



TERMÉSZETTUDOMÁNYI KUTATÓKÖZPONT
KOGNITÍV IDEGTUDOMÁNYI ÉS PSZICHOLÓGIAI INTÉZET
DR. WITTNER LUCIA, PHD
1117 BUDAPEST, Magyar Tudósok krt. 2.

LEVÉLCÍM: 1519 BUDAPEST, PF. 286.
TELEFON: +36 1 382 6807
E-MAIL: WITTNER.LUCIA@TTK.HU
WWW.TTK.HU

Válasz Dr. Toldi József opponensi véleményére

Mindenekelőtt hálás vagyok Dr. Toldi Józsefnek, hogy elolvasta és értékelte az MTA doktora címre benyújtott pályázatomat, és szeretném megköszönni megjegyzéseit, javaslatait és elgondolkodtató kérdéseit, melyek a témakör még mélyebb megértésére sarkalltak. Külön köszönöm méltató sorait az értekezésben bemutatott tudományos eredményeket és azok bemutatását illetően.

Kérem, fogadja válaszaimat az opponensi véleményében megfogalmazott kérdéseire és megjegyzéseire.

Formai szempontú észrevételek, kérdések

Először is szeretném megköszönni a Bírálónak az értekezésem igényes kivitelezésére tett pozitív megjegyzését. Igyekeztem egy gördülékenyen olvasható, de tömör szöveget írni, amely ezek szerint többségében egész jól sikerült. Az angol nyelvű kéziratok magyarra való átültetése úgy, hogy közben tömörebbre veszi az ember, nem is mindig egyszerű feladat. Előfordulhat, hogy voltak olyan részek, amelyek túl tömörre, vagy nem elég magyarosra sikerültek. Elírások és félreütések pedig az ember legjobb igyekezete ellenére is mindig maradnak a szövegben, ez alól ez az értekezés sem kivétel. Nagyon köszönöm a listát, ha lehetne, kijavítanám.

Köszönöm az észrevételt az ábrákat és az ábraszövegeket illetően. Valóban több helyen is összevontam az eredeti közleményekben külön szereplő ábrákat. A cél az volt, hogy az ábraanyag jól illeszkedjen a szöveghez, hogy azokat a főbb adatokat mutassa, amelyek alátámasztják a szövegben megfogalmazottakat. Valóban jobban érthető lett volna, ha részletesebben leírok minden kísérletsorozatot, és sokkal több ábrával támasztom alá, de valahogy optimalizálnom kellett, hogy a reális hosszúságú értekezés és a megfelelő érthetőség keretei között maradjak.

Az ábrákat igyekeztem magyarul feliratozni, ha már az értekezés nyelve is magyar. Sajnos néhány ábra esetében az eredeti, szerkeszthető változat valahol elsikkadt az idők során (pl. az említett 28. ábra), így azokat nem tudtam átírni magyarra. Más esetekben meg egyszerűen fel se tűnt (pl. 8., 10., 18., 21. ábrák), hogy az ábrán szereplő szövegek között maradt angol nyelvű felirat is, annyira hozzá van szokva az ember ezek látványához. Elnézést, hogy az ábraalírások nem voltak elég részletesek minden esetben, ez valóban megkönnyítette volna a megértést. Legközelebb jobban figyelni fogok arra, hogy minden ábrán levő jelölés meg legyen magyarázva az aláírásban.

Az elemszámok is a gördülékeny olvasás és a tömörségre való törekvés miatt maradtak ki. Nem akartam túl hosszú értekezést írni, és szerettem volna, ha könnyedén olvasható, nem szakad meg mindenhol a beszúrt elemszámok miatt. Utólag belátom, az elemszámokat mégis bele kellett volna írni, mert azokból lehet leginkább leszűrni, hogy az adott tulajdonság mennyire sporadikus előfordulású, vagy inkább stabil jellemzője a vizsgált jelenségnek. Természetesen minden esetben igyekeztünk a lehető legmagasabb, jól értékelhető elemszámot elérni. A válaszom végén található a főbb elemszámok (állatok, szeletek, vizsgált sejtek, szinapszisok, stb. száma), cikkenként, az értekezésben szerepeltetett sorrendben.

Tartalmi szempontú észrevételek, kérdések

1. A fiziológiás éles hullám keletkezésével kapcsolatban megállapították - többek között-, hogy a perizomatikus gátló sejteknek kiemelten fontos szerepe van az éles hullám-ripple-k (SPW) kialakulásában, vezérlésében. Kétféle SPW-t karakterizáltak (T1 és T2). Mindkettő generálódásában szerepe van még a piramis sejteknek, valamint további interneuronoknak is. Kérdés: Milyen további kísérletekkel lehetne tisztázni a többi különféle gátlósejt esetlegesen differenciált szerepét a T1 és a T2 SPW kialakulásában?

A legkézenfekvőbb megoldás – a rendkívül heroikus „egyidejű extra-és intracelluláris elvezetések során vakon elvezetjük és töltögetjük a neuronokat, majd post hoc anatómiával igazoljuk a típusukat” című kísérletsorozaton kívül – a genetikailag módosított állatok használata. Egérben leírták már a különböző interneuron típusok tüzelési mintázatát az in vitro körülmények között keletkező SPW-ek során (Hájos *et al.*, 2013). Ebben a közleményben PV-EGFP, illetve GAD65-EGFP állatokat használtak az interneuronok hatékonyabb megtalálása érdekében, de léteznek más genetikailag módosított egér törzsek is, amelyekben a különböző interneuron típusok kifejeznek valamilyen fluoreszcens fehérjét. A kosársejtek célzott vizsgálatára különösen alkalmas a CCK-DsRED egér is, amelyben a cholecystokinin/cannabinoid receptor 1-pozitív sejtek fejezik ki a pirosan fluoreszkáló fehérjét (pl. (Kohus *et al.*, 2016). A genetikailag módosított egér törzsek használatával azonban van egy probléma. Az egér hippocampusban nincs kétféle SPW, pedig a fent említett cikkben használt kísérleti módszerek nagyon hasonlóak voltak a mieinkhez. Valószínűleg fajok közötti különbségről van szó. Az említett konstitutív genetikai módosítás ugyanakkor sajnos patkányokban még mindig gyerekcipőben jár. A legjobb megoldás a vírus vektorok használata lehet. A vírus típusok, a promoterek és a bejuttatandó gének széles tárházával valószínűleg relatíve egyszerűen el lehet érni azt, hogy a különböző marker fehérjékkel azonosított interneuron típusok (pl. calbindin, calretinin, somatostatin, vasoactive intestinal protein, stb.) szelektíven kifejezzenek adott fluoreszcens fehérjét. A célzott interneuron vizsgálat ilyen kísérleti elrendezésben jó eséllyel hatékonyabb volna, mint a vakon végzett sejtöltés. Sajnos az egész optogenetikai rendszer is egérré van optimalizálva, és tapasztalataink szerint, ami egérben rutinosan megy, egyáltalán nem biztos, hogy patkányban (vagy pláne egyéb, magasabb rendű fajokban) is hasonlóan működni fog. De egy intrahippocampalis vírus vektor beadással jó eséllyel meg lehetne jelölni specifikusan a különböző interneuron típusokat, és vizsgálni lehetne azok szerepét a kétféle SPW-R kialakulásában.

