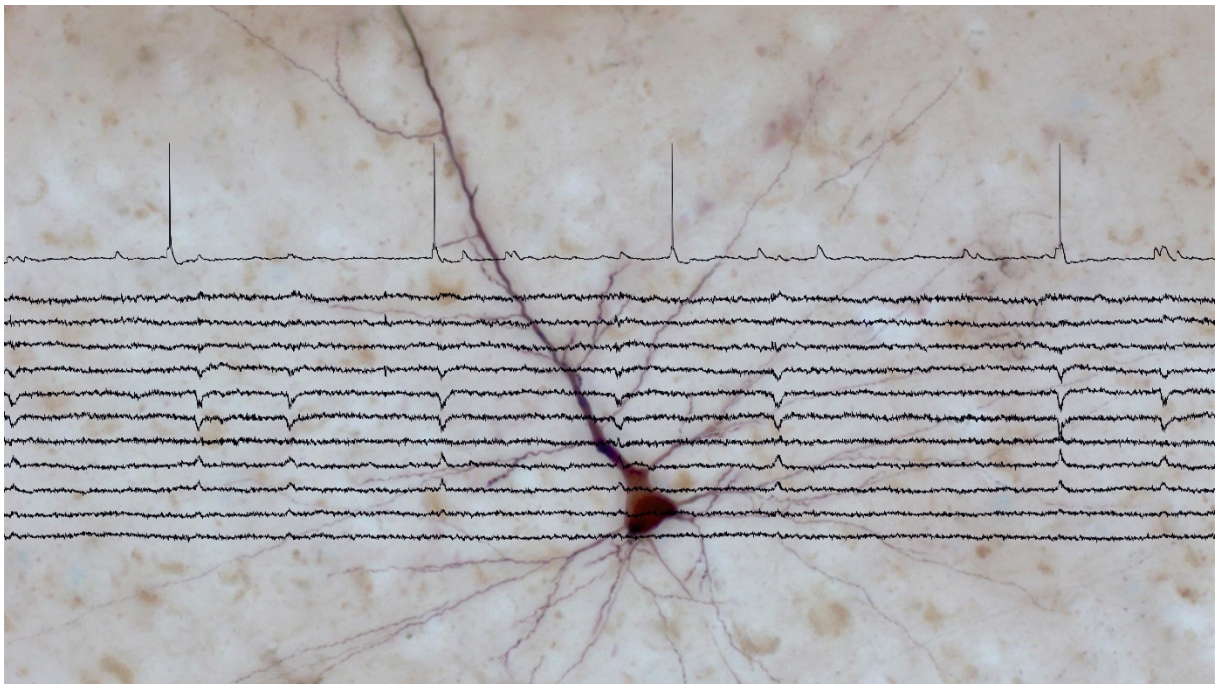


Fiziológiás és epilepsziás szinkronizációs folyamatok vizsgálata humán és rágcsáló agykéregben



Dr. Wittner Lucia

Eötvös Loránd Kutatási Hálózat

Természettudományi Kutatóközpont

Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézet

Integratív Idegtudományi Csoport

Budapest, 2021.

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés.....	3
1.1	Epilepszia, rohamok és interiktális tüsskék.....	3
1.2	A hippocampus és a neocortex anatómiája, illetve azok elváltozásai epilepszia esetén.....	4
1.2.1	A neocortex és a hippocampus szerkezete	4
1.2.2	A gátló interneuronok	4
1.2.3	A hippocampalis sclerosis és focalis corticalis dysplasia	5
1.3	Állatmodellek: in vivo, ex vivo és akut in vitro modellek	5
1.4	Rágcsálók hippocampusában és neocortexében megfigyelhető szinkron események	6
1.4.1	Éles hullám-ripple komplexumok	6
1.4.2	Epilepsiás aktivitás	6
1.5	A humán hippocampusban és neocortexben megjelenő epilepsiás aktivitás.....	7
1.6	Humán kontroll kérdése	7
2	Célkitűzések.....	9
3	Módszerek.....	11
3.1	Páciensek.....	11
3.2	Anatómiai módszerek.....	11
3.3	Epilepszia modellek	11
3.4	Genetikai profil vizsgálata	11
3.5	Elektrofiziológiai módszerek	11
3.6	Két-foton mikroszkópia	12
3.7	Adatanalízis	12
4	Eredmények.....	13
4.1	Rágcsálók hippocampusában megjelenő fiziológiás és epileptiform aktivitás.....	13
4.1.1	Fiziológiás éles hullám keletkezési mechanizmusai	13
4.1.2	Epileptiform aktivitások keletkezése.....	14
4.1.3	Hippocampalis szinkron aktivitások anatómiai háttere rágcsálókban	16
4.2	Az emberi hippocampusban megjelenő interiktális aktivitás	17
4.2.1	A subiculumban keletkező interiktális tüsskék	17
4.2.2	A hippocampus CA2 régiójában megjelenő interiktális tüsskék.....	17
4.2.3	A humán hippocampusban megjelenő epilepsiás aktivitás anatómiai háttere.....	18
4.3	Az emberi nagyagykéregben megjelenő fiziológiás és epileptiform aktivitás	19
4.3.1	Fiziológiás szinkron populációs aktivitás és spontán interiktális tüsske	19
4.3.2	Epileptiform aktivitások keletkezési mechanizmusai.....	20
5	Következtetések	23
5.1	A hippocampus és a neocortex közti különbségek in vitro preparátumokban.....	23
5.2	Ember és állat közti különbségek	23
5.3	Az epilepsziamodellek és az emberi betegség közti különbségek	24
6	Összefoglalás	25
7	Irodalom	27
8	A doktori értekezés alapjául szolgáló saját közlemények	31
9	Publikációs mutatók a tézisek beadásakor.....	32

1 Bevezetés

1.1 Epilepszia, rohamok és interiktális tüskék

A Nemzetközi Epilepsziaellenes Liga (International League Against Epilepsy, ILAE) szerint „az epilepsziás roham olyan jelek és/vagy szimptómák átmeneti előfordulása, melynek hátterében az agy patológiásan túlzott vagy szinkron neuronális aktivitása áll” (1). Ezzel szemben az epilepszia az agy megbetegedése, mely során legalább az egyik feltétel teljesül: 1) a páciensnek legalább két nem provokált rohama van, legalább 24 órás eltéréssel; 2) a páciensnek történt egy nem provokált rohama, amelyet követő 10 évben nagy a valószínűsége egy újabb roham kialakulásának; 3) a beteget epilepszia szindrómával diagnosztizálták (1). Az epilepszia tehát nem csak egy helyi fiziológiai és anatómiai elváltozásként értelmezhető tünetegyüttes, hanem inkább egy idegi hálózati rendszer eltérés, mely során a neurofiziológiai jelenségek patológiás változásai együtt járnak a morfológiai módosulásokkal.

Az epilepsziás roham egy néhány másodperctől akár öt percre is tartó patológiás folyamat, mely hátterében a neuronok hosszantartó, túlzottan szinkron kisülése áll. Status epilepticus az a rohamot, amely hosszabb ideig tart, mint öt perc, vagy azt, ha két roham követi egymást öt percen belül. A rohamok felosztása elsősorban a megjelenésük alapján történik. Megkülönböztetünk 1) fokális (vagy parciális) indulású rohamokat, melyek során az egyik agyfélteke egy körülírható területe indítja a rohamokat, 2) generalizált rohamokat, melyek mindkét agyféltekét érintik, valamint 3) ismeretlen indulású rohamokat, melyeknél a rohamindulás nem meghatározott. (2). Az epilepsziás betegekben, a rohammentes időszakokban interiktális tüskék is megjelennek, melyek a skalp EEG-n egy nagy amplitúdójú tüskéből, és egy elnyújtottabb hullámból állnak. Az interiktális tüskék – a rohamok mellett – fontos diagnosztikai értékkel bírnak, mert az agyterületi eloszlásuk szorosan összefügg az epileptogén, vagyis az epilepsziás aktivitásokat generáló területtel (3).

A temporális lebeny eredetű epilepszia (TLE) a leggyakoribb parciális epilepsziás tünetegyüttes, többnyire fokális rohamokkal jár, melyek sok esetben másodlagosan generalizálódnak. Az epileptogén terület a temporális lebenyben található, és legtöbbször a hippocampus is érintett (2). A frontális lebeny eredetű epilepszia a második leggyakoribb parciális tünetegyüttes, amely a frontális lebenyből indul, és általában fokális rohamokkal jár (4). Az antiepileptikumok széles skálája ellenére a temporális és frontális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő betegek egy jó része gyógyszeres terápia mellett sem tünetmentes. E betegek nagy hányada azonban jól gyógyítható sebészeti módszerrel, mellyel általában az életminőségben jelentős javulást lehet elérni.

Jelentős az összefüggés az epilepsziás rohamok kialakulása és az agyi tumorok jelenléte között. A leginkább epileptogén tumorok közé tartoznak a gliális eredetű daganatok, a legkevésbé epileptogén daganatok pedig a test egyéb szerveit érintő elsődleges tumorok agyi metasztázisai (5). Kutatásaink szempontjából kiemelkedő szereppel bírnak mind a corticalis, parciális epilepsziát okozó tumorok, mind azok az agyi térfoglaló elváltozások, amelyek esetén a páciensnek nincsenek epilepsziára utaló jelei.

1.2 A hippocampus és a neocortex anatómiája, illetve azok elváltozásai epilepszia esetén

1.2.1 A neocortex és a hippocampus szerkezete

A neocortex 6 rétegű, moduláris szerkezetű kérgi terület, komplex összeköttetési mintázattal. Serkentő sejtjei a II-III. és V-VI. rétegi piramis sejtek és a IV. rétegben található tüskés csillagsejtek, melyek az összes neuron kb. 80%-át teszik ki. A piramis sejtek nagy része kivetít az adott kérgi területről, kivéve a II. rétegieket, amelyek inkább helyi axonkollaterálisokat adnak, akár csak a tüskés csillagsejtek. Jóval kevesebb számban, a neocortex minden rétegében megtalálhatók a gátló interneuronok, melyek morfológiai és neurokémiai szempontból nagyon heterogén csoportot alkotnak, és lokális szinapszisokat adnak (ld. később). A komplex felépítés alkalmassá teszi a nagyagykérget arra, hogy a magasabb rendű kognitív folyamatokat ellássa, mint például az érzékelés, a tárgyak és események reprezentációja, tervezés és döntéshozatal (6).

A hippocampust két nagyobb területre, a gyrus dentatusra (GD) és a cornu Ammonisra osztják, melyek két egymásba forduló U alakot formálnak. A serkentő principális sejtek adják a hippocampus neuronjainak kb. 85%-át, melyek a GD-ban a szemcsesejtek, illetve a hilusban elhelyezkedő mohasejtek, míg a cornu Ammonisban a piramis sejtek. A maradék 15% a gátló interneuronok, melyek – a neocortexhez hasonlóan – nagyon heterogének, és a hippocampus minden rétegében megtalálhatók. A tanulás és memóriefunkciók szempontjából fontos triszinaptikus kör anatómiai alapját adja a principális sejtek specifikus kapcsolatrendszere (7). A hippocampus ezzel a speciális kapcsolatrendszerével alkalmas a külvilágból érkező információk integrálására, a memórianyomok kialakítására és továbbítására a nagyagykéreg felé (8). A különböző emlősfajok, így tehát a modellállatként leggyakrabban használt rágcsálók és az ember között természetesen vannak különbségek a neocortex és a hippocampus anatómiáját illetően, de a fent leírt általános anatómiai struktúra azonos, vagy nagyon hasonló minden emlősfajban.

1.2.2 A gátló interneuronok

A neocortexben és a hippocampusban egyaránt a gátló interneuronok három nagyobb funkcionális csoportját szokták megkülönböztetni: 1) periszomatikus gátló interneuronokat, amelyek a principális sejtek sejttestje körüli régióra adnak szinapszisokat, és azok kimenetét szabályozzák, 2) dendritikus gátlósejteket, melyek a dendritikus régiót idegzik be, és a principális sejtek bemenetét szabályozzák, valamint 3) interneuron-szelektív gátlósejteket, melyek specifikusan más gátlósejteket gátolnak, és nagyobb neuronpopulációk szinkronitásáért felelősek (9). A dendritikus gátlósejtek sokkal heterogénebb csoport, mint a periszomatikus gátlósejtek, elhelyezkedésük, neurokémiai markereik, be- és kimenetük alapján szokták osztályozni őket. A dendritikus gátlósejtek közös tulajdonsága, hogy elsősorban a principális sejtek dendritjeire érkező serkentő bemenetet szabályozzák (9). Az interneuron-szelektív gátlósejtek a kérgi interneuronok harmadik nagy funkcionális csoportja, melyek specifikusan más interneuronokat idegeznek be, és nagy valószínűséggel a nagyobb sejtpopulációk szinkronizálását végzik (10). Természetesen a különböző emlősfajok között vannak különbségek a gátlósejtek tekintetében is, de a különböző funkciójú interneuron csoportok megtalálhatók mind emberben, mind rágcsálókban.

1.2.3 A hippocampalis sclerosis és focalis corticalis dysplasia

A hippocampalis sclerosis (HS) jelensége nagyon gyakori patológia a TLE betegek esetén. A HS a páciensek MR felvételén is látszódik, és a hippocampus atrófiáját jelenti. A különböző hippocampalis régiók nem egyformán érintettek, a CA1 régió piramis sejtei gyakorlatilag teljesen eltűnnek, de a CA3 piramis sejtek egy része is elpusztul. Ezzel szemben a GD, a CA2 régió és a subiculum nem atrófiás, a sejteik nagy része rezisztens az epilepsziához köthető sejtpusztulás során. Az irodalomban „strong HS” (sHS) néven szokták említeni (11). A betegek egy részében az MR felvételen nem mutatható ki a HS, ezt az irodalmi adatoknak megfelelően „mild HS” (mHS) néven említem. Ezen esetekben a CA1 és CA3 régiók nem atrófiásak, makroszkóposan a hippocampus érintetlennek tűnik. Mikroszkópos szinten azonban ezen esetekben is megfigyelhető az interneuronok szelektív pusztulása, és az epilepsziás reorganizáció bizonyos jelei (12).

A dysgenesisek egyik leggyakoribb formája, a focalis corticalis dysplasia (FCD) a neocortexet érintő fejlődési rendellenesség, amely igen epileptogén. Neuropatológiai szempontból több alcsoportra osztható, aszerint, hogy a neocortex felépítése és rétegzettsége mennyire sérült (13). Az FCD általában azonosítható a képző eljárásokkal végzett vizsgálatokban, és sebészi eljárással többnyire jól csökkenthető a páciensek rohamainak száma (14).

