drug-resistant patients with MTLE. Hippocampal sections were immunohistochemically stained for aggrecan, neurocan, versican, chondroitin-sulfate (CS-56), fibronectin, *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA), a nuclear neuronal marker (NeuN), parvalbumin (PV), and glial-fibrillary-acidic-protein (GFAP). In HS1, besides the reduced number of neurons and astrogliosis, we found a significantly changed expression pattern of versican, neurocan, aggrecan, WFA-specific glycosylation, and a reduced number of PNNs. Patients with a lower number of epileptic seizures had a less intense diffuse WFA staining in *cornu Ammonis* (CA) fields. Our findings suggest that PNN reduction, changed ECM protein and glycosylation expression pattern in HS1 might be involved in the pathogenesis and persistence of drug-resistant MTLE by contributing to the increase of CA pyramidal neurons' excitability. This research corroborates the validity of ECM molecules and their modulators as a potential target for the development of new therapeutic approaches to drug-resistant epilepsy.



## 10. POPIS LITERATURE

1. Petelin Gadže Ž, Nanković S, Šulentić V, Poljaković Z, Čajić I, Bujan Kovač A. Uvod. U: Petelin Gadže Ž, Poljaković Z, Nanković S, Šulentić V, ur. Epilpsija Dijagnostički i terapijski pristup Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str.1–11.
2. Petelin Gadže Ž. Klinička semiologija žarišnih epileptičnih napadaja. U: Petelin Gadže Ž, Poljaković Z, Nanković S, Šulentić V, ur. Epilepsija Dijagnostički i terapijski pristup. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 21–39.
3. Ryvlin P, Cross JH, Rheims S. Epilepsy surgery in children and adults. *Lancet Neurol.* 2014;13(11):1114–26.
4. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, i sur. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2017;58(4):512–21.
5. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, i sur. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia.* 2010;51(6):1069–77.
6. Mrak G. Kirurgija epilepsije. U: Petelin Gadže Ž, Poljaković Z, Nanković S, Šulentić V, ur. Epilepsija Dijagnostički i terapijski pristup. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 212–18.
7. Lorente de Nó R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol.* 1934;46:113–177.
8. Duvernoy HM, Cattin F, Risold P-Y. *The Human Hippocampus* [Internet]. 4. izd. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. Dostupno na: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-33603-4>
9. Rose M. Der allocortex bei tier und mensch. *J Psychol Neurol.* 1926;34:1–99.
10. Amaral DG. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol.* 1978;182(4 Pt 2):851–914.
11. Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res.* 2007;163:3–22.
12. Scharfman, HE, Witter MP. Preface. U: *The Dentate Gyrus: A Comprehensive Guide to Structure, Function and Clinical Implications.* New York, NY: Elsevier; 2007.
13. Judaš M, Kostović I. *Temelji neuroznanosti.* Zagreb: Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu; 1997.
14. Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, i sur. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia.* 2013;54(7):1315–29.
15. Sharma AK, Reams RY, Jordan WH, Miller MA, Thacker HL, Snyder PW. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol*

- Pathol. 2007;35(7):984–99.
16. Pelkey KA, Chittajallu R, Craig MT, Tricoire L, Wester JC, McBain CJ. Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiol Rev.* 2017;97(4):1619–747.
  17. Chagnac-Amitai Y, Connors BW. Synchronized excitation and inhibition driven by intrinsically bursting neurons in neocortex. *J Neurophysiol.* 1989;62(5):1149–62.
  18. Kisvárdy ZF, Kim DS, Eysel UT, Bonhoeffer T. Relationship between lateral inhibitory connections and the topography of the orientation map in cat visual cortex. *Eur J Neurosci.* 1994;6(10):1619–32.
  19. Jones EG. GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cereb Cortex.* 1993;3(5):361–72.
  20. Lytton WW, Sejnowski TJ. Simulations of cortical pyramidal neurons synchronized by inhibitory interneurons. *J Neurophysiol.* 1991;66(3):1059–79.