2) Az epilepsziához köthető szinkron események az ún. interiktális tüskék. Megállapították, hogy az interiktális tüskéket a CA3a régió piramis sejtjei kezdik, és onnan tevődnek át a CA2-be és a CA3b-be.

A 17. ábra D része olyan helyzetet mutat be, ahol mini szeleteket készítették, azaz, szétválasztották a CA3a-t és a CA3b-t. Ekkor a két régióban egymástól függetlenül keletkeztek interiktális tüskék, melyek előfordulási valószínűsége különbözött. A CA3b aktivitása sokkal alacsonyabb volt.

Kérdések: 1: Minél távolabb kerülünk a CA3a-tól annál kisebb lesz az előfordulási valószínűsége ezeknek a tüskéknek? Ha nem szakítjuk meg a kapcsolatokat a CA3a és a CA3b között, akkor teljesen szinkron az aktivitásuk (17. ábra A). 2: Ezek szerint a CA3a, mint „elsődleges vezérlő központ” dominálja a körülötte lévő régiókat? 3: A CA1-ben egyáltalán nem keletkezik interiktális tüske? 4: Kijelenthető, hogy a CA3a finomszerkezeti jellegzetessége (ti. a piramis sejtekre érkező magasabb serkentő bemenet szám) meghatározó jelentőségű a fokozott szinkron aktivitásban?

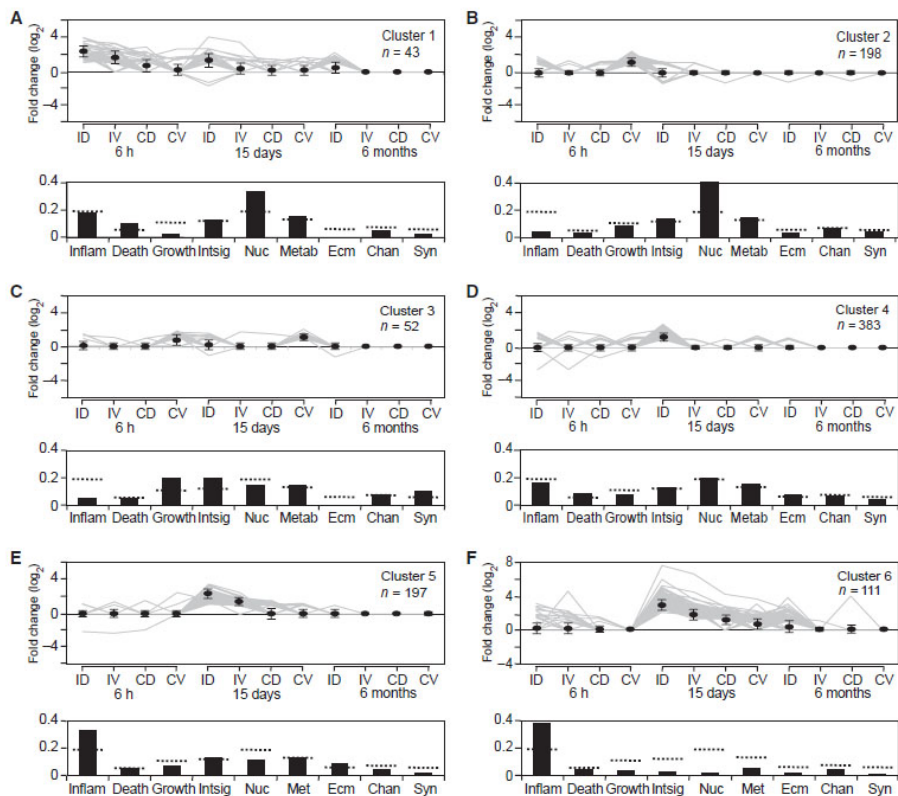
A diszinhibíciós in vitro hippocampus modell vizsgálata, mint az epilepsziás interiktális tüske modellje, az 1970-es évekre nyúlik vissza. A legtöbb munkacsoport (állattól és alkalmazott farmakontól függetlenül) arra a megállapításra jutott, hogy a teljes hippocampust tartalmazó szeletben a klasszikus CA3-CA1-Subiculum irányban terjednek a diszinhibícióval indukált tüskék, ám ha a CA3 és CA1 közötti kapcsolatot elvágjuk, akkor a CA3-ban továbbra is keletkeznek spontán tüskék, míg a CA1 régióban nem (Schwartzkroin & Prince, 1978), csak további elektromos stimuláció hatására (Dingledine & Gjerstad, 1980). Az értekezésben szerepeltetett munkánkban a CA3 régióra koncentráltunk, azt próbáltuk feltárni, hogy mely sejt és hálózati tulajdonságok kelljenek ahhoz, hogy egy régió vezető szerepet játsszon a tüskék generálásában. Jó modellnek adódott a tengerimalac hippocampus, amelyben a CA3a régió indítja a BIC-indukált tüskéket, és a CA3b (illetve a CA2) régió követi. Ugyanakkor, ha izoláljuk a CA3a és b alrégiókat, mindkettő képes a tüskék generálására. Azért ezt a modellt választottuk, mert ebben a két alrégióban minden nagyon hasonló, nincsenek régióbeli (pl. összeköttetésbeli) különbségek, mint a CA3 vs. CA2, CA1, vagy a gyrus dentatus között. A CA3c (vagyis a gyrus dentatus két szára közötti terület) izoláltan vizsgálni elég nehéz: ha rajta hagyjuk a gyrus dentatust, akkor annak hatásait nem lehet kiküszöbölni, ha levágjuk, az elég jelentősen deafferentálja az alrégiót (és nem mellesleg annyira kicsi, hogy hagyományos technikákkal, vagyis szikével, ollóval elég nehéz levágni). Hogy a kérdésekre is válaszoljak: minél távolabb kerülünk a CA3a régiótól, annál később látszik az interiktális tüske csúcsa a CA3a-hoz képest. Ez igaz a CA3c-re és a CA1 régió közeli szakaszára (ezeket vizsgáltuk, de nem kerültek fel az ábrára). Más régiókat nem vizsgáltunk, de valószínűnek tartom, hogy a CA1 régió subiculumhoz közelebb eső szakaszához még később ér a tüske (mondjuk azért itt is csak 5-10 ms-os késésekről beszélünk). Kijelenthető, hogy a tengerimalac hippocampus szeletben a CA3a régió vezérli a tüskék kialakulását, és vonja bele a többi régiót. Ennek az alrégiónak a finomszerkezete és a sejtjeinek tulajdonságai kelljenek ahhoz, hogy indítsa a tüskéket. A piramissejtek e tulajdonságai közé tartozik az összességében hosszabb dendritfa (18F ábra), a nagyobb arányban érkező serkentő axonok (19C ábra). Érdeemes megfigyelni, hogy a CA3a piramissejtek több axonterminálist adnak a saját régiójukban (19F ábra, bal oldal, meleg színek), míg a CA3b sejtek jobban elosztva adnak mindkét régióba (jobb oldal). Ez azt eredményezi, hogy a CA3a sejtek hosszabb dendritfájára nagyobb számú (kb. 30%-kal több!) serkentő bemenet érkezik, mint a CA3b sejtekére (19E ábra). De ezek mellett az is fontos (és össze is függ a nagyobb serkentő bemenettel), hogy a CA3a régióban jóval több a spontán és a burst-ben tüzelő sejt, mint a CA3b-ben (18A-E ábra). A burstlő sejtek közül kerülnek ki azok a sejtek, amelyek akkor is tudnak burst-ben tüzelni, amikor hiperpolarizált állapotban vannak (ezeket neveztük erősen vezető sejteknek), és amelyek képesek arra, hogy sejttüzelést, valamint mezőpotenciál tranzienszt is kiváltsanak. Ilyen sejteket csak a CA3a-ban találtunk, a

