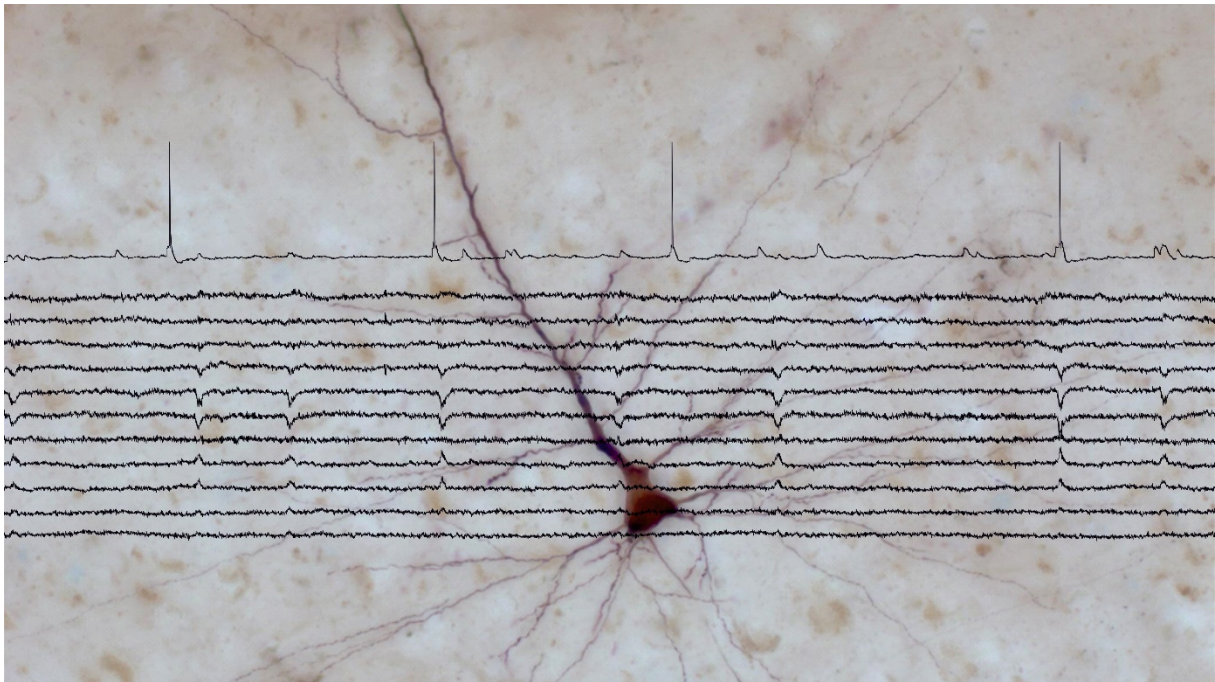


Fiziológiás és epilepsziás szinkronizációs folyamatok vizsgálata humán és rágcsáló agykéregben



Dr. Wittner Lucia

Eötvös Loránd Kutatási Hálózat

Természettudományi Kutatóközpont

Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézet

Integratív Idegtudományi Csoport

Budapest, 2021.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1 Bevezetés.....	7
1.1 Epilepszia, rohamok és interiktális tüskék.....	7
1.2 A hippocampus és a neocortex anatómiája, illetve azok elváltozásai epilepszia esetén.....	11
1.2.1 A neocortex szerkezete	11
1.2.2 A hippocampus szerkezete.....	12
1.2.3 A gátló interneuronok	15
1.2.4 A hippocampalis sclerosis.....	17
1.2.5 A focalis corticalis dysplasia	17
1.3 Állatmodellek: in vivo, ex vivo és akut in vitro modellek	20
1.4 Rágcsálók hippocampusában és neocortexében megfigyelhető szinkron események	21
1.4.1 Éles hullám-ripple komplexumok	21
1.4.2 Epilepsziás aktivitás	24
1.5 A humán hippocampusban és neocortexben megjelenő epilepsziás aktivitás.....	25
1.6 Humán kontroll kérdése.....	33
2 Célkitűzések.....	35
3 Módszerek.....	39
3.1 Páciensek.....	39
3.2 Anatómiai módszerek.....	39
3.3 Epilepszia modellek	40
3.4 Genetikai profil vizsgálata	40
3.5 Elektrofiziológiai módszerek	40
3.6 Két-foton mikroszkópia	41
3.7 Adatanalízis	41
4 Eredmények.....	43
4.1 Rágcsálók hippocampusában megjelenő fiziológiás és epileptiform aktivitás.....	43
4.1.1 Fiziológiás éles hullám keletkezési mechanizmusai	43
4.1.2 Epileptiform aktivitások keletkezése.....	49
4.1.3 Hippocampalis szinkron aktivitások anatómiai háttere rágcsálókban	66
4.2 Az emberi hippocampusban megjelenő interiktális aktivitás	72
4.2.1 A subiculumban keletkező interiktális tüskék	73
4.2.2 A hippocampus CA2 régiójában megjelenő interiktális tüskék	77
4.2.3 A humán hippocampusban megjelenő epilepsziás aktivitás anatómiai háttere.....	84
4.3 Az emberi nagyagykéregben megjelenő fiziológiás és epileptiform aktivitás	96
4.3.1 Fiziológiás szinkron populációs aktivitás és spontán interiktális tüske	96

4.3.2	Epileptiform aktivitások keletkezési mechanizmusai.....	107
5	Következtetések	121
5.1	A hippocampus és a neocortex közti különbségek in vitro preparátumokban.....	121
5.2	Ember és állat közti különbségek	122
5.3	Az epilepsziamodellek és az emberi betegség közti különbségek	123
6	Összefoglalás	125
7	Köszönetnyilvánítás.....	128
8	Irodalom	130
9	A doktori értekezés alapjául szolgáló saját közlemények	142
10	Az értekezéshez fel nem használt, epilepsziával és szinkronizációs folyamatokkal foglalkozó saját publikációk.....	144
11	Publikációs mutatók a tézisek beadásakor.....	146

Fedőlap ábrája: Humán neocorticalis 5. rétegi piramissejt, egy tumoros, nem epilepsziás betegből. Egyidejű intra- és sokcsatornás extracelluláris elvezetés, háttérben az intracellulárisan elvezetett és töltött sejt fénymikroszkópos képe.

Rövidítések jegyzéke

4-AP – 4-amino-piridin

AIS – axon iniciális szegmentum

AMPA – α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

AP – akciós potenciál

APV – (2R)-amino-5-phosphonovaleric acid, or (2R)-amino-5-phosphonopentanoate, NMDA receptor antagonist

BAPTA – 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, Ca^{2+} -kelátor

BIC – bicuculline, GABA_A receptor antagonist

CA1-3 – cornu Ammonis 1-3 régiók

CaMKII α – Ca^{2+} /calmodulin-dependens kináz II α alegysége

CB – calbindin

CB1 – 1-es típusú cannabinoid receptor

CCK – cholecystokinin

CD – contralateralis dorsalis

CR – calretinin

CSD – current source density, áramforrás sűrűség

CV – contralateralis ventralis

DAB – di-amino-benzidin

DCG-IV – metabotróp glutamát receptor 2/3 alegység specifikus agonista

EC – entorhinal cortex

ECoG – electrocorticogram

EEG – elektroencephalogram

FCD – focalis corticalis dysplasia

GABA – γ -amino-vajsav

GCL – granule cell layer, szemcsesejt réteg

GD – gyrus dentatus

GFAP – glial fibrillar acidic protein, gliális fibrillaris savas protein

H – hilus

HFO – high frequency oscillation, magas frekvenciás oszcilláció

HC – hippocampus

HS – hippocampalis sclerosis

HYP – hypersynchronous onset seizure, hiperszinkron kezdetű roham

IB-PC – intrinsically bursting pyramidal cell, belső tulajdonságai alapján burst-ölő piramissejt

IC – intracelluláris
ID – ipsilateralis dorsalis
IID – interictal-like discharge, spontán előforduló, in vitro interiktális-jellegű kisülés
IIS – interictal spike, diszinhibíció-indukált in vitro interiktális-jellegű túske
IISP – interictal spike, in vivo mért interiktális túske
IN – interneuron
IPSP – inhibitory postsynaptic potential, gátló posztzinaptikus potenciál
IV – ipsilateralis ventralis
KA – kainic acid, kainát
KCC2 – K^+ - Cl^- cotransporter 2, 2-es típusú kálium-klorid kotranszporter
LFP – local field potential, mezőpotenciál
LFPg – local field potential gradient, mezőpotenciál grádiens
LM – stratum lacunosum-moleculare
LVF – low voltage fast onset seizure, alacsony feszültségű. gyors kezdetű roham
M – str. moleculare
MC – mossy cell, mohasejt
MF – mossy fiber, moharost
mGluR – metabotróp glutamát receptor
mGluR1 α – metabotróp glutamát receptor 1 α alegység
mHS – mild hippocampalis sclerosis, gyenge hippocampalis sclerosis
MR – mágneses rezonancia
mRNS – messenger ribonukleinsav
MT – mossy terminal, mohaterminális
MUA – multiple unit activity, soksejt aktivitás
NBQX – 2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline, AMPA/KA receptor antagonist
NeuN – neuronális marker
NKCC1 – Na^+ - K^+ - Cl^- cotransporter 1, 1-es típusú nátrium-kálium-klorid kotranszporter
NMDA – N-metil-D-aszpartát
NoEpi – no epilepsy, nem epilepsziás betegek csoportja
NoMed – no medication, antiepileptikumot nem kapott betegcsoport, akinek volt rohama
OGB-1-AM – Oregon Green 488 BAPTA-1 acetoxymethyl ester, sejt permeábilis Ca^{2+} -kelátor festék
O – stratum oriens
O-LM – oriens-lacunosum-moleculare interneuron
P – stratum pyramidale
PC – pyramidal cell, piramissejt

PCL – pyramidal cell layer, piramissejt réteg

PDS – paroxysmal depolarization shift, paroxysmalis depolarizációs eltolódás

PHC – parahippocampal gyrus

PV – parvalbumin

R – str. radiatum

Re – stratum radiatum externum, külső

ResEpi – therapy resistant epilepsy, terápiarezisztens epilepszia

Ri – stratum radiatum internum, belső

RS-PC – regular spiking pyramidal cell, szabályosan tüzelő piramissejt

sHS – strong hippocampalis sclerosis, erős hippocampalis sclerosis

SOM – somatostatin

SPA – spontán populációs aktivitás

SPR – substance P receptor

SPW – sharp wave-ripple komplexum

SR-101 – sulphorhodamin 101, gliasejteket jelölő piros fluoreszcens festékanyag

str. – stratum, réteg

TFR – time-frequency plot, idő-frekvencia hisztogram

TLE – temporális lebeny eredetű epilepszia

TreatEpi – treatable epilepsy, gyógyszeresen kezelhető epilepszia

VIP – vasoactiv intestinalis peptid

1 Bevezetés

1.1 Epilepszia, rohamok és interiktális tüskék

Az epilepszia egy rendkívül heterogén betegségcsoportot jelent, melybe különböző eredetű, klinikai lefolyású és prognózisú betegségek, tünetegyüttesek tartoznak, melyekben az a közös, hogy epilepsziás rohamokkal járnak.

A Nemzetközi Epilepsziaellenes Liga (International League Against Epilepsy, ILAE) 2005-ben meghatározta az epilepsziás roham, és az epilepszia, mint neurológiai megbetegedés definícióit. Eszerint „az epilepsziás roham olyan jelek és/vagy szimptómák átmeneti előfordulása, melynek hátterében az agy patológiásan túlzott vagy szinkron neuronális aktivitása áll” (Fisher *et al.*, 2005). 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 (Fisher *et al.*, 2005; Fisher *et al.*, 2014). 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. Egyszerűnek hangzó kijelentés lehet, hogy a páciensnek „epilepsziás rohama” zajlott, de fontos megkülönböztetni az epilepsziás rohamokat a snycopétól, konvulzív snycopétól, a pszichogén (nem epilepsziás) rohamtól, vagy akár egy komplikált migrénes rohamtól. A diagnózis felállításakor több körülmény is hátráltathatja, hogy pontos képet kapjunk az epilepsziás rosszullétről, mivel a betegnek gyakran tudatzavara és amnéziája van a rohamra, így sokszor nem áll rendelkezésre kellő információ a rosszullétet illetően. Ha a diagnózis felállításához feltárjuk azokat az anatómiai vagy elektrofiziológiai jelenségeket, amelyek összefüggésben állhatnak az epilepsziával, akkor közelebb kerülhetünk a rosszullét megfelelő kategorizálásához. Ilyen jelenségek például az MR vizsgálattal kimutatható agykérgi fejlődési zavar (dysgenesis), egy agysérülés maradványai, vagy pedig az elektroencefalográfiás (EEG) elvezetéssel megjeleníthető speciális jelenségek (roham, és interiktális tüske), amelyek a módosult neurofiziológiai állapotot tükrözik (Trichlerné Gyimesi, 2016).

Az epilepsziás roham egy néhány másodperctől akár öt percig is tartó patológiás folyamat, amely hátterében a neuronok hosszantartó, túlzottan szinkron kisülése áll. Status epilepticus-nak nevezzük azt 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. A parciális rohamokat ezen felül aszerint is klasszifikálják, hogy tudatvesztéssel jár-e (komplex parciális roham) vagy sem (egyszerű parciális roham), illetve, hogy motoros, vagy nem motoros területek indítják. Külön kiemelendő egy speciális roham típus, a parciális indulású, másodlagosan generalizált tónusos-klónusos roham, amelyet régebben 'grand mal' rohamnak neveztek. A generalizált rohamokat is csoportosíthatjuk aszerint, hogy motoros vagy nem motoros területeket érint, az ismeretlen indulású rohamoknál pedig ezen felül megkülönböztetünk egy nem osztályozott roham típust is (Fisher *et al.*, 2017).

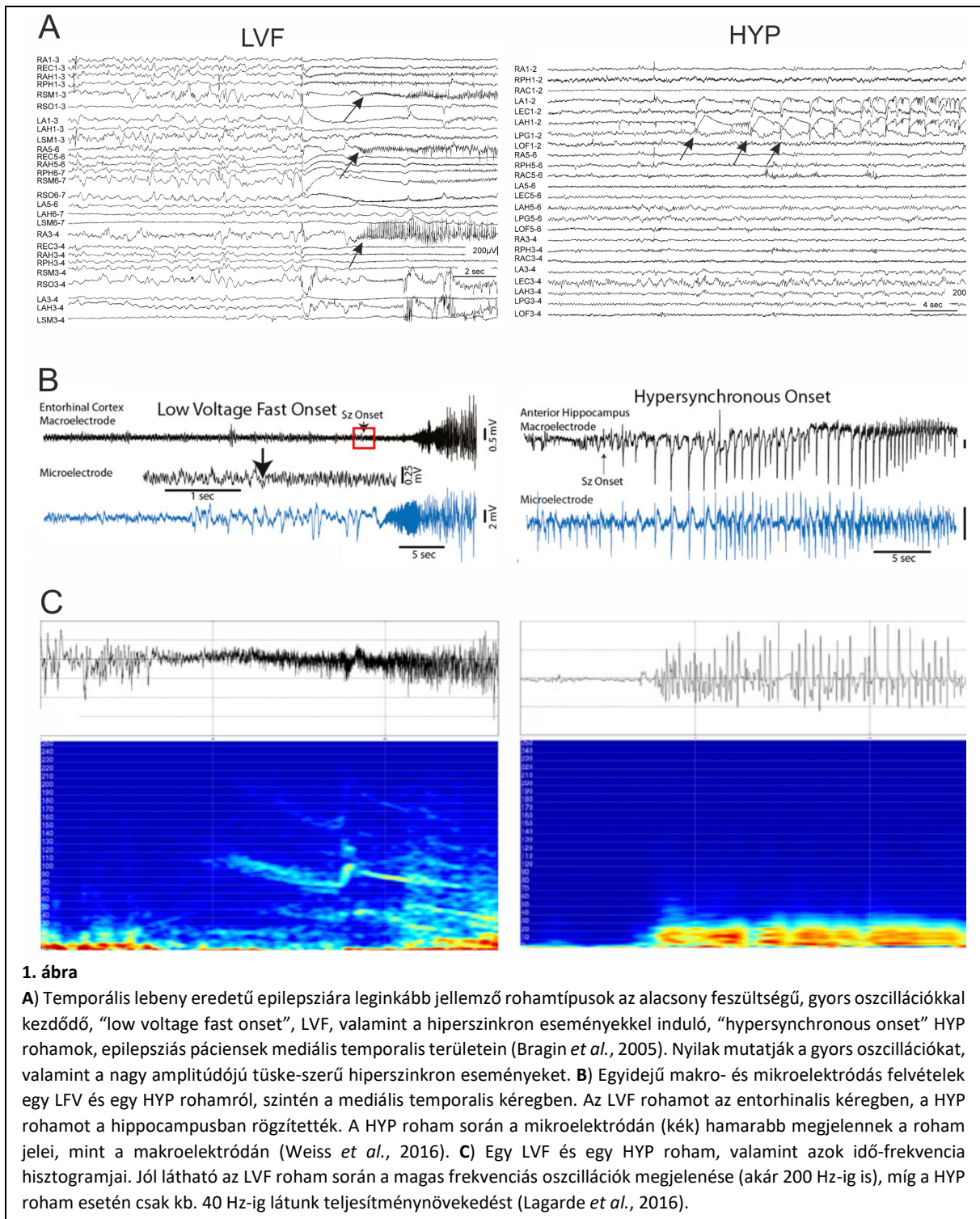
Az epilepsziás betegekben, a rohammentes időszakokban interiktális tüskék is megjelennek, melyek a skalp EEG-n egy nagy amplitúdójú tüskéből, és egy elnyújtottabb hullámból állnak. Az interiktális tüskék – a rohamok mellett – fontos diagnosztikai értékkel bírnak, mert az agyterületi eloszlásuk szorosan összefügg az epileptogén, vagyis az epilepsziás aktivitásokat generáló területtel (de Curtis & Avanzini, 2001). Szintén egyre gyakrabban alkalmazott diagnosztikai eszköz a magas frekvenciás oszcillációk (high frequency oscillation, HFO, >100 Hz) vizsgálata (Jefferys *et al.*, 2012). Míg a „ripple” (80-250 Hz) oszcillációkat fiziológias jelenségnek tartják, addig a „fast ripple” (250-600 Hz) sávban megjelenő aktivitást többnyire patológiásnak tekintik. Mind a ripple, mind a fast ripple oszcillációk adott agyterületen való megjelenése összeköthető az epileptogén zónával és a rohamindító területtel (Jiruska *et al.*, 2017).

Jelentős az összefüggés az epilepsziás rohamok kialakulása és az agyi tumorok jelenléte között. A tumorok előfordulása az epilepsziával diagnosztizált betegeknek kb. 5%, míg a tumoros betegeknek kb. 30% az esély, hogy epilepsziás rohamok alakulnak ki, bár ez az esély nagyban függ a tumor típusától és egyéb faktoroktól. A leginkább epileptogén tumorok közé tartoznak a gliális eredetű daganatok, melyek esetében az epilepszia előfordulási esélye az 50-100% közötti értéket is elérheti. A legkevésbé epileptogén daganatok pedig a test egyéb szerveit érintő elsődleges tumorok agyi metasztázisai (van Breemen *et al.*, 2007). Az epilepszia kialakulásának esélyét befolyásoló további tényezők a genetikai faktorok, az angiogenezis, a tumorok mikrokozonyát meghatározó tényezők, valamint a daganat elhelyezkedése. A corticalis tumorok esetén nagy valószínűséggel, míg a kisagyi és az agyalapi területeken elhelyezkedő tumorok esetén ritkán alakulnak ki rohamok. 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.

A temporális lebeny eredetű epilepszia (TLE) a leggyakoribb parciális epilepsziás tünetegyüttes, többnyire fokális rohamokkal jár, melyek sok esetben másodlagosan generalizálódnak (Fisher *et al.*,

2017). Az epileptogén terület a temporális lebenyben található, és legtöbbször a hippocampus is érintett. Többféle rohamindulási mintázatot szoktak megkülönböztetni (1. ábra), ezek közül a leggyakrabban előforduló az alacsony feszültségű, gyors kezdetű roham (low voltage fast onset seizure, LVF), mely egy nagyobb tüskével, és magas frekvenciás oszcillációkkal indul, valamint a hiperszinkron indulású roham (hypersynchronous onset seizure, HYP), mely ritmusosan kialakuló túsorosozattal indul (Bragin *et al.*, 2005; Weiss *et al.*, 2016). Gyakori patológia ezeknél a betegeknél a hippocampalis sclerosis, a gyermekkorban elszenvedett lázgörcs, fejsérülés, corticalis fejlődési rendellenességek (dysgenesis) és tumorok. A frontális lebeny eredetű epilepszia a második leggyakoribb parciális tünetegyüttes, amely a frontális lebenyből indul, és általában fokális rohamokkal jár (Menghi *et al.*, 2018). Leggyakoribb típusa az alvás során jelentkező, motoros tevékenységekkel járó roham (sleep-related hypermotor seizure, SHE). Az okok között első sorban agyi daganatok és dysgenesisek szerepelnek. 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.

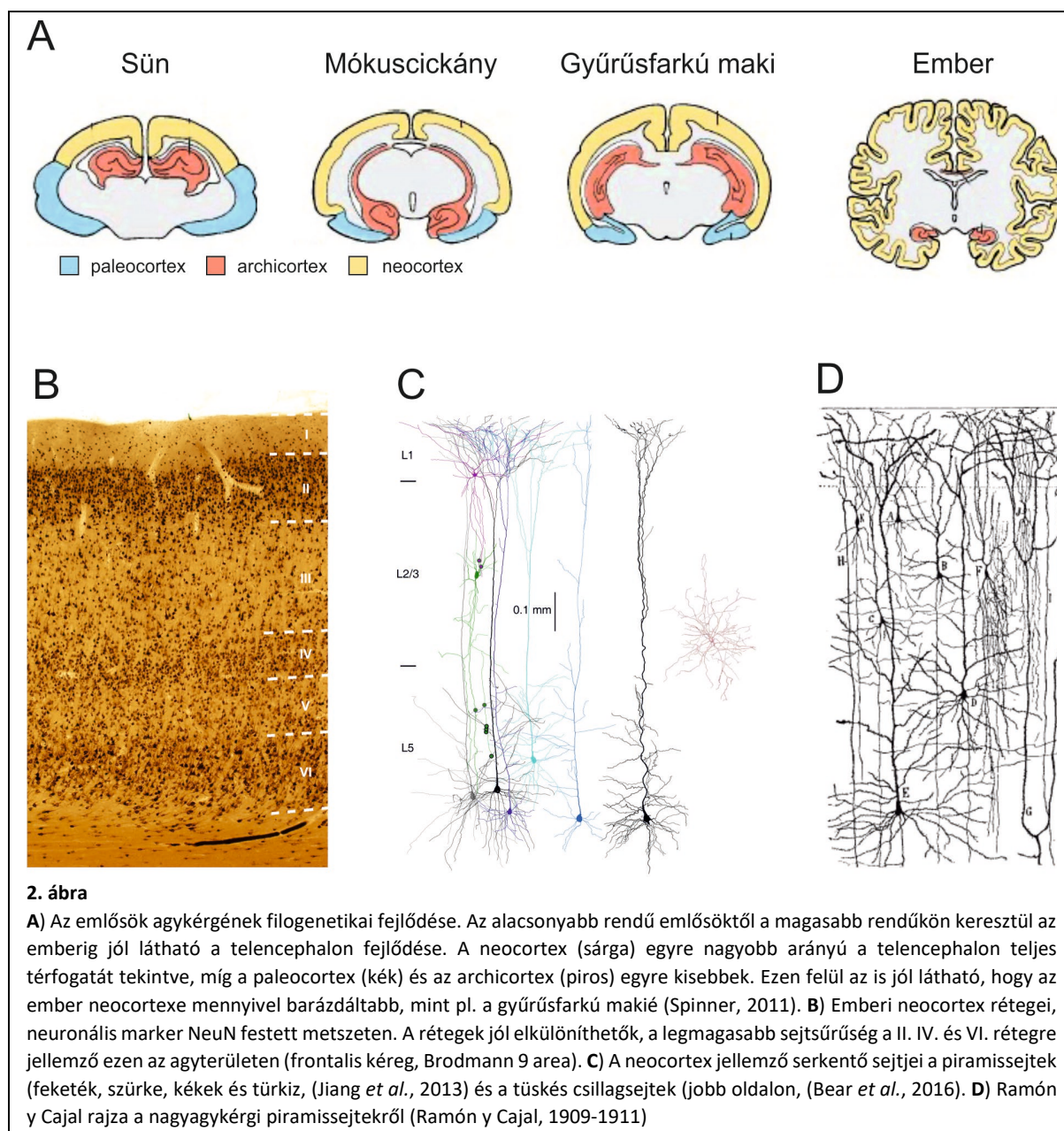
A legkevésbé epileptogén tumorok a vékony agyhártyákat érintő tumorok, az elsődleges központi idegrendszeri limfóma és az egyéb szerveket érintő daganatok agyi metasztázisai. Kutatásaink szempontjából jelentős ez az etiológiailag heterogén csoport, mert így olyan betegekből kaphatunk neocorticalis mintákat, akiknek nem volt rohamuk, és epilepszia szempontból kontroll csoportnak tekinthetők. Amikor a tumor az agy bázisán, vagy mediális subcorticalis területeken helyezkedik el, sebészeti technikai okok miatt egészségesnek tekinthető nagyagykérgi területek is eltávolításra kerülhetnek.