  21. Somogyi P, Tamás G, Lujan R, Buhl EH. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998;26(2–3):113–35.
  22. Andrioli A, Alonso-Nanclares L, Arellano JI, DeFelipe J. Quantitative analysis of parvalbumin-immunoreactive cells in the human epileptic hippocampus. *Neuroscience.* 2007;149(1):131–43.
  23. Arellano JI, Muñoz A, Ballesteros-Yáñez I, Sola RG, DeFelipe J. Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain.* 2004;127(1):45–64.
  24. Sloviter RS, Sollas AL, Barbaro NM, Laxer KD. Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J Comp Neurol.* 1991;308(3):381–96.
  25. Wittner L, Maglóczy Z, Borhegyi Z, Halász P, Tóth S, Eross L, i sur. Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience.* 2001;108(4):587–600.
  26. Alhourani A, Fish KN, Wozny TA, Sudhakar V, Hamilton RL, Richardson RM. GABA bouton subpopulations in the human dentate gyrus are differentially altered in mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol.* 2020;123(1):392–406.
  27. Zhu ZQ, Armstrong DL, Hamilton WJ, Grossman RG. Disproportionate loss of CA4 parvalbumin-immunoreactive interneurons in patients with Ammon’s horn sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56(9):988–98.
  28. Ábrahám H, Molnár JE, Sóki N, Gyimesi C, Horváth Z, Janszky J, i sur. Etiology-related Degree of Sprouting of Parvalbumin-immunoreactive Axons in the Human Dentate Gyrus in Temporal Lobe Epilepsy. *Neuroscience.* 2020;448:55–70.
  29. Bandtlow CE, Zimmermann DR. Proteoglycans in the developing brain: New conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev.* 2000;80(4):1267–90.
  30. Novak U, Kaye AH. Extracellular matrix and the brain: components and function. *J Clin Neurosci.* 2000;7(4):280–90.
  31. Rauch U, Clement A, Retzler C, Fröhlich L, Fässler R, Göhring W, i sur. Mapping of a defined neurocan binding site to distinct domains of tenascin-C. *J Biol Chem.* 1997

- ;272(43):26905–12.
32. Rauch U, Hirakawa S, Oohashi T, Kappler J, Roos G. Cartilage link protein interacts with neurocan, which shows hyaluronan binding characteristics different from CD44 and TSG-6. *Matrix Biol.* 2004;22(8):629–39.
  33. Ruoslahti E. Brain extracellular matrix. *Glycobiology.* 1996;6(5):489–92.
  34. Yamaguchi Y. Lecticans: Organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(2):276–89.
  35. Soleman S, Filippov MA, Dityatev A, Fawcett JW. Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. *Neuroscience.* 2013;253:194–213.
  36. Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT. Extracellular matrix of the central nervous system: From neglect to challenge. *Histochem Cell Biol.*;130(4):635–53.
  37. Kjellén L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem.* 1991;60:443–75.
  38. Prydz K, Dalen KT. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci.* 2000;113 Pt 2:193–205.
  39. Doege K, Sasaki M, Horigan E, Hassell JR, Yamada Y. Complete primary structure of the rat cartilage proteoglycan core protein deduced from cDNA clones. *J Biol Chem.* 1987;262(36):17757–67.
  40. Zimmermann DR, Ruoslahti E. Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *EMBO J.* 1989;8(10):2975–81.
  41. Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK. Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J Biol Chem.* 1992;267(27):19536–47.
  42. Jaworski DM, Kelly GM, Hockfield S. BEHAB, a new member of the proteoglycan tandem repeat family of hyaluronan-binding proteins that is restricted to the brain. *J Cell Biol.* 1994;125(2):495–509.
  43. Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y. Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family. *J Biol Chem.* 1994;269(13):10119–26.
  44. McRae PA, Porter BE. The perineuronal net component of the extracellular matrix in plasticity and epilepsy. *Neurochem Int.* 2012;61(7):963–72.