CA3b-ben nem. A fiziológiai és anatómiai tulajdonságok együttesen eredményezik azt, hogy a CA3a régióban nagyobb eséllyel alakul ki epilepsziás tüske, mint a CA3b régióban, és hatékonyan tudja bevonni a környező régiókat. Azt gondolom, hogy ezek a sejt- és hálózatszintű tulajdonságok más szinkronizációs folyamatokban is fontosak lehetnek. Az mindenképp elmondható, hogy a hosszabb dendritfa, a rá érkező serkentő bemenet magas száma, a nagy arányú spontán, burstben tüzelő sejtek aránya egy adott agyterületen előrevetíti annak a lehetőségét, hogy az egy szinkronizációs (vagy akár epilepsziás) góccá váljon.

3) Az epilepsziás rohamok keletkezésének tanulmányozása során génexpressziós, elektrofiziológiai és anatómiai kísérleteket végeztek. Genetikai profil vizsgálattal 1526 transzkript expressziójának változását figyelték meg kainát egyik oldali dorsalis hippocampusba történő beadása után, különböző időkben. Megállapították, hogy a génaktivációs változások a korai (status epilepticus) idejére és a latens szakaszhoz köthetők, míg a gyulladásszerű folyamatok főként a látens szakaszt jellemzik. Érdekesnek találom, hogy 6 órával a beadás után, vagyis kb. a status epilepticus kialakulásának az idejére, éppen a contralaterális ventrális hippocampusban upregulálódott a legtöbb gén expressziója.

Kérdés: *Mi lehet ennek a magyarázata? Azaz, mi lehet az oka annak, hogy a legkorábbi vizsgálat során tapasztalt génexpresszió upregulálódás a legnagyobb mértékben éppen a contralaterális-ventrális régióban történik?*

Nagyon köszönöm a Bíráló kérdését, ezen a tényen mi magunk is meg voltunk lepve annak idején. Aztán amikor kielemeztük az egerek EEG elvezetéseit, akkor azt láttuk (értekezés 21. ábra), hogy a kainát beadását követően az ipsilateralis ventralis (IV) hippocampus indítja a rohamokat, majd áttérjed a contralateralis ventralis (CV) oldalra, onnan a contralateralis dorsalis (CD) oldalra, majd kb. 5 óra elteltével az ipsilateralis dorsalis (ID) oldal is bevonódik a rohamba. Különösen érdekes, hogy a beadás helye kapcsolódik be legkésőbb a rohamokba. Ez két dologgal magyarázható. Egyrészt a beadás helyén a piramissejtek jó eséllyel nagyon hamar bekerülnek egy depolarizációs blokkba (Le Duigou *et al.*, 2005), és/vagy elpusztulnak, így nem tudnak részt venni egy epilepsziás rohamban. Másrészt a ventralis hippocampusban sűrűbb a CA3 rekurrens kollaterális hálózat, mint a dorsalis oldalon (Li *et al.*, 1994), amely – ahogy fentebb is szóba került – nagyobb serkenthetőséget okoz, így nagyobb valószínűséggel fognak ott hiperszinkron események keletkezni. A beadást követő 6. óra környékén a contralateralis ventralis hippocampusban voltak a legnagyobb amplitúdójúak a rohamok (értekezés 21. ábra), így elképzelhető, hogy ez a magas aktivitás összefüggésben van az upregulálódott gének számával is. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy az expresszióban történt változás mértéke többnyire az ipsilateralis dorsalis hippocampusban, vagyis a beadás helyén volt a legmagasabb (1. ábra). Ezt talán jó lett volna egy kicsit jobban kifejteni az értekezésben.



1. ábra

Hat klaszterre osztottuk a géneket az idő- és térbeli változásuk mintázata szerint. A hasonló változásokat mutató géneket tettük egy klaszterbe, majd megvizsgáltuk, hogy ezekben a klaszterekben milyen biológiai folyamatokhoz köthető gének találhatóak. A 6. óraban (minden felső panel bal oldala) főleg az első (A), valamint a második (B) és harmadik (C) klaszterbe tartozó gének mutattak szignifikáns változást. Az első klaszterben főleg nukleáris és intracelluláris szignalizációval (Nuc, Intsig), sejtpusztulással (Death) és metabolikus folyamatokkal (Metab) kapcsolatos gének voltak és az ID, IV, CD részeken változott az expressziójuk. A második klaszterben szintén nukleáris, intracelluláris szignalizációval (Nuc, Intsig), és metabolikus folyamatokkal (Metab) kapcsolatos gének voltak (sejtpusztulás nem!), és csak a CV területeken változott az expressziójuk, a harmadik klaszterben pedig sejtnövekedéssel (Growth), intracelluláris szignalizációval (Intsig) és metabolikus folyamatokkal kapcsolatos gének voltak, amelyek szintén csak a CD hippocampusban mutattak expresszió változást.