1.3 Állatmodellek: in vivo, ex vivo és akut in vitro modellek

A neocorticalis és hippocampalis epilepsziás aktivitások vizsgálatára többféle állatmodell létezik. Az in vivo modelleket aszerint szokták csoportosítani, hogy milyen típusú rohamot modelleznek. Egyszerű parciális rohamokat agyfelszínre helyezett fémekkel (pl. alumíniummal) lehet kiváltani, komplex parciális rohamokat pl. a glutamát receptor agonista kainát beadásával lehet elérni. Ezen felül széles körben elterjedt az acetil kolin antagonistá pilocarpine beadása, melyet status epilepticus, illetve a későbbi, spontán kialakuló komplex parciális rohamok modellezésére használnak. A generalizált parciális rohamok előidézésére pedig penicillint vagy GABA_A receptor antagonistá bicuculline-t injektálnak a megfelelő agyterületre, valamint megvonják a GABA-t a motoros kéregbe való krónikus beadást követően (15).

Az in vivo modelleken kívül több akut, in vitro farmakológiai modell is létezik. Ez utóbbiak esetén egészséges állatok agyszeleteit vizsgálják in vitro körülmények között, melyekben epilepsziás eseményeket idéznek elő, többnyire az átáramoltatott folyadék módosításával. A GABA_A receptorok blokkolásával vagy a K⁺-áramok módosításával interiktális-jellegű tuskék megjelenése indukálható neocorticalis és hippocampalis túlélő szeletekben. Az NMDA-típusú glutamát receptorokon átfolyó áramok megnövelésével, valamint a kainát típusú glutamát receptorok agonistáinak hozzáadásával pedig epilepsziás rohamokhoz hasonló események válthatók ki. Az akut in vitro modellek használatával nagyon sok információt szereztünk az epilepsziás aktivitások kialakulási mechanizmusairól. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy ezek a modellek – mivel egészséges állatokból származó szövetet használnak – nem veszik figyelembe az epilepsziás agyban már létrejött molekuláris, elektrofiziológiai, anatómiai változásokat. Az ex vivo modellek azonban, amelyek során epilepsziás állatokból származó agyszövetet vizsgálunk in vitro körülmények között, a már megváltozott epilepsziás agy tulajdonságaival is számolnak (összefoglalásként lásd (16)).

1.4 Rágcsálók hippocampusában és neocortexében megfigyelhető szinkron események

1.4.1 Éles hullám-ripple komplexumok

A rágcsálók hippocampusában igen jellegzetes éles hullám-ripple komplexumok (sharp wave ripple complex, SPW) jelennek meg lassú hullámú alvás és éber mozdulatlanság alatt (17). Nevének megfelelően ez egy nagy amplitúdójú éles hullámot jelent, amelynek a csúcán egy kb. 200 Hz-es „ripple” oszcillációs aktivitás jelenik meg (18). E szinkron eseményeknek fontos szerepet tulajdonítanak a memórianyomok kialakulásában és továbbításában az extrahippocampalis területek felé (19). Rágcsálók hippocampusából készített túlélő szeletekben nagyon hasonló szinkron jelenségek regisztrálhatók, melyek az élő állatban található folyamatok jó modelljének tekinthetők (összefoglalásként lásd (8)). A kutatócsoportok a modelltől függetlenül abban megegyeznek, hogy akár csak az élő állatban, a CA3 régió játssza a központi szerepet a SPW-ek kialakításában. Mind in vivo, mind in vitro körülmények között a piramis sejtek kis része aktiválódik és általában burst-ben tüzel a SPW-ek során, míg a többség inkább gátlódik. Ennek megfelelően a gátló neuronok fázis-csatoltan tüzelnek a SPW-ek során, bár a különböző interneuron típusok különböző arányban vesznek részt a SPW eseményekben. A legfontosabb szerepet a periszomatikus gátlósejteknek, azon belül is a parvalbumin (PV)-pozitív kosársejteknek, valamint a „bistratified” típusú dendritikus gátlósejteknek tulajdonítják élő állatban, míg in vitro körülmények között a PV-pozitív kosársejtek mellett az „O-LM” típusú dendritikus interneuronok tüzeltek a legjobban (8).

1.4.2 Epilepsziás aktivitás

A rágcsálók agykérgében, de főleg a hippocampusában keletkező epilepsziás rohamoknak és interiktális tüskéknek jelentős irodalma van (összefoglalásként lásd (16, 20)). A két leggyakrabban alkalmazott in vivo modellben, a kainát és a pilocarpine modellben spontán visszatérő rohamok, interiktális tüskék, és a patológiásnak gondolt fast ripple oszcillációk jelentkeznek. A különböző rohamindulási mintázatú rohamok során más sejt típusok aktiválódnak: az alacsony feszültségű, magas frekvenciás indulású rohamok kezdetekor a GABAerg interneuronok aktiválódnak, míg a hiperszinkron indulású rohamok során pedig valószínűleg a glutamaterg sejtek tüzelése uralja a rohamkezdetet (20).

Az interiktális tüskék kialakulási mechanizmusainak magyarázatára több modell is létezik. Először a neocortexben mutatták ki, hogy az interiktális tüske egy burst tüzeléssel függ össze, amely egy lassú depolarizációs potenciálra rátevődő rövid, de magas frekvenciás (200-500Hz) akciós potenciál sorozattal jellemezhető. Ez az intracelluláris tüzelési mintázat, melyet paroxysmalis depolarizációs eltolódásnak (paroxysmal depolarization shift, PDS) neveztek el, megfigyelhető gyakorlatilag az összes in vitro és in vivo állatmodellben (összefoglalásként lásd (3)). Fiziológiai körülmények között a hippocampus CA3 régiójában, valamint a neocortex V. rétegében elhelyezkedő piramis sejtek egy kis csoportja mutat burst tüzelést. A hipotézis szerint tehát ezek a piramis sejtek indítják a PDS-t, és ezen keresztül az interiktális tüskét (21, 22). A másik modell a serkentés-gátlási egyensúly felborulásán alapszik, mely felelős lehet több burst tüzelés beindításáért, és ezáltal az interiktális tüske kialakulásáért (3). A gátlás csökkenése és a túlzott serkentés anatómiai módszerekkel is kimutatható epilepsziában és alátámasztja ezt a hipotézist (összefoglalásként lásd (23)).

1.5 A humán hippocampusban és neocortexben megjelenő epilepsziás aktivitás

A humán agykéregben mind az epilepsziás rohamok, mind pedig a rohammentes időszakokban jelentkező interiktális tüskék kialakulási mechanizmusa régóta kutatott terület. Az interiktális tüske (interictal spike, IIS) elnevezés kétféle epilepsziás tüskét foglal magába, az egyik a szigorú értelemben vett tüske (spike), amely egy gyors (<50 ms), nagy amplitúdójú populációs aktivitás, a másik pedig az éles hullám (sharp wave, SW), amely egy hosszabb (50-200 ms) tüske-hullám komplexumot jelöl (összefoglalásként lásd (3)). Nem keverendő össze a rágcálók hippocampusában leírt éles hullám-ripple komplexummal (sharp wave-ripple complex, SPW), amely egy fiziológias eseményt jelöl. Ezzel szemben az emberi agykéregben spontán módon megjelenő éles hullámokat és interiktális tüskéket patológias eseményeknek tekintik, mivel nagyon szoros összefüggésben állnak az epilepsziás rohamok, és az epilepszia, mint betegség kialakulásával.

In vitro kísérletekben bizonyították, hogy az emberi agykéregben a rágcálókéhoz nagyon hasonló sejtípusok találhatók, mind anatómiai, mind elektrofiziológiai szempontból. A szabályosan tüzelő (regular spiking, RS-PC) és burst-ölő (intrinsically bursting IB-PC) serkentő piramissejtek mellett a gyors tüzelésű (fast spiking) gátló interneuronok sokasága található a humán neocortexben. Az állatmodellekből származó eredményeknek megfelelően, az epilepsziás területeken celluláris szinten is tetten érhető a túlzott serkentetőség, és a membránáramok leírása mellett hamar összekötötték a burst-ölő sejtek jelenlétét, valamint a PDS-t az epilepsziás aktivitás kialakulásával (24, 25). Ugyanakkor epilepsziás páciensekben végzett mikroelektrodás elvezetésekben nem sikerült egyértelműen bizonyítani az összefüggést a burst-ölő sejtek és az interiktális tüskék kialakulása között (26-28).

Az elmúlt évtizedekben a következő hipotéziseket járták körbe az epilepsziakutatással foglalkozó kutatócsoportok. A feltevés szerint a gátlósejtek pusztulása, és ezáltal a gátlás eltűnése, vagy hypofunkciója kapcsolatba hozható az epilepsziás aktivitás kialakulásával (29, 30), ami így hozzájárul a serkentés-gátlás egyensúlyának felborulásához. A mi korábbi elektronmikroszkópos munkáink azonban rávilágítottak arra, hogy a gátlósejtek – típustól függően – nem feltétlenül tűnnek el az epilepsziás hippocampusban, csak esetleg immunfestéssel nem mutathatók ki epilepsziás szövetben, sőt, egyes típusok axonjai akár sarjadzanak is, hogy még több gátló szinapszist adjanak a serkentő sejtekre (31). Ugyanakkor a principális sejtekre érkező GABAerg axonok nem feltétlenül gátolják a sejteket. A feltételezések szerint a csillarsejtek kiválthatnak serkentő posztszinaptikus választ a piramissejtek axon iniciális szegmentumán (32). Ezen felül humán epilepsziás hippocampusból készített szeleteken spontán megjelenő interiktális tüskék során a subicularis piramissejtek egy kisebb hányada pedig a GABAerg bemenetre depolarizáló választ adott (33). A feltételezések szerint ez a kloridion grádiens megváltozása miatt fordulhat elő, melynek hátterében az ezt a grádiens felállító kation-klorid kotranszporterek megváltozott expressziója állhat (34, 35). Ez a két mechanizmus, vagyis a serkentés-gátlás egyensúlyának, valamint a klorid háztartás felborulása lehet az alapja az epilepsziás aktivitások kialakulásának az agykérgi epilepsziákban.

1.6 Humán kontroll kérdése

Az epilepsziakutatás során fontos még szót ejtenünk a kontroll kérdéséről. Ez a humán kutatások egyik sarkalatos pontja. Anatómiai vizsgálatokhoz a legmegfelelőbb kontroll szövet a post mortem humán minta olyan alanyokból, akiknek nem volt semmilyen neurológiai betegségük (pl. (31)). Hasonlóságuk okán, az egészséges humán szöveten kívül főemlősökből származó kontroll szövetet is lehet használni (36). Az elektrofiziológiai kutatásokhoz azonban nem használható post mortem minta,

és érthető etikai okokból egészséges agyszövet sem vizsgálható. Így más megoldások jöhetnek csak szóba. Akárcsak az anatómiai vizsgálatokhoz, főemlősökből származó mintákat (37), illetve rágcsáló szövetet is szoktak kontrollnak használni, sok esetben a megfelelő in vivo epilepszia modellel együtt (pl. (38)). A humán hippocampust érintő vizsgálatok során gyakran a nem scleroticus hippocampust (mHS) tekintik a scleroticus hippocampus (sHS) kontrolljának, annak ellenére, hogy ezek a minták szintén epilepsiás páciensekből származnak (pl. (39)). A dysgenesises betegek esetén a dysgenesist tartalmazó (és gyakran rohamindító) neocorticalis szövet kontrolljának akár ugyanabból a betegből származó, nem, vagy kevésbé epileptogén, a dysgenesisen kívül eső területekről származó szöveteket tekintik (pl. (40)), vagy a tumor-asszociált epilepsiás betegekből eltávolított peritumorális régióból származó szövetet hasonlítják össze (pl. (29)). Az összes itt felsorolt humán lehetőség tehát epilepsiás betegek agyából eltávolított olyan szövetet tekint kontrollnak, amelyek nem, vagy kevésbé vesznek részt az epilepsiás aktivitás kialakításában. De mégis epilepsiás betegekből származnak, és az epilepsiás szinaptikus reorganizáció jelei egyértelműen (pl. a hippocampusban, lásd (41)) vagy kevésbé egyértelműen (pl. a neocortexben, lásd (42)), de tetten érhetőek. Humán elektrofiziológiai kutatásokhoz a legjobb kontroll az a szövet, amelyet nem epilepsiás betegek operációja során távolítanak el. A hippocampus esetében ez gyakorlatilag nem fordul elő, ugyanis a tanulási és memóriefolyamatokban betöltött fontos szerepe miatt a sebészeti eljárások során a hippocampust a lehetőségekhez mérten megőrzik, csak akkor rezekálják, ha patológiás. A neocortex esetében a nem epilepsiás – általában tumoros – betegek egészségesnek tekinthető nagyagykérgi szövetét esetenként eltávolítják, ha a tumor subcorticalisan található, és a sebészeti technika ezt megkívánja. Ezek az esetek az elérhető legjobb kontrolljai a humán epilepsiás neocorticalis mintáknak, a szakirodalomban mégis nagyon kevés publikációban találkozunk vele (37, 43).

2 Célkitűzések

Főbb célkitűzéseink a fiziológiás és patológiás (epilepsziás) szinkron populációs aktivitások kialakulási mechanizmusainak a feltárása volt rágcsálók és az ember agykérgében. Az epilepsziás és nem epilepsziás szinkron események közti hasonlóságok és különbségek kiderítésével szerettünk volna közelebb kerülni annak a megértéséhez, hogy mitől válik egy adott agyi régió patológiás szinkron folyamatok gócpontjává, illetve, hogy hol is húzódik a határ (ha egyáltalán van) a fiziológiás és az epilepsziás aktivitások között. E kérdéseknek a feltárására a humán szövet mellett állatmodelleket is vizsgáltunk, amelyekkel azon túl, hogy a szinkronizációs folyamatok mechanizmusaira igyekeztünk fényt deríteni, szerettük volna megvizsgálni az állatok és az ember agyában létrejövő oszcillációk különbözőségeit. Kutatásainkban az alábbi kérdésekre kerestük a válaszokat.

Fiziológiás SPW aktivitás karakterizálása rágcsálók hippocampusában (44)

- Milyen neuronhálózati tulajdonságai vannak a rágcsálók hippocampusának CA3 régiójában in vitro körülmények között megjelenő SPW aktivitásoknak?
- Mi a különbség a kétféle SPW aktivitás között?
- Hogyan vesznek részt a serkentő CA3 piramisjelek a SPW-ekben?
- Mi a szerepe a gátló interneuronoknak, azon belül is a periszomatikus gátlósejteknek a hippocampalis SPW-ek generálásában?

Epilepsziás interiktális tuskék mechanizmusainak feltárása rágcsálók hippocampusában (45)

- Melyik régióban keletkezik a diszinhibíció által indukált interiktális-jellegű túske a rágcsálók hippocampalis szeletein?
- Melyek a neuronok azon elektrofiziológiai jellemzői, amelyek elősegítik, hogy az interiktális túske egy adott területen alakuljon ki?
- A CA3 régió piramisjeleinek melyek azok az anatómiai és összeköttetésbeli tulajdonságai, amelyek szerepet játszhatnak az interiktális tuskék generálásában?