  45. Spicer AP, Joo A, Bowling RAJ. A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core protein genes: the missing links. *J Biol Chem.* 2003;278(23):21083–91.
  46. Bekku Y, Su W-D, Hirakawa S, Fässler R, Ohtsuka A, Kang JS, et al. Molecular cloning of Bral2, a novel brain-specific link protein, and immunohistochemical colocalization with brevican in perineuronal nets. *Mol Cell Neurosci.* 2003;24(1):148–59.
  47. Hirakawa S, Oohashi T, Su WD, Yoshioka H, Murakami T, Arata J, et al. The brain link protein-1 (BRAL1): cDNA cloning, genomic structure, and characterization as a novel link protein expressed in adult brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276(3):982–9.

48. Ikonomidou C. Matrix metalloproteinases and epileptogenesis. *Mol Cell Pediatr.* 2014;1(1):6.
49. Llamazares M, Cal S, Quesada V, López-Otín C. Identification and characterization of ADAMTS-20 defines a novel subfamily of metalloproteinases-disintegrins with multiple thrombospondin-1 repeats and a unique GON domain. *J Biol Chem.* 2003;278(15):13382–9.
50. Nicholson AC, Malik SB, Logsdon JMJ, Van Meir EG. Functional evolution of ADAMTS genes: evidence from analyses of phylogeny and gene organization. *BMC Evol Biol.* 2005;5:11.
51. Stanton H, Melrose J, Little CB, Fosang AJ. Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(12):1616–29.
52. Tang BL. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33(1):33–44.
53. Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(6):981–5.
54. Nicholson C, Syková E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci.* 1998;21(5):207–15.
55. Jovanov Milošević N, Judaš M, Aronica E, Kostovic I. Neural ECM in laminar organization and connectivity development in healthy and diseased human brain. *Prog Brain Res.* 2014;214:159–78.
56. Milev P, Maurel P, Chiba A, Mevissen M, Popp S, Yamaguchi Y, i sur. Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;247(2):207–12.
57. Rauch U. Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cell Mol Life Sci C.* 2004;61(16):2031–45.
58. Meyer-Puttlitz B, Milev P, Junker E, Zimmer I, Margolis RU, Margolis RK. Chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of nervous tissue: developmental changes of neurocan and phosphacan. *J Neurochem.* 1995;65(5):2327–37.
59. Pesheva P, Spiess E, Schachner M. J1-160 and J1-180 are oligodendrocyte-secreted nonpermissive substrates for cell adhesion. *J Cell Biol.* 1989;109(4 Pt 1):1765–78.
60. Dityatev A, Fellin T. Extracellular matrix in plasticity and epileptogenesis. *Neuron Glia Biol.* 2008;4(3):235–47.
61. Dityatev A. Remodeling of extracellular matrix and epileptogenesis. *Epilepsia.* 2010;51 (Suppl 3):61–5.
62. Fawcett JW, Oohashi T, Pizzorusso T. The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. *Nat Rev Neurosci.* 2019;20(8):451–65.
63. Shen HH. Core Concept: Perineuronal nets gain prominence for their role in learning, memory, and plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(40):9813–5.
64. Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science.* 2002;298(5596):1248–

- 51.
65. Barritt AW, Davies M, Marchand F, Hartley R, Grist J, Yip P, i sur. Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2006;26(42):10856–67.
  66. Massey JM, Hubscher CH, Wagoner MR, Decker JA, Amps J, Silver J, i sur. Chondroitinase ABC digestion of the perineuronal net promotes functional collateral sprouting in the cuneate nucleus after cervical spinal cord injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2006;26(16):4406–14.
  67. Hockfield S, McKay R. Monoclonal antibodies demonstrate the organization of axons in the leech. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1983;3(2):369–75.
  68. Sur M, Frost DO, Hockfield S. Expression of a surface-associated antigen on Y-cells in the cat lateral geniculate nucleus is regulated by visual experience. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1988;8(3):874–82.
  69. Kalb RG, Hockfield S. Molecular evidence for early activity-dependent development of hamster motor neurons. *J Neurosci*. 1988;8(7):2350–60.