4) A hippocampalis szinkron aktivitások anatómiai hátterét vizsgálva arra a megállapításra jutottak, hogy a két párhuzamos rendszer (a gyrus dentatus: GD és a CA1) közé ékelődő CA3-as régió, a maga sajátos kapcsolatrendszerével lehet az anatómiai alapja az SPW-k keletkezésének.

Megjegyzés: Az értekezésnek ebben a fejezetében két olyan állítást találok, melyek önmagukban is és együtt is helytállóak lehetnek, mégis, tartalmuk rejt ellentmondó elemeket. Az egyik állítást a fenti bekezdésben már említettem: „... a hippocampus, és ezen belül is a CA3 régió eme sajátos összeköttetési rendszere lehet az anatómiai alapja a SPW-ek keletkezésének..” Ez a megállapítás –bár azt nem állítja, hogy csak ebben a kapcsolatrendszerben keletkezhetnek SPW-k, annyit mond, hogy ez az összeköttetési rendszer lehet az anatómiai alapja. A másik állítás, - ami, ha nem is mond ellent-, mindenképpen gyengíti az előzőt, az pedig azt mondja, hogy „morfológiailag különböző neuronális hálózatok ugyan olyan szinkron aktivitás létrehozására képesek...” (64. old. 14-15. sor).

Szeretném megköszönni a Bírálónak ezt a megjegyzést.

A CA3 régiónak valóban elég speciális összeköttetési rendszere van: az egyirányú bemenet, a rekurrens kollaterális rendszer, majd a szintén egyirányú kimenet, mindez megspékelve a gátló sejtípusok kapcsolatrendszerével. Ez az összeköttetési rendszer a benne levő sejtek tulajdonságaival együtt alkalmas arra, hogy SPW-R komplexumokat generáljon, amely szinkron események valóban biztosítani tudják a tanulási és memóriafolyamatokhoz kapcsolódó információkiemelést és továbbítást. A másik kijelentés, mely szerint a morfológiailag különböző neuronális hálózatok ugyanolyan szinkron aktivitás létrehozására képesek, az interiktális tüskék keletkezésére vonatkozik. Ez a kijelentés mind a kainát egér modellben, mind a humán in vitro kísérleteinkben megállja a helyét. A humán subiculumban in vitro körülmények között kialakulnak interiktális jellegű tüskék (Huberfeld *et al.*, 2007), míg az anatómiailag különböző CA2-ben ugyanúgy kinéző tüskék keletkeznek (Wittner *et al.*, 2009).

A SPW-R komplexumok és az interiktális tüskék ráadásul nagyon hasonlítanak, ha EEG-vel (pl. 0.1-100 Hz közötti spektrumban) vizsgáljuk őket. Emellett, hogy még bonyolultabb legyen a kép, az interiktális tüskék egy típusát sharp wave-nek is nevezik. A tüskék és a SPW-R-ek még akkor is hasonlítanak, ha a spektrumot szélesítjük és a magasabb frekvenciájú komponenseket is mérjük. Egy nagy amplitúdójú mezőpotenciál tranziens (éles hullám) a rajta ülő magas frekvenciájú oszcillációkkal és megnövekedett sejtaktivitással – ez a meghatározás érvényes a SPW-R-re és az interiktális tüskékre is. A hippocampus CA3 régiója (ahogy fentebb is volt róla szó), valószínűleg pont a speciális struktúrájának és tulajdonságainak köszönhetően képes az interiktális tüskék indítására és a más agyterületek bevonására. Ugyanez a régió generálja a SPW-R komplexumokat, mind in vivo, mind in vitro körülmények között, minden modellben (Buzsáki, 2015), és ugyanazon az útvonalon terjednek a SPW-R-ek, mint az interiktális tüskék. Ez felveti azt a kérdést is, hogy vajon hol van a határ (van-e egyáltalán) a fizioiógias és a patológiás jelenségek között.

Azt gondolom, hogy ez az egész kérdéskör nagyon jól rámutat arra a másik filozófiai kérdésre is, amellyel minden tudományos megközelítéskor szembesülünk. Látunk, majd vizsgálunk valamilyen jelenséget, és megpróbáljuk feltárni az okait. Mindig eszembe jut az a hasonlat (amit sajnos nem emlékszem, hol olvastam), hogy a XX. század előtt hogyan közelítették meg a köhögést és az okait. Volt a „köhögő betegség”, és nem is gondolták, hogy mennyi féle oka lehet. Ma már, az orvostudomány fejlődésével tudjuk, hogy rengeteg oka és kialakulási mechanizmusa lehet, kezdve a vírusos/bakteriális felsőlégúti fertőzésektől, át a TBC-n, az asztmán, a COPD-n, a cisztás fibrózison és a refluxon, egészen a daganatos megbetegedések és a szív- és érrendszeri panaszok melléktünetéig. Tehát a jól körülírható, többé-kevésbé homogén tünet, a köhögés sokféle módon keletkezhet. Ugyanez igaz lehet az általunk vizsgált szinkron aktivitásokra is (SPW-ekre, interiktális tüskékre). Látunk egy adott elektrofiziológiai jelenséget, amely háttérben ugyanakkor lehet többféle mechanizmus is, nem csak egy. Például a humán szeletekben keletkező interiktális tüskék, melyek háttérben valószínűleg a klorid háztartás megbomlása játszik szerepet a subiculumban (Huberfeld *et al.*, 2007), míg a CA2-ben ugyanúgy kinéző tüskék esetén a klorid háztartás változását nem, csak a serkentés-gátlás egyensúlyának megbomlását tudtuk kimutatni (Wittner *et al.*, 2009). Vagy az is előfordulhat, hogy egymáshoz nagyon hasonló (netán ugyanolyan) elektrofiziológiai jelenséget látunk olyan agyterületeken, amelyekben jelentősen eltérnek az anatómiai jellemzők (mint az említett interiktális tüskék, melyek megjelennek a kainát egér modellben a sejtpusztulást mutató és nem mutató területeken is). Érdemes tehát ezt észben tartani, hogy amit az állatmodellünkben látunk, nem biztos, hogy ugyanúgy zajlik emberben, még akkor se, ha ugyanúgy, vagy hasonlóan néz ki. És természetesen az in vitro eredményekből is csak mérsékelten lehet extrapolálni az in vivo eseményekre.

Azt gondolom tehát, hogy a két állítás egyáltalán nem mond ellent egymásnak, csak egészen más aspektusból közelíti meg a vizsgált jelenségeket.

5) Az emberi hippocampusban megjelenő interiktális aktivitás mechanizmusát vizsgálva azt találták, hogy a subicularis piramis sejtek kb. 1/5-e GABA-ra depolarizálódik. In situ hibridizációs módszerrel pedig kimutatták, hogy a subiculum piramis sejteinek 20-30%-ban nem fejeződik ki a klorid homeosztázis szempontjából fontos kettes típusú K-Cl kotranszporter (KCC2) mRNS-e.