Epilepsziás rohamok mechanizmusainak vizsgálata rágcsáló hippocampusban (46, 47)

- Melyek a különböző szakaszai az in vivo kainát beadásával kiváltott epilepsziának?
- Mely biológiai folyamatokhoz kapcsolható gének expressziója változik, és hogyan, epilepszia során, a különböző szakaszokban?
- Milyen terjedési mintázatot mutat a hippocampusban a kainát in vitro körülmények között való alkalmazásával kiváltott epilepsziás roham?
- Milyen tüzelési mintázatot mutatnak a serkentő piramisjelek a rohamok alatt?
- Milyen szinkron aktivitások alakulnak ki a hippocampusban a kainát ex vivo körülmények között való alkalmazása során?
- Milyen morfológiai változások kísérik a kainát beadását követő epilepsziás aktivitásokat a hippocampusban?

Hippocampalis aktivitások anatómiai háttere rágcsáló hippocampusban (48, 49)

- Milyen hosszú és hány axon terminálist adnak az ipsilateralis hippocampusban a CA3 piramisjelek axonjai?
- Milyen eloszlást mutatnak a CA3 piramisjelek boutonjai az ipsilateralis hippocampusban?
- Milyen gátló interneuronokon végződnek a CA3 piramisjelek axonjai? Van-e szelektív beidegzése adott sejtípusoknak?

Epilepsziás interiktális tuskék vizsgálata a humán hippocampusban (36, 50)

- A humán subiculumban in vitro körülmények között megjelenő interiktális tuskék során milyen aktivitást mutatnak a subicularis piramisjelek?

- Előfordulhat-e, hogy egyes subicularis piramissejtekből hiányzik a kloridion gradiens felállításáért felelős KCC2 transzporter fehérje?
- Van-e összefüggés a piramissejtek viselkedése és a KCC2-tartalmuk között?
- Melyek a hálózati tulajdonságai a humán hippocampalis szeletekben a CA2 régióban spontán megjelenő interiktális tüskéknek?
- Mi a szerepe a serkentő CA2 piramissejteknek az interiktális tüskék kialakításában?
- Szerepet játszik-e a kloridion háztartás megváltozása a CA2 régióban detektálható interiktális tüskék létrejöttében?
- Szerepet játszik-e a serkentés-gátlás egyensúlyának felborulása az interiktális tüskék kialakulásában a hippocampalis CA2 régióban?

Az epilepsziás folyamatok lehetséges anatómiai háttere az emberi hippocampusban (41, 51, 52)

- Milyen eloszlást mutat a KCC2 transzporter fehérje a humán hippocampusban, és hogyan változik epilepszia során?
- Milyen eloszlást mutatnak a PV-tartalmú interneuronok a humán hippocampusban, és milyen posztszinaptikus célelemei vannak?
- Hogyan változik a PV-pozitív sejtek és azok posztszinaptikus célelemeinek eloszlása epilepszia során?
- Mi az eloszlása a CCK/CB1+ kosársejteknek a humán hippocampusban, és milyen posztszinaptikus célelemeken végződnek?
- Hogyan változnak a CCK/CB1+ kosársejtek és célelemeik epilepszia során?

Fiziológias spontán populációs aktivitás vizsgálata a humán neocortexben (53, 54)

- Mely hálózati tulajdonságokkal rendelkezik a humán neocortexben spontán megjelenő SPA?
- Van-e összefüggés a betegek kórelőzményei és az SPA megjelenése között?
- Van-e különbség az epilepsziás betegek és a nem epilepsziás (tumoros) betegek neocorticalis szeleteiben keletkező SPA-k között?
- Hogyan vesznek részt a serkentő piramissejtek az SPA-k kialakításában?

Epilepsziás tüskék és rohamok kialakulási mechanizmusai a humán neocortexben (55)

- Megjelennek-e epilepsziás események, és ha igen, milyenek, humán neocorticalis szeletekben diszinhibíció hatására?
- Van-e különbség az epilepsziás betegek és a nem epilepsziás (tumoros) betegek neocorticalis szeleteiben keletkező interiktális tüskék és rohamok között?
- Melyek a hálózati tulajdonságai a diszinhibíció indukálta interiktális tüskéknek és rohamoknak? Milyen terjedési mintázatot mutatnak az epilepsziás események a humán neocortexben?
- Mi a szerepe a serkentő piramissejteknek (azon belül is a burst-ölő piramissejteknek) és a gátló interneuronoknak az epilepsziás események kiváltásában?

3 Módszerek

3.1 Páciensek

Agysebészeti műtetre kerülő epilepsziás és nem epilepsziás páciensek rezezált mintáit használtuk a munkáinkhoz. Kísérleteinket az Európai Unió szabályainak megfelelően, hatósági engedélyek birtokában, a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően végeztük. A páciensek írásos beleegyezésüket adták a kutatáshoz. A betegek nagy részét Budapesten, az Országos Klinikai Idegtudományi Intézetben és a MÁV Kórházban, kisebb részét Párizsban, a Pitié-Salpêtrière kórházban, valamint New Yorkban, a New York University School of Medicine Idegsebészeti Osztályán műtötték. Az anatómiai vizsgálatokhoz post mortem kontroll hippocampalis mintákat kaptunk a Lenhossék Program keretein belül, a Semmelweis Egyetem Igazságügyi Kórbonctani Intézetéből.

3.2 Anatómiai módszerek

Beágyazás előtti immunreakciót alkalmaztunk a különböző gátló interneuronok megjelenítésére. Di-amino-benzidinnel (DAB), arany szemcsékkel, valamint Alexa típusú fluoreszcens antitestekkel vizualizáltuk a festett elemeket. A DAB-bal és arany szemcsékkel előhívott metszeteket dehidráltuk úgy, hogy elektronmikroszkópos vizsgálatokat lehessen végezni rajtuk. A festett elemeket camera lucida segítségével rajzoltuk ki, vagy NeuroLucida segítségével rekonstruáltuk 3 dimenzióban. A fénymikroszkópos és rekonstrukciós vizsgálatokat követően elektronmikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk a mintákon. Gallyas-féle ezüst impregnációt (56) végeztünk az epilepsziás állatokban bekövetkező sejtpusztulás vizsgálatára.

Mind in vivo, mind in vitro kísérletekben végeztünk intracelluláris sejtöltést, biocytin vagy neurobiotin jelölőanyagok segítségével. A sejtek egy részét Alexa594 fluoreszcens antitesttel hívtuk elő, majd egy KCC2 elleni fluoreszcens immunfestést végeztünk rajta. Utána, ahogy a többi intracellulárisan töltött sejtet is, DAB-bal hívtuk elő, és dehidráltuk úgy, hogy elektronmikroszkópban is lehessen vizsgálni. Az intracellulárisan töltött sejteket egy NeuroLucida rendszer segítségével rekonstruáltuk 3 dimenzióban. A fénymikroszkópos és sejt-rekonstrukciós analíziseket követően elektronmikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk.

3.3 Epilepszia modellek

Kétféle in vivo epilepszia modellt alkalmaztunk: intraperitonealis pilocarpine-t injektáltunk egerekbe, valamint kainátot adtunk be intrahippocampalisán az egerekbe. Akut in vitro modellekkel is dolgoztunk, a GABA_A receptor antagonistá bicuculline-t, picrotoxint, valamint a glutamát receptor agonistá kainátot alkalmaztuk epilepsziás aktivitás előidézésére agyi túlélő szeletekben.

3.4 Genetikai profil vizsgálata

Genetikai profil vizsgálatokat gén chip technika segítségével végeztünk az intrahippocampalis kainátot, illetve fiziológiás sóoldatot kapott állatokban. Valós idejű polimeráz láncreakció (real time polimerase chain reaction, RT-PCR) alkalmazásával nyert adatokhoz hasonlítottuk a gén chip segítségével nyert adatokat.

3.5 Elektrofiziológiai módszerek

In vivo elvezetésekét végeztünk epilepsziás páciensek hippocampusából a rezezáls műtétjük során 24 csatornás lineáris mikroelektródával (57), amely elvezetésekét kiegészítettünk a temporális lebeny felszínére helyezett, klinikai subduralis elektródákkal felvett electrocorticogrammal.

Az in vitro elvezetésekhez vagy egycsatornás extracelluláris fémelektrodákat, vagy ugyanolyan mikroelektrodát és felvevő rendszert használtunk, mint az in vivo intraoperatív elvezetésekhez. Rágcsálók hippocampusából, epilepsziás páciensek hippocampusából, valamint epilepsziás és nem epilepsziás (tumoros) betegek neocortexéből szeleteket készítettünk és vizsgáltunk in vitro körülmények között, interface típusú kamrában. Az egycsatornás fémelektrodával mezőpotenciált, míg a 24 csatornás mikroelektrodával mezőpotenciál grádiens (local field potential gradient, LFPg) vettünk fel. A farmakológiai kísérletek során az adott farmakológiai reagenst az átáramoltatott oldatba beoldva alkalmaztuk a szeleteken. Az extracelluláris elvezetésekkel egyidejűleg intracelluláris elvezetéseket végeztünk „sharp” típusú üvegelektrodákkal, melyeket követően a sejteket feltöltöttük biocytin vagy neurobiotin jelölőanyaggal.

3.6 Két-foton mikroszkópia

Epilepsziás és nem epilepsziás tumoros páciensek neocortexéből készített túlélő szeleteket vizsgáltunk egy két-foton mikroszkópos kombinált elektrofiziológiai és képalkotó rendszer segítségével. Az extracelluláris jeleket egy üvegelektrodával és a fent említett sokcsatornás lineáris mikroelektrodával regisztráltuk, miközben az intracelluláris méréseket „patch” típusú üvegelektrodával végeztük. Az intracellulárisan elvezetett sejteket Alexa594 fluoreszcens jelölőanyaggal töltöttük meg az elektrofiziológiai és Ca^{2+} -képalkotási vizsgálatok végén. A neuronok nagyobb csoportját „bulk loading” technikával Oregon green 488 BAPTA-1 AM, Ca^{2+} -kelátor zöld jelölőanyaggal jelöltük, majd mértük a sejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjának változásait. A gliasejtek elkülönítésére az sulphorhodamin-101 piros fluoreszcens festéket használtuk.

3.7 Adatanalízis

A populációs aktivitások hálózati tulajdonságait a 24 csatornás mikroelektrodával, széles sávban felvett mezőpotenciál grádiensből elemeztük. Meghatároztuk a szinkron események előfordulási frekvenciáit, az LFPg, soksejt aktivitás (multiple unit activity, MUA) és áramforrás sűrűség (current source density, CSD) amplitúdóit. További analízisekhez az események LFPg csúcspontját tekintettük nulla időpontnak. Wavelet analízist alkalmaztunk a magas frekvenciás oszcillációk (high frequency oscillation, HFO) teljesítményének és frekvenciáinak a megállapításához. Extracelluláris elvezetésekben sejtklaszterezési eljárással állapítottuk meg az egyes sejtek akciós potenciáljainak időpontját és vetettük össze a populációs eseményekkel. A klaszterezett sejteket az akciós potenciáljuk alakja és a tüzelési mintázatuk, autokorrelogramjuk alapján serkentő principális sejt (PC) és gátló interneuron (IN) kategóriákba soroltuk. Az intracelluláris elvezetésekben meghatároztuk a sejtek nyugalmi membránpotenciálját, input rezisztenciáját és az idő konstans értékét, valamint azt, hogy spontán módon tüzel-e nyugalmi membránpotenciálon, illetve képes-e spontán vagy kiváltott burst tüzelésre. Az egyidejűleg felvett extracelluláris elvezetésekben jelentkező populációs eseményekkel összevetettük az intracelluláris potenciálokat és esetleges tüzeléseket.

4 Eredmények

4.1 Rágcsálók hippocampusában megjelenő fiziológiás és epileptiform aktivitás

4.1.1 Fiziológiás éles hullám keletkezési mechanizmusai

Kísérleteinkben patkány hippocampus szeleteken vizsgáltuk a SPW-ek kialakulási mechanizmusait. Elvezetéseinkben kétféle SPW-et különböztettünk meg a CA3 régióban: az egyik típus (T1) esetén az LFPg-ben negatív, a másik típus (T2) esetén pozitív kitérést tapasztaltunk a CA3 régió piramissejt rétegében. A kétféle SPW hálózati paramétereiben is adódtak különbségek: a T1 előfordulási frekvenciája alacsonyabb, LFPg amplitúdója nagyobb, és a rátevődő ripple oszcilláció teljesítménye magasabb volt. A szeletek kb. 10%-ában a kétféle esemény együtt, de általában egymástól függetlenül jelent meg. Ezekben az esetekben a hálózati paraméterek közti különbségek még kifejezettebbek voltak, a soksejt aktivitás (multiple unit activity, MUA) is szignifikánsan nagyobb volt a T1 SPW-ek során, mint a T2 SPW alatt. A nagyobb LFPg amplitúdó és nagyobb sejtaktivitás (magasabb MUA érték) arra utal, hogy a T1 SPW-ek kialakításában több idegsejt vesz részt, mint a T2 SPW-eknél, míg a nagyobb ripple oszcilláció teljesítmény azt jelzi, hogy a T1 SPW események szinkronizáltabbak, mint a T2 SPW-ek. Az áramforrás sűrűség vizsgálat (current source density, CSD) mindkét típusú SPW esetén áramforrást mutatott a sejtrétegben, ugyanakkor az áramnyelők mintázata a T1 SPW során a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek aktivációs mintázatára emlékeztetett, a T2 SPW-é pedig a CA3 piramisok axonjainak serkentéséhez hasonló mintázatot mutatott. Kísérleteink azt mutatták, hogy sem a moharostok aktivitásának farmakológiai csökkentése, sem pedig a gyrus dentatus fizikai eltávolítása nem tüntette el a T1 SPW-eket. Ez arra utal, hogy a T1 SPW-ek megjelenéséhez nem elengedhetetlenül szükséges a gyrus dentatus felől jövő bemenet.

A piramistrétegben található áramforrásnak megfelelően a piramissejtek nagy része hiperpolarizáló választ mutatott a SPW-ek során. Ugyanakkor depolarizáló válaszokat adó sejteket is megfigyeltünk, melyek egy része tüzelt is a SPW-R események során. Az interneuronok kb. 80%-a megemelte a tüzelési frekvenciáját a SPW-ek során, a maradék 20% viselkedése nem mutatott összefüggést a SPW-ekkel. A gátló sejteket a SPW-ek során mutatott tüzelési mintázatuk alapján több kategóriába soroltuk. Az interneuronok kb. 3/4-ének maximális tüzelése megelőzte a SPW-ek csúcsát, ami azt sugallja, hogy fontos szerepük van e szinkron események beindításában. A GABAerg interneuronok tüzelési mintázata – a serkentő sejtekkel ellentétben – különböző volt a kétféle SPW esetén. Az interneuronok tüzelési mintázata összefüggést mutatott a sejtek lokalizációjával is. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a funkcionálisan különböző típusú interneuronok különbözőképp, differenciáltan vesznek részt a kétféle SPW kialakításában. Farmakológiai kísérletekkel igazoltuk, hogy a periszomatikus gátlósejtek részt vesznek mindkét típusú SPW létrehozásában.