  70. Lurie DI, Pasic TR, Hockfield SJ, Rubel EW. Development of Cat-301 immunoreactivity in auditory brainstem nuclei of the gerbil. *J Comp Neurol*. 1997;380(3):319–34.
  71. Balmer TS, Carels VM, Frisch JL, Nick TA. Modulation of perineuronal nets and parvalbumin with developmental song learning. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2009;29(41):12878–85.
  72. McRae PA, Baranov E, Sarode S, Brooks-Kayal AR, Porter BE. Aggrecan expression, a component of the inhibitory interneuron perineuronal net, is altered following an early-life seizure. *Neurobiol Dis*. 2010;39(3):439–48.
  73. Mennerick S, Zorumski CF. Neural activity and survival in the developing nervous system. *Mol Neurobiol*. 2000;22(1–3):41–54.
  74. Zito K, Svoboda K. Activity-dependent synaptogenesis in the adult Mammalian cortex. *Neuron*. 2002;35(6):1015–7.
  75. Goda Y, Davis GW. Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron*. 2003;40(2):243–64.
  76. Kalb RG, Hockfield S. Large diameter primary afferent input is required for expression of the Cat-301 proteoglycan on the surface of motor neurons. *Neuroscience*. 1990;34(2):391–401.
  77. McRae PA, Rocco MM, Kelly G, Brumberg JC, Matthews RT. Sensory deprivation alters aggrecan and perineuronal net expression in the mouse barrel cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2007;27(20):5405–13.
  78. Härtig W, Brauer K, Brückner G. Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport*. 1992;3(10):869–72.
  79. Schüppel K, Brauer K, Härtig W, Grosche J, Earley B, Leonard BE, i sur. Perineuronal nets of extracellular matrix around hippocampal interneurons resist destruction by activated microglia in trimethyltin-treated rats. *Brain Res*. 2002;958(2):448–53.
  80. Dityatev A, Brückner G, Dityateva G, Grosche J, Kleene R, Schachner M. Activity-

- dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev Neurobiol.* 2007;67(5):570–88.
81. Wegner F, Härtig W, Bringmann A, Grosche J, Wohlfarth K, Zuschratter W, i sur. Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells immunoreactive for glutamate and the GABA(A) receptor alpha1 subunit form a unique entity in rat cerebral cortex. *Exp Neurol.* 2003;184(2):705–14.
  82. Mészár Z, Girard F, Saper CB, Celio MR. The lateral hypothalamic parvalbumin-immunoreactive (PV1) nucleus in rodents. *J Comp Neurol.* 2012;520(4):798–815.
  83. Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Hashimoto T, Kaneko T, Takeuchi K, Nishi M. A newly identified mouse hypothalamic area having bidirectional neural connections with the lateral septum: the perifornical area of the anterior hypothalamus rich in chondroitin sulfate proteoglycans. *Eur J Neurosci.* 2015;42(6):2322–34.
  84. Vazquez-Sanroman D, Leto K, Cerezo-Garcia M, Carbo-Gas M, Sanchis-Segura C, Carulli D, i sur. The cerebellum on cocaine: plasticity and metaplasticity. *Addict Biol.* 2015;20(5):941–55.
  85. Yamada J, Ohgomori T, Jinno S. Perineuronal nets affect parvalbumin expression in GABAergic neurons of the mouse hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2015;41(3):368–78.
  86. Brückner G, Grosche J, Hartlage-Rübsamen M, Schmidt S, Schachner M. Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. *J Chem Neuroanat.* 2003;26(1):37–50.
  87. Galtrey CM, Kwok JCF, Carulli D, Rhodes KE, Fawcett JW. Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci.* 2008;27(6):1373–90.
  88. Rowlands D, Lensjø KK, Dinh T, Yang S, Andrews MR, Hafting T, i sur. Aggrecan directs extracellular matrix-mediated neuronal plasticity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2018;38(47):10102–13.