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

1.2.1 A neocortex szerkezete

Az emlősök agykérgét a sejtés rétegek számától függően két részre szokták osztani. Az ősi, 3-4 rétegű allocortex további két részre, az archicortexre és a paleocortexre osztható (2. ábra). Az archicorticalis régiók a piriform kéreg és a hippocampus, míg a paleocortex a szaglással kapcsolatos kérgi területek összessége. Az újabb, evolúció során később kialakult kérgi terület a neocortex, amely a teljes agyszövet tömegének jelentős hányadát teszi ki. Míg az evolúciós szempontból alacsonyabb rendű emlősökben a neocortex az agy 20%-át adja, addig ez az érték emberben a 80%-ot is eléri (Kaas, 2011). A neocortex 6 rétegű, moduláris szerkezetű kérgi terület, komplex összeköttetési mintázattal (2. ábra). Serkentő sejtjei a II-III. és V-VI. rétegi piramissejtek és a IV. rétegben található tüskés csillagsejtek (tüskés közti neuronok), melyek az összes neuron kb. 80%-át teszik ki. A piramissejtek nagy része kivetít az adott kérgi területről, kivéve a II. rétegieket, amelyek inkább helyi axonkollaterálisokat adnak, akárcsak 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 különböző funkciókat betöltő kérgi területek, amelyek száma akár a 200-at is elérheti emberben, specifikus bemenetet kapnak a különböző subcorticalis és egyéb corticalis területekről. A különböző sejtípusok eloszlása, a belső kapcsolatrendszer és a szinaptikus kimenet is az adott régióra jellemző mintázatot követ. Ez 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. (Szentágothai & Réthelyi, 2003)



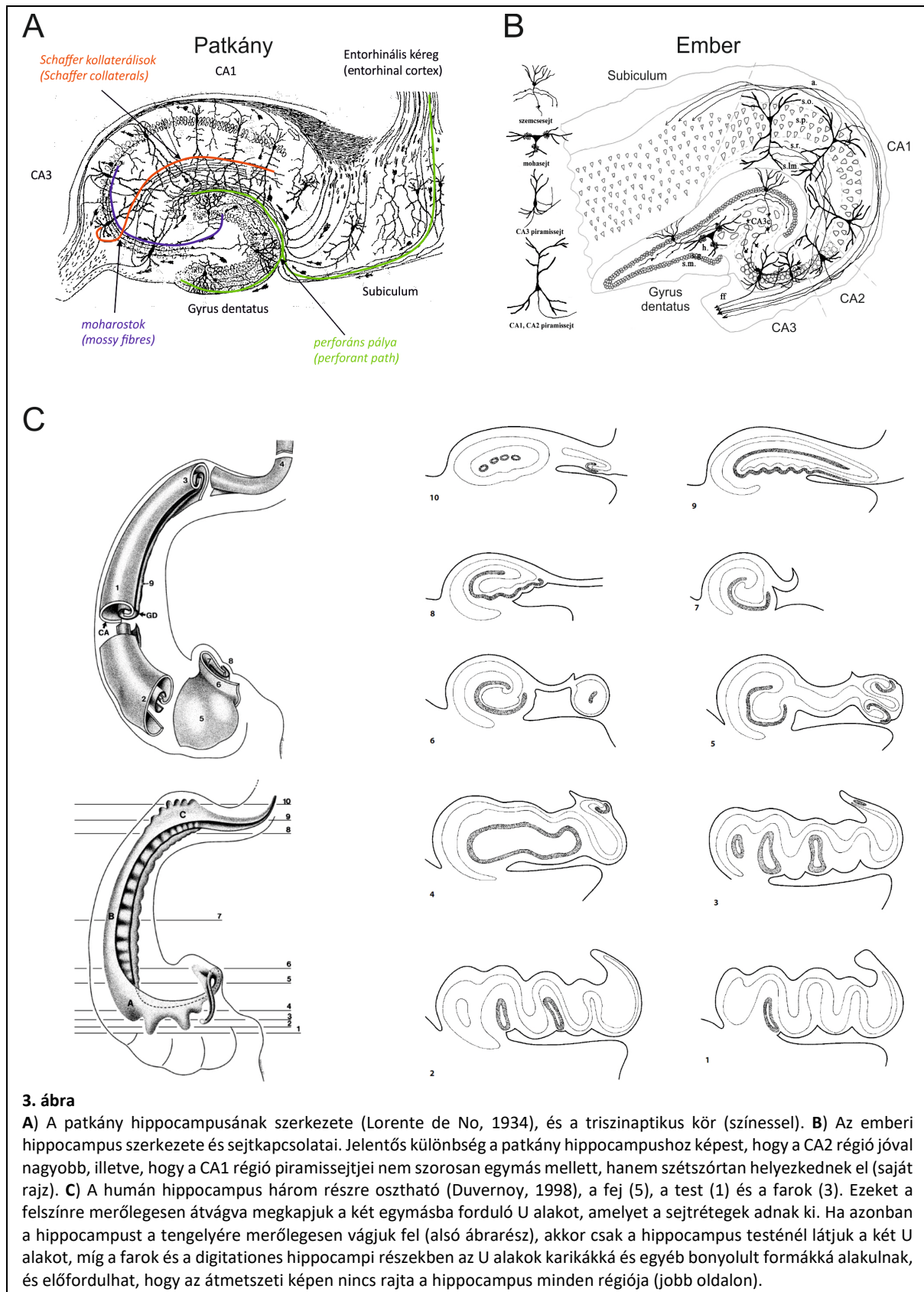
2. ábra

A) Az emlősök agykérgének filogenetikai fejlődése. Az alacsonyabb rendű emlősöktől a magasabb rendűkön keresztül az emberig jól látható a telencephalon fejlődése. A neocortex (sárga) egyre nagyobb arányú a telencephalon teljes térfogatát tekintve, míg a paleocortex (kék) és az archicortex (piros) egyre kisebbek. Ezen felül az is jól látható, hogy az ember neocortexe mennyivel barázdáltabb, mint pl. a gyűrűsfarkú makié (Spinner, 2011). **B)** Emberi neocortex rétegei, neuronális marker NeuN festett metszeten. A rétegek jól elkülöníthetők, a legmagasabb sejtsűrűség a II. IV. és VI. rétegre jellemző ezen az agyterületen (frontalis kéreg, Brodmann 9 area). **C)** A neocortex jellemző serkentő sejtjei a piramis sejtek (feketék, szürke, kékek és türkiz, (Jiang *et al.*, 2013) és a tüskés csillagsejtek (jobb oldalon, (Bear *et al.*, 2016). **D)** Ramón y Cajal rajza a nagyagykérgi piramis sejtekről (Ramón y Cajal, 1909-1911)

1.2.2 A hippocampus szerkezete

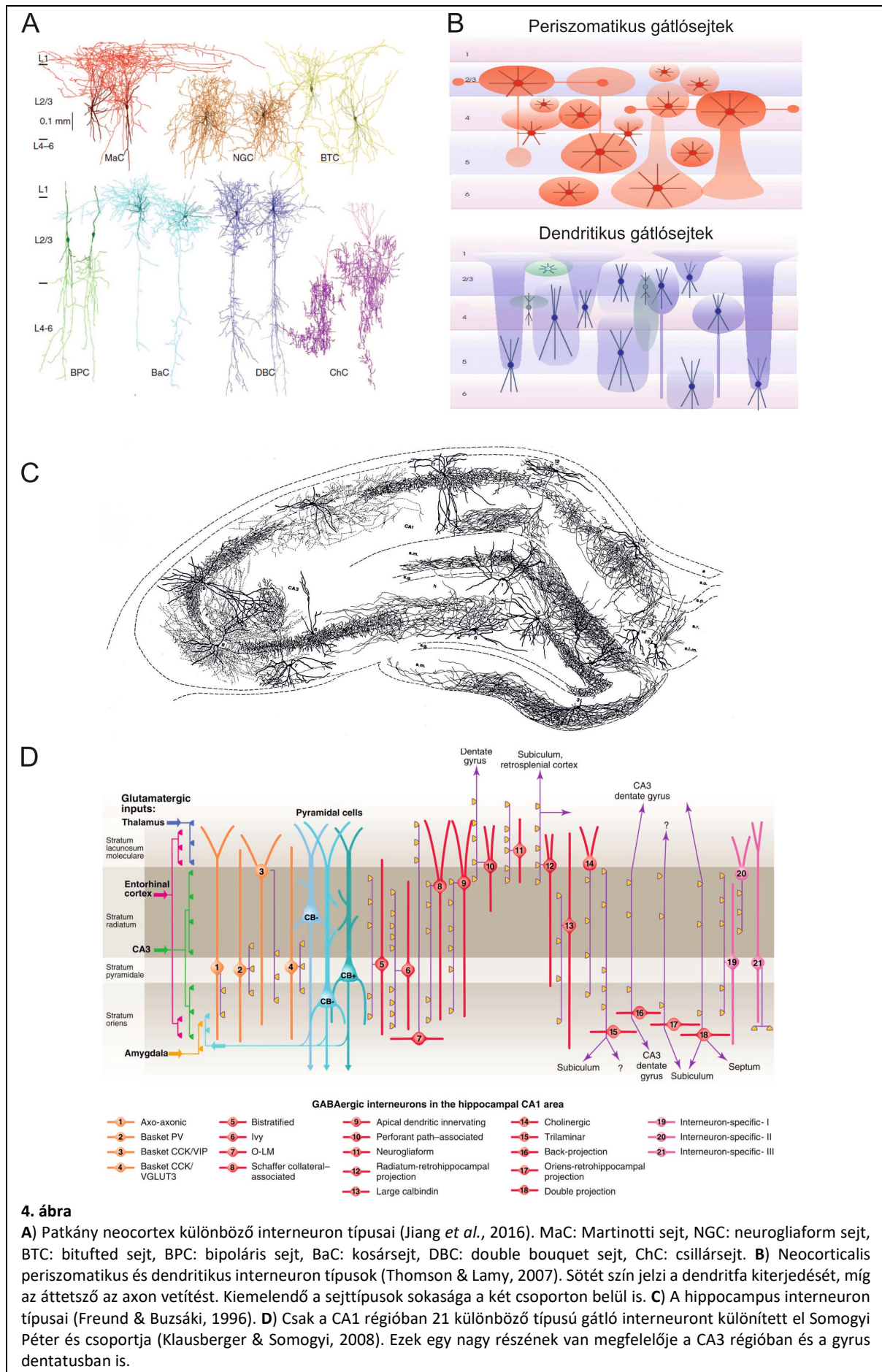
A hippocampus az agy filogenetikailag ősbibb részének, az archicortexnek a tagja. Emberben a mediális temporális kéregben helyezkedik el, és három nagyobb részre szokták osztani (3. ábra): a hippocampus feje (digitationes hippocampi), a hippocampus teste (pes hippocampi) és a hippocampus farka (cauda hippocampi). Speciális szerkezetű, három rétegű kérgi szerv. Az elnevezések a szakirodalomban nem teljesen tiszták. A hippocampus megnevezés alatt gyakran a formatio hippocampit, más esetekben pedig a szűkebb értelemben vett hippocampust értik. A formatio

hippocampi három nagyobb terület együttesét takarja, a gyrus dentatust (GD), az Ammonszarvat, vagy cornu Ammonist, és a subiculumot. A subiculum a nagyagy felé való kimenetet adja, és a szűkebb értelemben vett hippocampusba nem tartozik bele. A szűkebb értelemben vett hippocampus két nagyobb területe, a GD és a cornu Ammonis, melyek két egymásba forduló U alakot formálnak. A cornu Ammonist további három régióra, a CA1, CA2 és CA3 régiókra különítjük el. A CA3 régió helyezkedik el a GD-hoz legközelebb, a CA1 régió pedig a subiculumban folytatódik. A GD két szára közé benyúló rész a CA3c, a fimbria környékén található a CA3b, a CA2 régióhoz legközelebb eső rész pedig a CA3a régió. 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 piramissejtek. 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 (3. ábra). A szomszédos neocorticalis terület, az entorhinalis kéreg adja a GD bemenetének nagy részét (perforáns pálya). A szemcsesejtek axonjai, a moharostok a mohasejtekre és a CA3 régió piramissejtjeire adnak szinapszisokat, míg a mohasejtek szintén a CA3 régió piramissejtjeire adnak terminálisokat, valamint visszavetítenek a GD molekuláris rétegébe és a szemcsesejtek dendritjeivel szinaptizálnak. A CA3 piramissejtek a rekurrens kollaterálisakon keresztül jelentős beidegzést adnak egymásnak, míg a Schaffer-kollaterálisnak nevezett axonjaik átnyúlnak a CA1 régióba és ott szinaptizálnak a piramissejtekkel. A CA1 piramissejtek egymásra alig, vagy nem adnak szinapszist, a subiculumba és az entorhinalis kéregbe vetítenek vissza (Lorente de No, 1934). A hippocampus így, a speciális kapcsolatrendszerével alkalmas a külvilágból érkező információk integrálására, a memórianyomok kialakítására és továbbítására a nagyagykéreg felé (Buzsáki, 2015). 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.



1.2.3 A gátló interneuronok

A neocortexben és a hippocampusban egyaránt, a gátló interneuronok három nagyobb funkcionális csoportját szokták megkülönböztetni (4. ábra): 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. A periszomatikus gátlósejteket 3 nagyobb alcsoportra szokták elkülöníteni, a parvalbumin (PV)-tartalmú kosársejtekre, a szintén PV-pozitív axo-axonikus, vagy más néven csillársejtekre és a cholecystokinin (CCK)/1-es típusú cannabinoid receptor (CB1)-tartalmú kosársejtekre (Freund & Buzsáki, 1996), melyek a principális sejtek kimenetét szabályozzák (Miles *et al.*, 1996). Míg a PV+ sejtek elsősorban a precíz óraszerű szinkronizációért felelősek, addig a CCK+/CB1+ kosársejtek inkább a finomhangolást végzik a corticalis oszcillációk során (Freund & Katona, 2007). A dendritikus gátlósejtek a principális sejtek dendritjeire adnak szinapszisokat, vagy csak azok egyes szakaszaira specializálódnak. Sokkal heterogénebb csoport, mint a periszomatikus gátlósejtek, elhelyezkedésük, neurokémiai markereik, be- és kimenetük alapján szokták osztályozni őket. A sokféle osztályozási rendszer egységesítésére történtek törekvések (Petilla Interneuron Nomenclature *et al.*, 2008), de a dendritikus gátlósejtek csoportja továbbra is nagy számú, különböző típusú sejteket tartalmaz. A hippocampusnak csak a CA1 régiójában 14 altípust különböztetett meg Somogyi Péter kutatócsoportja (Klausberger & Somogyi, 2008), míg a neocortexben elhelyezkedés, morfológia, neurokémiai marker és kimeneti mintázat alapján valószínűleg ennél jóval többet lehet elkülöníteni (Thomson & Lamy, 2007). A dendritikus gátlósejtek közös tulajdonsága, hogy elsősorban a principális sejtek dendritjeire érkező serkentő bemenetet szabályozzák (Miles *et al.*, 1996). Az interneuron-szelektív gátlósejtek a kérgi interneuronok harmadik nagy funkcionális csoportja, melyet szintén három alcsoportra szoktak osztani. Egyik alcsoport a calretinin-tartalmú interneuronok, a másik két alcsoport pedig vasointestinal peptide (VIP)-pozitív interneuronokat tartalmaz, melyek kimeneti mintázatukban különböznek. Specifikusan más interneuronokat idegeznek be, és nagy valószínűséggel a nagyobb sejtpopulációk szinkronizálását végzik (Freund & Buzsáki, 1996). Természetesen a különböző emlősfajok között vannak különbségek a gátlósejtek tekintetében is, de a különböző funkciójú interneuron csoportok megtalálhatók mind emberben, mind rágcsálókban.

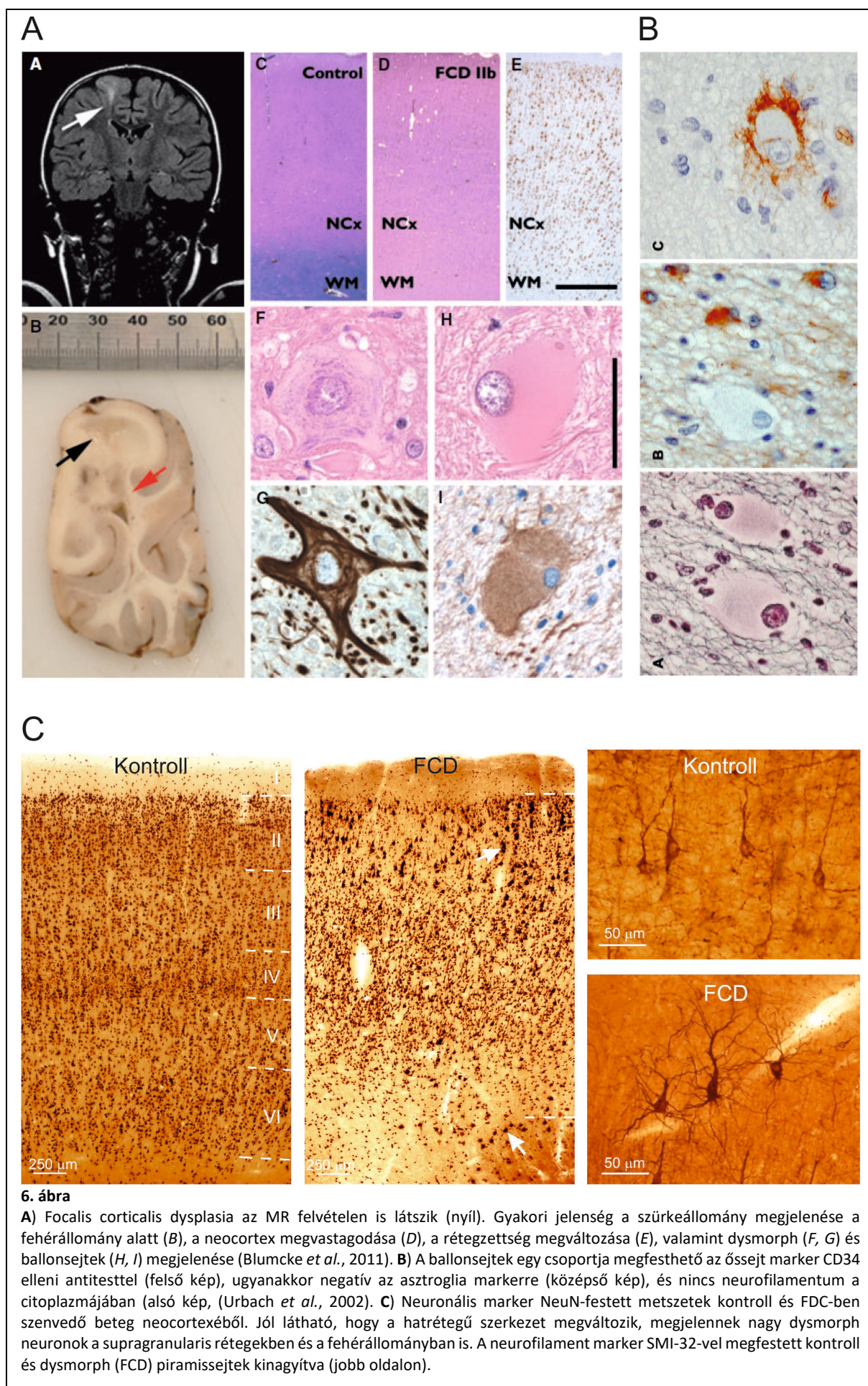


1.2.4 A hippocampalis sclerosis

A hippocampalis sclerosis (HS) jelensége nagyon gyakori patológia a TLE betegek esetén (5. ábra). A HS a páciensek MR felvételén is látszódik, és a hippocampus atrófiáját jelenti. A különböző hippocampalis régiók nem egyformán érintettek, a CA1 régió piramis sejteit 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. HS esetén azonban a GD szemcsesejtjei gyakran szétvándorolnak, és a hippocampus minden régiójában kimutatható az egyes interneuron típusok szelektív pusztulása, valamint mind a principális sejtek, mind az interneuronok neurokémiai markereinek megváltozása (Maglóczy, 2010). A betegek egy részében az MR felvételen nem mutatható ki a HS. 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 (Maglóczy & Freund, 2005). Egyes esetekben a CA1 régióban a piramis sejtek foltokban pusztulnak (Wittner *et al.*, 2005), a szemcsesejtek szétvándorolnak (Houser, 1990), a szemcsesejtek és egyes interneuronok axonjai sarjadzanak (Wittner *et al.*, 2001; Wittner *et al.*, 2002). Azokat a pácienseket, akiknél a hippocampus nem volt atrófiás, az irodalmi adatoknak megfelelően „mild hippocampal sclerosis” (mHS), míg a klasszikus HS morfológiáját mutató pácienseket pedig „strong hippocampal sclerosis” (sHS) néven fogom említeni a továbbiakban. A foltos sejtpusztulást mutató nem scleroticus eseteket egyes munkáinkban külön csoportként vizsgáltuk, így foltos sejtpusztulást mutató mHS esetekként fogok rá hivatkozni.

1.2.5 A focalis corticalis dysplasia

A dysgenesisek egyik leggyakoribb formája, a focalis corticalis dysplasia (FCD) a neocortex érintő fejlődési rendellenesség (6. ábra), amely igen epileptogén. Neuropatológiai szempontból több alcsoportra osztható, aszerint, hogy a neocortex felépítése és rétegzettsége mennyire sérült (Blumcke *et al.*, 2011). A neuronok a neocortex rétegeivel párhuzamosan, vagy azokra merőlegesen szétvándorolnak, bevándorolnak a fehérállományba, a rétegzettség eltűnik, illetve új sejtípusok jelennek meg, mint a pl. a ballonsejtek, vagy a cytomegalias neuronok. Az FCD általában azonosítható a képalkotó eljárásokkal végzett vizsgálatokban, és sebészi eljárással többnyire jól csökkenthető a páciensek rohamainak száma (Crino, 2015).



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

Mind a rohamok, mind az interiktális tüskék keletkezési mechanizmusainak vizsgálata elősegíti annak megértését, hogy epilepszia esetén hogyan alakul ki a jellegzetes túlzott serkenthetőség és a túlzott szinkronitás. 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: alumíniummal, kobalttal vagy cinkkel lehet kiváltani, komplex parciális rohamokat a glutamát receptor agonista kainát, vagy a Na^+ -csatorna blokkoló tetanus toxin beadásával, valamint repetitív elektromos ingerléssel (ún. kindling modell) 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 GABAa receptor antagonistá bicuculline-t injektálnak a megfelelő agyterületre, valamint megvonják a GABÁ-t a motoros kéregbe való krónikus beadást követően (Rubio *et al.*, 2010).