Összegzésképpen elmondható, hogy a hippocampalis SPW-ek túlélő szeletekben is kialakulnak, nagyon hasonló tulajdonságokkal, mint az élő állatban. A CA3 régió egy dinamikusan változó komplex neuronális rendszer, amely in vitro körülmények között is többféle aktivitás kialakítására képes, akár egyidejűleg is. A kétféle, fiziológiás körülmények között spontán módon megjelenő SPW-ek generálásában mind a serkentő piramissejtek, mind az interneuronok részt vesznek. A gátló sejtek a SPW-ek beindításában jelentős részt vállalnak, közülük is a periszomatikus gátlósejtek szerepe a legjelentősebb. A kétféle szinkron aktivitás során a különböző interneuron típusok különbözőképp vesznek részt az események generálásában, és más piramissejt populációkat tudnak bevonni a szinkron

eseményekbe. Az interneuronok differenciált aktivitásával a CA3 régió neuronális hálózata többféle szinkron aktivitás létrehozására képes.

4.1.2 Epileptiform aktivitások keletkezése

4.1.2.1 Interiktális tüskék keletkezési mechanizmusai

A GABA_A receptor blokkoló bicuculline hozzáadásával rágcsálók (tengerimalacok) hippocampusából készített szeleteken interiktális tüskék jelennek meg, amelyek egyértelműen a CA3a régióban generálódnak, míg a szomszédos CA2 és CA3b régiók később vonódnak be a szinkron eseménybe. A piramis sejteknek mind az elektromos tulajdonságaiban, mind az anatómiájában és az összeköttetéseiben találtunk különbséget a vezető CA3a és a követő CA3b régiók között. Intracelluláris elvezetésekben a CA3a régióban nagyobb mértékű volt a spontán módon tüzelő neuronok aránya, mint a CA2 és CA3b régiókban. A CA3a piramis sejtek mindegyike képes volt burst tüzelés generálására, míg a CA2 és CA3b piramis sejtek csak kb. 3/4-e tüzelt burst-ökben. A CA3a sejteknek a CA3b és CA2 sejtekhez képest elágazóbb, hosszabb, és messzebbre nyúló dendritfájuk volt. Kimutattuk, hogy a CA3a piramis sejtek több beidegzést kapnak a Schaffer-kollaterálisoktól, mint a CA3b piramis sejtek. Az interiktális tüskék előtti és kezdeti szakaszában a piramis sejtek esetén háromféle tüzelési mintázatot tudtunk megkülönböztetni. Mindhárom sejtípus burst-ölő tüzelést mutatott a tüskék során, és gyakran kerültek depolarizációs blokk állapotba. Az „erős vezető sejtek” ezen kívül az interiktális tüskék előtti szakaszban is mutattak burst tüzelést, mind nyugalmi membránpotenciálon, mind hiperpolarizált állapotban. Ezzel szemben a „gyenge vezető sejtek” csak nyugalmi állapotban tüzeltek, míg hiperpolarizált állapotban nem. A „követő sejtek” a tüskéket megelőző szakaszban nem tüzeltek, csak az interiktális tüskék mezőpotenciál csúcsát követő szakaszban. Erős vezető sejteket csak a CA3a régióban találtunk, a CA3b régióban nem, amely alátámasztja a megfigyelést, hogy az interiktális tüskék ebben az alrégióban keletkeznek. Intracelluláris serkentéssel burst tüzelést váltottunk ki a CA3a és CA3b piramis sejtekből, és a másik alrégió válaszait vizsgáltuk extracelluláris elvezetésekben. Azt találtuk, hogy a CA3a piramis sejtek hatékonyabban képesek a többi sejt tüzelésének az emelésére, így feltételezhetjük, hogy a burst-ölő, erős vezető szerepű piramis sejteknek a jelenléte és aktivitása, valamint a CA3a régió magasabb serkentő bemenete hozzájárul ahhoz, hogy a CA3a régióban alakuljanak ki az interiktális tüskék, és onnan terjedjenek át más régiók felé.

E kutatásaink eredménye alapján elmondhatjuk tehát, hogy a hippocampus CA3 régiójában a sejtek elektrofiziológiai, anatómiai és összeköttetés-beli tulajdonságai hozzájárulnak ahhoz, hogy ennek a régióknak vezető szerepe legyen egy patológiás szinkronizációs folyamat generálásában. E folyamatban fontos szerepe van a burst-ölő piramis sejteknek, amelyeknek a megemelkedett serkentő bemeneti tulajdonságai az interiktális tüskék kezdeti szakaszában, a burst tüzelésű kimenete pedig a tüskék felépülési szakaszában bírnak nagy jelentőséggel.

4.1.2.2 Epilepsziás rohamok keletkezése

Az epilepsziás rohamok vizsgálatára az in vivo kainát modellt használtuk egerekben, és génexpressziós, elektrofiziológiai és anatómiai kísérleteket végeztünk. Genetikai profil vizsgálattal felderítettük azokat a sejtes folyamatokat, amelyek szerepet játszanak a status epilepticus és a visszatérő rohamok kialakításában. Detektáltuk 1526 transzkript expressziójának változásait az injektált, valamint a kontralaterális hippocampusból. Három időpontban vettünk mintát: 1) hat órával a beadás után, vagyis kb. a status epilepticus során, 2) két héttel a beadás után, a látens periódusban és 3) hat

hónappal a beadást követően, miután a visszatérő rohamok megjelentek. Az időben és térben hasonló változást mutató transzkripteket klaszterekbe rendeztük, és megvizsgáltuk, hogy milyen biológiai folyamatokhoz rendelhetők hozzá: immunválasz és gyulladás, sejtpusztulás, növekedési folyamatok, intracelluláris szignalizáció, nukleáris szignalizáció, metabolikus folyamatok, extracelluláris mátrix, csatornák és transzporterek és szinaptikus szignalizáció. Ezzel a módszerrel kimutattuk, hogy a status epilepticust követően a nukleáris szignalizációval, egy erős immunválasszal, sejtpusztulással és növekedési folyamatokkal kapcsolatos korai génaktiváció jelenik meg. Úgy tűnik, hogy a status epilepticus, mint epileptogén stimulus, jelentős változásokat idéz elő a gének regulációjában mindkét hippocampusban. A korai aktivációt egy hosszabb ideig fennálló, az extracelluláris mátrixot és az immunválasz elemeit kódoló gének aktivációja követi. A status epilepticus okozta korai génaktivációval szemben a sejtpusztulás és az azt követő gliaképződés és deafferentáció már inkább csak lokális, az injektált hippocampusra kiterjedő változásokat okoz a gének expressziójában. Az epilepsziára történő génaktivációs változásokról elmondhatjuk, hogy elsősorban a status epilepticushoz, valamint az utána következő látens szakaszhoz kötődik. Más biológiai folyamatok jellemzik a korai, illetve a látens szakaszt: a beadást követően főleg nukleáris szignalizáció és sejtpusztulás, míg a látens szakaszban inkább a gyulladásos köthető folyamatok zajlanak. A visszatérő rohamok során jelentős génaktiváció már nincsen, csak a beadás helyén látszódik néhány gén upregulációja.

Egészséges állatok hippocampusából készített szeletekbe lokálisan kainátot injektáltunk be, mellyel epilepsziás rohamokat idéztünk elő. Jelentős sejtüzelési hullámot láttunk a hippocampus minden régiójában, melyet egy mezőpotenciál oszcillációs aktivitás is kísért. A megnövekedett sejtüzelés minden esetben magától abbamaradt a beadás után pár perccel, és a kísérlet ideje alatt már nem is tért vissza. A rohamok a szeletek egyik végétől a másikig, egy irányban terjedtek. A terjedés sebessége jóval alacsonyabb volt, mint a nem mielinizált axonok vezetési sebessége, így arra a következtetésre jutottunk, hogy a rohamok terjedése valószínűleg a kainát szövetbeli diffúziójával függ össze, nem pedig a neuronális aktiváció szinaptikus továbbításával. Abban az esetben, amikor a hosszanti szeletekben blokkoltuk a gyors GABAerg neurotranszmisszót (bicuculline-nal), a kainát által kiváltott rohamok terjedési sebessége több nagyságrenddel magasabbnak bizonyult, vagyis a hippocampus serkentő kapcsolatai a gátlás hiányában jelentősen felerősítették a rohamterjedést. Ez arra utal, hogy az egészséges agyban levő gátló neuronális hálózat mégiscsak hatékonyan képes akadályozni a rohamok terjedését. Amikor azonban az sérül, a rohamok terjedése gyorsabbá válhat.

A piramissejtek intracelluláris vizsgálata azt mutatta, hogy a kainát a beadáshoz közeli piramissejteken egy hosszú, akár 200 Hz-es frekvenciájú sejtüzélést idézett elő, melyet követően a sejtek depolarizációs blokkba kerültek. A beadástól távol (legalább 2 mm-re) elhelyezkedő piramissejtek változatosabb viselkedést mutattak, mely során láttunk hiperpolarizációt, depolarizációs blokkot és repolarizációt is. A rohamok szinaptikus úton terjedő mechanizmusait úgy tártuk fel, hogy az élő állatok hippocampusába injektáltuk be a kainátot, majd a 2-2.5 óra elteltével készített szeleteket vizsgáltuk. Az ipsilaterális oldalon (ahol a diffúziós és a szinaptikus terjedés is szerepet játszik), a beadáshoz közeli szeletekben semennyi, vagy nagyon kicsi többsejt aktivitást láttunk. A távoli szeletekben azonban jelentős extracelluláris sejtüzelés volt megfigyelhető, melyet interiktális tüskékre emlékeztető populációs események kísérték. Az ellenoldali hippocampusból készített szeletekben (ahol csak a szinaptikus terjedés alakítja az epilepsziás aktivitást), szintén regisztráltunk interiktális-jellegű tüskéket a beadást követő 2-5 órában. A neuronális aktivitás hiánya a beadás körüli területeken mindkét modellben nagyon szembetűnő volt, és igazoltuk, hogy ott igen jelentős sejtpusztulás tapasztalható, míg a többi területeken nem láttunk pusztuló neuronokat. Az injektált hippocampusban minden gátlósejt

száma is jelentősen lecsökkent. Ahogy távolodtunk a beadási helytől, egyre kevésbé volt jelentős ez a csökkenés. Az ellenoldali hippocampusban pedig egyáltalán nem tapasztaltunk csökkenést az interneuronok számában a kontrollhoz képest. Megfigyeltük, hogy az azonos oldali, a beadástól távoli terület, ahol a cornu Ammonisban sejtpusztulás tapasztalható, ugyanolyan interiktális-jellegű aktivitás generálására képes, mint az ellenoldali hippocampus, ahol egyáltalán nem voltak pusztuló neuronok. Ez arra utal, hogy a morfológiailag különböző neuronális hálózatok ugyanolyan szinkron aktivitás létrehozására képesek, illetve, hogy a serkentő és gátló sejtek pusztulása nem alapfeltétele a rohamok generálásának.

4.1.3 Hippocampalis szinkron aktivitások anatómiai háttere rágcsálókban

Korábbi munkákkal megegyezően (58) kimutattuk, hogy az in vivo körülmények között töltött CA3 piramis sejtek axonjai a hosszanti tengely mentén a hippocampus kb. 2/3-ába vetítenek. A fő axon a sejttesthez közel több ágra ágazott, és minden axonág adott kollaterálisokat az azonos oldali CA3 és CA1 régiókba egyaránt. Az axonágak a sejttesttől több, mint 2 cm-re eljutottak, a teljes axonfa hossza meghaladta az 50 cm-t, az axon terminálisok száma pedig csaknem elérte a 40 000-et, amely potenciálisan majdnem ugyanennyi szinapszist is jelent. Az axon terminálisok eloszlása az axonágak mentén homogénnek mutatkozott, amely azzal együtt, hogy több axonág is vetít ugyanarra a területre, arra utal, hogy a CA3 piramis sejtek a közeli CA3 sejteket és a távolabbi CA1 neuronokat hasonló eséllyel idegzik be. Megvizsgáltuk a CA3 piramis sejtek gátló interneuronokra adott szinapszisainak az eloszlását is. A CA3 piramis sejtek a hippocampus minden régiójában szelektíven a sima dendritű sejtekre adtak szinapszisokat, míg a tüskés interneuronokon csak elvétve láttunk axon terminálisokat. Az interneuron célsejtekre adott szinapszisok jelentős többsége egyszeres szinapszis volt, bár többszörös szinapszisokat (akár hatszorost) is találtunk. Ezeknek az eredményeknek a jelentősége abban áll, hogy úgy tűnik, a CA3 piramis sejtek adott gátló interneuron csoportokat beidegeznek, míg másokat elkerülnek. A sima dendritű interneuronok között nagy valószínűséggel mindhárom funkcionális csoportba tartozó sejtek vannak, köztük a periszomatikus gátlósejtek is, amelyeknek fontos szerepét láttuk a SPW-ek kialakításában az elektrofiziológiai kísérleteinkben (lásd fentebb).

A CA3 régió speciális összeköttetési rendszere és kimeneti mintázata kiemelt szereppel bír a hippocampus információáramlási mechanizmusaiban. A hippocampus bemeneti régiója a gyrus dentatus, amelyben a szemcsesejtek közvetlen visszacsatolás nélküli, párhuzamos kapcsolatokkal érik el a CA3 régió piramis sejtjeit. Hasonlóképpen, a hippocampus kimenetét adó CA1 régióban szintén nagyon ritka a CA1 piramis sejtek közötti direkt, serkentő kapcsolat, a CA1 piramis sejtek axonjai szintén egy párhuzamos információtovábbítást valósítanak meg a subiculum felé. E két párhuzamos rendszer közé beékelve helyezkedik el a CA3 régió a maga sűrű rekurrens kollaterális hálózatával, és a serkentő sejtekre véletlenszerűen, a gátló sejtekre pedig szelektíven érkező szinaptikus kapcsolataival. Az ilyen struktúrájú számítási rendszerek alkalmasak a különböző mintázatok szétválasztására és integrálására, amely tulajdonságok nélkülözhetetlenek a memórianyomok eltárolásához és előhívásához. Így a hippocampus, és ezen belül is a CA3 régió eme sajátos összeköttetési rendszere lehet az anatómiai alapja a SPW-ek keletkezésének, amely hullámformák ilyen formán közvetíthetik a tanulási és memóriafeladatokhoz kapcsolódó információáramlást.