  89. Deepa SS, Carulli D, Galtrey C, Rhodes K, Fukuda J, Mikami T, i sur. Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J Biol Chem.* 2006;281(26):17789–800.
  90. Miyata S, Komatsu Y, Yoshimura Y, Taya C, Kitagawa H. Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nat Neurosci.* 2012;15(3):414–22, S1-2.
  91. Miller GM, Hsieh-Wilson LC. Sugar-dependent modulation of neuronal development, regeneration, and plasticity by chondroitin sulfate proteoglycans. *Exp Neurol.* 2015;274(Pt B):115–25.
  92. Miyata S, Nadanaka S, Igarashi M, Kitagawa H. Structural variation of chondroitin sulfate chains contributes to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *Front Integr Neurosci.* 2018;12:3.
  93. Beurdeley M, Spatazza J, Lee HHC, Sugiyama S, Bernard C, Di Nardo AA, i sur. Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2012;32(27):9429–37.

94. Spatazza J, Di Lullo E, Joliot A, Dupont E, Moya KL, Prochiantz A. Homeoprotein signaling in development, health, and disease: a shaking of dogmas offers challenges and promises from bench to bed. *Pharmacol Rev.* 2013;65(1):90–104.
95. Kitagawa H, Tsutsumi K, Tone Y, Sugahara K. Developmental regulation of the sulfation profile of chondroitin sulfate chains in the chicken embryo brain. *J Biol Chem.* 1997;272(50):31377–81.
96. Carulli D, Pizzorusso T, Kwok JCF, Putignano E, Poli A, Forostyak S, i sur. Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain.* 2010;133(Pt 8):2331–47.
97. Richter RP, Baranova NS, Day AJ, Kwok JC. Glycosaminoglycans in extracellular matrix organisation: are concepts from soft matter physics key to understanding the formation of perineuronal nets? *Curr Opin Struct Biol.* 2018;50:65–74.
98. Ueno H, Suemitsu S, Okamoto M, Matsumoto Y, Ishihara T. Sensory experience-dependent formation of perineuronal nets and expression of Cat-315 immunoreactive components in the mouse somatosensory cortex. *Neuroscience.* 2017;355:161–74.
99. Carulli D, Verhaagen J. An extracellular perspective on CNS maturation: perineuronal nets and the control of plasticity. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5).
100. Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher C, Choquet D, Gundelfinger E. Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci.* 2009;12:897–904.
101. Kalb RG, Hockfield S. Electrical activity in the neuromuscular unit can influence the molecular development of motor neurons. *Dev Biol.* 1994;162(2):539–48.
102. Hockfield S, Sur M. Monoclonal antibody Cat-301 identifies Y-cells in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat. *J Comp Neurol.* 1990;300(3):320–30.
103. Dityatev A, Schachner M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(6):456–68.
104. Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia.* 2004;46(3):225–51.
105. Galtrey CM, Fawcett JW. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev.* 2007;54(1):1–18.
106. Zurn AD, Bandtlow CE. Regeneration failure in the CNs: cellular and molecular mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* 2006;557:54–76.
107. McRae PA, Baranov E, Rogers SL, Porter BE. Persistent decrease in multiple components of the perineuronal net following status epilepticus. *Eur J Neurosci.* 2012;36(11):3471–82.
108. Heck N, Garwood J, Loeffler JP, Larmet Y, Faissner A. Differential upregulation of extracellular matrix molecules associated with the appearance of granule cell dispersion and mossy fiber sprouting during epileptogenesis in a murine model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 2004;129(2):309–24.
109. Perosa SR, Porcionatto MA, Cukiert A, Martins JRM, Passeroti CC, Amado D, i sur.

- Glycosaminoglycan levels and proteoglycan expression are altered in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Res Bull.* 2002;58(5):509–16.
110. Okamoto M, Sakiyama J, Mori S, Kurazono S, Usui S, Hasegawa M, i sur. Kainic acid-induced convulsions cause prolonged changes in the chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan in the limbic structures. *Exp Neurol.* 2003;184(1):179–95.