Az in vivo modelleken kívül több akut, in vitro farmakológiai modell is létezik. Ez utóbbiak esetén egészséges állatok agyszeteit vizsgálják in vitro körülmények között, melyekben epilepsziás eseményeket idéznek elő, többnyire az átáramoltatott folyadék módosításával. A GABAa receptorok blokkolásával (gabazine-t, picrotoxint vagy bicuculline-t tartalmazó oldattal) és a K^+ -áramok módosításával (magas extracelluláris K^+ -koncentrációjú oldattal, vagy a feszültség-függő K^+ -csatorna blokkoló 4-aminopiridinnel, 4-AP) interiktális-jellegű tüskék megjelenése indukálható neocorticalis és hippocampalis túlélő szeletekben. Az NMDA-típusú glutamát receptorokon átfolyó áramok megnövelésével (alacsony vagy 0 mM Mg^{2+} -tartalmú tápoldattal), valamint a kainát típusú glutamát receptorok agonistáinak hozzáadásával (pl. kainátot tartalmazó oldat) epilepsziás rohamokhoz hasonló események válthatók ki in vitro körülmények között rágcsálók corticalis szeletpreparátumaiban. 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 McCormick & Contreras, 2001).

1.4 Rágcsálók hippocampusában és neocortexében megfigyelhető szinkron események

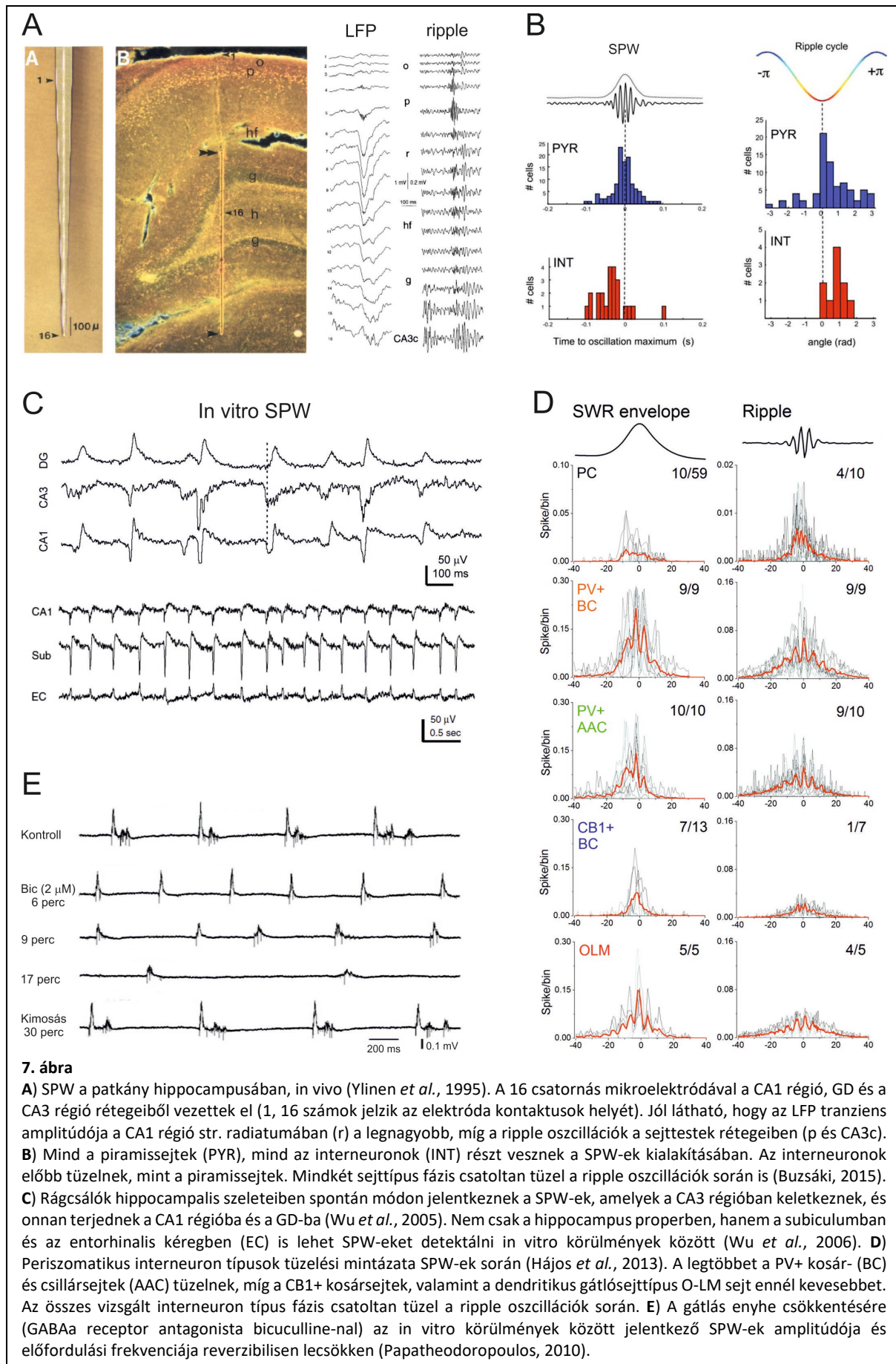
1.4.1 Éles hullám-ripple komplexumok

A rágcsálók hippocampusában igen jellegzetes éles hullám-ripple komplexumok (sharp wave ripple complex, SPW, 7. ábra) jelennek meg lassú hullámú alvás és éber mozdulatlanság alatt (Buzsáki, 1986). Nevének megfelelően ez egy nagy amplitúdójú éles hullámot jelent, amelynek a csúcsán egy kb. 200 Hz-es „ripple” oszcillációs aktivitás jelenik meg (Ylinen *et al.*, 1995). E szinkron eseményeknek fontos szerepet tulajdonítanak a memórianyomok kialakulásában és továbbításában az extrahippocampalis területek felé. A SPW-ek, mint neuronális populációs események, alkalmasak arra, hogy a hippocampus által megkapott és feldolgozott információt „kis csomagocskába” rendezzék, amelyek ilyen formán haladnak egyik helyről a másikra (Buzsáki, 2006). Rágcsálók hippocampusából készített túlélő szeletekben nagyon hasonló szinkron jelenségek regisztrálhatók, melyek az élő állatban található folyamatok jó modelljének tekinthetők (7. ábra). Az *in vitro* modellek használatával nyert adatok sokat tettek hozzá a SPW-ek kialakulási mechanizmusainak megértéséhez (összefoglalásként lásd Buzsáki, 2015).

A kutatócsoportok a modelltől függetlenül abban megegyeznek, hogy akárcsak az élő állatban, a CA3 régió játssza a központi szerepet a SPW-ek kialakításában *in vitro* körülmények között is (7. ábra). Több *in vitro* modellben a gyurus dentatusban, a CA1 régióban, illetve a subiculumban és az entorhinális kéregben is kimutattak SPW-eket, amíg teljes hippocampust tartalmazó szeleteket vizsgáltak, de a legtöbb modellben, ha ezeket a régiókat izolálták a CA3 régiótól, akkor nem tudtak SPW-eket detektálni. Szinte minden modell megegyezik abban, hogy mind a glutamáterg, mind a GABAerg rendszer szerepet játszik a SPW-ek generálásában. *In vitro* kísérletek támasztják alá, hogy az AMPA- és a kainát receptorok aktivációja nélkülözhetetlen a SPW-ek kialakulásához, míg az NMDA-receptorok szerepéről ellentétes adatok láttak napvilágot. A GABA_A receptorok szerepének vizsgálata nem egyszerű, mert a hippocampalis piramissejtek diszinhibíciója könnyen epilepsziás aktivitás kialakulásához vezet. A GABA_A receptorok agonistáinak és antagonistáinak alkalmazása is ellentmondásos eredményeket hozott. Egyes agonisták, mint pl. a pentobarbitál dózisfüggő módon csökkentik, vagy növelik a SPW-ek előfordulásának frekvenciáját és/vagy amplitúdóját, de azt is kimutatták, hogy a GABA_A receptor antagonistá bicuculline hatására a SPW-ek amplitúdója megnőtt *in vivo* körülmények között, míg jelentősen lecsökkent *in vitro* kísérletek során. A különböző agonisták és

antagonisták hatására bekövetkező változások nagy valószínűséggel összefüggnek a receptor alegység-összetételével (Buzsáki, 2015).

Talán közelebbi képet kaphatunk a SPW-ek kialakulási mechanizmusairól, ha a serkentő és gátló neuron populációk tüzelési mintázatait vizsgáljuk (7. ábra). Mind in vivo, mind in vitro körülmények között a piramissejtek kis része aktiválódik és általában burst-ben tüzel a SPW-ek során, míg a többség inkább gátlódik. Nagy általánosságban, 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-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. A PV-tartalmú kosársejtek azok, amelyek a SPW-ek csúcán jelentkező ripple oszcillációkat is vezérlik, de a SPW-ekben részt vevő interneuronok és piramissejtek szintén fázis-csatoltan tüzelnek a ripple oszcilláció során (Buzsáki, 2015).

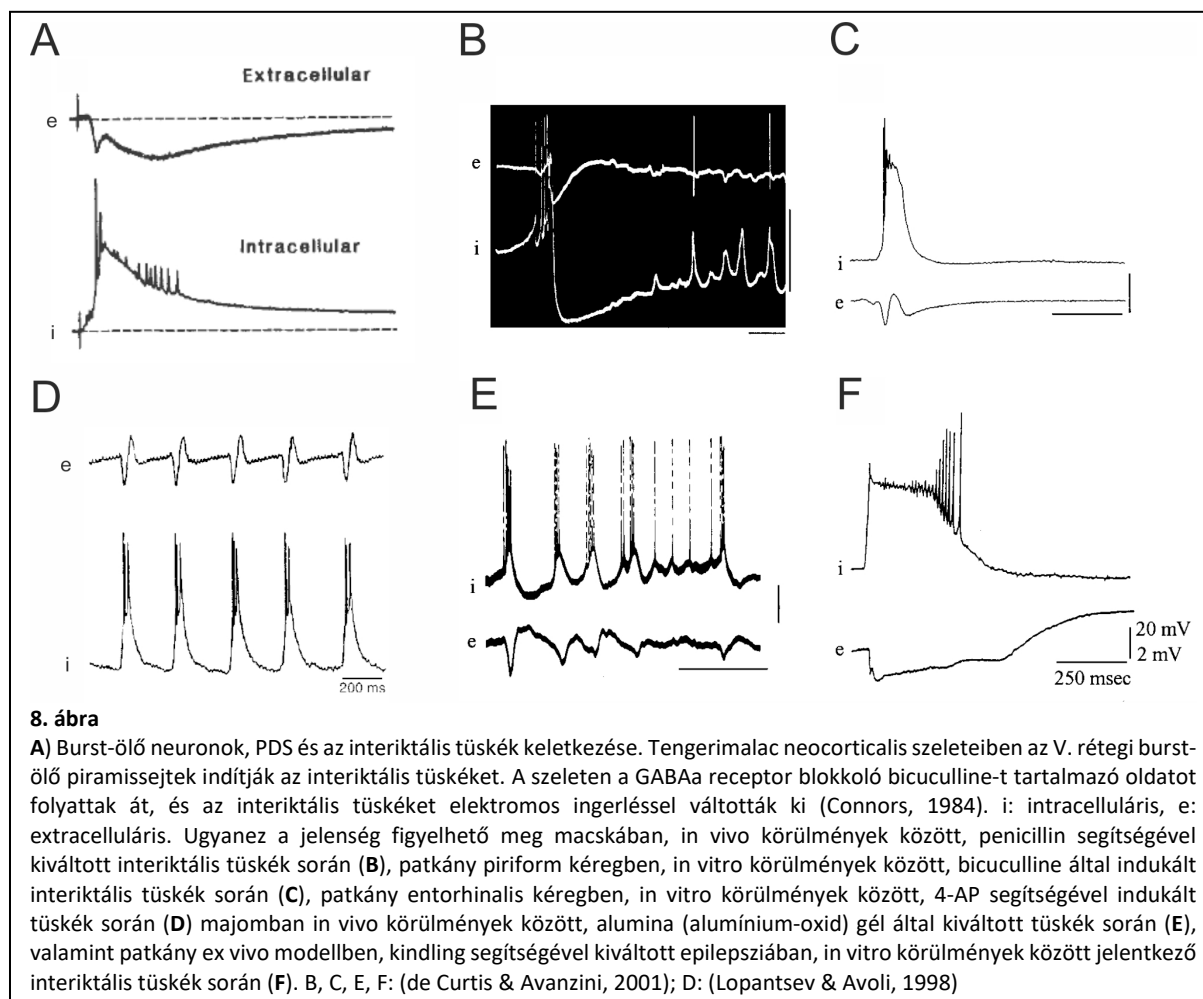


1.4.2 Epilepsziás aktivitás

A rágcsálók agykérgében, de főleg a hippocampusában keletkező epilepsziás rohamoknak és interiktális tuskéknek jelentős irodalma van. A temporális lebeny epilepszia modellek sokat segítettek az epilepsziás folyamatok sejtés és hálózati hátterének a megértésében (összefoglalásként lásd McCormick & Contreras, 2001; Levesque *et al.*, 2018). A két leggyakrabban alkalmazott in vivo modellben, a kainát és a pilocarpine modellben spontán visszatérő rohamok, interiktális tuskék, és a patológiásnak gondolt fast ripple oszcillációk jelentkeznek. Akárcsak epilepsziás páciensekben (lásd később), mindkét modellben kimutatták az LVF és HYP rohamindulási mintázatú epilepsziás rohamot. A pilocarpine modellben az LVF rohamok a ripple oszcillációkhoz csatoltan jelentek meg, míg a HYP rohamokat a fast ripple oszcillációkkal együtt detektálták. Valószínűsíthető, hogy az LVF rohamok során a GABAerg interneuronok aktiválódnak a roham kezdetekor, lévén, hogy a ripple oszcillációkat a PV-tartalmú kosársejtek pontos, óraműszerű tüzelésével hozták összefüggésbe. A HYP rohamok során pedig valószínűleg a glutamaterg sejtek tüzelése uralja a rohamkezdetet, mivel a fast ripple oszcillációk alatt e sejtek szinkron, illetve fázison kívüli tüzelését figyelték meg (Levesque *et al.*, 2018).

Az interiktális tuskék kialakulási mechanizmusainak magyarázatára több modell is létezik. Először a neocortexben mutatták ki, hogy az interiktális túske 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 (8. ábra, összefoglalásként lásd de Curtis & Avanzini, 2001). A PDS során először egy 50-100 ms hosszú burst tüzelés játszódik le, melyet egy másodlagos, hosszantartó tüzelés követ. Az első burst tüzelés valószínűleg a sejtek belső membrántulajdonságaiból fakadóan jelentkezik, míg a másodlagos tüzelést az első burst hatására keletkező szinaptikus visszacsatolási folyamatok okozzák. Fiziológiás körülmények között a hippocampus CA3 régiójában, valamint a neocortex V. rétegében elhelyezkedő piramissejtek egy kis csoportja mutat burst tüzelést, míg a neocortex és a hippocampus többi piramissejtje csak akkor tüzel burst-ben, ha a gátlást csökkentjük, és/vagy a serkentést növeljük. A hipotézis szerint tehát a burst-ölő (intrinsically bursting, IB) piramissejtek indítják a PDS-t, és ezen keresztül az interiktális tuskéket (Connors, 1984; Chagnac-Amitai & Connors, 1989). A másik modell a serkentés-gátlási egyensúly felborulásán alapszik. Ha a serkentés nő, a gátlás csökken, vagy mindkettő egyszerre, akkor több küszöb alatti szinaptikus esemény adódik össze térben és időben, melyek felelősek lehetnek több burst tüzelés beindításáért, így serkentés-gátlás egyensúlyának eltolódása és a PDS együttesen felelnek az interiktális túske kialakulásáért (de Curtis & Avanzini, 2001). A gátlás csökkenése és a túlzott serkentés anatómiai módszerekkel is

kimutatható epilepsziában és alátámasztja ezt a hipotézist (összefoglalásként lásd Alexander *et al.*, 2016).

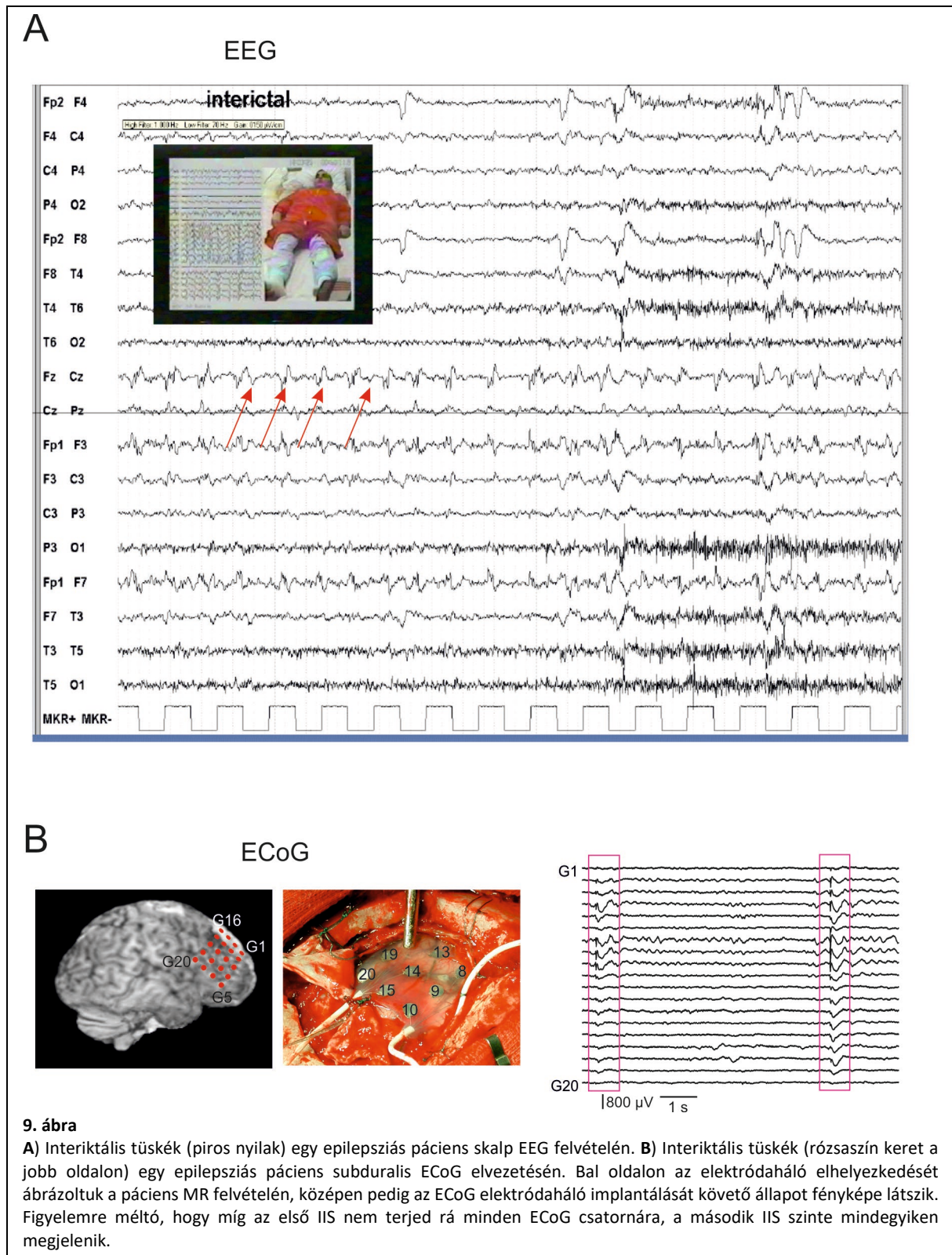


1.5 A humán hippocampusban és neocortexben megjelenő epilepsziás aktivitás

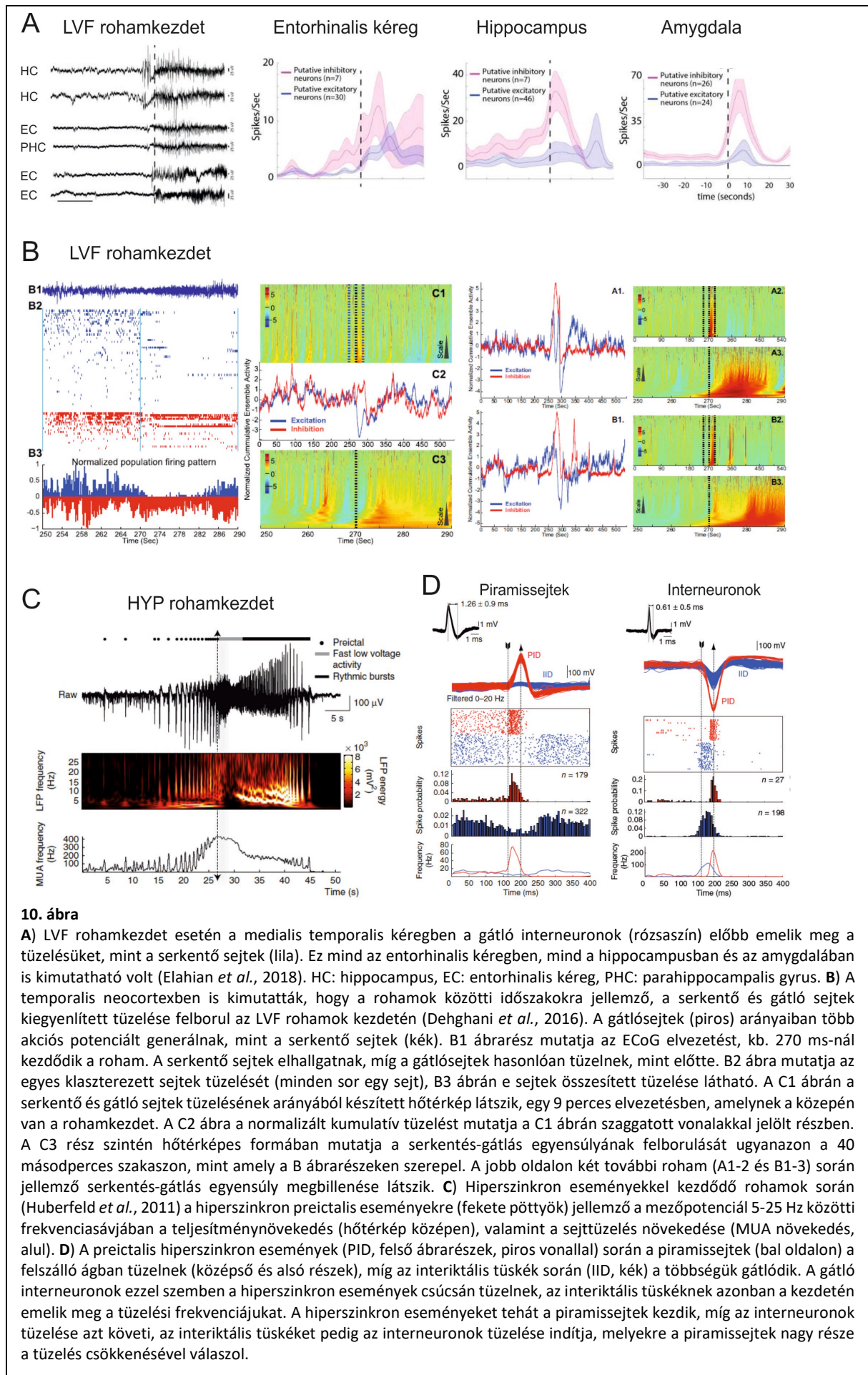
A humán agykéregben mind az epilepsziás rohamok, mind pedig a rohammentes időszakokban jelentkező interiktális tüskék kialakulási mechanizmusa régóta kutatott terület. Az interiktális tüske (interictal spike, IIS) elnevezés kétféle epilepsziás tüskét foglal magába, az egyik a szigorú értelemben vett tüske (spike), amely egy gyors (<50 ms), nagy amplitúdójú populációs aktivitás, a másik pedig az éles hullám (sharp wave), amely egy hosszabb (50-200 ms) tüske-hullám komplexumot jelöl (összefoglalásként lásd de Curtis & Avanzini, 2001). Nem keverendő össze a rágcslók hippocampusában leírt éles hullám-ripple komplexummal (sharp wave-ripple complex, SPW), amely egy fiziológiás eseményt jelöl. Ezzel szemben az emberi agykéregben spontán módon megjelenő éles

hullámokat és interiktális tüskéket patológiás eseményeknek tekintik, mivel nagyon szoros összefüggésben állnak az epilepsziás rohamok, és az epilepszia, mint betegség kialakulásával.