6) Kimutatták továbbá, hogy -bár a CA2 régió szintén képes interiktális tüskék generálására, itt a subiculummal ellentétben, a kloridion gradiens nem játszik fontos szerepet az interiktális tüskék generálásában. Itt más mechanizmust kellett feltételezni. Azt találták, hogy itt a serkentő bemenetek száma nő meg, azaz, a gyrus dentatus moharostjai sarjadzanak, benőnek a CA2 régióba, ahol a piramis sejtekre extra serkenető bemeneteket adnak.

Kérdés: Mi készítheti sarjadzásra a gyrus dentatus moharostjait? Végző soron, mi lehet a CA2 régióbeli interiktális aktivitás kialakulásának eredő oka?

Részletesen vizsgálták a human hippocampusban megjelenő epilepsziás aktivitás anatómiai hátterét is. Itt is gyanúba került a klorid homeosztázis egyensúlyának lehetséges megbillenése, azaz, a KCC2 fehérje. Az állatkísérleti eredményeknek némileg ellentmondott az az eredmény, hogy a KCC2 fehérje mennyisége megemelkedik epilepsziás betegek hippocampusában a kontrollhoz képest. Ezzel kapcsolatos

Kérdések: A hippocampalis sclerosis mértéke (mHS vs sHS) mennyire áll arányban a betegség súlyosságával, pl. a hiperexcitabilitással, az interiktális-jellegű aktivitással? Hogyan kell értelmezni azt a Western blot eredményt, miszerint a KCC2 fehérje mennyisége az mHS esetében nőtt meg szignifikánsan, míg a súlyos szklerotikus esetekben (sHS) nem tért el a kontrolltól (44. ábra B)?

A várakozásainkkal ellentétben, a humán epilepsziás CA2 régióban nem tudtuk kimutatni a klorid homeosztázis megváltozását. Az intracellulárisan elvezetett sejtek is másképp viselkedtek, mint a subiculumban. Míg ez utóbbiban a sejtek 80%-a hiperpolarizáló választ mutatott az interiktális tüskék során, a CA2 régióban ez az arány pont a fordítottja volt, a sejtek kb. 80%-a depolarizálódott. Emellett a KCC2 fehérje hiányát sem tudtuk kimutatni az egyes sejtek szintjén. Ezzel ellentétben a serkentő moharostok benőttek a CA2-be, egy extra serkentést adva a régió piramissejtjeire. A moharostok sarjadzását valószínűleg az epilepszia során megváltozott morfológia váltja ki. Ahogy más patológiás esetekben is, az epilepszia modellekben a deafferentáció, mint például a perforáns pálya, vagy a commissuralis pálya átmetszése/lecsökkenése okozhatja a moharostok sarjadzását (Noebels *et al.*, 2012). Az epilepsziás emberi hippocampusban szelektíven elpusztulnak egyes interneuron típusok a hilusban és a CA3 régióban, illetve a scleroticus esetekben a CA3 régió piramissejtjei is pusztulnak (Noebels *et al.*, 2012). Valószínűnek tartom, hogy e sejtek pusztulása, és az ezáltal kieső rostok is okai lehetnek a moharostok sarjadzásának. És a mi eredményeink szerint ez nem csak a gyrus dentatus molekuláris rétegébe jut vissza, mint ahogy azt eddig humán és kísérletes epilepsziákban kimutatták, hanem tovább nő a CA3 régió túlra, a CA2 régióba is. A CA2 régióbeli interiktális aktivitás valószínűleg úgy alakul ki, hogy a moharostok adnak egy extra serkentést, miközben a periszomatikus gátlás funkcionálisan kissé megváltozik (a parvalbumin eltűnik a sejtekből, így azok Ca^{2+} -háztartása megváltozik). Emellett sok a spontán tüzelő sejt, és burstoló sejtek is előfordulnak, amelyek képesek lehetnek elindítani egy ilyen szinkron eseményt. Ezen kívül természetesen nem kizárhatóak más folyamatok sem, mint a más interneuron típusok, a glutamát és a GABA-

receptorok, egyéb transzporterek érzékenységének változása, az asztroglia sejtek diszfunkciója (ld. Noebels *et al.*, 2012), illetve akár a CA2 piramissejtek esetleges axonjainak sarjadzása, amelyekről mind nincs információnk a CA2 régióra vonatkozóan. De minden, ami a serkentés-gátlás megbillenéséhez vezet a serkentés javára, egy meglevő, működő szomatikus gátlással a szinkronizációk kialakulásához vezethet.

A hippocampalis sclerosis mértéke (mHS, sHS) nem feltétlenül függ össze az epilepszia időtartamával és a rohamok gyakoriságával. A több, mint 100 főt számláló adatbázisunkban több olyan beteg is volt, aki 35-40 éve epilepsziás, terápia rezisztens, de mégis az mHS csoportba tartozik. Ugyanakkor voltak olyan betegek is, akiknek alig fél-egy éve voltak epilepsziás rohamaik, de mégis kimutatható volt náluk a hippocampalis sclerosis. Az epilepsziás betegekben az interiktális tüskék gyakorisága és a HS mértéke közötti összefüggésre nem találtam adatot. A klinikai oldalról inkább arra koncentrálnak, hogy vajon mi a kapcsolat az interiktális tüskék és a rohamok megjelenése között, vagy mi a rezekciós műtét kimenetének prognózisa, ha az interiktális tüskézés egy oldalon vagy mindkét oldalon megfigyelhető (pl. Noebels *et al.*, 2012). Ezzel szemben, humán epilepsziás hippocampalis szeletekben körülbelül hasonló arányban jelennek meg interiktális jellegű tüskék a nem scleroticus (mHS) és a scleroticus hippocampusban (sHS) is, ha az átáramoltatott oldat excitabilitását megnöveljük magas K^+ koncentrációval (Reyes-Garcia *et al.*, 2018). A hiperexcitabilitás egyértelműen összefüggést mutat a hippocampalis sclerosis mértékével. Mivel kontroll (nem epilepsziás) humán hippocampus nem elérhető elektrofiziológiai kísérletekhez, rengeteg közlemény tekinti az mHS patológiájú betegek hippocampusát kontrollnak. És valóban, az mHS és az sHS hippocampusok között jelentős különbségek mutatkoznak mind a neuronális fiziológiai jellemzők, mind a glutamát és GABA receptorok tulajdonságai és az általuk közvetített áramok között (pl. Avoli *et al.*, 2005), mind a sejtpusztulás mintázatát illetően (Noebels *et al.*, 2012).