4.2 Az emberi hippocampusban megjelenő interiktális aktivitás

4.2.1 A subiculumban keletkező interiktális tüskék

In vitro körülmények között, fiziológiás oldatban a subiculumban interiktális tüske-jellegű események keletkeznek, melyek nagyon hasonlítanak az in vivo regisztrált epilepsziás tüskékhez. A sejtek nagy része (kb. 80%-a) hiperpolarizáló, kis része depolarizáló választ mutat az interiktális tüskék során. A piramis sejtek alapvető elektrofiziológiai paramétereit és morfológiáját hasonlítottuk össze a depolarizáló és a hiperpolarizáló választ adó sejtek esetén, de a GABA reverz potenciál különbözött. A KCC2 transzporter mRNS-ének in situ hibridizációs módszerrel történő vizsgálata kimutatta, hogy a subiculumban a piramis sejtek kb. 20-30%-a nem fejezi ki a KCC2 mRNS-t. Ezzel szemben a gyrus dentatus és a CA2 régió serkentő sejtjeinek kevesebb, mint 5%-ából hiányzott a KCC2 mRNS. További immunhisztokémiai vizsgálattal a subicularis piramis sejtek kb. 10%-ában nem tudtuk KCC2 fehérjét kimutatni, míg a gyrus dentatusban ez az érték kb. 3%, a CA2 régióban pedig kb. 6% volt. Kontrollnak egészséges makákó majom hippocampusában vizsgáltuk meg a KCC2 fehérje kifejeződését, és azt találtuk, hogy minimális (<2%) a KCC2-negatív sejtek aránya. Kimutattuk, hogy minden hiperpolarizáló választ adó sejt KCC2 pozitív volt, míg a depolarizáló választ adó sejtek nagyobb részében hiányzott a KCC2 fehérje. Ez arra utal, hogy a kloridion gradiens regulációja valóban kapcsolatban van a GABÁ-ra adott depolarizáló válasszal. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy az NKCC1 transzporter blokkolása eltolja az IPSP reverz potenciált a negatív irányba és visszaállítja a hiperpolarizáló választ, valamint reverzibilisen blokkolja az interiktális tüskék megjelenését. Összességében tehát elmondhatjuk, hogy a kation-klorid kotranszporterek (NKCC1 és KCC2) által felállított kloridion gradiens megváltozása okozhatja azt, hogy a GABA a szokásos hiperpolarizáció helyett depolarizáló választ vált ki bizonyos subicularis piramis sejtekben, amely összefüggésben lehet az interiktális tüskék kialakulásával.

4.2.2 A hippocampus CA2 régiójában megjelenő interiktális tüskék

A CA2 régióban is keletkeztek interiktális-jellegű tüskék mind sHS, mind mHS betegekben, in vitro körülmények között, fiziológiás oldatban, a subiculumtól függetlenül. A CA2 piramis sejt rétegben – a subicularis egyes típusú tüskékhez hasonlóan – egy CSD áramnyelő jelenlétét, valamint a soksejt aktivitás (MUA) emelkedését tapasztaltuk. Az intracelluláris elvezetésekkel kimutattuk, hogy a subiculummal ellentétben a CA2 régióban a piramis sejtek kb. 3/4-e depolarizáló választ mutat, sőt, gyakran tüzelnek is a populációs események során. Megvizsgáltuk a klorid gradiens kialakításáért felelős két transzporter jelenlétét. A depolarizáló sejtek ilyen aránya mellett azt várnánk, hogy a sejtek nagy részében hiányzik a KCC2, de ezzel szemben azt találtuk, hogy majdnem az összes CA2 piramis sejt KCC2+ volt, akárcsak a kontrollnak használt makákó majom esetében. Ugyanakkor jelentősebb számban találtunk minden epilepsziás mintában NKCC1-negatív sejteket, amely a majomnál elenyésző hányad volt. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a kloridion gradiens nem játszik fontos szerepet az interiktális tüskékre adott válaszok kialakításában. A depolarizáló választ adó sejtek nagy aránya arra is utalhat, hogy a serkentés-gátlás egyensúlya felborulhatott a CA2 régióban. A parvalbumin (PV)-pozitív sejtek száma nagyon lecsökkent az epilepsziás CA2 régióban a humán post mortem kontrollhoz képest. A sejtek eltűnése mellett ugyanakkor az axonok megőrződését tapasztaltuk, de a kontrollban látható homogén, sejttesteket behálózó festéssel szemben az epilepsziás szövetben csak egyes neuronok sejttestjét körülvevő kosárszerű axonokat láttunk, míg más sejtek körül nem. Elektron mikroszkópiával azonban azt találtuk, hogy a CA2 sejtek gátló bemenete nem változott jelentősen a kontrollhoz képest, viszont megjelent egy, a GD-ből érkező serkentő bemenet, amely kontrollban nem volt jelen. Tehát kimutattuk, hogy a CA2 piramis sejt sejttestjén a gátló bemenet nem csökkent, bár valószínűleg funkcionálisan

módosult azáltal, hogy a kosár- és csillársejtekből eltűnt a PV. Ezzel egyidejűleg a szemcsesejtek moharostjai sarjádzanak, benőnek a CA2 régióba, ahol a piramissejtekre adnak egy extra serkentő bemenetet. A serkentés-gátlás egyensúlyának illetően felborulása eredményezheti azt, hogy a CA2 régió képes interiktális-jellegű tüskéket generálni, és hogy a piramissejtek nagy része depolarizáló választ mutat ezen események során.

4.2.3 A humán hippocampusban megjelenő epilepsziás aktivitás anatómiai háttere

4.2.3.1 *Kloridion grádiens kialakításáért felelős transzporterek vizsgálata*

Western blot segítségével az mHS betegekben szignifikáns KCC2 fehérje tartalom növekedést mutattunk ki a humán hippocampusban, míg az sHS betegekben nem kaptunk szignifikáns különbséget, bár a minták több, mint felében itt is növekedést tapasztaltunk a kontrollhoz képest. Pilocarpine-os egér modellben külön vizsgáltuk a GD-t, a CA3 és CA1 régiókat, és mindhárom régióban növekedett a KCC2 fehérje mennyisége a kontrollhoz képest, bár a CA3 régióban ez nem volt szignifikáns. Immunfestéssel a humán kontroll hippocampusban egy gyenge, homogén háttérfestés jellemezte a serkentő sejteket, és sötétebbre festődő, jól elkülönülő, dendritek mutatták a gátló sejteket. Az epilepsziás humán mintákban a festés erősödését tapasztaltuk: a háttérfestés is erősebb lett, valamint több, erősebben jelölt interneuron dendritet láttunk, illetve megjelentek a kirajzolódó sejttestek is, melyek között mind principális sejteket, mind interneuronokat azonosítottunk. Egér modellben a humánhoz nagyon hasonló eredményeket kaptunk. Elektron mikroszkópos vizsgálatok azt mutatták, hogy a KCC2 transzporter mind a humán, mind az egér hippocampus serkentő sejtjeinek tüskéiben van leginkább jelen, valamint a gátlósejtek dendritjeiben. Az immunarany technikával jól kimutatható volt mind humánban, mind egérben a KCC2 jelölés intenzitásának emelkedése az epilepsziás szövetben: míg kontrollban egy-egy arany szemcsét láttunk a tüskékben és dendrit szegmensekben, addig epilepsziás szövetben az immunpozitív elemek (sejttestek, dendritek és tüskék) sok arany szemcsét tartalmaztak. Kimutattuk tehát, hogy a KCC2 fehérje mennyisége megemelkedik a humán epilepsziás hippocampusban a kontrollhoz képest. Ugyanakkor a megemelkedett KCC2-szint nem feltétlenül tükrözi a transzporter funkciók változását: az összességében megemelkedett fehérje mennyiség mellett egyes sejtekből szelektíven hiányozhat a KCC2 (mint pl. a subiculumban), amely következtében az adott sejtek aktivitása megváltozhat (depolarizáló választ adhat a GABÁ-ra), ez pedig hatással lehet a neuronpopuláció viselkedésére: interiktális jellegű tüskék alakulhatnak ki.

4.2.3.2 *Serkentő és gátló rendszerek változásainak vizsgálata*

A PV-pozitív sejtek száma az mHS betegekben kisebb mértékben, míg az sHS betegekben a túlélő régiókban is jelentősen lecsökkent a kontrollhoz képest. Az sHS betegcsoportban a GD-ban jellegzetes axonfelhők látszottak a megmaradó sejtek körül, míg a CA2 régióban inkább homogén axon eloszlást láttunk. A scleroticus CA1 régióban csak néhány dendrit, sejttest elvéve, axon pedig gyakorlatilag egyáltalán nem volt megfigyelhető. Várakozásainkkal ellentétben (mely szerint a kevesebb PV+ sejt kevesebb szinapszist ad), a GD-ban mind a sejttestekre, mind az axon iniciális szegmentumokra érkező gátló bemenet megnőtt az epilepsziás csoportokban. A CA1 és CA2 régiókban viszont a sejttestek és az axon iniciális szegmentumok gátló szinapszissal való borítottsága nem változott, csak a CA1 régióban csökkent a foltos sejtpusztulást mutató mintákban. Ugyanakkor, az sHS mintákban a GD-ban és a CA2 régióban a principális sejtek sejttestjén megjelent egy serkentő bemenet, amely kontrollban nem volt megfigyelhető. A GD-ban tehát a PV-tartalmú periszomatikus gátlósejtek megőrződnek epilepsziában,

de eltűnik belőlük a PV, az axonjaik sarjadzanak, és egy megnövekedett gátló bemenetet adnak a szemcsejtekre. A cornu Ammonisban a PV szintén eltűnik a sejtekből epilepszia során, de amíg a célsejtjeik, a piramissejtek jelen vannak, addig jelentős változásokat nem látunk azok periszomatikus régiójának gátló beidegzésében.

A kosársejtek másik nagy csoportjának, a CCK és CB1-tartalmú interneuronok megőrződését tapasztaltuk az epilepsziás hippocampusban, még a scleroticus CA1 régióban is látszottak sejttestek. Az axonhálózat megnövekedett a GD-ban, de a CB1+ szinapszisok célelemeinek eloszlása nem változott: nagyrészt dendritekre és sejttestre érkeztek a CB1+ kosársejtek szinapsziszai mind kontroll, mind epilepsziás szövetben. Mind a hilusban, mind a CA1 és CA3 régiókban azt tapasztaltuk, hogy a kontroll szövetben homogén eloszlású axonhálózat epilepsziában inhomogénné változik, egyes mohasejtek és piramissejtek körül nagyon sűrű CB1+ axonfelhő alakul ki. Összességében tehát a periszomatikus gátlósejtek megőrződését, valamint axonjainak túlélését és sarjadzását tapasztaltuk az epilepsziás humán hippocampusban. A PV+ sejtek működése valószínűleg sérül azáltal, hogy eltűnik belőlük a kalciumkötő fehérje PV. Az axonsarjadzásból fakadó túlzott periszomatikus gátlás lehet egy kompenzációs mechanizmus a megemelkedett serkentésre, de ugyanakkor növelheti a hippocampalis principális sejtek szinkronitását is.

4.3 Az emberi nagyagykéregben megjelenő fiziológiás és epileptiform aktivitás

4.3.1 Fiziológiás szinkron populációs aktivitás és spontán interiktális tüske

Az epilepsziás pácienseket három csoportra osztottuk: 1) terápiarezisztens epilepsziában szenvedő páciensek (ResEpi), 2) antiepileptikumokkal rohammentesen tartható páciensek (kezelhető epilepszia, treatable epilepsy, TreatEpi), és 3) olyan betegek, akiknek csak alkalmi, esetleg provokált rohamuk volt, és nem kaptak antiepileptikumot (no medication, NoMed). A negyedik, epilepszia szempontból kontrollnak tekinthető csoportba soroltuk azokat a tumoros pácienseket, akiknek nem volt rohama (no epilepsy, NoEpi).

Fiziológiás oldatban spontán megjelenő szinkron populációs aktivitást (synchronous population activity, SPA) figyeltünk meg mind a négy vizsgált betegcsoportból származó szeletekben. Ezek a jelenségek egy mezőpotenciál tranziensből álltak, melyhez egy magas frekvenciás oszcilláció és megemelkedett tüzelés csatlakozott. A ResEpi és TreatEpi betegcsoportokban ezen felül spontán interiktális-jellegű tüskék (interictal-like discharges, IID) is megjelentek. Epilepsziás betegekben több szeletben fordult elő SPA (46.8±28.9%), mint nem epilepsziásokban (29.7±26.3%). Bizonyos esetekben ugyanabban a szeletben több SPA-t, illetve egyes ResEpi szeletekben SPA+IID aktivitást is láttunk. A ResEpi csoportban jóval többször láttunk többszörös SPA-t, mint a NoEpi csoportban. Az SPA-k előfordulási frekvenciája szignifikánsan magasabb volt, mint az IID-ké, az LFP, MUA és CSD amplitúdók pedig az IID-k esetén voltak szignifikánsan magasabbak. A ResEpi SPA-k LFP és CSD amplitúdói magasabbak voltak, mint a NoEpi SPA-ké. Megvizsgáltuk a HFO-k előfordulását is a szinkron események során, és mind a ripple, mind a fast ripple sávban láttunk teljesítménynövekedést. A ResEpi és NoEpi SPA-k között nem volt jelentős különbség, míg a ResEpi IID-k során szignifikánsan magasabb volt mindkét HFO típus teljesítménye az SPA-kénál.

Két-foton mikroszkópiával kimutattuk, hogy nem epilepsziás mintákban a sejtek kb. kétharmada (68%) egyáltalán nem vett részt az SPA-k kialakításában, míg epilepsziás esetekben ez az arány csak 35% volt. NoEpi mintákban a sejtek kb. egyenlő arányban válaszolnak az SPA-kra depolarizáló,

hiperpolarizáló, illetve hiper- majd depolarizáló bifázisos válasszal, addig az epilepsziás esetekben a sejtek kb. 90%-a depolarizálódik az SPA-k során. Az intracellulárisan elvezetett sejtek szignifikánsan többet tüzeltek az SPA-k alatt ResEpi, mint NoEpi mintákban. Mind epilepsziás, mind nem epilepsziás szövetben nem szignifikánsan, de több neuron található azokban a régiókban, amelyekben SPA keletkezik, mint ahol nem. A sejtszámokban, illetve a szinapszisok sűrűségében a ResEpi és NoEpi minták között nem láttunk különbséget. Ugyanakkor az kimutatható volt, hogy az epilepsziás neocortexben nagyobb volt a serkentő szinapszisok sűrűsége, mint nem epilepsziásban, míg a gátlóké ugyanannyi.