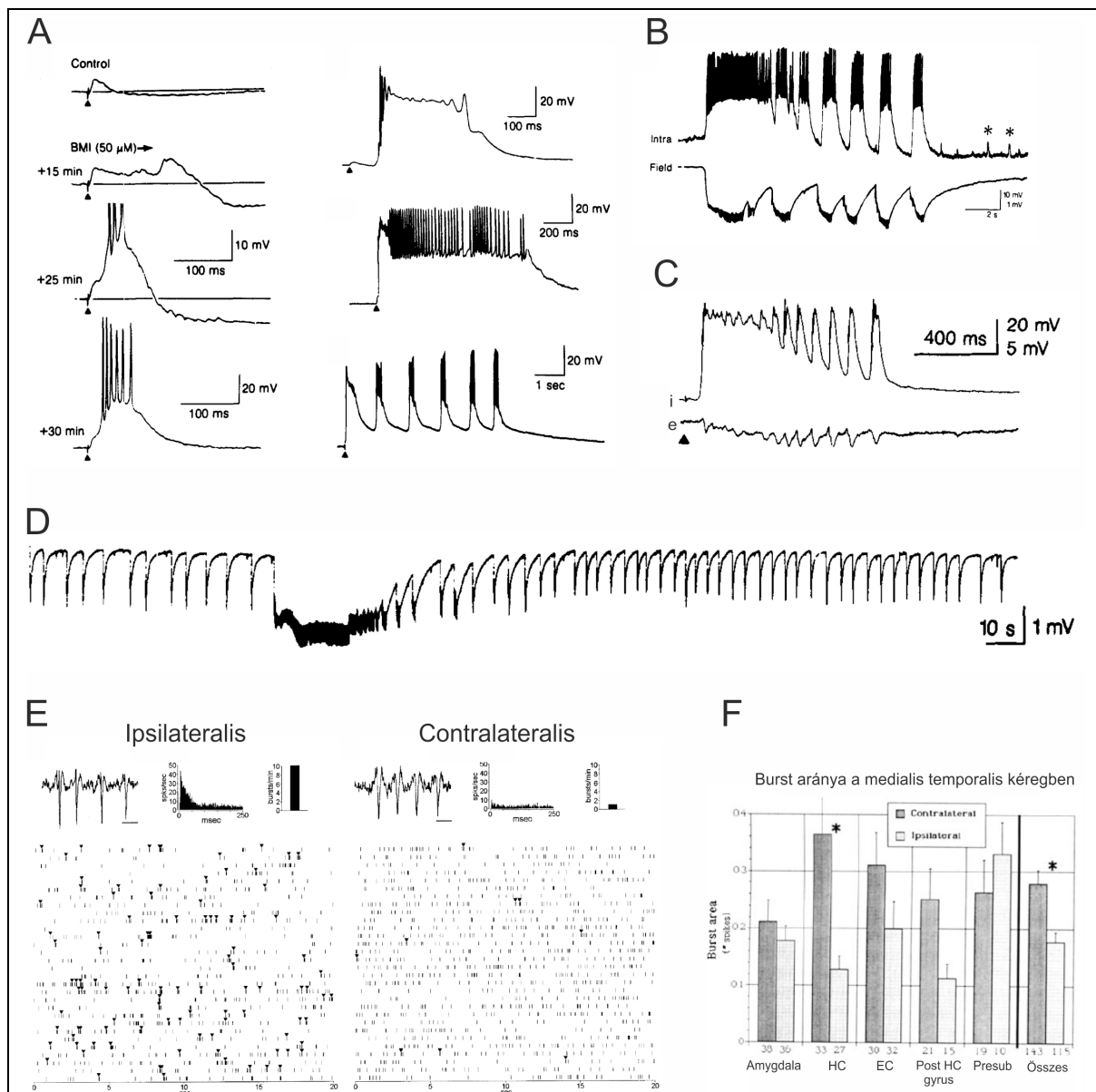
A fokális epilepsziák esetén a skalpról elvezetett EEG a legalapvetőbb módszer az epilepsziás rohamokat indító zóna körülhatárolásához (9. ábra). Az epileptogén agyi területen belül elkülönítjük az ún. irritatív zónát, amelyre jellemző az interiktális tüskék megjelenése. A skalp EEG-nél azonban lényegesen pontosabb képet kaphatunk a rohamindító és az irritatív zónákról, valamint a rohamokról és az interiktális tüskékről az operációt megelőző részletes invazív kivizsgáláskor, mely során subduralis electrocorticographia (ECoG), sztereo EEG (sztereotaxiás módszerekkel beültetett elektródák), vagy mélyagyi elektródák segítségével vesszük fel az agy elektromos aktivitását. Az mind a mai napig nem teljesen tisztázott, hogy az interiktális tüskék vajon elősegítik a rohamokat, vagy azok kialakulása ellen hatnak. Mind a két elméletre, vagyis 1) az interiktális tüskékből rohamok alakulnak ki, illetve 2) a tüskéknek antikonvulzív hatásuk van, vannak ráutaló adatok (de Curtis & Avanzini, 2001).



A preoperatív invazív elvezetési technikák segítségével közelebb kerültünk az epilepsziás rohamok és az interiktális tüskék kialakulásának megértéséhez, bár a modell állatokból nyert adatokhoz képest még mindig elenyészően keveset tudunk az emberi epilepsziás aktivitás mechanizmusairól. Az adatok többsége a leggyakrabban előforduló temporális lebeny eredetű epilepsziákból származik, de relatíve sokat tudunk az egyéb neocorticalis fokális epilepsziák során jelentkező rohamok kialakulásáról is. A rohamkezdet során megfigyelt mintázatok nagyon változatosak, és nem mutatnak összefüggést az epileptogén léziók típusával. A hét különböző rohamindító mintázat közül a leggyakrabban megfigyelt az LVF rohamkezdet volt (Perucca *et al.*, 2014), amelyről kimutatták, hogy a gátló interneuronok megemelkedett aktivitásával kezdődik (10. ábra) mind a mediális temporális lebenyben (Elahian *et al.*, 2018), mind más nagyagykérgi régiókban (Dehghani *et al.*, 2016). A HYP rohamkezdetet kizárólag mediális temporális lebeny eredetű epilepsziás páciensekben detektálták (Perucca *et al.*, 2014), és megemelkedett serkentési folyamatokkal hozták összefüggésbe (Huberfeld *et al.*, 2011). A rohamokat megelőzően, akár néhány perccel a rohamkezdet előtt, a neuronok tüzelési frekvenciája megemelkedett, mind a neocortexben (Truccolo *et al.*, 2011), mind a hippocampusban (Lambrecq *et al.*, 2017). A neocortexből induló rohamok során, melyek a mediális temporális lebenybe terjedtek, megfigyelték, hogy a gátló sejtek aktivitása megemelkedik, ugyanakkor a serkentő neuronoké nem (Misra *et al.*, 2018). A rohamok alatt az idegsejtek nagy részének megnőtt a tüzelési frekvenciája, az egyes neuronok tüzelési mintázata pedig rendkívül heterogén volt mind a hippocampusban (Babb *et al.*, 1987), mind a neocortexben (Truccolo *et al.*, 2011). Epilepsziás betegekből származó neocorticalis szövetszeletben rohamszerű epileptiform mintázatok jelennek meg kainát és kolinerg agonista carbachol együttes alkalmazásakor (Florez *et al.*, 2015), valamint Mg^{2+} -mentes oldatban (Avoli *et al.*, 1987; Mattia *et al.*, 1995). Leírták, hogy ezek során az idegsejtek membránja jelentősen eltolódott a depolarizáció irányába (depolarization shift), és burst-ökben tüzeltek (Avoli *et al.*, 1997).



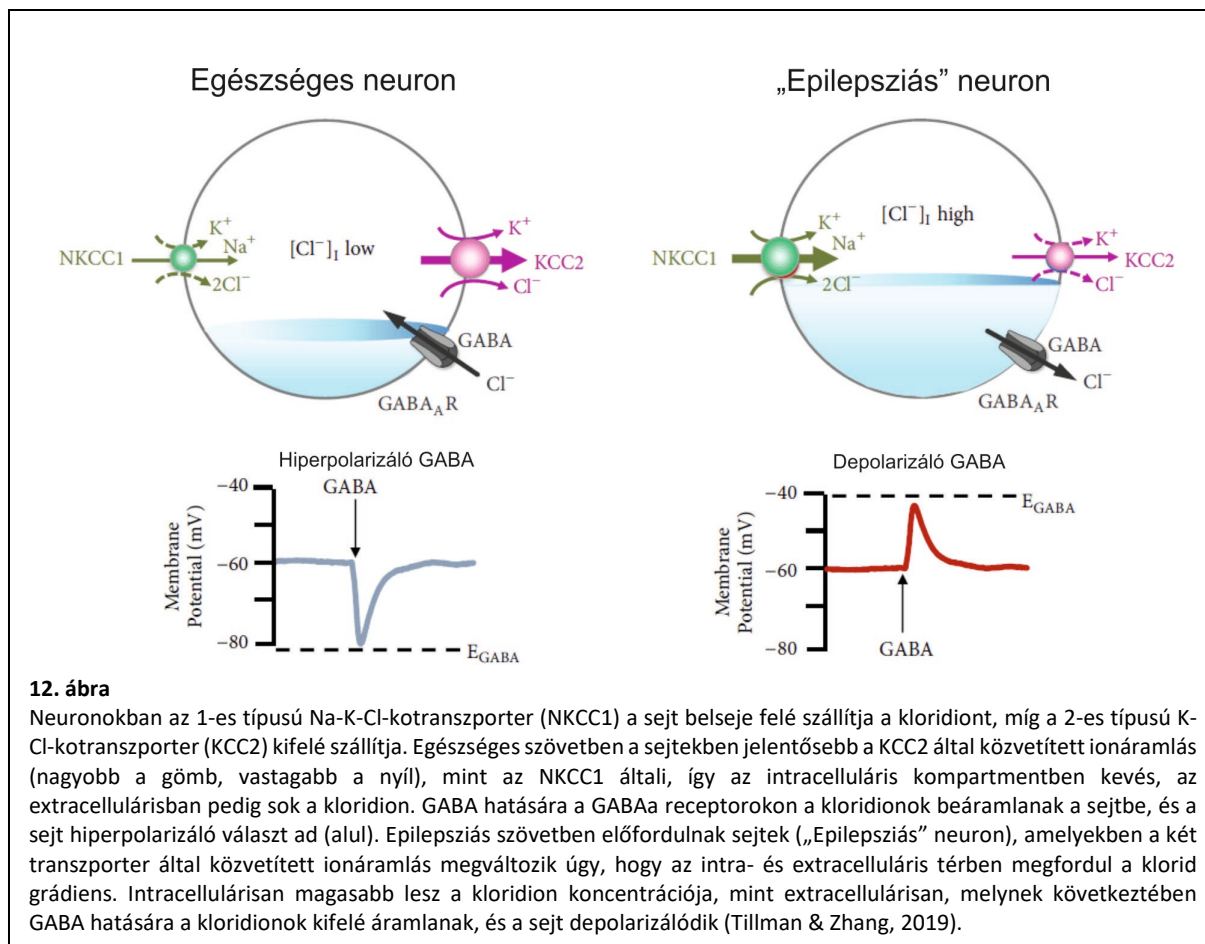
Az elmúlt fél évszázad során sokat megtudtunk az epilepsziás emberi agyban levő neuronok celluláris tulajdonságairól, valamint azoknak az epilepsziás aktivitás kialakulásával való összefüggéseiről (összefoglalásként lásd Avoli & Williamson, 1996; Avoli *et al.*, 2005). In vitro kísérletekben bizonyították, hogy az emberi agykéregben a rágcsálókéhoz nagyon hasonló sejtípusok találhatóak, 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 serkenthetőség, és a membránáramok leírása mellett hamar összekötötték a burst-ölő sejtek jelenlétét, valamint a PDS-t az epilepsziás aktivitás kialakulásával (11. ábra, Avoli & Williamson, 1996). Ugyanakkor epilepsziás páciensekben végzett mikroelektrodás elvezetésekben nem sikerült egyértelműen bizonyítani az összefüggést a burst-ölő sejtek és az interiktális tüskék kialakulása között (Calvin *et al.*, 1973; Ishijima *et al.*, 1975; Wyler *et al.*, 1982). Az egyik tanulmány azt találta, hogy a rohamindító medialis temporalis lebenyben több a spontán előforduló burst, mint a contralateralis oldalon (Staba *et al.*, 2002), míg a másik tanulmány ennek pont a fordítottját figyelte meg (Colder *et al.*, 1996). A neocorticalis fokális epilepsziák esetén is csak annyit sikerült kimutatni, hogy az interiktális tüskék során modulált tüzelést mutató neuronoknak magasabb a burst indexe, mint a nem modulált sejteké (Keller *et al.*, 2010).



11. ábra

A) Epilepsiás betegek neocorticalis szeleteiben a piramis sejtek burst tüzeléssel reagálnak az elektromos ingerlésre (háromszöggel jelezve), miután bicuculline-t adnak az oldalhoz. Az idő előrehaladtával a serkentő válaszok egyre nagyobbak lesznek, majd megjelennek a burst-ök. A bicuculline oldat átáramoltatása során a piramis sejtek válasza között jellegzetes PDS-eket (jobb oldal két felső), illetve többszörös tüskéket (jobb oldal, alsó) is megfigyeltek (Hwa *et al.*, 1991). **B)** Humán neocorticalis szeletben Mg^{2+} -mentes oldat segítségével kiváltott epilepsiás aktivitás során a sejtek jellegzetes PDS-t mutatnak (intra), mely alakja jól megfeleltethető az extracelluláris térből elvezetett mezőpotenciálnak (field, (Avoli *et al.*, 1995). **C)** Az epilepsiás aktivitás mezőpotenciál jelének (e) megfeleltethető intracellulárisan elvezetett (i) PDS keletkezik humán neocorticalis piramis sejtekben elektromos ingerlés hatására (fekete háromszög), a 4-AP in vitro modellben (Mattia *et al.*, 1995). **D)** 4-AP hatására interiktális tüske jellegű tranziensek (nyíl) és rohamszerű események (középen) keletkeznek epilepsiás páciensekből származó humán neocorticalis szeletben. Egy ilyen roham során elvezetett egyidejű intra- és extracelluláris jel látható kinagyítva a C ábrarészen. **E)** Epilepsiás páciensek medialis temporalis kérgéből (hippocampus, subiculum, entorhinalis kéreg) mélyelektrodás elvezetésekkel klaszterezett sejtek aktivitása interiktális tüskék során (Staba *et al.*, 2002). A rohamindító (ipsilateralis) oldalon több burst tüzelést figyeltek meg (háromszögekkel jelezve), mint a nem rohamindító (contralateralis) oldalon. **F)** Szintén epilepsiás páciensek medialis temporalis kérgéből történt elvezetésben vizsgálták a neuronok burst tüzelését (Colder *et al.*, 1996), és azt kapták, hogy a nem rohamindító (contralateralis) oldalon több a burst tüzelés összességében is (jobb oldalon), illetve a presubiculumot (Presub) leszámítva minden vizsgált régióban is. HC: hippocampus, EC: entorhinalis cortex

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 (Sloviter, 1991; Williamson *et al.*, 2003), 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 (Wittner *et al.*, 2001). Ugyanakkor a piramissejtekre érkező GABAerg axonok nem feltétlenül gátolják a sejteket. A feltételezések szerint az csillársejtek kiválthatnak serkentő posztzinaptikus választ a piramissejtek axon iniciális szegmentumán (Szabadics *et al.*, 2006). Ezen felül humán epilepsziás hippocampusból készített szeleteken spontán megjelenő interiktális tuskék során a subicularis piramissejtek egy kisebb hányada pedig a GABAerg bemenetre depolarizáló választ adott (Cohen *et al.*, 2002). A feltételezések szerint ez a kloridion gradiens megváltozása miatt fordulhat elő, melynek hátterében az ezt a grádiens felállító kation-klorid kotranszporterek megváltozott expressziója állhat (Ben-Ari *et al.*, 1989; Rivera *et al.*, 1999). A 2-es típusú kálium-klorid kotranszporter (KCC2) a neuron belsejéből szállítja a kloridiont az extracelluláris térbe, míg az 1-es típusú nátrium-kálium-klorid kotranszporter (NKCC1) ennek fordítottját végzi (12. ábra). Elsősorban ez a két transzporter tartja fenn azt a klorid grádiens, amely ahhoz szükséges, hogy a GABAerg szignalizáció gátlást eredményezzen. A KCC2 expressziójának csökkenése vagy eltűnése azonban a megőrződött NKCC1 funkcióval együtt a kloridion intracelluláris feldúsulását eredményezheti. Ez akár olyan fokú lehet, hogy a GABAa receptor aktivációja során kinyíló ioncsatornákon a kloridion a szokásos befelé áramlás (és ezáltal hiperpolarizáció) helyett kifelé áramlik, így depolarizálja a sejtet (Tillman & Zhang, 2019). A feltételezések szerint tehát 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. Wittner *et al.*, 2001). Ugyanakkor érdemes figyelembe venni a minták post mortem idejét, mert jelentős változások mennek végbe a szövet bomlása következtében (Urbán *et al.*, 2002). Hasonlóságuk okán, az egészséges humán szöveten kívül főemlősökből származó kontroll szövetet is lehet használni (Wittner *et al.*, 2009). 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 (Schwartzkroin & Haglund, 1986), illetve rágcsáló szövetet is szoktak kontrollnak használni, sok esetben a megfelelő in vivo epilepszia modellel együtt (pl. Jiang *et al.*, 2012). 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 epilepsziás páciensekből származnak (pl. Williamson & Spencer, 1994). 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. Avoli *et al.*, 1994b), vagy a tumor-asszociált epilepsziás betegekből eltávolított peritumorális régióból származó szövettel hasonlítják össze (pl. Williamson *et al.*, 2003). Az összes itt felsorolt humán lehetőség tehát epilepsziás betegek agyából eltávolított olyan szövetet tekint kontrollnak, amelyek nem, vagy kevésbé vesznek részt az epilepsziás aktivitás kialakításában. De mégis epilepsziás betegekből származnak, és az epilepsziás szinaptikus reorganizáció jelei egyértelműen (pl. a hippocampusban, lásd Wittner *et al.*, 2005) vagy kevésbé egyértelműen (pl. a neocortexben, lásd Alonso-Nanclares *et al.*, 2005), de tetten érhetők. Humán elektrofiziológiai kutatásokhoz a legjobb kontroll az a szövet, amelyet nem epilepsziás 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 epilepsziás – 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 epilepsziás neocorticalis mintáknak, a szakirodalomban mégis nagyon kevés publikációban találkozunk vele (Schwartzkroin & Haglund, 1986; Avoli *et al.*, 1994a).

2 Célkitűzések

Főbb célkitűzéseink a fiziológias és patológias (epilepsziás) szinkron populációs aktivitások kialakulási mechanizmusainak a feltárása 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 patológias szinkron folyamatok gócpontjává, illetve, hogy hol is húzódik a határ (ha egyáltalán van) a fiziológias 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, szerettünk volna megvizsgálni az állatok és az ember agyában létrejövő oszcillációk különbözőségeit. Kutatásainkban az alábbi kérdésekre kerestük a válaszokat.

Fiziológias SPW aktivitás karakterizálása rágcsálók hippocampusában (Hofer *et al.*, 2015)

- 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 piramis sejtek a SPW-ekben?
- Mi a szerepe a gátló interneuronoknak, azon belül is a periszomatikus gátlósejteknek a hippocampalis SPW-ek generálásában?

Epilepsziás interiktális tüskék mechanizmusainak feltárása rágcsálók hippocampusában (Wittner & Miles, 2007)

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

Epilepsziás rohamok mechanizmusainak vizsgálata rágcsáló hippocampusban (Le Duigou *et al.*, 2005; Motti *et al.*, 2010)

- 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 piramissejtek 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 (Wittner *et al.*, 2006, 2007)

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

Epilepsziás interiktális tüskék vizsgálata a humán hippocampusban (Huberfeld *et al.*, 2007; Wittner *et al.*, 2009)

- A humán subiculumban in vitro körülmények között megjelenő interiktális tüskék során milyen aktivitást mutatnak a subicularis piramissejtek?
- 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 (Wittner *et al.*, 2005; Karlócai *et al.*, 2016; Wittner & Maglóczy, 2017)

- 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?

Fiziológiás spontán populációs aktivitás vizsgálata a humán neocortexben (Kerekes *et al.*, 2014; Tóth *et al.*, 2018)

- 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 (Kandrács *et al.*, 2019)

- 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 rezekált 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. Temporális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő betegekből rezekált hippocampalis szöveten *in vitro* elektrofiziológiai (Huberfeld *et al.*, 2007; Wittner *et al.*, 2009) és anatómiai (Wittner *et al.*, 2005; Karlócai *et al.*, 2016; Wittner & Maglóczky, 2017) vizsgálatokat végeztünk. Neocorticalis szövetet kaptunk epilepsziás és nem epilepsziás, tumoros betegek rezekációs műtétje során, melyen elektrofiziológiai és anatómiai kísérleteket végeztünk (Kerekes *et al.*, 2014; Tóth *et al.*, 2018; Kandrác *et al.*, 2019). 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. Metabotrób glutamát receptor 1 α (mGluR1a, Wittner *et al.*, 2006), 2-es típusú kálium-klorid kotransporter (KCC2, Huberfeld *et al.*, 2007; Wittner *et al.*, 2009; Karlócai *et al.*, 2016), 1-es típusú nátrium-kálium-klorid kotranszporter (NKCC1, Huberfeld *et al.*, 2007; Wittner *et al.*, 2009), neuronális marker NeuN (Tóth *et al.*, 2018), parvalbumin (PV, Wittner *et al.*, 2009; Wittner & Maglóczky, 2017; Tóth *et al.*, 2018), 1-es típusú kannabinoid receptor (CB1, Wittner & Maglóczky, 2017) elleni immunfestést alkalmaztunk. Di-amino-benzidinnel (DAB), aranyzemcséssel, valamint Alexa típusú fluoreszcens antitestekkel vizualizáltuk a festett elemeket. A DAB-bal és aranyzemcséssel 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.

Mind *in vivo* (Wittner *et al.*, 2006, 2007), mind *in vitro* (Huberfeld *et al.*, 2007; Wittner & Miles, 2007; Wittner *et al.*, 2009; Kerekes *et al.*, 2014; Tóth *et al.*, 2018) 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 (Huberfeld *et al.*, 2007). Utána, ahogy a többi intracellulárisan töltött sejtet is (Wittner *et al.*, 2006, 2007; Wittner & Miles, 2007; Wittner *et al.*, 2009; Kerekes *et al.*, 2014; Tóth *et al.*, 2018), 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 sejtreakonstruktív analíziseket követően elektronmikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk (Kerekes *et al.*, 2014).

Gallyas-féle ezüst impregnációt (Gallyas *et al.*, 1990) végeztünk az epilepsziás állatokban bekövetkező sejtpusztulás vizsgálatára (Le Duigou *et al.*, 2005).