  111. Wilczynski GM, Konopacki FA, Wilczek E, Lasińska Z, Gorlewicz A, Michaluk P, i sru. Important role of matrix metalloproteinase 9 in epileptogenesis. *J Cell Biol.* 2008;180(5):1021–35.
  112. Yepes M, Sandkvist M, Coleman TA, Moore E, Wu J-Y, Mitola D, i sur. Regulation of seizure spreading by neuroserpin and tissue-type plasminogen activator is plasminogen-independent. *J Clin Invest.* 2002;109(12):1571–8.
  113. Rankin-Gee EK, McRae PA, Baranov E, Rogers S, Wandrey L, Porter BE. Perineuronal net degradation in epilepsy. *Epilepsia.* 2015;56(7):1124–33.
  114. Yuan W, Matthews RT, Sandy JD, Gottschall PE. Association between protease-specific proteolytic cleavage of brevican and synaptic loss in the dentate gyrus of kainate-treated rats. *Neuroscience.* 2002;114(4):1091–101.
  115. Brenneke F, Schachner M, Elger CE, Lie AA. Up-regulation of the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R during axonal reorganization and astrogliosis in the adult rat hippocampus. *Epilepsy Res.* 2004;58(2–3):133–43.
  116. Geissler M, Gottschling C, Aguado A, Rauch U, Wetzel CH, Hatt H, i sur. Primary hippocampal neurons, which lack four crucial extracellular matrix molecules, display abnormalities of synaptic structure and function and severe deficits in perineuronal net formation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2013;33(18):7742–55.
  117. Kurazono S, Okamoto M, Sakiyama J, Mori S, Nakata Y, Fukuoka J, i sur. Expression of brain specific chondroitin sulfate proteoglycans, neurocan and phosphacan, in the developing and adult hippocampus of Ihara's epileptic rats. *Brain Res.* 2001;898(1):36–48.
  118. Matsui F, Kawashima S, Shuo T, Yamauchi S, Tokita Y, Aono S, i sur. Transient expression of juvenile-type neurocan by reactive astrocytes in adult rat brains injured by kainate-induced seizures as well as surgical incision. *Neuroscience.* 2002;112(4):773–81.
  119. Yutsudo N, Kitagawa H. Involvement of chondroitin 6-sulfation in temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol.* 2015;274(Pt B):126–33.
  120. Ueno H, Suemitsu S, Murakami S, Kitamura N, Wani K, Takahashi Y, i sur. Alteration of Extracellular Matrix Molecules and Perineuronal Nets in the Hippocampus of Pentylentetrazol-Kindled Mice. *Neural Plast.* 2019;2019:8924634.
  121. Perosa SR, Porcionatto MA, Cukiert A, Martins JRM, Amado D, Nader HB, i sur. Extracellular matrix components are altered in the hippocampus, cortex, and cerebrospinal fluid of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2002;43 (Suppl 5):159–61.
  122. Cudna A, Jopowicz A, Mierzejewski P, Kurkowska-Jastrzębska I. Serum metalloproteinase 9 levels increase after generalized tonic-clonic seizures. *Epilepsy Res.*



- 2017;129:33–6.
123. Rogers SL, Rankin-Gee E, Risbud RM, Porter BE, Marsh ED. Normal Development of the Perineuronal Net in Humans; In Patients with and without Epilepsy. *Neuroscience*. 2018;384:350–60.
  124. Bašić S, Županić S. Predoperativna obrada pacijenata s farmakorezistentnom epilepsijom. U: Petelin Gadže Ž, Poljaković Z, Nanković S, Šulentić V, uz. Epilepsija Dijagnostički i terapijski pristup. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str.1975–95.
  125. Jovanov-Milošević N, Petanjek Z, Petrović D, Judaš M, Kostović I. Morphology, molecular phenotypes and distribution of neurons in developing human corpus callosum. *Eur J Neurosci*. 2010;32(9):1423–32.
  126. Culjat M, Milošević NJ. Callosal septa express guidance cues and are paramedian guideposts for human corpus callosum development. *J Anat*. 2019;235(3):670–86.