Összesítve tehát kétféle spontán szinkron aktivitás keletkezik a humán neocortexben: SPA és IID. Az SPA, mivel nem epilepsziás betegekben is előfordul, valószínűleg nem köthető össze epilepsziás folyamatokkal. IID-eket csak epilepsziás betegekben láttunk, megjelenésük és tulajdonságaik alapján ezek valószínűleg patológiás folyamatok. Jól tetten érhető az epilepsziás mintákban a jellegzetes hiperexcitabilitás: több sejt vesz részt az SPA-k generálásában, több transzmembrán áram keletkezik, de az intracellulárisan mért depolarizáló válaszok aránya és tüzelése, valamint a serkentő szinapszisok magasabb denzitása is arra utal, hogy a ResEpi minták serkenthetőbbek, mint a NoEpi minták. Az IID-k az SPA-khoz képest magasabb excitabilitású és szinkronitású folyamatok, ezt jelzik a nagy LFP, CSD és MUA amplitúdó, és a kiugróan magas HFO teljesítmény.

Emberi neuronokban először tudtuk korrelálni a szomatikus és dendritikus Ca^{2+} -jeleket a sejttesten mért akciós potenciálokkal. Ugyanúgy, ahogy rágcsálók sejtjeiben, a Ca^{2+} -válasz jóval elnyújtottabb volt, mint az elektromos akciós potenciál, és a Ca^{2+} jel amplitúdója mind a sejttesten, mind a dendriten összefüggést mutatott az akciós potenciálok számával. Ugyanakkor a töltött sejtek rekonstrukciója azt mutatta, hogy az emberi neocorticalis piramissejtek dendritfája jóval nagyobb (akár háromszor akkora), és jóval komplexebb, mint a rágcsálóké (59). Ennek nagy jelentősége lehet a corticalis jelfeldolgozási folyamatokban, lévén, hogy a hosszabb és komplexebb dendritfára sokkal több szinapszis érkezhetsen, így a sejtek összeköttetései is jóval komplexebbek lehetnek. Ez a komplexitás hozzájárul ahhoz, hogy az emberi neuronális hálózatok kódolási és jelfeldolgozási kapacitásai magasabbak, mint a modell állatokéi (60).

A mi kísérleteinkben látott SPA-k nagyon hasonlítanak a más csoportok által a hippocampusban (33, 61) és a neocortexben (62-64) leírt szinkron aktivitásokra. Akárcsak ezek a kutatócsoportok, a hippocampust érintő munkáinkban mi magunk is interiktális tüskékkel azonosítottuk ezeket az eseményeket, mert csak epilepsziás páciensekből származó mintákból származtak a felvételek. A neocortexet bevonó kísérleteinkben azonban nem epilepsziás betegek neocortexében is láttunk ugyanolyan SPA eseményeket, mint az epilepsziásokéban. Ez felveti a kérdést, hogy mennyire köthető össze az SPA az epilepsziás aktivitással. Vannak más kutatócsoportok is, akiknek a humán intracelluláris adatai felvetik a lehetőségét annak, hogy ezek nem epileptiform események (37, 65, 66). A mi eredményeink mindenképpen azt a feltevést támasztják alá, hogy ezek a szinkron események nem köthetők össze az epilepsziás aktivitással, ezért is adtuk neki a semleges „szinkron populációs aktivitás” nevet.

4.3.2 Epileptiform aktivitások keletkezési mechanizmusai

GABA_A receptor antagonistá bicuculline (BIC) hozzáadásával indukáltuk interiktális tüskék és rohamok kialakulását az epilepsziás és nem epilepsziás (tumoros) betegekben származó neocorticalis szeletekben. BIC-indukált interiktális tüskék (interictal-like spikes, IIS) jelentkeztek mind a négy betegcsoportban, míg rohamokat csak a ResEpi és a NoEpi csoportban figyeltünk meg. Azért, hogy ne

keverjük össze a spontán megjelenő interiktális-jellegű tuskéket (IID, ld. fentebb) a diszinhíbiós modellben indukált tuskékkal (IIS), különböző névvel jelöltük azokat. Az interiktális tuskék nagy része a teljes neocortexet átérte, de láttunk kevesebb rétegre kiterjedő tuskéket is. Megkülönböztettünk időben és térben egyszerű és összetett eseményeket. Nem epilepsziás (NoEpi) mintákban csak teljes neocortexet átérő, térben és időben egyszerű IIS-ek fordultak elő, míg epilepsziás mintákban, főleg a ResEpi páciensekből származó szövetekben kisebb területre kiterjedő, térben és időben egyszerű, komplex IIS-ek, illetve ezek különböző variációi is kialakultak.

Az epilepsziás mintákban gyakrabban fordultak elő rohamok, mint nem epilepsziás mintákban. A ResEpi szeletekben leginkább visszatérő rohamokat láttunk, míg NoEpi mintákban csak egyszeres rohamok fordultak elő. A rohamok mindegyike időben komplex, nagy többségük pedig térben is komplex volt. Az IIS-ek az SPA-khoz képest szignifikánsan, kb. egy-két nagyságrenddel ritkábban jelentkeztek, a rohamok pedig még ennél is egy nagyságrenddel ritkábban. A ResEpi és NoEpi csoportok között e tekintetben nem láttunk különbséget. Nem csak az események előfordulási frekvenciájában, hanem azok hosszában, az LFP és MUA amplitúdóban, valamint a HFO-k teljesítményében is szignifikánsak voltak a különbségek az SPA-k, IIS-ek és rohamok között. Ezekben a jellemzőkben mind SPA<IIS<roham tendenciát láttunk. Megfigyeltük, hogy míg az SPA-k és a spontán IID-k egyszerre jelentkeznek a neocortex különböző rétegeiben, addig a BIC-indukálta IIS-ek egy adott rétegben keletkeznek, és onnan terjednek a neocortex többi rétegébe.

A különböző állapotmodellek eredményei mind arra utalnak, hogy a burst-ölő piramissejteknek fontos szerepe van az interiktális tuskék iniciálásában (összefoglalásként lásd (16)). Ugyanakkor humán in vitro adatok azt jelzik, hogy az interneuronok tüzelése indítja be a folyamatot, amelyet aztán követ a piramissejtek aktivitás-emelkedése (64). Fiziológias oldatban 193 (ResEpi) és 182 (NoEpi) sejtet klasztereztünk, BIC oldatban pedig 191 (ResEpi) és 167 (NoEpi) neuront különítettünk el, melyeket principális sejtek (PC), azok között is szabályosan tüzelő (regular spiking, RS-PC) és burst-ölő (intrinsically bursting, IB-PC) sejtek, valamint interneuronok (IN) és nem klasszifikált (unclassified, UC) neuronok csoportokra osztottunk. Eredményeink azt mutatják, hogy az SPA-k kezdeti szakaszában a sejtek kb. 50-65%-a emeli meg a tüzelési frekvenciáját, míg az IIS-ek során ez az arány 90-100%, a rohamokban pedig 100% volt. Összességében az SPA-k során minden sejtípus egyaránt részt vesz a populációs aktivitás kialakításában, bár legfőbb szerepe a PC-eknek van, lévén, hogy arányaiban a legtöbb akciós potenciál e sejtektől érkezik. Ezzel szemben, az IIS-ek és a rohamok kezdeti szakaszában ugyan (szinte) minden sejt megnöveli az aktivitását, de általában az IN-ok tüzelnek előbb, és arányaiban lényegesen többet, mint a többi sejtípus. Megvizsgáltuk külön a burst-ölő piramissejteket (IB-PC) abból a tekintetből, hogy hogyan vesznek részt az SPA-k, a spontán IID-k és az indukált IIS-ek kialakításában. Eredményeink azt mutatják, hogy az SPA-k során a serkentő és gátló sejtek egy kiegyensúlyozott tüzelési mintázatot mutatnak az események elején, csúcán, végén, ezzel egyidejűleg az RS-PC-ek és IN-ok kiugró aktivitása jelentkezik az SPA-k csúcán. Ezzel szemben a spontán IID-k esetén az IB-PC-ek kiemelkedő tüzelése látszik az események elején, az események végén pedig az IN-ok mutatnak magasabb aktivitást. A BIC-indukálta epilepsziás események kezdetén pedig az IN-ok igen erős tüzelését tapasztaltuk, az IB-PC-ek pedig minden esetben később kezdtek tüzelni, mint a felvételen látható többi sejt.

Összességében tehát elmondhatjuk, hogy a GABAerg gátlás csökkentésével indukálni tudtunk epilepsziás eseményeket. Korábbi publikációkban a BIC mellett elektromos ingerlést is alkalmazni kellett, hogy interiktális tuskéket tudjanak kiváltani humán neocorticalis szeletekben (67), míg a mi mintáinkban mind az IIS-ek, mind a rohamok spontán módon jelentkeztek. Az epilepsziás szövetre jellemző hiperexcitabilitást itt is ki lehetett mutatni. A néhány rétegre kiterjedő, valamint a térben és

időben komplex interiktális tüskék jelenléte pedig arra utal, hogy az epilepsziás neocortexben léteznek kisebb gócpontok, amelyek létre tudnak hozni epilepsziás aktivitást. Kimutattuk, hogy az SPA-khoz képest az IIS-ek és a rohamok olyan események, amelyeket egyre nagyobb excitabilitás és szinkronitás jellemez. A három különböző populációs aktivitás (SPA, IID és BIC-indukálta epilepsziás események) különböző mechanizmussal keletkeznek humán neocorticalis szeletekben. Eredményeink részben alátámasztják az állatmodellekből kapott adatokat, részben pedig nem, és újabb kérdéseket vetnek fel. Az első cikk, amely bizonyította, hogy a burst-ölő V. rétegi piramis sejtek indítják az interiktális tüskéket (22), rágcsálók neocorticalis szeletein a diszinhibíciós (BIC) modellt használta. Ezzel szemben a humán neocorticalis szeleteken alkalmazott diszinhibíciós (szintén BIC) modellünkben a gátló interneuronok jelentős tüzelése indítja az IIS-eket. További különbség, hogy a spontán megjelenő IID-eket viszont az IB-PC-ek indítják a humán neocorticalis szeletekben. Ezek az eredmények rámutatnak az állatok és az ember közti különbségekre, illetve arra a kérdéskörre is, hogy a (farmakológiai) modellekből mennyire általánosíthatunk a vizsgált emberi betegségekre.

5 Következtetések

5.1 A hippocampus és a neocortex közti különbségek in vitro preparátumokban

A nyilvánvaló anatómiai különbségeken kívül elektrofiziológiai szempontból is jelentős különbségeket tapasztalhatunk, ha e két területet vizsgáljuk. A rágcsálók hippocampalis szeleteiben in vitro fiziológiás körülmények között spontán szinkron események keletkeznek, melyeket a tanulási és memóriafolyamatok szempontjából fontos élettani jelenséggel, a sharp-wave ripple komplexekkel (SPW) azonosítottak. Élő állatban csak a hippocampusra jellemző a SPW aktivitás, az eddig vizsgált neocorticalis területeken nem sikerült SPW-eket kimutatni (összefoglalásként lásd (8)). In vitro körülmények között is hasonló a helyzet: míg hippocampalis szeletekben több állatfajban detektáltak SPW aktivitást fiziológiás oldatban, addig a neocortexben nem azonosítottak SPW-jellegű eseményeket egyik vizsgált állatfaj (8, 22, 37, 68, 69) szeleteiben sem. Valószínűleg a hippocampus speciális sejtes és összeköttetési rendszere szolgáltat egy olyan anatómiai alapot, mely lehetővé teszi, hogy még egy olyan korlátozott rendszerben, mint egy kb. fél mm-es agyszelet is kialakulhassanak szinkron események.

5.2 Ember és állat közti különbségek

Ugyan a kutatáshoz használt állatokból meglehetősen jól lehet extrapolálni az emberi betegségekre, kutatásaink során több olyan jelenséggel is találkoztunk, amely felhívja a figyelmet az ember és a modellként használt állatok közti különbségekre. Az állatok hippocampusából készített szeletekben keletkező SPW-szerű események állatfajtól és hippocampalis alrégiótól függetlenül egy mezőpotenciál tranziensből állnak, melyre rátevődik egy magas – általában ripple – frekvenciájú oszcilláció, és egy megemelkedett sejtüzelés. Ehhez a mintázathoz rendkívüli módon hasonlít az a szinkron populációs aktivitás, amelyet epilepsziás páciensek hippocampalis (33, 36, 61), valamint nagyagykérgi szeleteiben (62, 64, 70, 71) lehet regisztrálni in vitro körülmények között, szintén fiziológiás oldatban. Bár két kutatócsoportban is felvetődött a kérdés, hogy ezek az események mennyire köthetők össze a páciensek epilepsziás megbetegedésével (62, 72), elég hamar (33) elfogadottá vált, hogy az epilepsziás páciensek agyszeleteiben megjelenő populációs események interiktális tüskéknek feleltethetők meg. Mindenképp lényeges megjegyezni, hogy míg állatok neocortexében nem sikerült ezeket a jellegzetes in vitro populációs eseményeket megfigyelni, még főemlősökben sem (37), addig emberben mind epilepsziás (62, 70, 71), mind nem epilepsziás (tumoros) betegek (53-55, 65, 66, 73) nagyagykérgi szövetszeletein spontán megjelenik fiziológiás oldatban. Úgy tűnik tehát, hogy a neocortexben megjelenő spontán populációs aktivitás (SPA) egy humán-specifikus jelenség, és mivel nem epilepsziás betegek neocortexében is kimutatható, igen valószínű, hogy nem epileptiform esemény. Epilepsziás páciensek neocorticalis szeleteiben az SPA-k mellett spontán módon interiktális tüskék is megjelennek (IID). Erre vonatkozólag sem találtam adatot, hogy ex vivo állatmodellekben spontán keletkeznének interiktális-jellegű tüskék (74). E jelenségeken túl több anatómiai és elektrofiziológiai eredmény is alátámasztja a feltevést, hogy az emberi nagyagykéreg jelentősen különbözik az állatok nagyagykérgétől. Nemrég írták le a humán-specifikus „rosehip” avagy „csipkebogyó” sejtípust (75), valamint az emberi neocortexre jellemző, speciális sejtes összeköttetéseken alapuló komplex, poliszinaptikus eseményeket (65). Azt is kimutatták, hogy az emberi neocorticalis neuronok egyedülálló strukturális és funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek. A dendritfájuk jóval hosszabb és komplexebb az állatokéinál (saját adat és (76)), amely sajátos elektromos tulajdonságokat és egy gyorsabb jelfeldolgozást eredményez (77). Mindez megfelelő anatómiai alapot szolgáltat ahhoz, hogy az emberi neocortex kisebb egységei is képesek legyenek különböző populációs aktivitásokat és oszcillációkat generálni. Ezek a humán-

specifikus tulajdonságok, vagyis a több idegsejt, azok megemelkedett jelfeldolgozási képessége, a komplexebb szinaptikus összeköttetési mintázat, és az ennek következtében kialakuló sokrétű és komplex oszcillációs aktivitás elősegíthette az ember kognitív képességeinek a fejlődését. Ennek következtében (is) juthatott oda a Homo sapiens az evolúció során, ahol most van.