Mi magunk az interictalis-jellegű aktivitás és a HS összefüggését nem vizsgáltuk sem a subiculummal, sem a CA2 régióval foglalkozó tanulmányunkban. Az előbbi közleményben 3/27 páciens volt az mHS csoportban, míg az utóbbi közleményben az előzővel nagyrészt átfedő pácienscsoportból 2/13 mHS mintánk volt. Ez annyira kevés, hogy ebből nehezen lehetne érdemi következtetéseket levonni a tüskék megjelenését és a sclerosis mértékét illetően. Ugyanakkor az anatómiai munkáinkban kimutattuk, hogy a HS mértéke összefügg egyes morfológiai jellemzők változásaival (ld. korábbi munkáink, Maglóczky *et al.*, 2000; Wittner *et al.*, 2001; Wittner *et al.*, 2002; Wittner *et al.*, 2005), tehát feltételezem, hogy az elektrofiziológiai jellemzők, köztük az interictalis-jellegű aktivitás megjelenése és a hiperexcitabilitás is mutathat összefüggést.

A korábbi anatómiai munkáinkban elsősorban a hippocampus gátló interneuronjaira koncentráltunk, de azért így is feltűnt egy-egy serkentő hálózat megváltozása. A gyrus dentatusban a jól ismert jelenségen, a moharost sarjadzason túl (amely egy jelentős extra serkentést ad a szemcsesejtekre) kimutattuk a supramammillaris nucleusból eredő pálya kiszélesedését (Maglóczky *et al.*, 2000), a CA2 régióban pedig a már említett moharostok benövését (Wittner *et al.*, 2009). A gátló sejtek változásai is összefüggést mutatnak a HS mértékével. A nem scleroticus mintákban is kimutathatók egyes változások, pl. megnövekedett periszomatikus gátlás a szemcsesejteken, egyes interneuronok szelektív pusztulása a gyrus dentatusban (Wittner *et al.*, 2001) és a CA1 régióban (Wittner *et al.*, 2005; Tóth *et al.*, 2007). Ugyanakkor a nagyon markáns változások, amelyek mind a serkentő, mind a gátló neuron hálózatokat érintik, csak a scleroticus hippocampusban figyelhetők meg (ld. pl. Wittner & Maglóczky, 2017).

A KCC2 fehérje mennyisége Western blottal csak a nem scleroticus hippocampusban nőtt meg, míg a scleroticusban nem tudunk szignifikáns változást kimutatni. Ennek az lehet az oka, hogy míg a kontroll és a nem scleroticus hippocampusban nagy arányú a cornu Ammonis régió az egész hippocampushoz képest, addig ez az arány a scleroticus hippocampusban megváltozik a CA1 régió atrófiája miatt. Ugyanakkora mennyiségű (tömegű/térfogatú) szövetben így tehát a scleroticus hippocampusban alulreprezentált lesz a cornu Ammonis. Ugyan az egyes dendritekben erősebb a KCC2-festés, a sejtes és dendritikus rétegek térfogata rendkívüli módon lecsökken a sejtpusztulás miatt, és ezzel együtt valószínűleg az összes fehérje mennyisége is kevesebb lesz, mint a nem scleroticus hippocampusban.

7. Az epileptiform aktivitás keletkezési mechanizmusait vizsgálva azt találták, hogy interiktális tüskék spontán módon jelentkeztek mind a négy betegcsoportban, míg rohamokat csak a ResEpi és a NoEpi csoportokban detektáltak.

Kérdés: Első hallásra ez meglepőnek tűnik -, mármint a NoEpi-ben megjelenő. Mi lehet ennek a magyarázata?

A NoEpi-ben megjelenő rohamokat (akárcsak az interiktális tüskéket) a GABA_A receptor antagonistá bicuculline hozzáadásával indukáltuk. Mindenképp szeretném megjegyezni, hogy a NoEpi csoportban összesen 3/26 szeletben láttunk 1-1 rohamot, míg a ResEpi csoportban 7/29 szeletben keletkeztek rohamok, és azon belül 6/7 szeletben visszatérő rohamokat láttunk. Tehát a NoEpi szeletekben megjelenő roham meglehetősen ritka esemény volt. A másik két betegcsoportban jóval kevesebb mintánk volt (TreatEpi 10 szelet, NoMed 5 szelet), így a véletlen is okozhatja, hogy csak tüskéket láttunk.

Ugyanakkor tény, hogy az in vitro farmakológiai modellek közül csak a 4-amino-piridin hozzáadásával lehet megbízhatóan elérni epilepsziás rohamok megjelenését konvencionális hippocampalis és neocorticalis rágsáló szeletekben (Avoli *et al.*, 2022). A GABA_A receptorok blokkolásával csak a piriform kéregben (de Curtis *et al.*, 2019), illetve izolált tengerimalac agy hippocampusában (Uva *et al.*, 2005) lehet rohamokat kiváltani, amúgy csak interiktális tüskék keletkeznek (pl. Wong & Traub, 1983). Hogy a humán neocorticalis szeletekben miért alakul ki mégis roham? Egyrészt metodikai okai lehetnek: míg a konvencionális szeletek inkább 300-350 µm-esek, a mi szeleteink 500 µm vastagok, így kicsit jobban megőrződnek a sejtek közti kapcsolatok. Valamint talán az átáramoltatott folyadék sebessége és a szelet oxigén ellátottsága is számíthat (Hajos *et al.*, 2009). Másrészt az is lehetséges, hogy a humán neocorticalis hálózatok ennyivel komplexebbek (Molnár *et al.*, 2008), mint a rágsálóké, és a kéregben levő erősen összekötött mikrohálózatok (Szegedi *et al.*, 2016) GABA_A receptoron keresztül történő gátlás hiányában képesek bevonni nagy neuronpopulációkat egy epilepsziás roamba. Az adatainkból egyértelműen látszik, hogy az epilepsziás szövetben (ResEpi), ahol van egy jelentős serkentő szinaptikus reorganizáció, gyakrabban fordulnak elő rohamok, mint ahol nincs (NoEpi).

8) A diszinhíbiós modellben indukált tüskéket (IIS-el jelölt) vizsgálva azt találták, hogy ezek a kéreg bármelyik rétegéből indulhatnak.

Kérdések: teljesen véletlenszerű, hogy az IIS-ek a kéreg mely rétegéből indulnak? Nem figyelhető meg semmiféle area-specifitás? Hasonlóképpen, a terjedési sebességük (3 félét írtak le) sem köthető areákhoz?