3.3 Epilepszia modellek

Kétféle *in vivo* epilepszia modellt alkalmaztunk: intraperitonealis pilocarpine-t injektáltunk egerekbe (Karlócai *et al.*, 2016), valamint kainátot adtunk be intrahippocampalisán az egerekbe (Le Duigou *et al.*, 2005; Motti *et al.*, 2010).

Akut *in vitro* modellekkel is dolgoztunk, a GABA_A receptor antagonistá bicuculline-t, picrotoxint (Wittner & Miles, 2007; Kandrács *et al.*, 2019), valamint a glutamát receptor agonista kainátot (Le Duigou *et al.*, 2005) alkalmaztuk epilepsziás aktivitás előidézésére agyi túlélő szeletekben.

3.4 Genetikai profil vizsgálata

Genetikai profil vizsgálatokat gén chip technika segítségével végeztünk az intrahippocampalis kainátot, illetve fiziológias sóoldatot kapott állatokban (Motti *et al.*, 2010). 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

Az *in vitro* elvezetésekhez vagy egycsatornás extracelluláris fémelektrodákat (Le Duigou *et al.*, 2005; Huberfeld *et al.*, 2007; Wittner & Miles, 2007; Wittner *et al.*, 2009), vagy egy 24 csatornás lineáris mikroelektrodát (Ulbert *et al.*, 2004b) használtunk (Wittner *et al.*, 2009; Kerekes *et al.*, 2014; Hofer *et al.*, 2015; Tóth *et al.*, 2018; Kandrács *et al.*, 2019). Rágcsálók hippocampusából (Le Duigou *et al.*, 2005; Wittner & Miles, 2007; Hofer *et al.*, 2015), epilepsziás páciensek hippocampusából (Huberfeld *et al.*,

2007; Wittner *et al.*, 2009), valamint epilepsziás és nem epilepsziás (tumoros) betegek neocortexéből (Tóth *et al.*, 2018; Kandrács *et al.*, 2019) 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 (Kerekes *et al.*, 2014). 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 OGB-1-AM (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 SR-101 (sulphorhodamin-101) piros fluoreszcens festéket használtuk, melyet specifikusan a gliasejtek vesznek fel.

3.7 Adatanalízis

A populációs aktivitások hálózati tulajdonságait a 24 csatornás mikroelektrodával, széles sávban felvett mezőpotenciál gradiensből elemeztük (Kerekes *et al.*, 2014; Hofer *et al.*, 2015; Wittner & Maglóczky, 2017; Tóth *et al.*, 2018). 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 elvezetésekből sejt klaszterezési 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 (Huberfeld *et al.*, 2007; Wittner & Miles, 2007; Wittner *et al.*, 2009; Hofer *et al.*, 2015; Tóth *et al.*, 2018) 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.

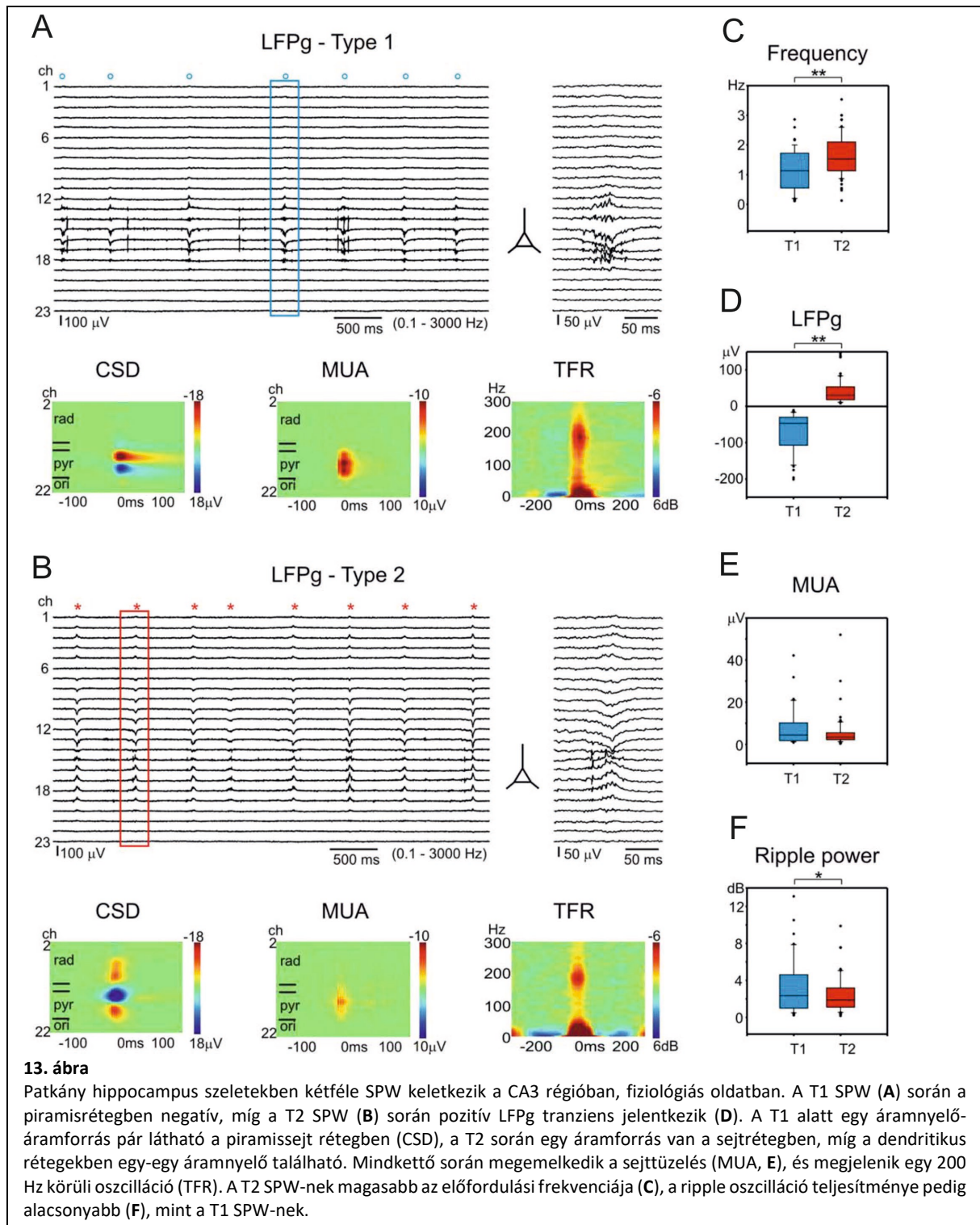
4 Eredmények

4.1 Rágcsálók hippocampusában megjelenő fiziológias és epileptiform aktivitás

4.1.1 Fiziológias éles hullám keletkezési mechanizmusai (Hofer *et al.*, 2015)

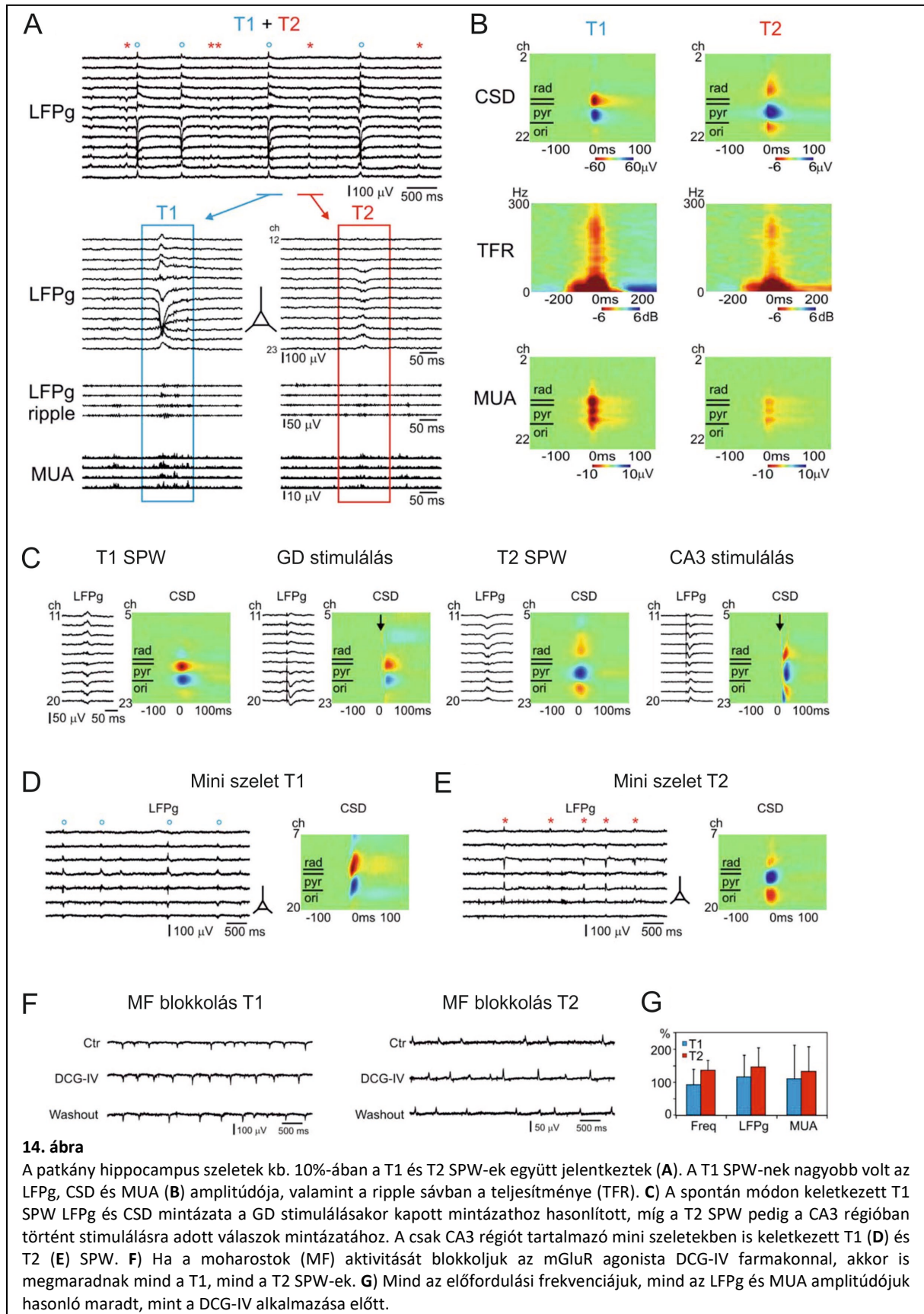
A rágcsálók hippocampusában jellegzetes karakterisztikájú éles hullám-ripple komplexumok (sharp wave ripple complex, SPW) jelennek meg lassú hullámú alvás és éber mozdulatlanság alatt, melyeknek fontos szerepet tulajdonítanak a memórianyomok kialakulásában és továbbításában a neocorticalis területek felé (Buzsáki, 2015).

Kísérleteinkben patkány hippocampus szeleteken vizsgáltuk a SPW-ek kialakulási mechanizmusait. Ahogy más csoportok (Maier *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005), mi is regisztráltunk SPW-eket a gyrus dentatusban, a CA3 és a CA1 régiókban. Elfogadott tény, hogy a SPW-ek a CA3 régióban keletkeznek (Buzsáki, 2015), így főként erre a régióra koncentráltunk. Elvezetéseinkben kétféle SPW-et különböztettünk meg: az egyik típus (T1) esetén a mezőpotenciál gradiensben (local field potential gradient, LFPg) negatív, a másik típus (T2) esetén pozitív kitérést tapasztaltunk a CA3 régió piramissejt rétegében (13. ábra). 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 (14. ábra). 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.

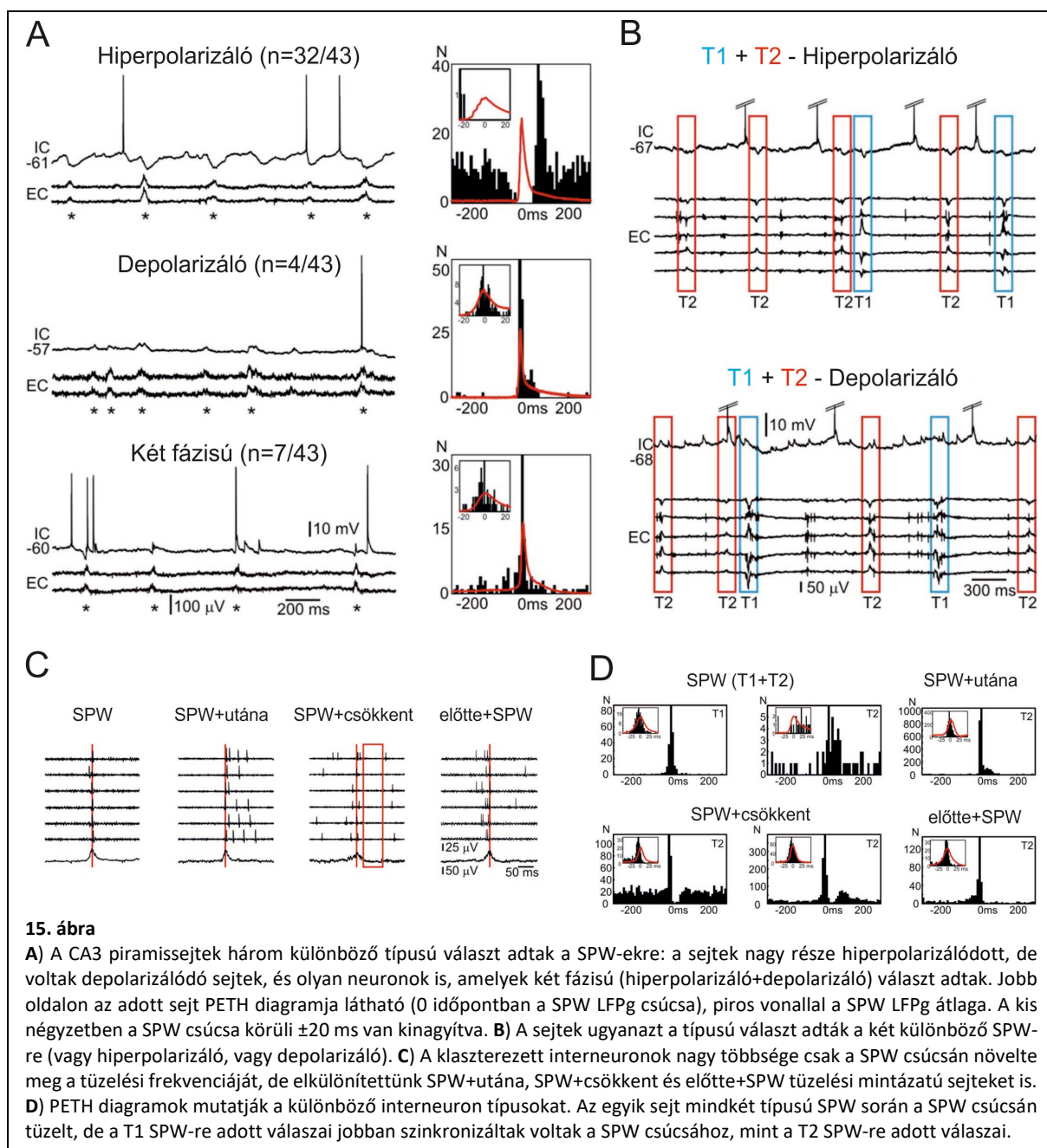


Az áramforrás sűrűség vizsgálat (current source density, CSD) mindkét típusú SPW esetén áramforrást mutatott a sejtrétegben, ugyanakkor az áramnyelők mintázata a T1 SPW során a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek aktivációs mintázatára emlékeztetett, a T2 SPW-é pedig a CA3 piramisok axonjainak serkentéséhez hasonló mintázatot mutatott (14. ábra). Annak ellenőrzésére, hogy a T1 SPW-et a gyrus dentatus generálja-e, kétféle kísérletet végeztünk. Adataink azt mutatták, hogy sem a moharostok aktivitásának farmakológiai csökkentése (szelektív mGluR agonista DCG-IV-gyel), 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.

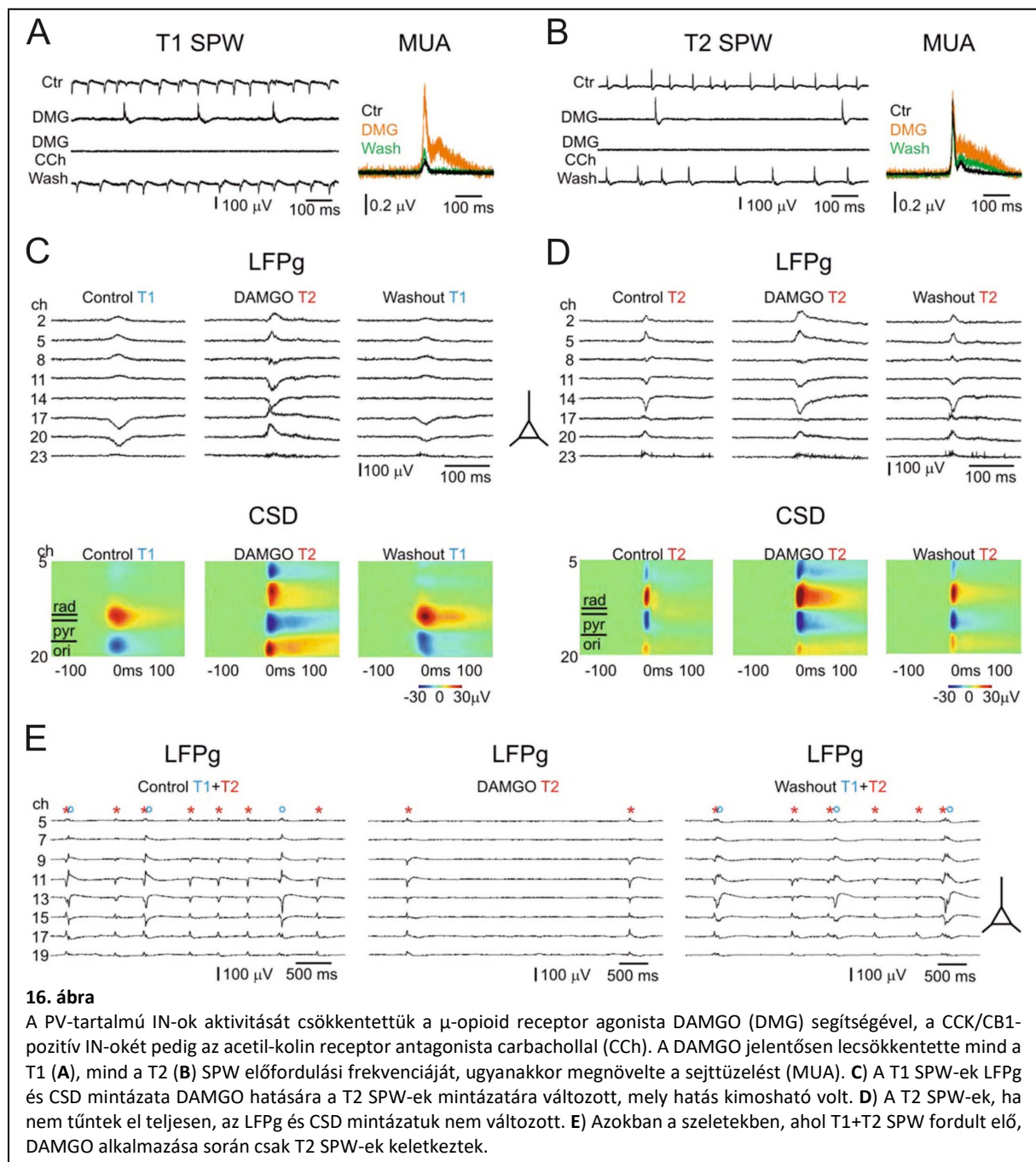


A serkentő glutamáterg rendszerek farmakológiai vizsgálata azt mutatta, hogy mindkét típusú SPW kialakításában részt vesznek az AMPA/kainát típusú glutamáterg receptorok, míg az NMDA receptorok nem. A GABAerg szignalizáció vizsgálata pedig kimutatta, hogy a GABA_A receptorok gátlásával mindkét típusú SPW eltűnik, míg a GABA_B receptorokéval nem. A serkentő sejhálózatok részvételének részletesebb vizsgálatára intracelluláris elvezetésekkel végeztünk CA3 piramisisejtekből (15. ábra). A piramisrétegben található áramforrásnak megfelelően a piramisisejtek nagy része hiperpolarizáló választ mutatott a SPW-ek során. Ugyanakkor depolarizáló, illetve két fázisú (hiperpolarizáló + depolarizáló) válaszokat adó sejteket is megfigyeltünk, melyek egy része tüzelte is a SPW-R események során. A kétféle SPW között a sejt válaszként tekintetében jelentős különbségeket nem találtunk. A sok gátlódó piramisisejt és ezzel együtt az áramforrás jelenléte a piramisisejtek rétegében a gátló neuronhálózatok (azon belül is a periszomatikus gátlósejtek) fontos szerepére utal a SPW-ek kialakításában a patkány hippocampusban, akárcsak egérben (Hájos *et al.*, 2013). A gátló hálózatok, azaz az interneuronok szerepének vizsgálatát extracelluláris elvezetésekkel, sejtclasszterezési technikával végeztük el (15. ábra). 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 több, mint fele kizárólag a SPW-ek során emelte meg a tüzelési rátáját, de elkülönítettünk SPW+előtte, SPW+utána, SPW+csökkent tüzelési mintázatú sejteket is. 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. SPW+előtte és SPW+utána tüzelési mintázatú sejteket kizárólag T2 SPW esetén figyeltünk meg, míg a többi mintázat mindkét SPW során előfordult. Az interneuronok tüzelési mintázata összefüggést mutatott a sejtek lokalizációjával is: a SPW+csökkent tüzelésű sejtek mind a str. oriensben helyezkedtek el, míg a többi típushoz tartozó sejtek a CA3 régió minden rétegében megtalálhatók voltak. Az interneuronok kb. 60%-a eltérő választ mutatott a T1 és a T2 SPW-ek során azokban az esetekben, amikor egy szeletben egyidejűleg fordult elő a kétféle SPW. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a funkcionálisan különböző típusú interneuronok különbözőképp, differenciáltan vesznek részt a kétféle SPW kialakításában.



A periszomatikus gátlósejtek szerepének tisztázását farmakológiai kísérletekkel végeztük (16. ábra). A parvalbumin (PV)-pozitív kosár- és csillársejtek aktivitását a μ -opioid receptor agonista DAMGO segítségével csökkentettük (Gulyás *et al.*, 2010), míg a cholecystokinin (CCK)-pozitív kosársejtekét az acetilkolin receptor agonista carbachollal (Katona *et al.*, 1999; Szabó *et al.*, 2010). Igazoltuk, hogy a periszomatikus gátlósejtek részt vesznek mindkét típusú SPW létrehozásában, ugyanis a DAMGO jelentősen lecsökkentette a SPW-ek előfordulási frekvenciáját, sőt, a T2 SPW-eket a szeletek majdnem felében blokkolta is. A T1 SPW-ek CSD mintázata reverzibilisen átalakult T2 SPW CSD mintázattá a DAMGO hatására, míg a T2 SPW-ek CSD mintázata nem változott. A DAMGO-t követő carbachol hatására a még detektálható SPW-ek is reverzibilisen eltűntek. Ezekkel a kísérletekkel

igazoltuk a periszomatikus gátlósejtek alapvető szerepét a SPW-ek kialakításában. Sajnos a μ -opioid receptor nem csak PV-pozitív periszomatikus gátlósejteken található, hanem más, dendritikus gátlósejteken is (a str. oriensben található O-LM sejteken), valamint a PV-pozitív sejtek csak kb. harmada tartalmazza a μ -opioid receptort (Drake & Milner, 2002), tehát a DAMGO használatával egy kevert interneuronális hatást lehet elérni. A kétféle kosáresejt, a csilláresejtek és esetleg az O-LM sejtek pontos szerepének tisztázására a kétféle SPW kialakításában még további kísérletekre volna szükség.