5.3 Az epilepsziamodellek és az emberi betegség közti különbségek

Régóta használunk modelleket az emberi folyamatok és betegségek mechanizmusainak megértésére. Természetesen ez az epilepsziakutatásban sincs másképp. A humán kutatások nagy hátulütője a megfelelő kontroll hiánya, de legalábbis korlátozott volta, így még inkább érthető a modellek használata. Munkánk során szembesültünk azzal, hogy az emberi betegség egyes aspektusai/mechanizmusai mennyire mások lehetnek, mint a modellek. Állatmodellekből származó adatokon alapul az a mára általánosan elfogadott tény, hogy a burst-ölő piramissejteknek fontos szerepe van az interiktális tuskék generálásában. Először egy akut diszinhíbiós modellben, tengerimalac neocorticalis szeleteiben mutatták ki ezt a jelenséget (22), de később más corticalis területeken és több különböző modellben is igazolták (45, 78-80). A kísérleteinkben kétféle (spontán, és diszinhíbió-indukálta) in vitro modellben vizsgáltuk a serkentő és gátló sejtek szerepét az interiktális tuskék kialakításában. Már ebben is láttunk különbséget: míg a spontán megjelenő tuskéket valóban a burst-ölő piramissejtek tüzelése indítja, addig a diszinhíbiós modellben a gátló interneuronok nagyarányú tüzelését láttuk a tuskék kezdeti szakaszában, és a burst-ölő piramissejtek minden esetben csak követték a más sejtek tüzelését (55). Ugyanaz a humán szelet modell, mégis, spontán módon egészen más mechanizmussal indul az interiktális tuska, mint a diszinhíbiós modellben, ahol a gátlást mesterségesen lecsökkentettük. Ezen kívül az is megjegyzendő, hogy míg a tengerimalac neocortexben a GABAa receptor antagonistá BIC a burst-ölő sejtek tüzelésén keresztül indította be az interiktális tuskéket (22), addig humán neocorticalis szeletben (mind epilepsziás, mind nem epilepsziás betegekben) a BIC hatására kialakuló interiktális tuskék a gátló sejtek tüzelésével kezdődnek (55). Ezek az eredmények felvetik egyrészt azt a kérdést, hogy egy akut in vitro epilepszia modell mennyire tekinthető a valódi epilepsziás folyamatok hasonmásának. Ha ugyanis az epilepsziás aktivitást mesterségesen hoztuk létre egy in vitro rendszerben, az szükségképpen különbözik a valódi epilepsziás állapotoktól, főleg azokban az esetekben, ahol egészséges agyból származó szeleteken idézzük elő az epilepsziás aktivitást. Másrészt újra előhozza azt a kérdést, hogy a rágcsálók vizsgálatán alapuló adatokból mennyire pontosan extrapolálhatunk az emberi folyamatokra. Eredményeink rávilágítanak arra a nagyon fontos tényre, hogy az emberi nagyagykéreg sok szempontból különbözik az állatokétól. A humán szövet vizsgálata tehát mindenképp szükséges, nem elég (állat)modellekre támaszkodva megpróbálni megérteni az emberi folyamatok és betegségek mechanizmusait.

A tudományos szemlélet szempontjából a legkorrektebb persze az lenne, ha a humán folyamatokra és betegségekre vonatkozó feltevéseket in vivo körülmények között lehetne tesztelni egészséges és beteg emberekben. Ez érthető etikai okok miatt nem lehetséges, így azon túl, hogy bizonyos kérdéseket valóban meg tudunk válaszolni humán in vivo kísérletekkel, mégiscsak a modellekre vagyunk kénytelenek hagyatkozni. A levonható következtetésekhez azonban észben kell tartanunk a modelljeink korlátait, az állatok és az ember közti különbségeket, a mesterségesen kiváltott és a természetben bekövetkező betegségek mechanizmusainak esetleges különbözőségét, valamint a vizsgálati körülményekből adódó eltéréseket. Körültekintő kísérlettervezéssel és következtetésekkel mégis közelebb juthatunk az emberi agy működési mechanizmusainak és azok patológiás változásainak a megértéséhez, így közvetve azok gyógyításához is.

6 Összefoglalás

Az epilepsziás agykéregben paroxysmalis aktivitás, vagyis rohamok és interiktális tüskék keletkeznek, amelyek az idegsejtek nagy csoportjának egyszerre történő, túlzottan szinkron tüzelése eredményez. Az állatmodellek jelentősen hozzájárultak ahhoz, amit tudunk a fiziológiás és epilepsziás agykérgi szinkronizációról, illetve az anatómiai és molekuláris változásokról. Ugyanakkor az emberi agyra és betegségre vonatkozó ismereteink hiányosak, pedig a terápiás lehetőségek fejlesztéséhez elengedhetetlen az ezek vizsgálata, illetve az állatmodellektől való eltérések feltárása. Az epilepsziás események kialakulási mechanizmusainak megértése, és a fiziológiás szinkron aktivitásoktól való elkülönítése elősegítheti új terápiás beavatkozási pontok kijelölését.

Munkám során állatmodellekben vizsgáltuk a hippocampusban in vitro körülmények között megjelenő fiziológiás SPW-ek, az interiktális tüskék, és a rohamok kialakulási mechanizmusait, valamint azok anatómiai hátterét. Megvizsgáltuk a temporális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő páciensek hippocampusában keletkező interiktális tüskék keletkezési mechanizmusait is, és a hozzá kapcsolódó anatómiai változásokat. Kialakítottunk egy in vitro humán nagyagykérgi modellt, amellyel a fiziológiás spontán populációs aktivitást (SPA), a spontán keletkező és kiváltott epilepsziás aktivitások kialakulását vizsgáltuk epilepsziás és nem epilepsziás (tumoros) páciensek neocorticalis mintáiban.

Eredményeink azt mutatják, hogy az állatmodellekben megjelenő fiziológiás SPW kialakulása során elengedhetetlen mind a serkentő, mind a gátló sejtek aktivitása, de az eseményeket a gátló, azon belül is a periszomatikus interneuronok vezérik. Ezzel szemben, az epilepsziás interiktális tüskéket a hippocampus CA3a régiójának serkentő piramissejtjei kezdi, és speciális burst-ölő tulajdonságuk, és sűrűbb összeköttetések révén vonják be a környező sejteket és a többi hippocampalis régió neuronjait. Egészséges állatokban kimutattuk, hogy míg a CA3 piramissejtek a hippocampus serkentő sejtjein homogén eloszlással végződnek, addig a sima dendritű gátló interneuronokat szelektíven idegzik be, a tüskés gátlósejteket pedig elkerülik. Ez a CA3 régió piramissejtjei által közvetített, speciális kapcsolatrendszer lehet az anatómiai alapja a hippocampalis szinkronizációknak. Az epilepsziás állatokban egy speciális sejtpusztulási mintázatot láttunk, amely érintette mind a serkentő, mind a gátlósejteket. Ugyanakkor, a szelektív interneuron pusztulást mutató hippocampalis területek ugyanúgy képesek voltak interiktális aktivitás generálására, mint a sejtpusztulást egyáltalán nem mutató területek, ami arra utal, hogy a sejtpusztulás nem feltétele az epilepsziás aktivitás kialakulásának.

Temporális lebeny eredetű epilepsziás páciensekben, a hippocampus kimenetét adó régióban, a subiculumban elkülönítettünk kétféle interiktális tüskét, valamint kimutattuk, hogy jelentős funkcionális kapcsoltság van a subiculum egymástól távol eső részei között, és a subiculumban keletkező epilepsziás aktivitás kijut a temporális neocortexbe. Az in vitro körülmények között spontán megjelenő tüskék során a subiculumban bizonyos piramissejtek serkentő választ adnak, míg a többség gátlódik. Eredményeink arra utalnak, hogy a kloridion gradiens fenntartásáért felelős KCC2 transzporter egyes sejtekben hiányzik, ennek következtében a klorid háztartás felborul, így ez – a gátló neurotranszmitter GABÁ-ra adott serkentő válaszon keresztül – elősegítheti az interiktális tüskék kialakulását. Ezzel szemben a hippocampus CA2 régiójában a sejtek nagy része serkentő választ mutat a tüskék során. Ebben a régióban inkább a periszomatikus gátlás funkcionális változása és a gyrus dentatus felőli érkező serkentő pálya megjelenése állhat a jelenség hátterében. A periszomatikus gátlás – a várakozásokkal ellentétben – nem csökken a humán epilepsziás hippocampusban. A parvalbumin-tartalmú kosár- és axo-axonikus sejtek számának csökkenését találtuk, az elektronmikroszkópos vizsgálatok azonban kimutatták, hogy a periszomatikus sejtek axonjai megőrződnek, vagy sarjadzanak. A másik, a

cholecystokinin-tartalmú kosársejt típus megerősödését tapasztaltuk a humán epilepsziás hippocampusban.

Humán neocorticalis szeletekben fiziológiásnak tekinthető SPA keletkezik mind epilepsziás, mind nem epilepsziás (tumoros) betegekből származó mintákban. Az epilepsziás szövetben ezen felül interiktális tüskék is keletkeztek, melyekről kimutattuk, hogy a szinkronizáltsági és serkenthetőségi fokuk lényegesen magasabb, mint az SPA-ké. A diszinhibícióval kiváltott interiktális tüskék és rohamok elemzése arra mutatott rá, hogy epilepsziás szövetben gyakrabban keletkeznek epilepsziás események, és azok megjelenése változatosabb, mint nem tumoros szövetben. Az epilepsziás betegekből származó szeletekben kisebb neuroncsoportok is képesek voltak interiktális tüskéket generálni. Az SPA során a sejtek kb. fele vesz részt az eseményekben, és átlagosan a serkentő sejtek tüzelése kifejezettebb. A szabályosan tüzelő piramis sejtek és a gátló interneuronok tüzelése kiemelkedő az események csúcán. A spontán megjelenő interiktális tüskékben valamivel több sejt vesz részt, mint az SPA-kban, és egyértelműen a burst-ölő piramis sejtek tüzelése indítja az eseményeket. Ezzel szemben a diszinhibíció által kiváltott epilepsziás eseményekben gyakorlatilag az összes sejt megnöveli a tüzelési aktivitását, és a gátló interneuronok egyértelműen előbb kezdenek tüzelni, mint a serkentő sejtek, különös tekintettel burst-ölő piramis sejtekre.

Munkánk során tehát feltártuk a fiziológiás és epilepsziás szinkron események sejtes és hálózati tulajdonságait, mind állatmodellben, mind az emberi hippocampusban és a neocortexben. Kimutattuk, hogy az epilepsziás események nagyobb excitabilitású és szinkronitású folyamatok, mint a fiziológiás aktivitások, és más sejt csoportok, más mechanizmussal indítják be a szinkron eseményeket. Eredményeink arra is rávilágítanak, hogy jelentős különbségek lehetnek az állatok és az ember agyi mechanizmusai között, de még a humán szövetet használó in vitro modellekből sem feltétlenül lehet pontos következtetéseket levonni és az emberi betegségre vonatkozóan. Az emberi agy és az emberi betegségek körültekintő vizsgálata tehát nélkülözhetetlen, ha új, hatékony terápiákat szeretnénk kifejleszteni a jövőben.

7 Irodalom

1. R. S. Fisher *et al.*, Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* **46**, 470-472 (2005).
2. R. S. Fisher *et al.*, Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* **58**, 522-530 (2017).
3. M. de Curtis, G. Avanzini, Interictal spikes in focal epileptogenesis. *Prog Neurobiol* **63**, 541-567 (2001).
4. V. Menghi, F. Bisulli, P. Tinuper, L. Nobili, Sleep-related hypermotor epilepsy: prevalence, impact and management strategies. *Nat Sci Sleep* **10**, 317-326 (2018).
5. M. S. van Breemen, E. B. Wilms, C. J. Vecht, Epilepsy in patients with brain tumours: epidemiology, mechanisms, and management. *Lancet Neurol* **6**, 421-430 (2007).
6. J. Szentágothai, M. Réthelyi, *Funkcionális anatómia I-II-III.*, (Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2003).
7. R. Lorente de No, Studies on the structure of the cerebral cortex - II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* **46**, 113-177 (1934).
8. G. Buzsáki, Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus* **25**, 1073-1188 (2015).
9. R. Miles, K. Tóth, A. I. Gulyás, N. Hájos, T. F. Freund, Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* **16**, 815-823. (1996).
10. T. F. Freund, G. Buzsáki, Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* **6**, 347-470 (1996).
11. Z. Maglóczky, Sprouting in human temporal lobe epilepsy: excitatory pathways and axons of interneurons. *Epilepsy Res* **89**, 52-59 (2010).
12. Z. Maglóczky, T. F. Freund, Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. *Trends Neurosci* **28**, 334-340 (2005).
13. I. Blumcke *et al.*, The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia* **52**, 158-174 (2011).
14. P. B. Crino, Focal Cortical Dysplasia. *Semin Neurol* **35**, 201-208 (2015).
15. C. Rubio, M. Rubio-Osornio, S. Retana-Marquez, M. L. Veronica Custodio, C. Paz, In vivo experimental models of epilepsy. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* **10**, 298-309 (2010).
16. D. A. McCormick, D. Contreras, On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annu Rev Physiol* **63**, 815-846 (2001).
17. G. Buzsáki, Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain Res* **398**, 242-252. (1986).
18. A. Ylinen *et al.*, Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J Neurosci* **15**, 30-46 (1995).
19. G. Buzsáki, *Rhythms of the brain.* (Oxford University Press, New York, NY, USA, 2006).
20. M. Levesque, P. Salami, Z. Shiri, M. Avoli, Interictal oscillations and focal epileptic disorders. *Eur J Neurosci* **48**, 2915-2927 (2018).
21. Y. Chagnac-Amitai, B. W. Connors, Synchronized excitation and inhibition driven by intrinsically bursting neurons in neocortex. *J Neurophysiol* **62**, 1149-1162 (1989).
22. B. W. Connors, Initiation of synchronized neuronal bursting in neocortex. *Nature* **310**, 685-687 (1984).
23. A. Alexander, M. Maroso, I. Soltész, Organization and control of epileptic circuits in temporal lobe epilepsy. *Prog Brain Res* **226**, 127-154 (2016).
24. M. Avoli, J. Louvel, R. Pumain, R. Köhling, Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. *Prog Neurobiol* **77**, 166-200 (2005).
25. M. Avoli, A. Williamson, Functional and pharmacological properties of human neocortical neurons maintained in vitro. *Prog Neurobiol* **48**, 519-554 (1996).