  127. Neumann M, Gabel D. Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. 2002;50(3):437–9.
  128. Sun Y, Ip P, Chakrabarty A. Simple elimination of background fluorescence in formalin-fixed human brain tissue for immunofluorescence microscopy. *J Vis Exp*. 2017;(127).
  129. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, i sur. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676–82.
  130. Berezin V, Walmod PS, Filippov M, Dityatev A. Targeting of ECM molecules and their metabolizing enzymes and receptors for the treatment of CNS diseases. *Prog Brain Res*. 2014;214:353–88.
  131. Bradbury EJ, McMahon SB. Spinal cord repair strategies: why do they work? *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(8):644–53.
  132. Gonzenbach RR, Schwab ME. Disinhibition of neurite growth to repair the injured adult CNS: focusing on Nogo. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(1):161–76.
  133. Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog Brain Res*. 2002;137:313–32.
  134. Carulli D, Laabs T, Geller HM, Fawcett JW. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Curr Opin Neurobiol*. 2005;15(1):116–20.
  135. Matsui F, Oohira A. Proteoglycans and injury of the central nervous system. *Congenit Anom*. 2004;44(4):181–8.
  136. Kempermann G, Song H, Gage FH. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(9):a018812.
  137. Engel M, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. Cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol*. 1996;366(1):34–43.
  138. Meyer-Puttlitz B, Junker E, Margolis RU, Margolis RK. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol*. 1996;366(1):44–54.

139. Margolis RK, Rauch U, Maurel P, Margolis RU. Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect Dev Neurobiol.* 1996;3(4):273–90.
140. Margolis RU, Margolis RK. Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding. *Cell Tissue Res.* 1997;290(2):343–8.
141. Garwood J, Rigato F, Heck N, Faissner A. Tenascin glycoproteins and the complementary ligand DSD-1-PG/ phosphacan--structuring the neural extracellular matrix during development and repair. *Restor Neurol Neurosci.* 2001;19(1–2):51–64.
142. Zhou X-H, Brakebusch C, Matthies H, Oohashi T, Hirsch E, Moser M, i sur. Neurocan is dispensable for brain development. *Mol Cell Biol.* 2001;21(17):5970–8.
143. Okamoto M, Sakiyama J, Kurazono S, Mori S, Nakata Y, Nakaya N, i sur. Developmentally regulated expression of brain-specific chondroitin sulfate proteoglycans, neurocan and phosphacan, in the postnatal rat hippocampus. *Cell Tissue Res.* 2001;306(2):217–29.
144. Faissner A, Heck N, Dobbertin A, Garwood J. DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatase-beta isoforms during development and regeneration of neural tissues. *Adv Exp Med Biol.* 2006;557:25–53.
145. Seki T, Rutishauser U. Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1998;18(10):3757–66.
146. Yamaguchi Y. Brevican: a major proteoglycan in adult brain. *Perspect Dev Neurobiol.* 1996;3(4):307–17.
147. Matthews RT, Kelly GM, Zerillo CA, Gray G, Tiemeyer M, Hockfield S. Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2002;22(17):7536–47.
148. Morawski M, Brückner G, Arendt T, Matthews RT. Aggrecan: beyond cartilage and into the brain. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(5):690–3.
149. Xi Z-Q, Wang X, Luo J, Wang W, Xiao F, Chen D, i sur. Fibronectin is a potential cerebrospinal fluid and serum epilepsy biomarker. *Epilepsy Behav.* 2015;48:66–9.
150. Tate MC, Shear DA, Hoffman SW, Stein DG, Archer DR, LaPlaca MC. Fibronectin promotes survival and migration of primary neural stem cells transplanted into the traumatically injured mouse brain. *Cell Transplant.* 2002;11(3):283–95.
151. Wu YP, Siao CJ, Lu W, Sung TC, Frohman MA, Milev P, i sur. The tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin extracellular proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan substrate. *J Cell Biol.* 2000;148(6):1295–304.