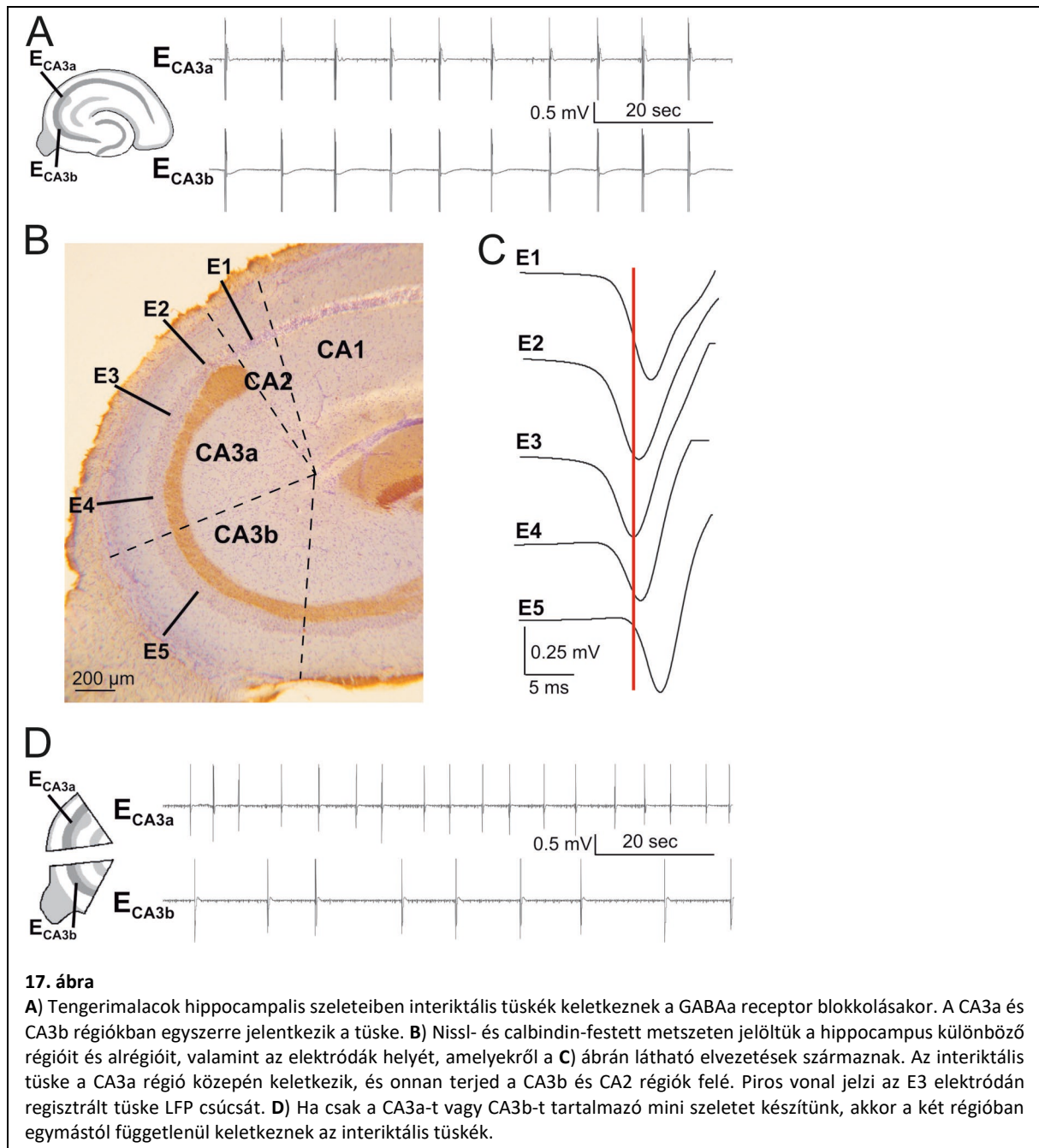


Összegésképpen elmondható, hogy a hippocampalis SPW-ek túlélő szeletekben is kialakulnak, nagyon hasonló tulajdonságokkal, mint az élő állatban. A CA3 régió egy dinamikusan változó komplex neuronális rendszer, amely in vitro körülmények között is többféle aktivitás kialakítására képes, akár egyidejűleg is. A kétféle, fiziológias 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, a gátló sejtek közül is a periszomatikus gátlósejtek szerepe a legjelentősebb. A kétféle szinkron aktivitás során a különböző interneuron típusok különbözőképpen vesznek részt az események generálásában, és más piramissejt populációkat tudnak bevinni a szinkron eseményekbe. Az interneuronok differenciált aktivitásával a CA3 régió neuronális hálózata többféle szinkron aktivitás létrehozására képes.

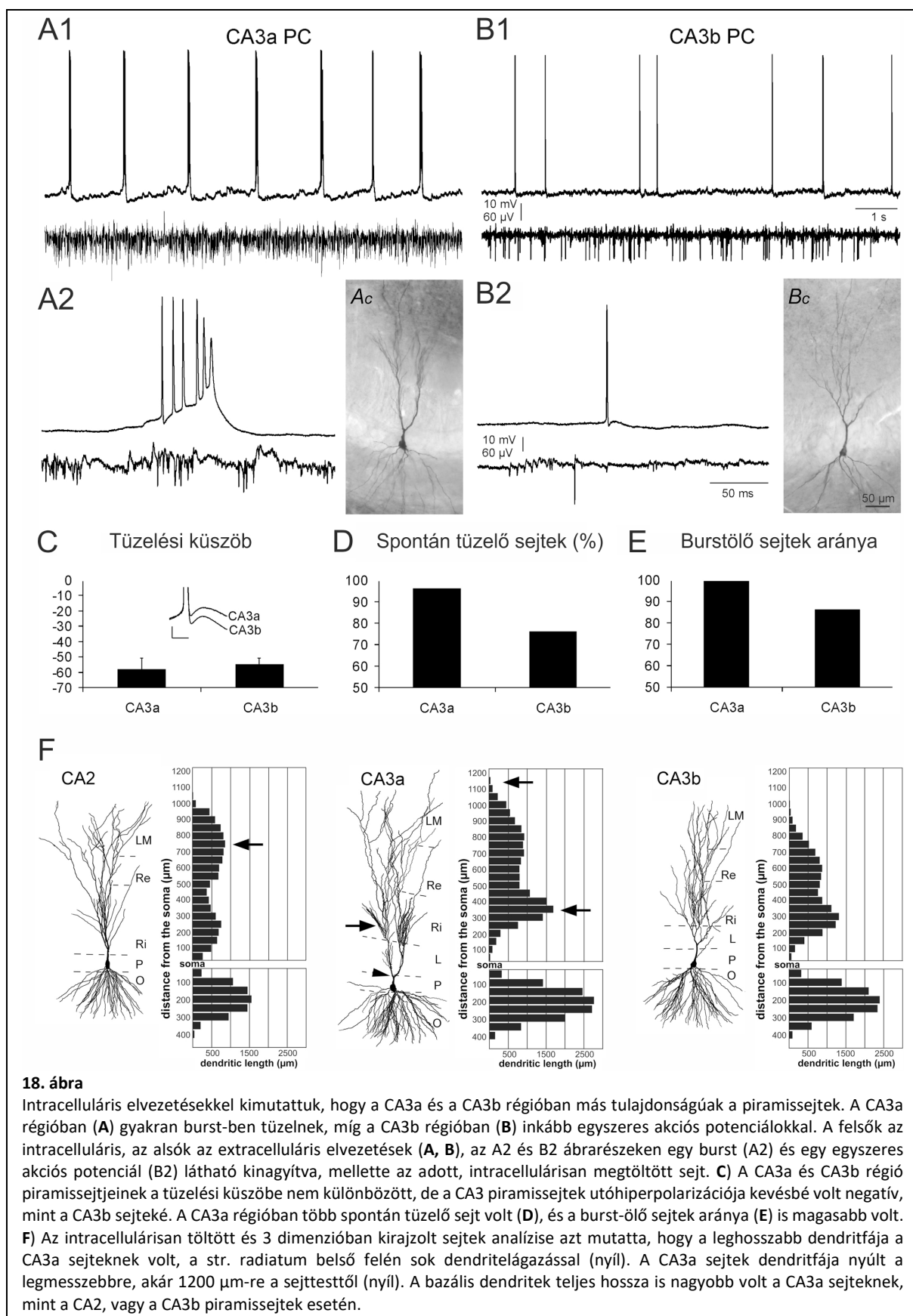
4.1.2 Epileptiform aktivitások keletkezése

4.1.2.1 *Interiktális tüskék keletkezési mechanizmusai* (Wittner & Miles, 2007)

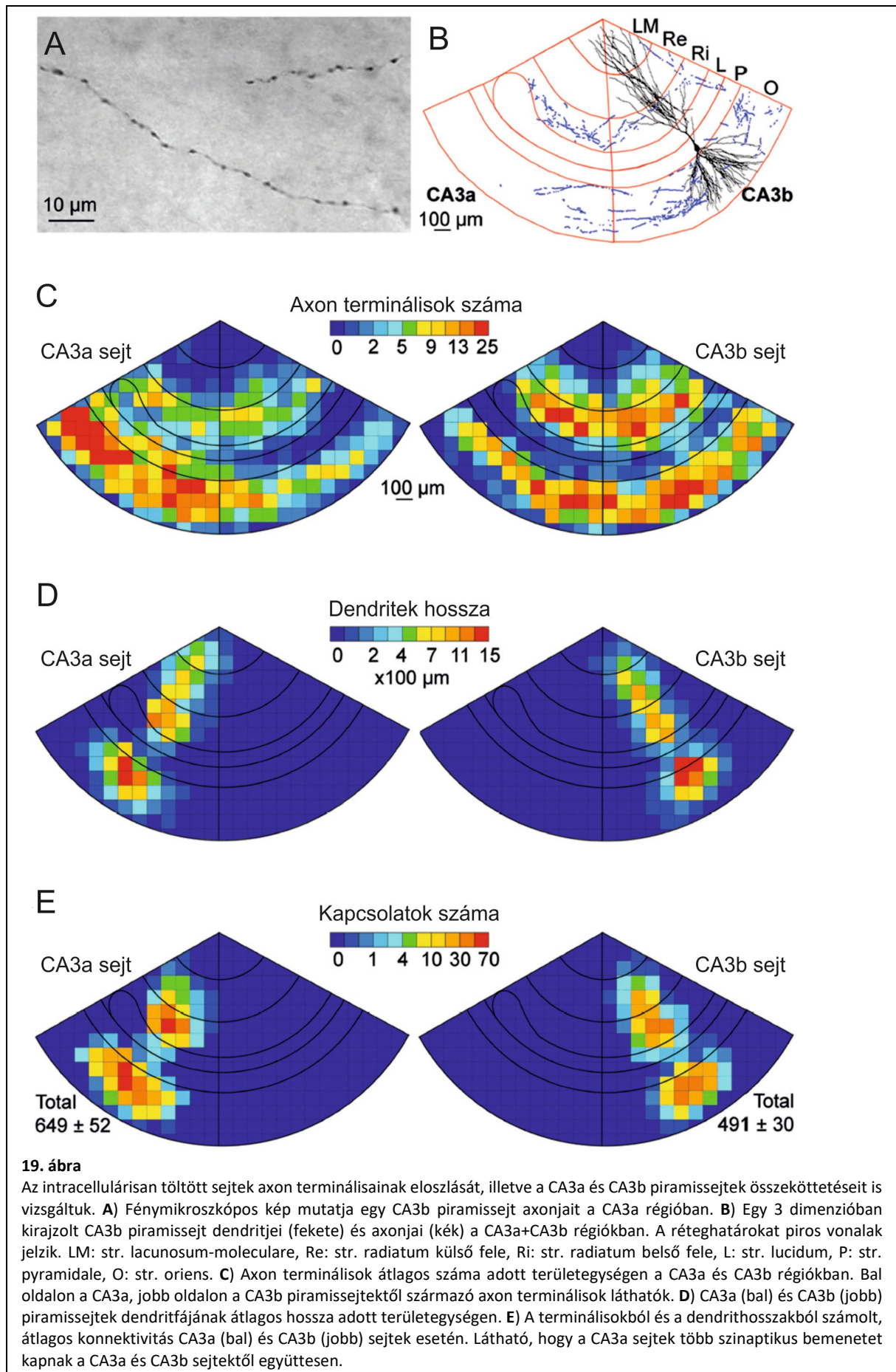
Az interiktális tüskék jellegzetes, epilepsziához köthető szinkron események. Egy gyors, meredek, tüske szerű mezőpotenciál tranziensből és egy elhúzódó hullámból állnak, mely mögött a neuronok túlzott szinkronitása, excesszív kisülése áll. Szerettük volna feltárni, milyen sejtszintű mechanizmusok játszanak közre az interiktális tüskék kialakításában. Annak megértésére, hogy mitől lesz egy neuronális hálózatnak vezető szerepe az interiktális tüskék generálásában, egy diszinhibíció alapultó in vitro modell vizsgálatát választottuk. 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. Ha a CA3a és CA3b régiókat fizikailag szétválasztjuk és külön vizsgáljuk, akkor mindkettőben megjelennek az interiktális tüskék, de a CA3a régióban jóval nagyobb előfordulási valószínűséggel (17. ábra).



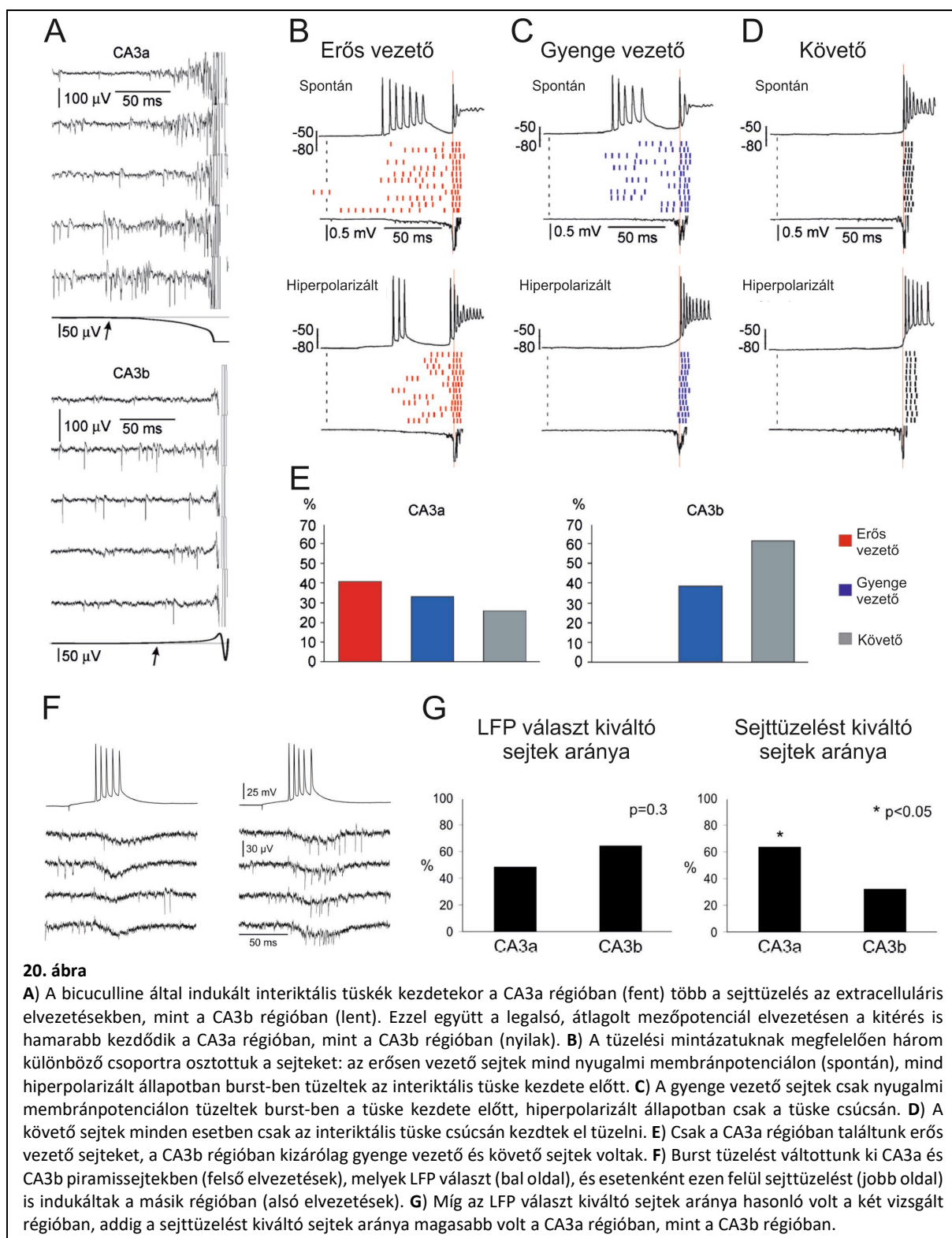
A piramissejteknek mind az elektromos tulajdonságaiban, mind az anatómiájában és az összeköttetéseiben találtunk különbséget a vezető CA3a és a követő CA3b régiók között. Intracelluláris elvezetésekben a CA3a régióban nagyobb mértékű volt a spontán módon tüzelő neuronok aránya, mint a CA2 és CA3b régiókban (18. ábra). A CA3a piramissejtek mindegyike képes volt burst tüzelés generálására, míg a CA2 és CA3b piramissejtek csak kb. 3/4-e tüzelt burst-ökben. Mind a spontán tüzelés nagyobb mértéke, mind a burst-ös tüzelési mintázat megfigyelhető volt az extracelluláris elvezetések segítségével regisztrált sejtes aktivitásban is.



A CA3a sejteknek a CA3b és CA2 sejtekhez képest elágazóbb és összességében véve hosszabb, és messzebbre nyúló dendritfájuk volt (18. ábra). A dendritágak összesített hossza lényegesen magasabb volt a CA3a régió azon rétegeiben, ahol a CA3 piramissejtek axonjai, a Schaffer-kollaterálisok végződnek (str. oriens és radiatum), mint a CA3b neuronok esetében. Ez utóbbi megfigyeléssel összhangban kimutattuk mind anatómiai (19. ábra), mind elektrofiziológiai módszerekkel, hogy a CA3a piramissejtek több beidegzést kapnak a Schaffer-kollaterálisoktól, mint a CA3b piramissejtek. Ehhez intracelluláris elvezetéseket követően jelölt sejteket rekonstruáltunk három dimenzióban. Felosztottuk a CA3a-b régiókat egységnyi területekre, és megállapítottuk az ezekre a területekre eső átlagos dendrithosszakát és átlagos axonterminális számokat. Így megkaptuk, hogy átlagosan mennyi szinapszis érkezik egy CA3a vagy CA3b piramissejtre egy szeletpreparátumban (19. ábra). Eredményeink alapján a CA3a piramissejtekre kb. egyharmaddal több serkentő szinapszis érkezik (átlagosan 649 ± 52 szinapszis/sejt), mint a CA3b piramissejtekre (átlagosan 491 ± 30 szinapszis/sejt). Ezt alátámasztotta az a megfigyelés, hogy a CA3a piramissejtekre lényegesen több, akciós potenciáltól független, de spontán vezikula felszabadulástól, és ezáltal a szinapszisszámtól függő serkentő potenciál érkezik, mint a CA3b piramissejtekre. A CA3a régióban a piramissejtek burst tüzelési tulajdonsága és a sejtekre érkező, a többi alrégiónál magasabb serkentő bemenet valószínűleg összefüggésben van azzal a képességgel, hogy túlzottan szinkron és túlserkentett szinkron eseményeket, interiktális tuskéket hozhat létre.



A hipotézis, hogy a burst-ölő piramisneuronoknak fontos szerepe van az epilepsziás szinkron események generálásában, régre nyúlik vissza. Több különböző rágcsáló fajban, több különböző agyi területen (neocortex, hippocampus, subiculum stb.), többféle in vitro (4-AP, diszinhibíció, 0 Mg^{2+} , stb.) és in vivo modellben kimutatták, hogy valóban a burst-ölő piramisneuronok indítják be az interiktális tüskéket (ld. 8. ábra, illetve összefoglalásként de Curtis & Avanzini, 2001). A mi hippocampalis diszinhibíciós modellünkben is megvizsgáltuk a burst-ölő és nem burst-ölő piramisneuronok aktivitását. Kíváncsiak voltunk, hogy az interiktális tüskék előtti és kezdeti szakaszában milyen aktivitást mutatnak a piramisneuronok, és háromféle tüzelési mintázatot tudtunk megkülönböztetni (20. ábra). Mindhárom sejtípus burst-ölő tüzelést mutatott a tüskék során, és gyakran kerültek depolarizációs blokk állapotba. Az „erős vezető neuronok” ezen kívül az interiktális tüskék előtti szakaszban is mutattak burst tüzelést, mind nyugalmi membránpotenciálon, mind hiperpolarizált állapotban. Ezzel szemben a „gyenge vezető neuronok” csak nyugalmi állapotban tüzeltek, míg hiperpolarizált állapotban nem. A „követő neuronok” a tüskék megelőző szakaszban nem tüzeltek, csak az interiktális tüskék mezőpotenciál csúcsát követő szakaszban. Erős vezető neuronokat csak a CA3a régióban találtunk, a CA3b régióban nem, amely alátámasztja a megfigyelést, hogy az interiktális tüskék ebben az alrégióban keletkeznek. Egy további analízist is végeztünk, hogy kiderítsük, hogyan képes a CA3a régió a többi régiót bevonni a szinkron eseménybe. Intracelluláris serkentéssel burst tüzelést váltottunk ki a CA3a és CA3b piramisneuronokból, és a másik alrégió válaszait vizsgáltuk extracelluláris elvezetésekben. Azt találtuk, hogy a CA3a piramisneuronok hatékonyabban képesek a többi sejt tüzelésének az emelésére, így feltételezhetjük, hogy a burst-ölő, erős vezető szerepű piramisneuronok jelenléte és az aktivitása hozzájárul ahhoz, hogy a CA3a régióban alakuljanak ki az interiktális tüskék, és onnan terjedjenek át más régiók felé.