26. A. R. Wyler, G. A. Ojemann, A. A. Ward, Jr., Neurons in human epileptic cortex: correlation between unit and EEG activity. *Ann Neurol* **11**, 301-308 (1982).
27. B. Ishijima, T. Hori, N. Yoshimasu, T. Fukushima, K. Hirakawa, Neuronal activities in human epileptic foci and surrounding areas. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **39**, 643-650 (1975).
28. W. H. Calvin, G. A. Ojemann, A. A. Ward, Jr., Human cortical neurons in epileptogenic foci: comparison of inter-ictal firing patterns to those of "epileptic" neurons in animals. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **34**, 337-351 (1973).
29. A. Williamson, P. R. Patrylo, S. Lee, D. D. Spencer, Physiology of human cortical neurons adjacent to cavernous malformations and tumors. *Epilepsia* **44**, 1413-1419 (2003).
30. R. S. Sloviter, Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability in vivo. *Hippocampus* **1**, 31-40. (1991).
31. L. Wittner *et al.*, Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* **108**, 587-600 (2001).
32. J. Szabadics *et al.*, Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* **311**, 233-235 (2006).
33. I. Cohen, V. Navarro, S. Clémenceau, M. Baulac, R. Miles, On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* **298**, 1418-1421 (2002).
34. Y. Ben-Ari, E. Cherubini, R. Corradetti, J. L. Gaiarsa, Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* **416**, 303-325 (1989).
35. C. Rivera *et al.*, The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251-255 (1999).
36. L. Wittner *et al.*, The epileptic human hippocampal cornu ammonis 2 region generates spontaneous interictal-like activity in vitro. *Brain* **132**, 3032-3046 (2009).
37. P. A. Schwartzkroin, M. M. Haglund, Spontaneous rhythmic synchronous activity in epileptic human and normal monkey temporal lobe. *Epilepsia* **27**, 523-533 (1986).
38. M. Jiang *et al.*, Enhancement of asynchronous release from fast-spiking interneuron in human and rat epileptic neocortex. *PLoS Biol* **10**, e1001324 (2012).
39. A. Williamson, D. D. Spencer, Electrophysiological characterization of CA2 pyramidal cells from epileptic humans. *Hippocampus* **4**, 226-237. (1994).
40. M. Avoli, D. Mattia, A. Siniscalchi, P. Perreault, F. Tomaiuolo, Pharmacology and electrophysiology of a synchronous GABA-mediated potential in the human neocortex. *Neuroscience* **62**, 655-666 (1994).
41. L. Wittner *et al.*, Surviving CA1 pyramidal cells receive intact perisomatic inhibitory input in the human epileptic hippocampus. *Brain* **128**, 138-152 (2005).
42. L. Alonso-Nanclares *et al.*, Microanatomy of the dysplastic neocortex from epileptic patients. *Brain* **128**, 158-173 (2005).
43. M. Avoli, G. G. Hwa, J. C. Lacaille, A. Olivier, J. G. Villemure, Electrophysiological and repetitive firing properties of neurons in the superficial/middle layers of the human neocortex maintained in vitro. *Exp Brain Res* **98**, 135-144 (1994).
44. K. T. Hofer *et al.*, The hippocampal CA3 region can generate two distinct types of sharp wave-ripple complexes, in vitro. *Hippocampus* **25**, 169-186 (2015).
45. L. Wittner, R. Miles, Factors defining a pacemaker region for synchrony in the hippocampus. *J Physiol* **584**, 867-883 (2007).
46. C. Le Duigou, L. Wittner, L. Danglot, R. Miles, Effects of focal injection of kainic acid into the mouse hippocampus in vitro and ex vivo. *J Physiol* **569**, 833-847 (2005).
47. D. Motti *et al.*, Gene expression analysis of the emergence of epileptiform activity after focal injection of kainic acid into mouse hippocampus. *Eur J Neurosci* **32**, 1364-1379 (2010).
48. L. Wittner, D. A. Henze, L. Záborszky, G. Buzsáki, Hippocampal CA3 pyramidal cells selectively innervate aspiny interneurons. *Eur J Neurosci* **24**, 1286-1298 (2006).
49. L. Wittner, D. A. Henze, L. Záborszky, G. Buzsáki, Three-dimensional reconstruction of the axon arbor of a CA3 pyramidal cell recorded and filled in vivo. *Brain Struct Funct* **212**, 75-83 (2007).

50. G. Huberfeld *et al.*, Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **27**, 9866-9873 (2007).
51. M. R. Karlócai *et al.*, Enhanced expression of potassium-chloride cotransporter KCC2 in human temporal lobe epilepsy. *Brain Struct Funct* **221**, 3601-3615 (2016).
52. L. Wittner, Z. Maglóczy, Synaptic Reorganization of the Perisomatic Inhibitory Network in Hippocampi of Temporal Lobe Epileptic Patients. *BioMed Research International* **2017**, 13 (2017).
53. B. P. Kerekes *et al.*, Combined two-photon imaging, electrophysiological and anatomical investigation of the human neocortex, in vitro. *NeuroPhotonics* **1**, 011013(011011-011010) (2014).
54. K. Tóth *et al.*, Hyperexcitability of the network contributes to synchronization processes in the human epileptic neocortex. *J Physiol* **596**, 317-342 (2018).
55. A. Kandrás *et al.*, Presence of synchrony-generating hubs in the human epileptic neocortex. *J Physiol* **597**, 5639-5670 (2019).
56. F. Gallyas, F. H. Gudner, G. Zoltay, J. R. Wolff, Golgi-like demonstration of "dark" neurons with an argyrophil III method for experimental neuropathology. *Acta Neuropathol.* **79**, 620-628 (1990).
57. I. Ulbert *et al.*, In vivo laminar electrophysiology co-registered with histology in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* **187**, 310-318 (2004).
58. X. G. Li, P. Somogyi, A. Ylinen, G. Buzsáki, The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol* **339**, 181-208. (1994).
59. G. A. Ascoli, D. E. Donohue, M. Halavi, NeuroMorpho.Org: a central resource for neuronal morphologies. *J Neurosci* **27**, 9247-9251 (2007).
60. G. Eyal, H. D. Mansvelder, C. P. de Kock, I. Segev, Dendrites impact the encoding capabilities of the axon. *J Neurosci* **34**, 8063-8071 (2014).
61. C. Wozny, A. Knopp, T. N. Lehmann, U. Heinemann, J. Behr, The subiculum: a potential site of ictogenesis in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **46 Suppl 5**, 17-21 (2005).
62. R. Köhling *et al.*, Spontaneous sharp waves in human neocortical slices excised from epileptic patients. *Brain* **121 (Pt 6)**, 1073-1087 (1998).
63. A. K. Roopun *et al.*, A nonsynaptic mechanism underlying interictal discharges in human epileptic neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 338-343 (2010).
64. J. Pallud *et al.*, Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. *Science translational medicine* **6**, 244ra289 (2014).
65. G. Molnár *et al.*, Complex events initiated by individual spikes in the human cerebral cortex. *PLoS Biol* **6**, e222 (2008).
66. V. Szegedi *et al.*, Plasticity in Single Axon Glutamatergic Connection to GABAergic Interneurons Regulates Complex Events in the Human Neocortex. *PLoS Biol* **14**, e2000237 (2016).
67. G. G. Hwa, M. Avoli, A. Oliver, J. G. Villemure, Bicuculline-induced epileptogenesis in the human neocortex maintained in vitro. *Exp Brain Res* **83**, 329-339 (1991).
68. M. V. Sanchez-Vives, D. A. McCormick, Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* **3**, 1027-1034 (2000).
69. A. B. Ali, A. P. Bannister, A. M. Thomson, Robust correlations between action potential duration and the properties of synaptic connections in layer 4 interneurons in neocortical slices from juvenile rats and adult rat and cat. *J Physiol* **580**, 149-169 (2007).
70. D. A. McCormick, GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. *J Neurophysiol* **62**, 1018-1027 (1989).
71. C. M. Florez *et al.*, In vitro recordings of human neocortical oscillations. *Cereb Cortex* **25**, 578-597 (2015).
72. P. A. Schwartzkroin, W. D. Knowles, Intracellular study of human epileptic cortex: in vitro maintenance of epileptiform activity? *Science* **223**, 709-712. (1984).
73. V. Szegedi *et al.*, High-Precision Fast-Spiking Basket Cell Discharges during Complex Events in the Human Neocortex. *eNeuro* **4**, (2017).

74. J. V. Raimondo *et al.*, Methodological standards for in vitro models of epilepsy and epileptic seizures. A TASK1-WG4 report of the AES/ILAE Translational Task Force of the ILAE. *Epilepsia* **58 Suppl 4**, 40-52 (2017).
75. E. Boldog *et al.*, Transcriptomic and morphophysiological evidence for a specialized human cortical GABAergic cell type. *Nat Neurosci* **21**, 1185-1195 (2018).
76. H. Mohan *et al.*, Dendritic and Axonal Architecture of Individual Pyramidal Neurons across Layers of Adult Human Neocortex. *Cereb Cortex* **25**, 4839-4853 (2015).
77. G. Eyal *et al.*, Unique membrane properties and enhanced signal processing in human neocortical neurons. *Elife* **5**, (2016).
78. V. Lopantsev, M. Avoli, Laminar organization of epileptiform discharges in the rat entorhinal cortex in vitro. *J Physiol* **509 (Pt 3)**, 785-796 (1998).
79. E. R. Sanabria, H. Su, Y. Yaari, Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Physiol* **532**, 205-216 (2001).
80. L. Menendez de la Prida, B. Gal, Synaptic contributions to focal and widespread spatiotemporal dynamics in the isolated rat subiculum in vitro. *J Neurosci* **24**, 5525-5536 (2004).

8 A doktori értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

- Kandrács Á, Hofer KT, Tóth K, Tóth EZ, Entz L, Bagó AG, Erőss L, Jordán Z, Nagy G, Fabó D, Ulbert I, **Wittner L.** (2019) Presence of synchrony-generating hubs in the human epileptic neocortex. *J Physiol.* 2019 Dec;597(23):5639-5670. doi: 10.1113/JP278499. Epub 2019 Oct 10. (IF: 4.547) Q1
- Tóth K, Hofer KT, Kandrács A, Entz L, Bagó A, Erőss L, Jordán Z, Nagy G, Sólyom A, Fabó D, Ulbert I, **Wittner L.** Hyperexcitability of the network contributes to synchronization processes in the human epileptic neocortex. (2018) *J Physiol (London)* 2018 Jan 15;596(2):317-342. doi: 10.1113/JP275413. Epub 2017 Dec 28. (IF: 4.95), Q1
- Wittner L** and Maglóczy Z (2017) Synaptic Reorganization of the Perisomatic Inhibitory Network in Hippocampi of Temporal Lobe Epileptic Patients. *BioMed Res Int* Volume 2017, Article ID 7154295, 13 pages <https://doi.org/10.1155/2017/7154295> (IF: 2.583) Q2
- Karlócai MR, **Wittner L**, Tóth K, Maglóczy Zs, Katarova Z, Rásonyi Gy, Erőss L, Czirják S, Halász P, Szabó G, Payne JA, Kaila K, Freund TF. (2016) Enhanced expression of potassium-chloride cotransporter KCC2 in human temporal lobe epilepsy. *Brain Struct Funct.* 2016 Sep;221(7):3601-15. doi: 10.1007/s00429-015-1122-8. Epub 2015 Oct 1. (IF: 4.698) Q1
- Hofer KT, Kandrács Á, Ulbert I, Pál I, Szabó C, Héja L, **Wittner L.** (2015) The hippocampal CA3 region can generate two distinct types of sharp wave-ripple complexes, in vitro. *Hippocampus.* 2015 Feb;25(2):169-86. (IF: 4.162) Q1
- Kerekes BP, Tóth K, Kaszás A, Chiovini B, Szadai Z, Szalay G, Pálfi D, Bagó A, Spitzer K, Rózsa B, Ulbert I, **Wittner L** (2014) Combined two-photon imaging, electrophysiological, and anatomical investigation of the human neocortex in vitro. *Neurophotonics* 1(1) 011013 (Jul-Sep 2014). (IF: 0)
- Motti D, Le Duigou C, Eugène E, Chemaly N, **Wittner L**, Lazarevic D, Krmac H, Marstrand T, Valen E, Sanges R, Stupka E, Sandelin A, Cherubini E, Gustincich S, Miles R. (2010) Gene expression analysis of the emergence of epileptiform activity after focal injection of kainic acid into mouse hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2010 Oct;32(8):1364-79. (IF: 3.658)
- Wittner L**, Huberfeld G, Clémenceau S, Erőss L, Dezamis E, Entz L, Ulbert I, Baulac M, Freund TF, Maglóczy Z, Miles R. (2009) The epileptic human hippocampal cornu ammonis 2 region generates spontaneous interictal-like activity in vitro. *Brain.* 2009 Nov;132(Pt 11):3032-46. (IF: 9.49)
- L. Wittner** and R. Miles (2007) Factors defining a pacemaker region for synchrony in the hippocampus. *Journal of Physiology (London)* 2007 Nov 1;584(Pt 3):867-83. (IF: 4.58)
- G. Huberfeld*, **L. Wittner***, S. Clémenceau, M. Baulac, K. Kaila, R. Miles and C. Rivera (2007) Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signalling in human temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience* 27(37):9866-73. (IF: 7.49)
- L. Wittner**, D. A. Henze, L. Záborszky and Gy. Buzsáki (2007) Three-dimensional reconstruction of the axon arbor of a CA3 pyramidal cell recorded and filled in vivo. *Brain Structure & Function* 212:75–83 (IF:0)
- K. Tóth, **L. Wittner**, Z. Urbán, W. K. Doyle, Gy. Buzsáki, R. Shigemoto, T. F. Freund and Zs. Maglóczy (2007) Morphology and synaptic input of substance P receptor-immunoreactive interneurons in control and epileptic human hippocampus. *Neuroscience* 144 (2): 495-508. (IF: 3.352)

- L. Wittner**, D. A. Henze, L. Záborszky and Gy. Buzsáki (2006) Hippocampal CA3 pyramidal cells selectively innervate aspiny interneurons. *European Journal of Neuroscience* 24(5):1286-1298. (IF: 3.709)
- C. Le Duigou, **L. Wittner**, L. Danglot, and R. Miles (2005) Effects of focal injection of kainic acid into the mouse hippocampus in vitro and ex vivo. *Journal of Physiology (London)* 569 (3): 833-847 (IF: 4.272)
- L. Wittner**, L. Erőss, S. Czirják, P. Halász, T. F. Freund and Zs. Maglóczy (2005) Surviving CA1 pyramidal cells receive intact perisomatic inhibitory input in the human epileptic hippocampus. *Brain* 128:138-152 (IF: 7.535)

9 Publikációs mutatók a tézisek beadásakor

Eredeti közlemények száma: 39

Összesített impact factor: 202.7

Összes független idézetek száma: 1639

h-index: 19