Nagyon köszönöm ezt a kérdést, nekünk eszünkbe se jutott, hogy ennek utánanézzünk. Ugyan 27 (epilepsziás) és 15 (nem epilepsziás) szeletben sikerült epileptiform aktivitást indukálnunk, de a terjedési sebességét csak azoknak az aktivitásoknak analizáltuk, amelyek során legalább 5 esemény követte egymást egy elvezetésben. Így (három visszatérő rohammal együtt) az analizálható file-ok száma 15-re csökkent (9 ResEpi, 1 TreatEpi, 2 NoEpi betegből). Valószínű, hogy nincs area-specificitása a terjedésnek, mert a minták közül kettő kivételével (1 frontalis és 1 occipitalis) mind a temporális lebenyből származott. Tehát a temporális lebenyben volt alacsony és magas sebességű terjedés, mindhárom típus előfordult, és volt közte gyorsuló és lassuló sebességű is. A temporális kérgen belül általában a T2 gyrusból kaptunk (n=5, illetve T1 n=1, a többiről sajnos nincs adat). A T2 gyrusban volt alacsony sebesség és magas, mindhárom indulási mintázat és egy gyorsuló sebességű IIS, így valószínűleg még gyrus-specificitást sem mutat a jelenség. Én inkább arra gondolok, hogy a BIC-indukált IIS-ek indulása és terjedése a szeletben található mikrohálózatok függvénye, amelyek valószínűleg elég esetlegesen változnak a szeletkészítés során.

9) A szakirodalomból is ismert, hogy rágcshálóok diszinhíbiós modelljében (bicuculline-al) a burst-ölő V. rétegbeli piramis sejtek indítják az interiktális tüskéket. Véleményem szerint fontos különbség az a megfigyelésük is, hogy humán (szintén bicuculline-s) neocorticalis szeletekben viszont a gátló interneuronok tüzelése indítja az IIS-eket.

Köszönöm ezt az észrevételt. Szerintem is ez egy rendkívül fontos megfigyelés, amely arra is rávilágít, hogy miért kell mindig visszanyúlni az emberi betegség és az emberi folyamatok vizsgálatához. Sajnos nagyon sokszor szembesültünk azzal a humán adatok publikálása során, hogy „ez nem újdonság, már le van írva egérben/patkányban”. Nyilván egyszerűbb egereken és patkányokon dolgozni, ahol a kutató maga irányítja a kísérletezést. A humán vizsgálatok mindig sokkal lassabbak, meg kell oldani a sebészek és a kutatók közti kommunikációt, a minták adott betegpopulációk/orvosi irányvonalaktól/pandémiától változhatnak, nincs megfelelő kontroll, stb. De mégis, az emberi agy működése, patológiai elváltozásainak megértése és az emberi betegség gyógyítása a cél, ezért nem elég csak állatmodellekből következtetéseket levonnunk.

A gap junction-ök vizsgálata a humán szinkronizációs folyamatokban tervbe van véve. Sajnos a pandémia és az idegsebészeti műtők felújítása elég jelentősen visszavetette a humán kísérleteinket, de ha minden igaz, januártól újra több mintára számíthatunk.

Szeretném még egyszer megköszönni a Bírálónak az értekezésemre szánt idejét, energiáját, pozitív megjegyzéseit és építő javaslatait.

Budapest, 2022. 11. 23.



Dr. Wittner Lucia
wittner.lucia@ttk.hu

Referenciák

- Avoli M, de Curtis M, Levesque M, Librizzi L, Uva L & Wang S. (2022). GABA_A signaling, focal epileptiform synchronization and epileptogenesis. *Frontiers in neural circuits* **16**, 984802.
- Avoli M, Louvel J, Pumain R & Köhling R. (2005). Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. *Prog Neurobiol* **77**, 166-200.
- Buzsáki G. (2015). Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus* **25**, 1073-1188.
- de Curtis M, Uva L, Levesque M, Biella G & Avoli M. (2019). Piriform cortex ictogenicity in vitro. *Exp Neurol* **321**, 113014.
- Dingledine R & Gjerstad L. (1980). Reduced inhibition during epileptiform activity in the in vitro hippocampal slice. *J Physiol* **305**, 297-313.
- Hájos N, Ellender TJ, Zemankovics R, Mann EO, Exley R, Cragg SJ, Freund TF & Paulsen O. (2009). Maintaining network activity in submerged hippocampal slices: importance of oxygen supply. *Eur J Neurosci* **29**, 319-327.
- Hájos N, Karlócai MR, Németh B, Ulbert I, Monyer H, Szabó G, Erdélyi F, Freund TF & Gulyás AI. (2013). Input-output features of anatomically identified CA3 neurons during hippocampal sharp wave/ripple oscillation in vitro. *J Neurosci* **33**, 11677-11691.
- Huberfeld G, Wittner L, Clémenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R & Rivera C. (2007). Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **27**, 9866-9873.
- Kohus Z, Kali S, Rovira-Esteban L, Schlingloff D, Papp O, Freund TF, Hajos N & Gulyas AI. (2016). Properties and dynamics of inhibitory synaptic communication within the CA3 microcircuits of pyramidal cells and interneurons expressing parvalbumin or cholecystokinin. *J Physiol* **594**, 3745-3774.
- Le Duigou C, Wittner L, Danglot L & Miles R. (2005). Effects of focal injection of kainic acid into the mouse hippocampus in vitro and ex vivo. *J Physiol* **569**, 833-847.
- Li XG, Somogyi P, Ylinen A & Buzsáki G. (1994). The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol* **339**, 181-208.
- Maglóczky Z, Wittner L, Borhegyi Z, Halász P, Vajda J, Czirják S & Freund TF. (2000). Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* **96**, 7-25.
- Molnár G, Oláh S, Komlósi G, Füle M, Szabadics J, Varga C, Barzó P & Tamás G. (2008). Complex events initiated by individual spikes in the human cerebral cortex. *PLoS Biol* **6**, e222.

- Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW & Delgado-Escueta AV. (2012). *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, 4th edition*. Oxford University Press, USA, Bethesda, MD, USA.
- Reyes-Garcia SZ, Scorza CA, Araujo NS, Ortiz-Villatoro NN, Jardim AP, Centeno R, Yacubian EMT, Faber J & Cavalheiro EA. (2018). Different patterns of epileptiform-like activity are generated in the sclerotic hippocampus from patients with drug-resistant temporal lobe epilepsy. *Sci Rep* **8**, 7116.
- Schwartzkroin PA & Prince DA. (1978). Cellular and field potential properties of epileptogenic hippocampal slices. *Brain Res* **147**, 117-130.
- Szegedi V, Paizs M, Csákvári E, Molnár G, Barzó P, Tamás G & Lamsa K. (2016). Plasticity in Single Axon Glutamatergic Connection to GABAergic Interneurons Regulates Complex Events in the Human Neocortex. *PLoS Biol* **14**, e2000237.
- Tóth K, Wittner L, Urbán Z, Doyle WK, Buzsáki G, Shigemoto R, Freund TF & Maglóczky Z. (2007). Morphology and synaptic input of substance P receptor-immunoreactive interneurons in control and epileptic human hippocampus. *Neuroscience* **144**, 495-508.
- Uva L, Librizzi L, Wendling F & de Curtis M. (2005). Propagation dynamics of epileptiform activity acutely induced by bicuculline in the hippocampal-parahippocampal region of the isolated Guinea pig brain. *Epilepsia* **46**, 1914-1925.
- Wittner L, Eröss L, Czirják S, Halász P, Freund TF & Maglóczky Z. (2005). Surviving CA1 pyramidal cells receive intact perisomatic inhibitory input in the human epileptic hippocampus. *Brain* **128**, 138-152.
- Wittner L, Eröss L, Szabó Z, Tóth S, Czirják S, Halász P, Freund TF & Maglóczky Z. (2002). Synaptic reorganization of calbindin-positive neurons in the human hippocampal CA1 region in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* **115**, 961-978.
- Wittner L, Huberfeld G, Clémenceau S, Eröss L, Dezamis E, Entz L, Ulbert I, Baulac M, Freund TF, Maglóczky Z & Miles R. (2009). The epileptic human hippocampal cornu ammonis 2 region generates spontaneous interictal-like activity in vitro. *Brain* **132**, 3032-3046.
- Wittner L & Maglóczky Z. (2017). Synaptic Reorganization of the Perisomatic Inhibitory Network in Hippocampi of Temporal Lobe Epileptic Patients. *BioMed Research International* **2017**, 13.
- Wittner L, Maglóczky Z, Borhegyi Z, Halász P, Tóth S, Eröss L, Szabó Z & Freund TF. (2001). Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* **108**, 587-600.
- Wong RK & Traub RD. (1983). Synchronized burst discharge in disinhibited hippocampal slice. I. Initiation in CA2-CA3 region. *J Neurophysiol* **49**, 442-458.

Elemiszámok a különböző publikációkban (az értekezésben való leírás sorrendjében):

Hofer et al., 2015.

68 állat (patkány), 274 szelet
farmakológiai kísérletek: 5-10 szelet/farmakon
43 intracellulárisan elvezetett sejt
71 klaszterezett gátlósejt

Wittner and Miles 2007.

70 állat (tengerimalac), kb. 250 szelet
csak extracelluláris elvezetés: 40 szelet
farmakológiai kísérletek: 5-12 szelet/farmakon
egyidejű extra- és intracelluláris elvezetés: 62 sejt
16 feltöltött és 3 dimenzióban rekonstruált sejt

LeDuigou et al., 2005.

62 állat (egér), 80 szelet
(23 corticohippocampalis, 26 CA3 longitudinális, KA beadás után: 10 ipsilateralis, 15
contralateralis, 6 longitudinális hippocampalis szelet)
13 intracellulárisan elvezetett sejt
anatómia: 3 KA-injektált, 3 kontroll állat

Motti et al., 2010.

11 állat (egér): 6 KA-injektált, 3 NaCl-injektált, 2 kontroll

Wittner et al., 2006.

9 állat (patkány), 13 in vivo intracellulárisan töltött sejt

Wittner et al., 2007.

25 állat (patkány), 34 in vivo intracellulárisan töltött sejt
1 intracellulárisan töltött sejt 3 dimenziós rekonstruálása

Huberfeld et al., 2007.

27 epilepsziás páciens, 145 szelet
102 intracelluláris elvezetés
farmakológiai kísérletek: 4-5 szelet/farmakon
sejtszámolás 6 páciensből
13 intracellulárisan töltött sejt addicionális KCC2-festéssel

Wittner et al., 2009.

13 epilepsziás páciens, 1 kontroll, 2 kontroll majom (makákó)
20 szelet
19 intracelluláris elvezetés
3 intracellulárisan töltött sejt, abból 1 sejt 3 dimenziós rekonstrukciója
sejtszámolás 7 páciensből és a 2 majomból
elektronmikroszkópia: 3 epilepsziás páciens, 1 kontroll
elemzett sejttestek: kontroll: 28 sejt, nem szklerotikus epilepsziás minták: 21 és 18 sejt,
szklerotikus minta: 10 sejt

Tóth et al., 2018.

82 páciens (49 epilepsziás, 33 tumoros)
481 szelet (287 epilepsziás, 194 tumoros szövetből)
farmakológiai kísérletek: 4-9 szelet/farmakon/páciens csoport
33 intracellulárisan elvezetett sejt (17 epilepsziás, 16 tumoros szövetből)
9 intracellulárisan töltött sejt, abból 4 sejt 3 dimenziós rekonstrukciója
NeuN-sejtszámolás 2-2 páciensből (14 202 sejt epilepsziás, 8 633 sejt tumoros szövetből)
PV-sejtszámolás 3-3 páciensből
elektronmikroszkópia 3-3 páciensből (757 szinapszis epilepsziás, 679 szinapszis tumoros szövetből)

Kerekes et al., 2014.

7 páciens (4 epilepsziás, 3 tumoros)
22 szelet
Ca²⁺-szignál elvezetés: 55 sejt epilepsziás, 31 sejt tumoros szövetből
7 intracellulárisan elvezetett sejt, 2 sejt loose patch elvezetéssel
4 intracellulárisan töltött sejt, abból 1 sejt 3 dimenziós rekonstrukciója

Kandrás et al., 2019.

49 páciens (30 epilepsziás, 19 tumoros)
69 szelet (43 epilepsziás, 29 tumoros szövetből)
intracorticalis terjedés vizsgálata 12 szeletben
klaszterezett sejtek száma: 384 sejt epilepsziás (193 sejt/16 szelet/13 páciensből kontroll körülmények között, 191 sejt/18 szelet/15 páciensből BIC alatt), 349 sejt tumoros szövetben (182 sejt/14 szelet/11 páciens kontroll, 167 sejt/14 szelet/10 páciens BIC)

Wittner et al., 2005.

32 epilepsziás páciens, 3 kontroll
PV sejtszámolás 6 páciens, 3 kontroll
elektronmikroszkópia: 5 páciens, 3 kontroll

Karlócai et al., 2006.

32 epilepsziás páciens, 12 kontroll
Western blot: 9 páciens, 4 kontroll
elektronmikroszkópia: 3 páciens, 2 kontroll (3 hippocampalis terület: GD, CA3, CA1)

Wittner és Maglóczky 2017.

Összefoglaló cikk kiegészítve új adatokkal és ábrákkal (Ludányi et al., 2008, Maglóczky et al., 2010, Wittner et al., 2001, 2002, 2005, 2009)
Összesen kb. 35 epilepsziás páciens és 12 kontroll
elektronmikroszkópia összesen kb. 12 páciens és 4 kontroll