152. Quirico-Santos T, Nascimento Mello A, Casimiro Gomes A, de Carvalho LP, de Souza JM, Alves-Leon S. Increased metalloprotease activity in the epileptogenic lesion--lobectomy reduces metalloprotease activity and urokinase-type uPAR circulating levels. *Brain Res.* 2013;1538:172–81.
153. Bausch SB. Potential roles for hyaluronan and CD44 in kainic acid-induced mossy fiber sprouting in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroscience.* 2006;143(1):339–

- 50.
154. Freeze HH, Eklund EA, Ng BG, Patterson MC. Neurological aspects of human glycosylation disorders. *Annu Rev Neurosci.* 2015;38:105–25.
  155. Spampanato J, Dudek FE. Targeted Interneuron Ablation in the Mouse Hippocampus Can Cause Spontaneous Recurrent Seizures. *eNeuro.* 2017;4(4).
  156. Schwaller B, Tetko I V, Tandon P, Silveira DC, Vreugdenhil M, Henzi T, i sur. Parvalbumin deficiency affects network properties resulting in increased susceptibility to epileptic seizures. *Mol Cell Neurosci.* 2004;25(4):650–63.
  157. Fujiwara-Tsukamoto Y, Isomura Y, Nambu A, Takada M. Excitatory GABA input directly drives seizure-like rhythmic synchronization in mature hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience.* 2003;119(1):265–75.
  158. Köhling R, Vreugdenhil M, Bracci E, Jefferys JG. Ictal epileptiform activity is facilitated by hippocampal GABA<sub>A</sub> receptor-mediated oscillations. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2000;20(18):6820–9.
  159. Penfield W HS. Epileptogenic lesions of the brain: a histologic study. *Arch Neurol Psychiatry.* 1940;43:240–261.
  160. Das A, Wallace GC 4th, Holmes C, McDowell ML, Smith JA, Marshall JD, i sur. Hippocampal tissue of patients with refractory temporal lobe epilepsy is associated with astrocyte activation, inflammation, and altered expression of channels and receptors. *Neuroscience.* 2012;220:237–46.
  161. Shao Y, McCarthy KD. Plasticity of astrocytes. *Glia.* 1994;11(2):147–55.
  162. Lin R, Kwok JCF, Crespo D, Fawcett JW. Chondroitinase ABC has a long-lasting effect on chondroitin sulphate glycosaminoglycan content in the injured rat brain. *J Neurochem.* 2008;104(2):400–8.
  163. Bernard C, Prochiantz A. Otx2-PNN Interaction to Regulate Cortical Plasticity. *Neural Plast.* 2016;2016:7931693.
  164. Khomiak D, Kaczmarek L. Matrix metalloproteinase 9 and epileptogenesis - the crucial role of the enzyme and strategies to prevent the disease development. *Postepy Biochem.* 2018;64(3):222–30.

## 11. ŽIVOTOPIS

Barbara Sitaš rođena je 29. ožujka 1987. godine u Prešovu, Slovačka. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2011. godine. Nakon pripravničkog staža i položenog stručnog ispita započinje specijalizaciju iz neurologije. Specijalistički ispit položila je 2018. godine. Radi kao neurolog na Klinici za neurologiju KBC-a Zagreb na Odjelu za neuromuskularne bolesti i kliničku elektromioneurografiju. Subspecijalistički ispit iz neuromuskularnih bolesti položila je 2021. godine. Koautor je u osam članaka (dva u kvartili Q1, jedan u kvartili Q2 te pet u kvartili Q3) i jedanaest nastavnih tekstova. Održala je više od 20 pozvanih predavanja (dva na međunarodnim kongresima, tri na kongresima s međunarodim sudjelovanjem, a ostala na domaćim skupovima). Autorica je ili koautorica 11 kongresnih priopćenja. Članica je Hrvatskog društva za neuroznanost, Hrvatskog neurološkog društva, Hrvatskog društva za neuromuskularne bolesti i kliničku elektromioneurografiju.