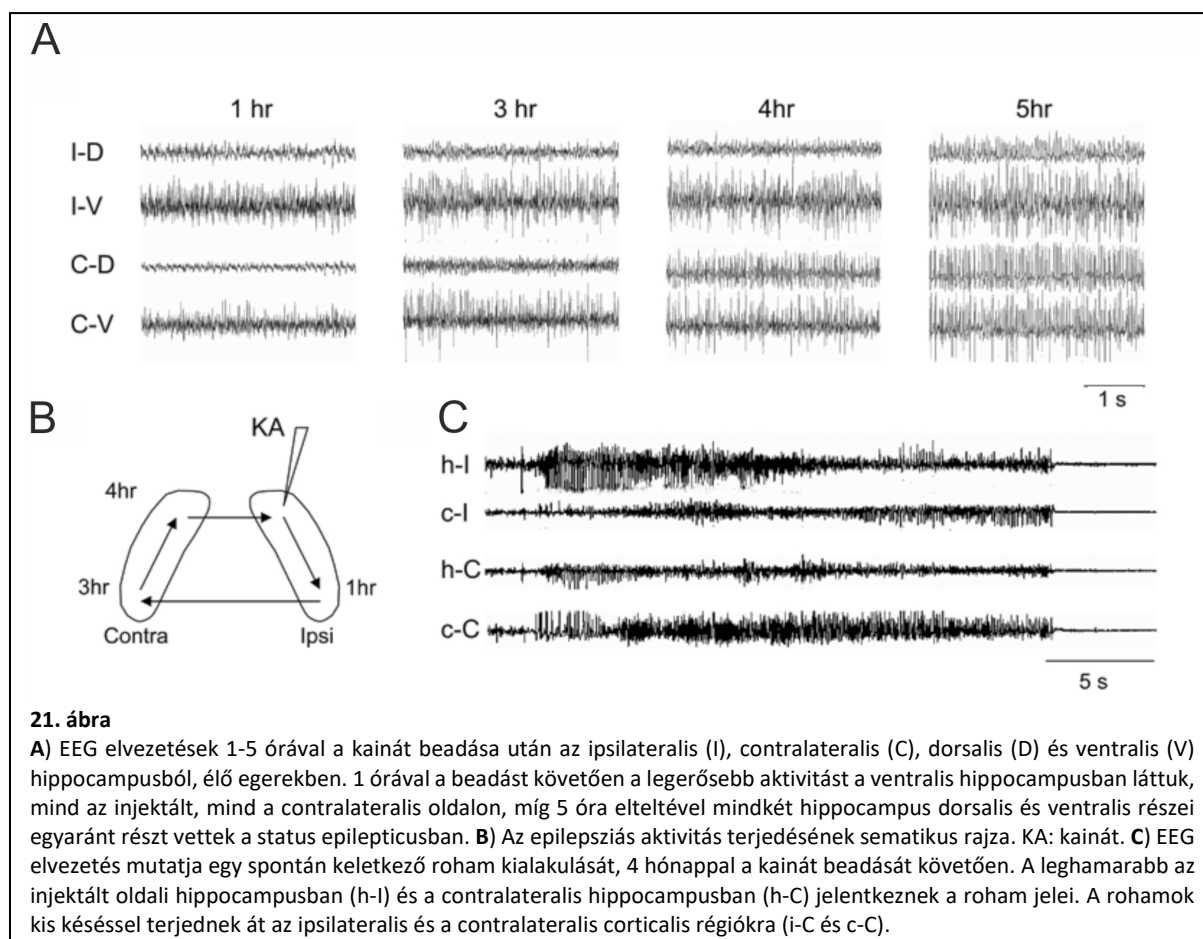
E kutatásaink eredménye alapján elmondhatjuk tehát, hogy a hippocampus CA3 régiójában a sejtek elektrofiziológiai, anatómiai és összeköttetés-beli tulajdonságai hozzájárulnak ahhoz, hogy ennek a régióknak vezető szerepe legyen egy patológiás szinkronizációs folyamat generálásában. E folyamatban fontos szerepe van a burst-ölő piramisisejteknek, 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

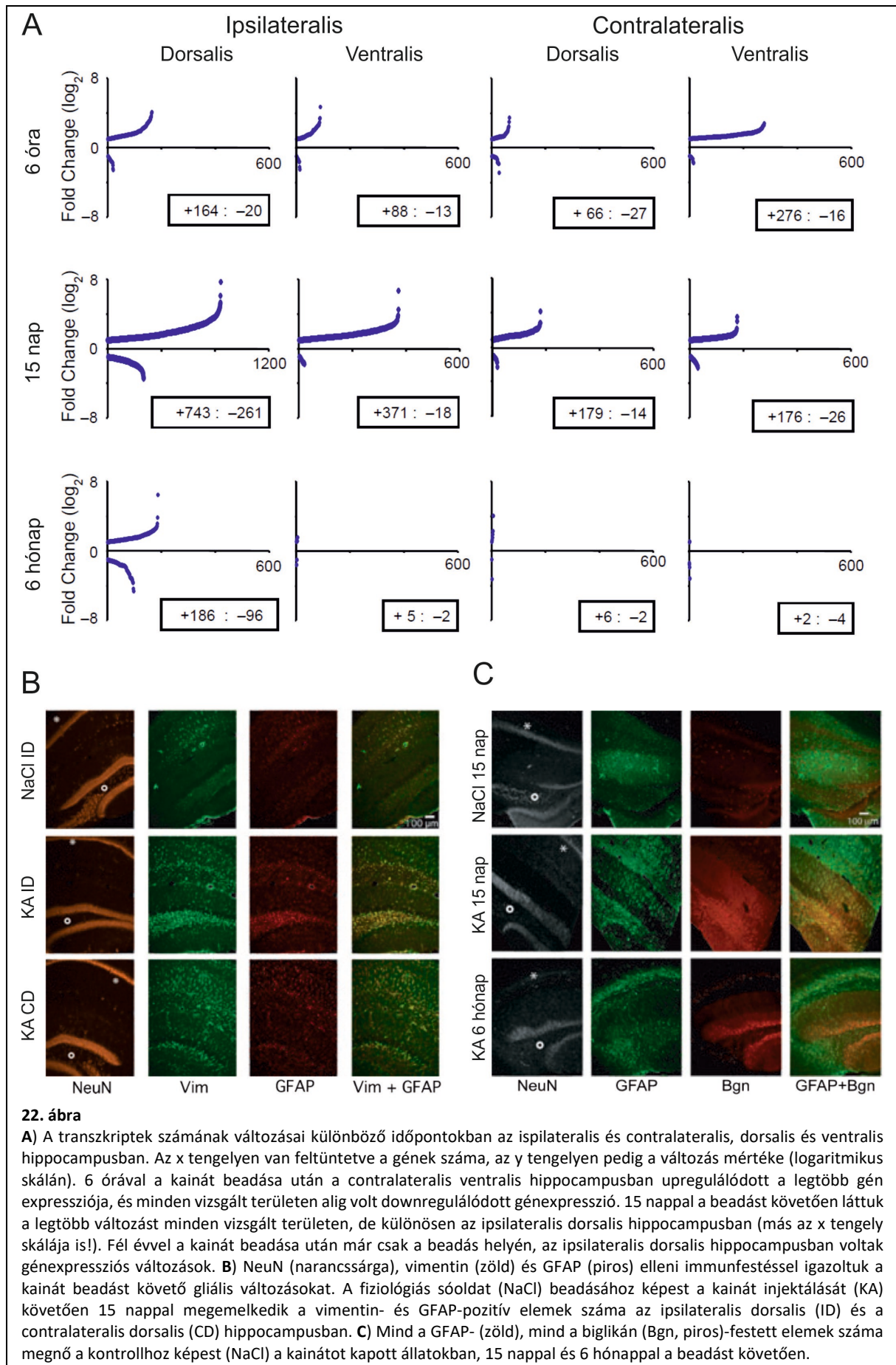
(Le Duigou *et al.*, 2005; Motti *et al.*, 2010)

Az epilepsziás rohamok vizsgálatára az *in vivo* kainát modellt használtuk egerekben, és génexpressziós, elektrofiziológiai és anatómiai kísérleteket végeztünk. Ha ionotróp glutamát receptor agonista kainátot injektálunk az egyik oldali dorzális hippocampusba, a beadás után 2-3 órával kialakul egy mindkét oldalra kiterjedő status epilepticus (21. ábra). Ezt egy 4-8 hétig tartó látens szakasz követi, majd pedig visszatérő spontán epilepsziás rohamok keletkeznek. Így ebben a modellben jól vizsgálható a status epilepticus keletkezése és terjedése, illetve azok a folyamatok, amelyek a későbbiekben a visszatérő rohamok kialakulásához vezetnek.



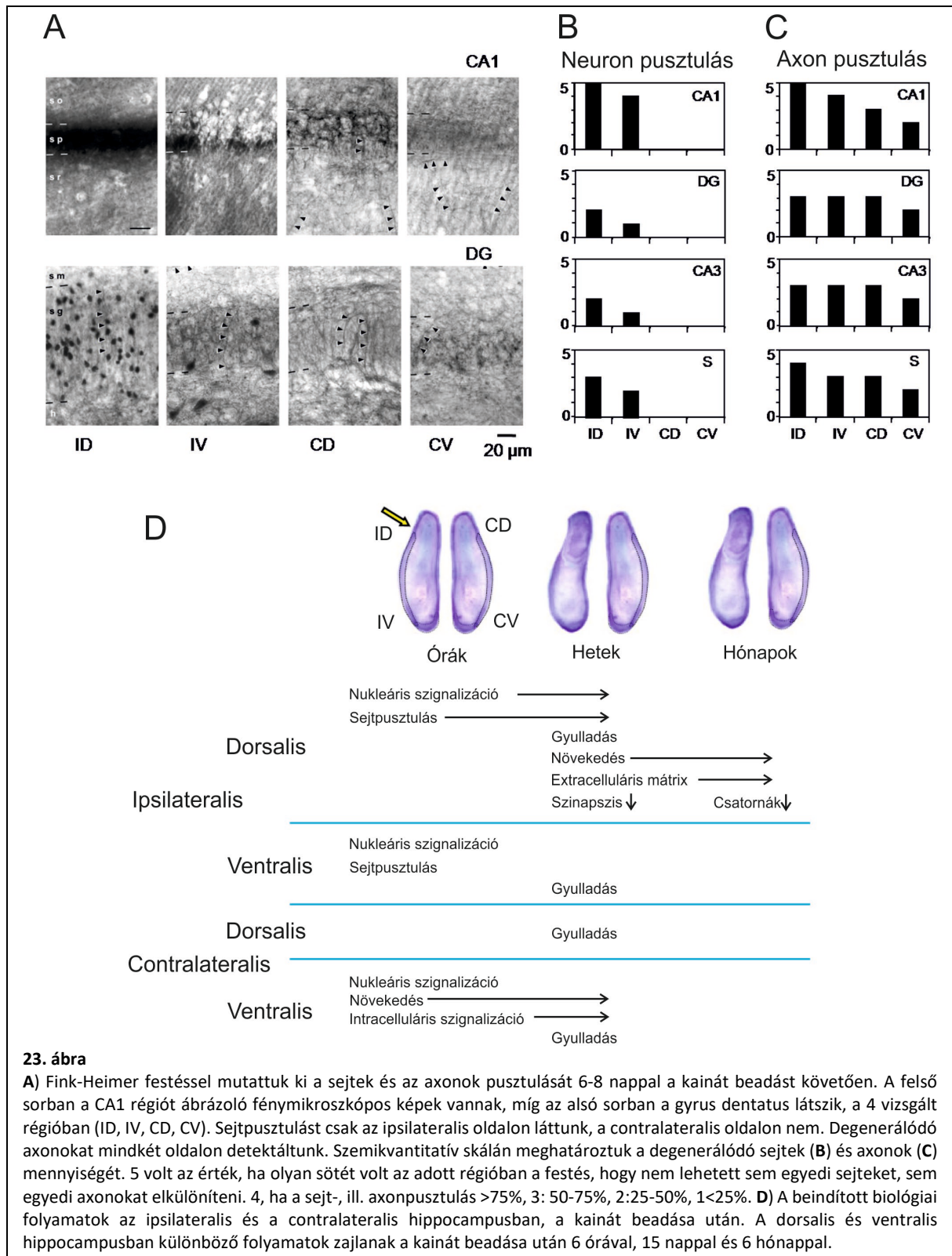
Genetikai profil vizsgálattal felderítettük azokat a sejtes folyamatokat, amelyek szerepet játszanak a status epilepticus és a visszatérő rohamok kialakításában. Detektáltuk 1526 transzkript expressziójának változásait az injektált hippocampus dorzális (ipsilateralis, ID) és ventrális (IV) felében,

valamint a kontralaterális hippocampus ugyanezen régióiból (contralateralis, CD és CV, 22. ábra). 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, mind dorzálisan, mind ventrálisan.



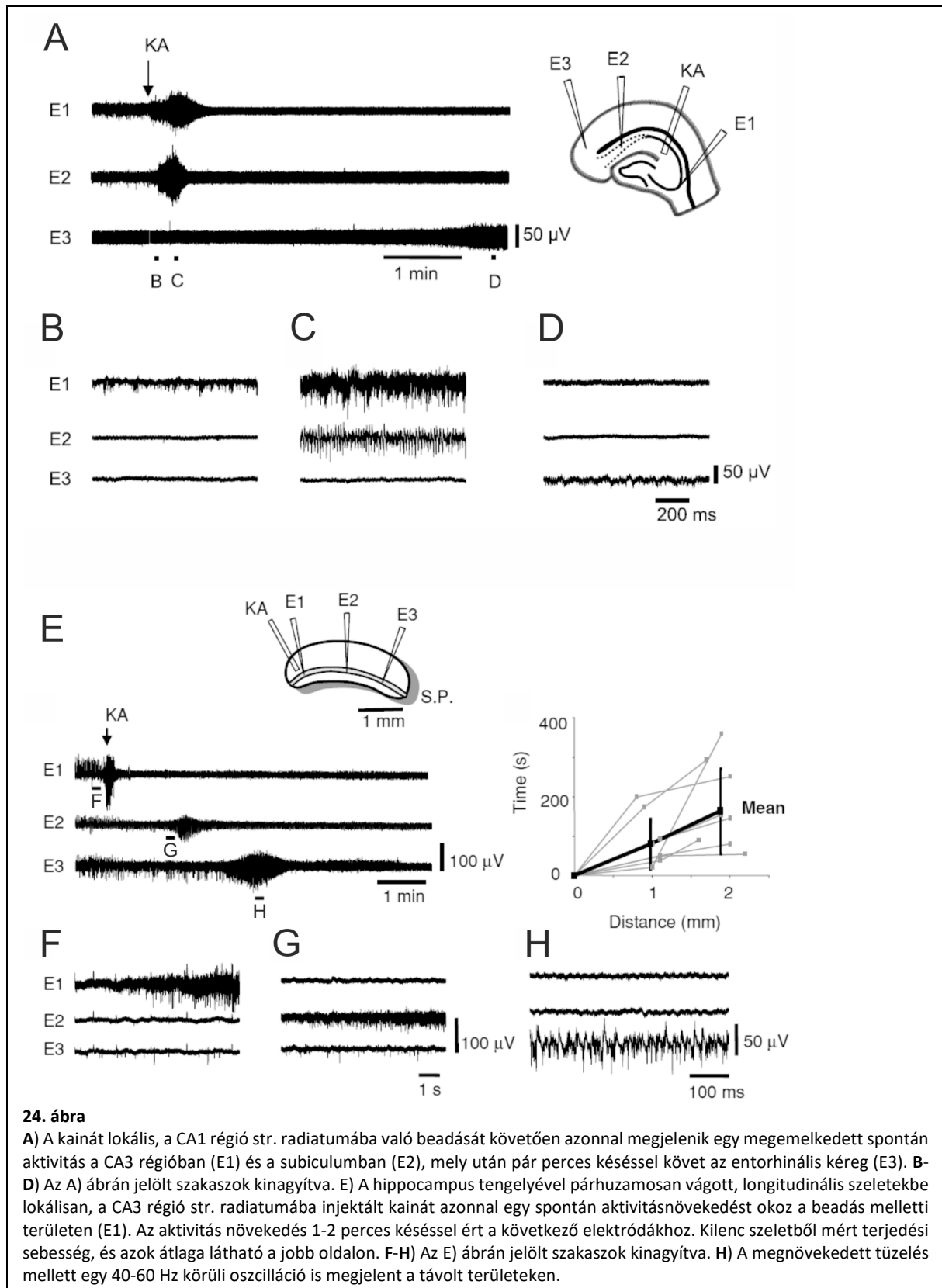
A korai aktivációt egy hosszabb ideig fennálló, az extracelluláris mátrixot és az immunválasz elemeit kódoló gének aktivációja követi. E gének közül néhánynak az aktivációját az általuk kódolt fehérje ellen végzett immunfestés segítségével is igazoltuk (22. ábra). Az asztrocita marker gliális fibrilláris savas fehérje (glial fibrillar acidic protein, GFAP) és a vimentin, amely egy gliális intermedier filamentum fehérje, jól mutatják a gliasejtek változásait. Ezen kívül a proteoglikánok közé tartozó biglikán az egyik olyan extracelluláris mátrix fehérje, amely a gliogenezisben és a gliális hegek képződésében szerepet játszik az epilepsziás agyban. A status epilepticus okozta korai génaktivációval szemben a sejtpusztulás és az azt követő gliaképződés és deafferentáció (23. ábra) 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 kötődnek. Más biológiai folyamatok jellemzik a korai, illetve a látens szakaszt: a beadást követően főleg nukleáris szignalizáció és sejtpusztulás, míg a látens szakaszban inkább a gyulladáshoz köthető folyamatok zajlanak. A visszatérő rohamok során jelentős génaktiváció már nincsen, csak a beadás helyén látszódik néhány gén upregulációja (23. ábra).

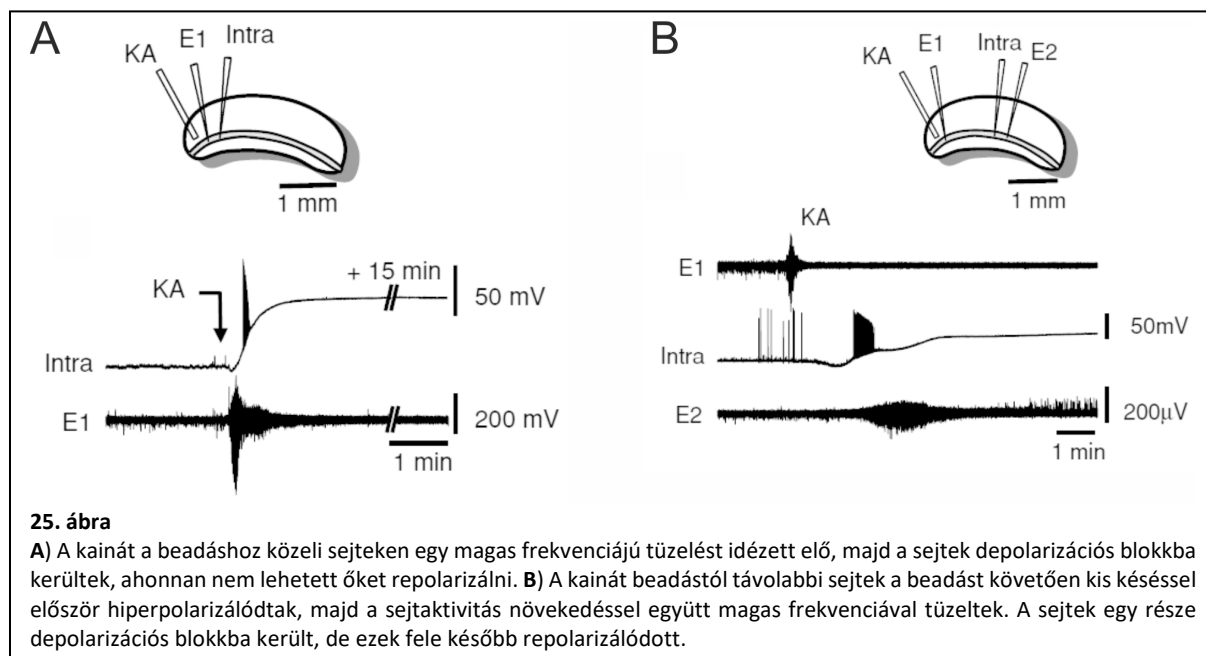


Hosszan tartó, az in vivo körülmények között megfigyelhető status epilepticus-ra emlékeztető aktivitás tapasztalható akkor is, ha egészséges állatok hippocampusából készített szeletekbe lokálisan kainátot injektálunk be. A kainát közvetlen hatásait hagyományos, a ventrális hippocampusból készített horizontális szeleteken vizsgáltuk (24. ábra). Hasonlóan az élő állatokhoz, a CA1 piramissejtek

apikális dendritjeit tartalmazó rétegbe adtuk be a kainátot. Ezt követően 0,15-2 s-os látenciával igen jelentős sejtüzelési hullámot láttunk a hippocampus minden régiójában: a gyrus dentatusban, a CA1 és CA3 régiókban és a subiculumban is. A megemelkedett sejtüzélést egy mezőpotenciál oszcillációs aktivitás is kísérte, 30-300 Hz-es tartományban. A megnövekedett sejtüzelés minden esetben magától abbamaradt a beadás után pár perccel, és a kísérlet ideje alatt már nem is tért vissza. A szeletek kb. felében, az entorhinális kéregben (2-3 mm-re a beadási helytől) egy lényegesen kisebb tüzelési frekvencia növekedést tapasztaltunk, amely 4-5 másodperces késéssel jelentkezett, és amely a kísérlet végéig fennmaradt. A rohamok terjedésének pontos sebességét hosszanti irányban metszett hippocampalis szeletekben határoztuk meg, mely szeletek kb. 3-4 mm hosszan, folyamatosan tartalmazzák a CA3 régió piramissejt rétegét. A szeletek egyik végétől a másikig egyirányú terjedést tapasztaltunk. 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.



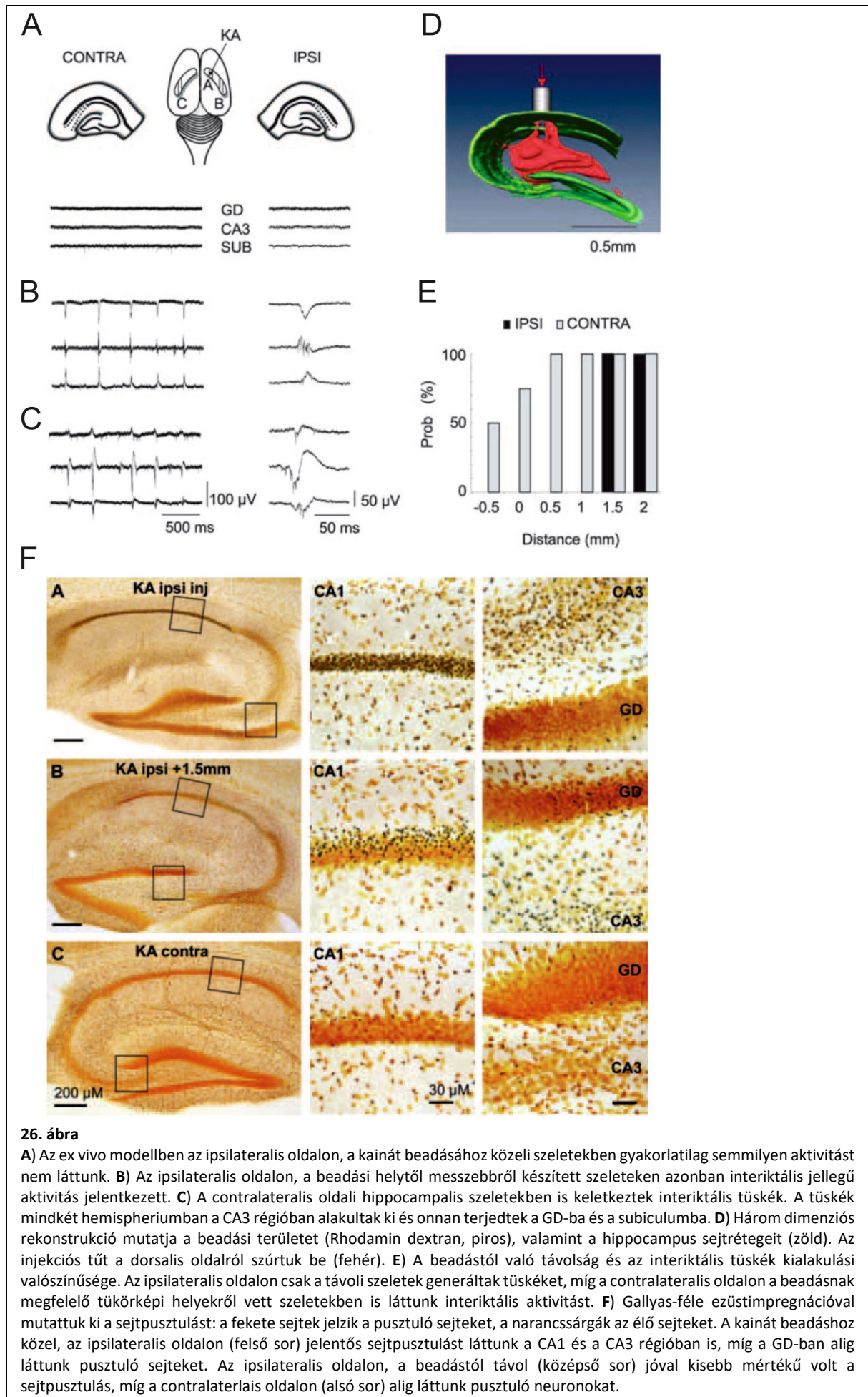
A piramis sejtek intracelluláris vizsgálata azt mutatta, hogy a kainát a beadáshoz közeli piramis sejteken egy 5-90 s hosszú, akár 200 Hz-es frekvenciájú sejtüzést idézett elő, az extracelluláris elvezetésen tapasztalt aktivitás megemelkedésével egyidejűleg (25. ábra). A sejtek ezt követően depolarizációs blokkba kerültek, amely állapotból nem sikerült repolarizálni őket. A beadástól távol (legalább 2 mm-re) elhelyezkedő piramis sejtek változatosabb viselkedést mutattak, melyet három fázisra lehetett bontani, bár nem minden sejt mutatta a három, egymást követő fázist. A kainát beadása után kis késéssel a sejtek hiperpolarizálódtak és több spontán szinaptikus úton közvetített gátlás érkezett rájuk. Ezután, az extracellulárisan megfigyelhető sejtaktivitás növekedésével egyidejűleg a sejtek depolarizálódtak, tüzelési frekvenciájuk megnőtt, és a többségük depolarizációs blokkba került. E sejtek fele a későbbiek során repolarizálódtak, míg a másik fele maradt a depolarizációs blokk állapotában.

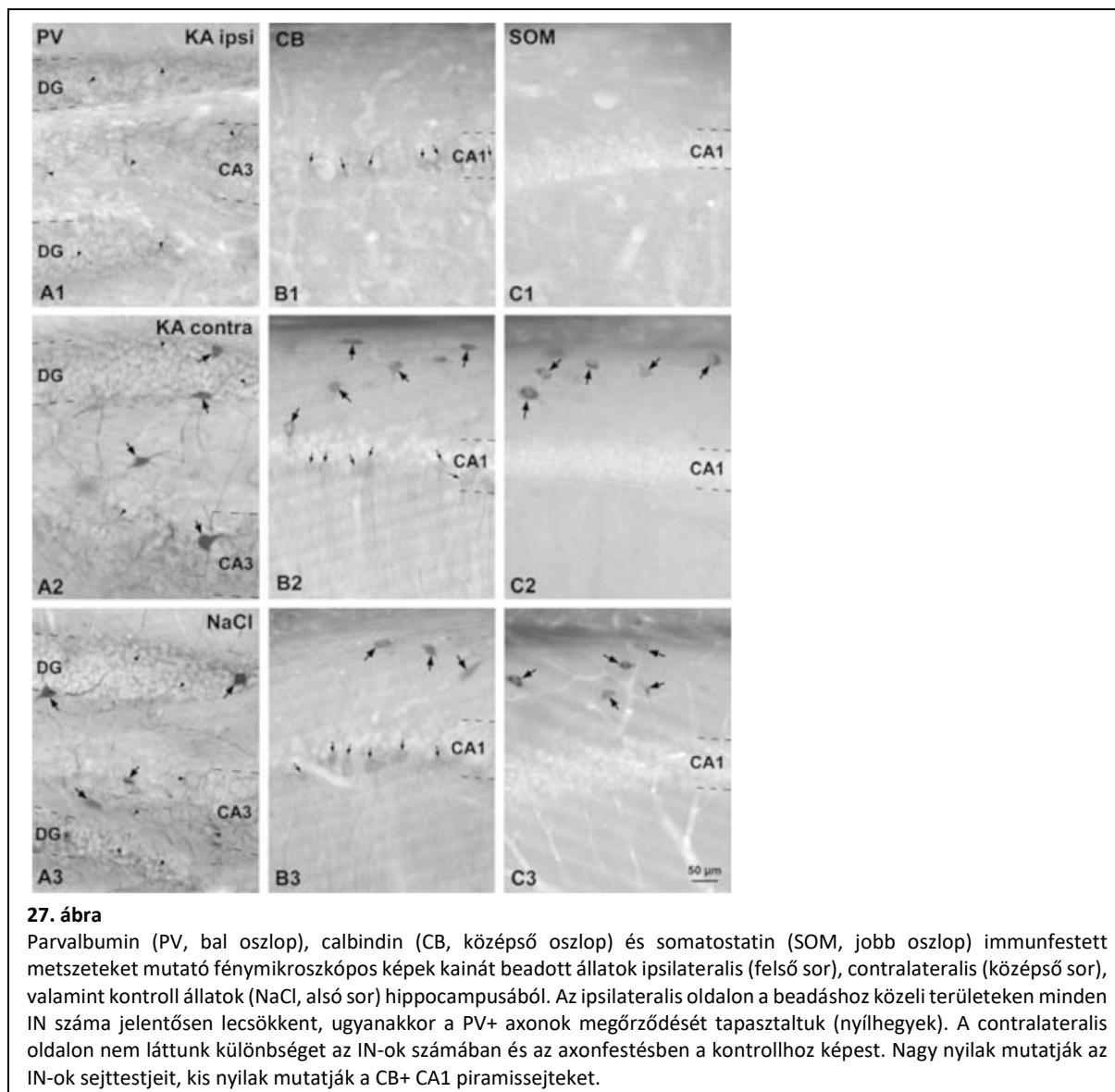


A szeletekbe injektált kainát a beadás környékén a neuronális aktivitást elnyomta, míg a távolabbi területeken gyakran egy megnövekedett szinkron aktivitást idézett elő. A rohamok szinaptikus úton terjedő mechanizmusait úgy tártuk fel, hogy az élő állatok hippocampusába injektáltuk be a kainátot, majd a 2-2.5 óra elteltével készített szeleteket vizsgáltuk (26. ábra). 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 beadástól számított 2-5 óra elteltével. A távoli szeletekben azonban jelentős extracelluláris sejtüzés volt megfigyelhető, melyet interiktális tüskékre emlékeztető populációs események kísértek. Ezek a tüskék a CA3 vagy a CA1 régióban keletkeztek, és onnan terjedtek a gyrus dentatus és a subiculum felé. Az ellenoldali hippocampusból készített szeletekben (ahol csak a szinaptikus terjedés alakítja az epilepsziás

aktivitást), szintén regisztráltunk interiktális-jellegű tuskéket a beadást követő 2-5 órában. A neuronális aktivitás hiánya a beadás körüli területeken mindkét modellben nagyon szembetűnő volt, és felvetődött a hipotézis, hogy ez a neuronok pusztulásával állhat összefüggésben. Gallyas-féle ezüstimpregnációs módszerrel (Gallyas *et al.*, 1990) igazoltuk, hogy az azonos oldali hippocampus CA1 és CA3 régiókban igen jelentős sejtpusztulás tapasztalható, míg a többi területeken (gyrus dentatus, subiculum és az ellenoldali hippocampus) nem láttunk pusztuló neuronokat.

A különböző típusú interneuronok immunhisztokémiai vizsgálata azt derítette ki, hogy az injektált területen minden gátlósejt száma jelentősen lecsökkent (26. ábra). Az ipsilateralis hippocampusban, ahogy távolodtunk a beadási helytől, egyre kevésbé volt jelentős a gátló sejtek számának csökkenése. 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. A késleltetett epileptiform aktivitások megjelenése a szeletekben hasonló időintervallumra esik, mint a status epilepticus kialakulása az élő állatban. Ez felveti a kérdést, hogy ez a két jelenség összefügg-e. Az injektált területek, lévén, hogy alig maradt élő neuron, nem tudnak hozzájárulni a status epilepticus kialakulásához, de az ipsilateralis távolabbi területek és az ellenoldali hippocampusban megjelenő szinkron aktivitások valószínűleg szerepet játszanak benne.

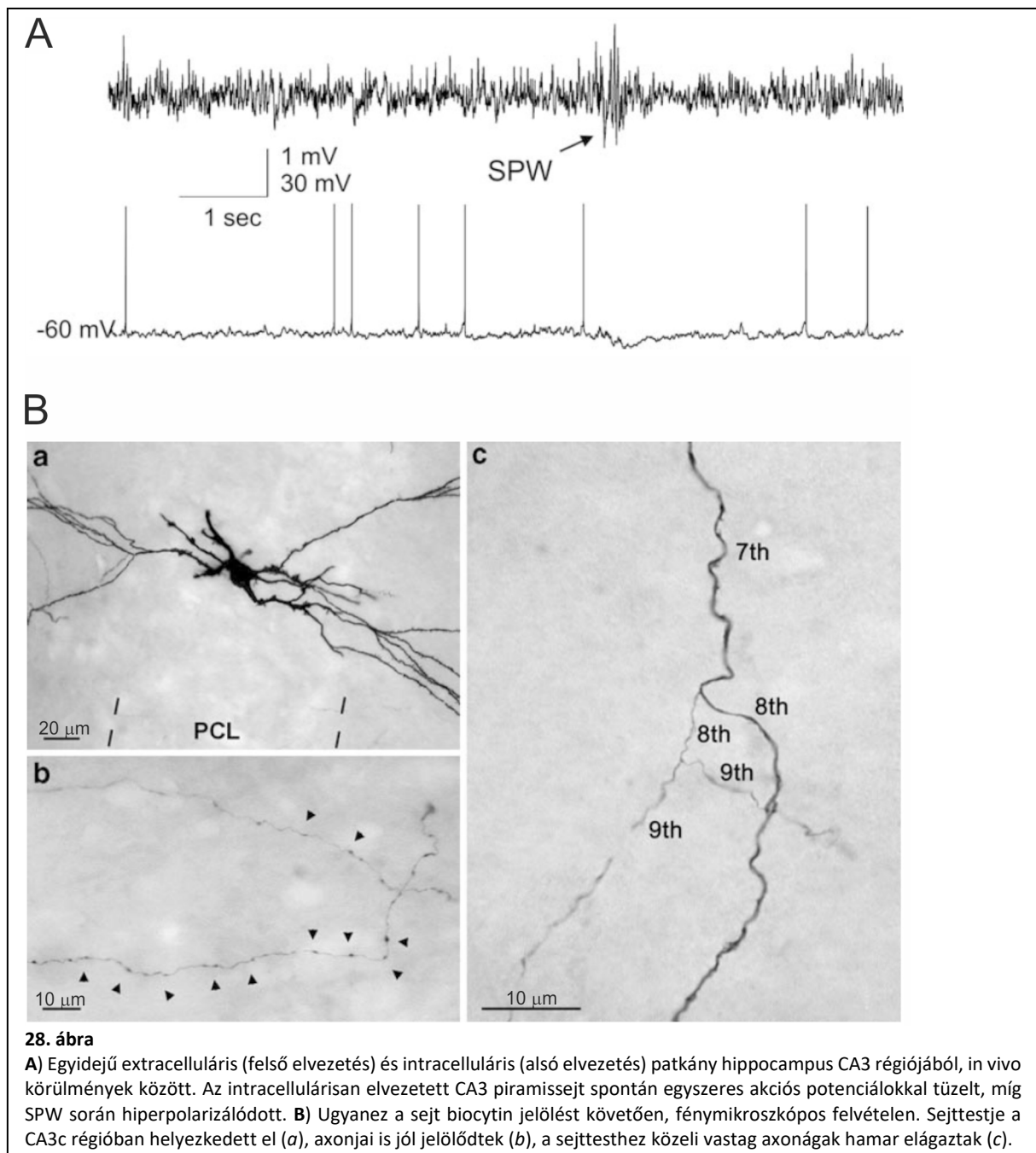




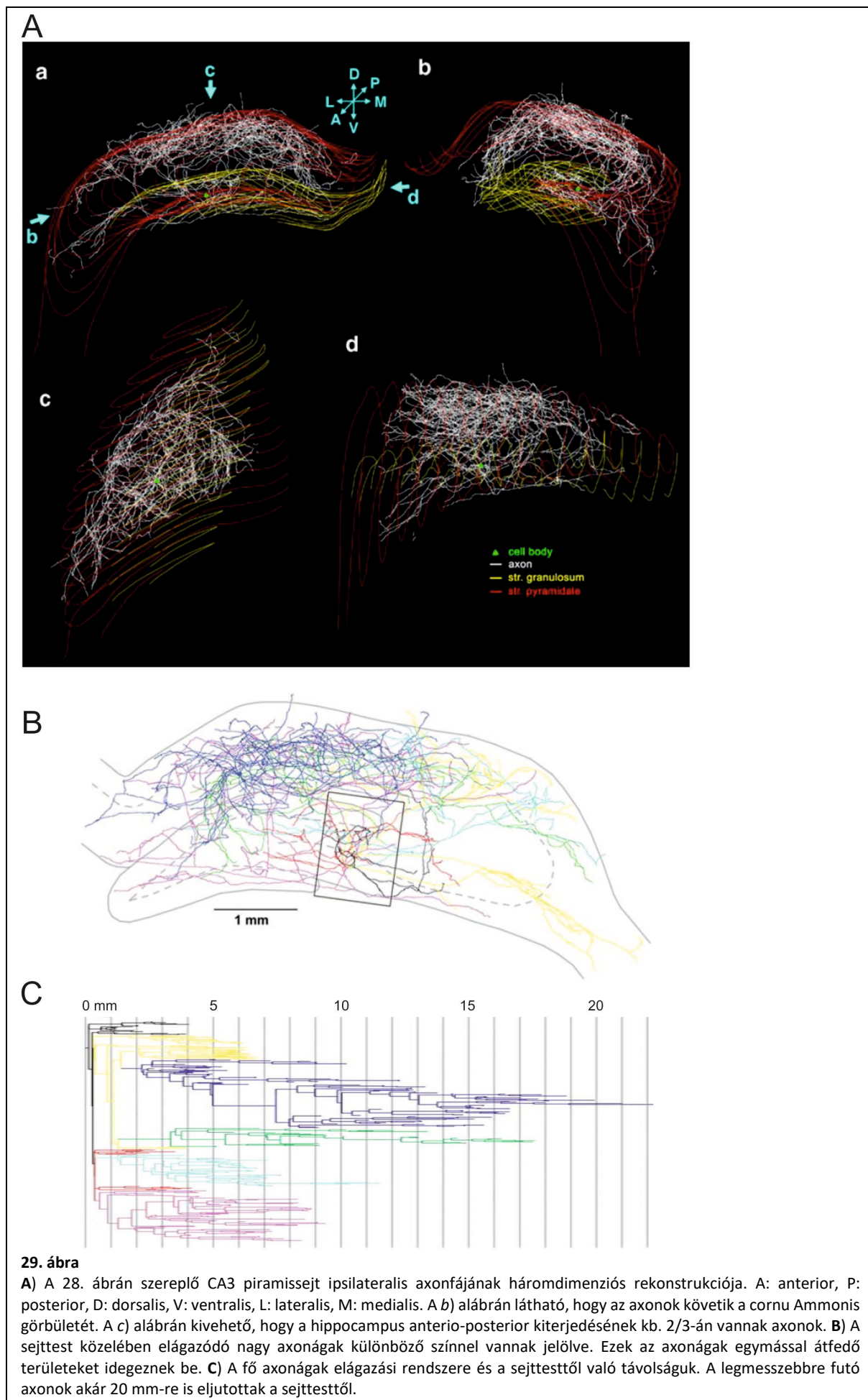
4.1.3 Hippocampalis szinkron aktivitások anatómiai háttere rágcslókban (Wittner *et al.*, 2006, 2007)

A CA3 piramis sejtek összeköttetéseinek és kimenetének, valamint azok szinkronizációban betöltött szerepének a vizsgálatára *in vivo* intracelluláris elvezetést követő sejtöltést és sejtreakonstruktóit végeztünk patkányok hippocampusában. A töltött sejtek nagy részének axon arborizációját részlegesen, továbbá egy CA3 piramis sejt teljes axonfáját rekonstruáltuk három dimenzióban, a NeuroLucida mikroszkóp rendszer segítségével (28. ábra). Korábbi munkákkal megegyezően (Ishizuka *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1994) kimutattuk, hogy a CA3 piramis sejtek axonjai a

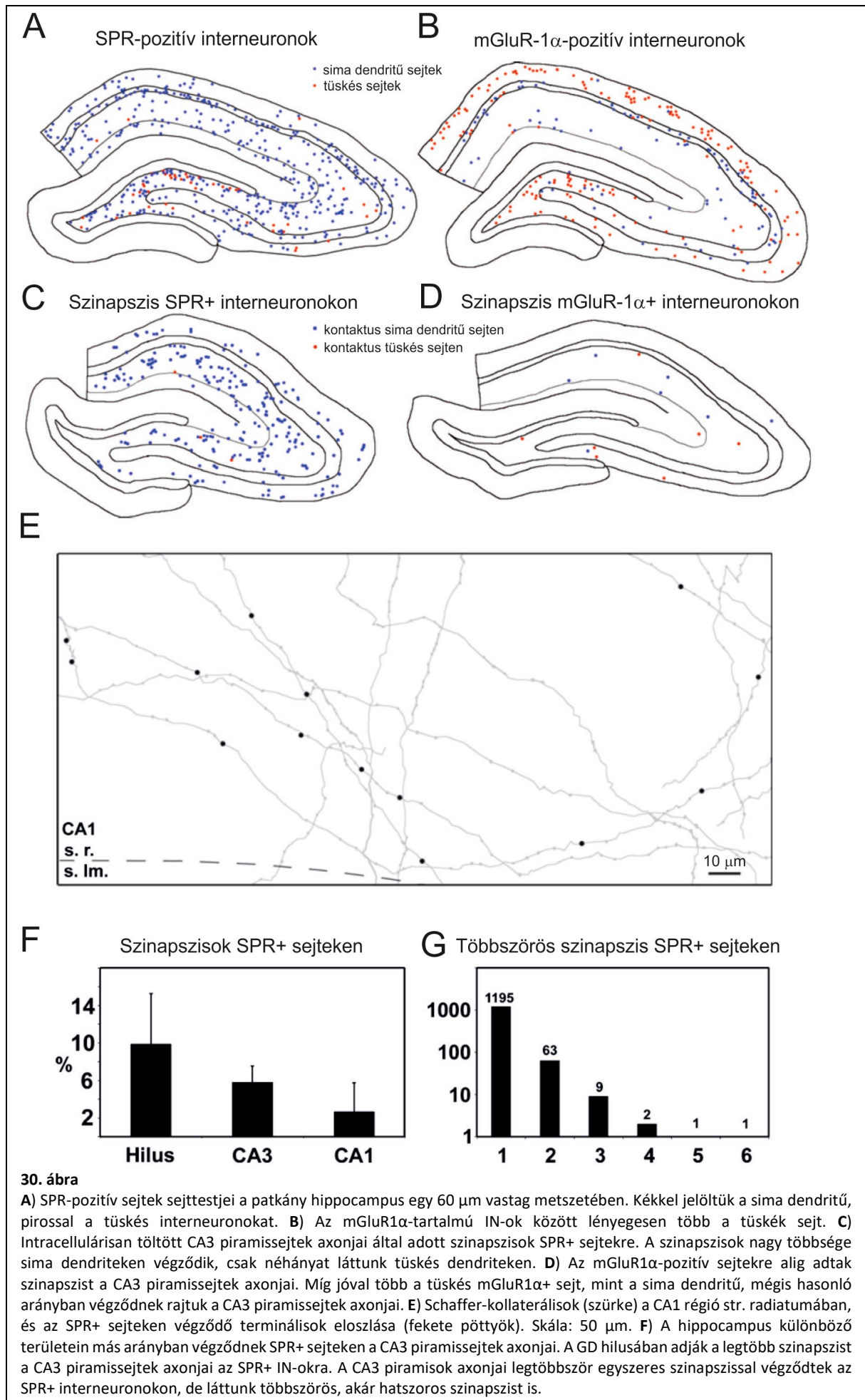
hosszanti tengely mentén a hippocampus kb. 2/3-ába vetítenek. A fő axon a sejttesthez közel több ágra ágazott, és minden axonág adott kollaterálisokat az azonos oldali CA3 és CA1 régiókba egyaránt.

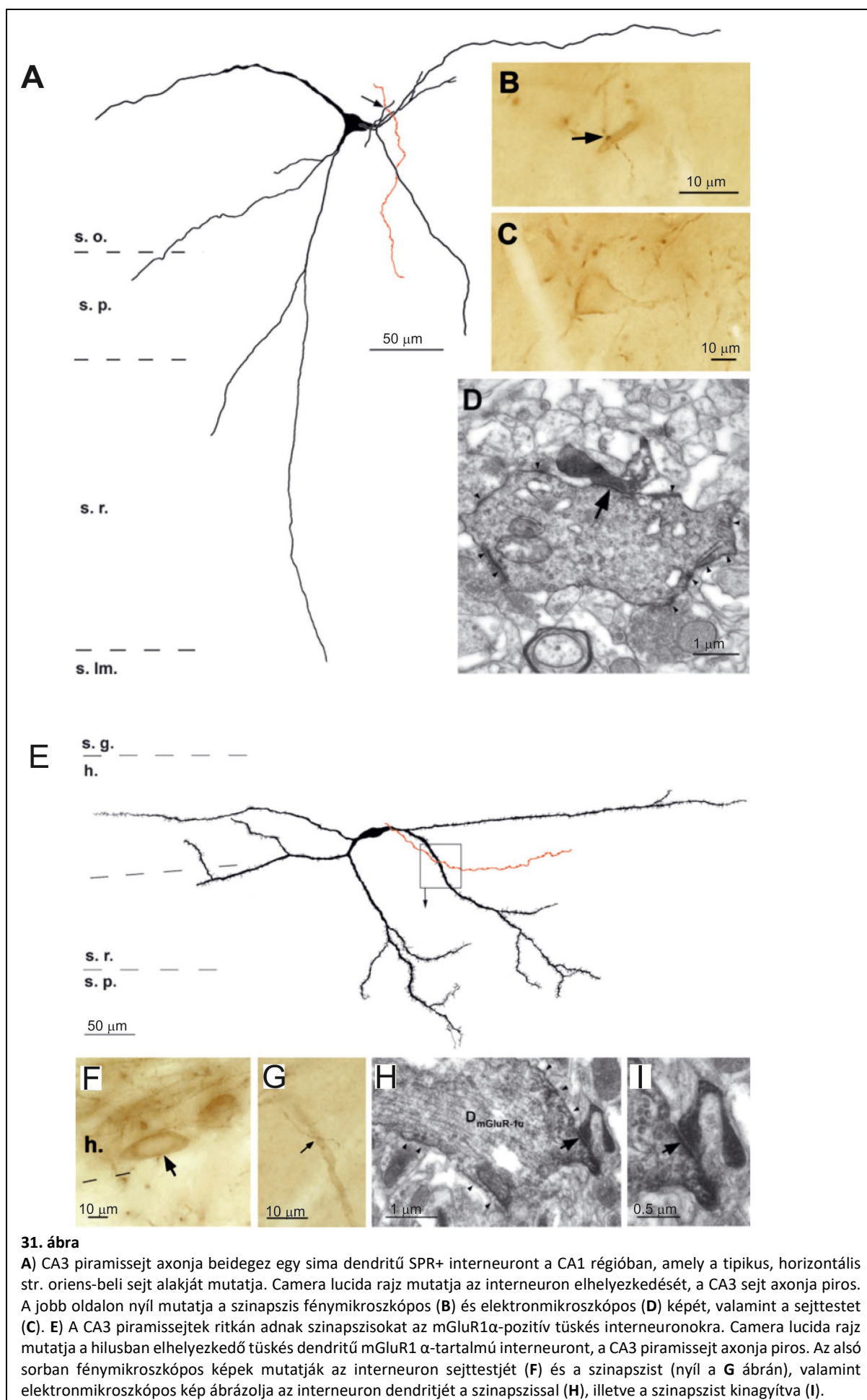


Az axonágak a sejttesttől több, mint 2 cm-re eljutottak, a teljes axonfa hossza meghaladta az 50 cm-t, az axon terminálisok száma pedig csaknem elérte a 40 000-et, amely potenciálisan majdnem ugyanennyi szinapszist is jelent (29. ábra). Az axon terminálisok eloszlása az axonágak mentén homogénnek mutatkozott, amely azzal együtt, hogy több axonág is vetít ugyanarra a területre, arra utal, hogy a CA3 piramissejtek a közeli CA3 sejteket és a távolabbi CA1 neuronokat hasonló eséllyel idegzik be.



Megvizsgáltuk a CA3 piramissejtek gátló interneuronokra adott szinapszisainak az eloszlását is. Az intracellulárisan feltöltött CA3 piramissejtek substance P receptor (SPR) és metabotróp glutamát receptor 1 α (mGluR-1 α) tartalmú interneuronokon végződő axonterminálisait elemeztük (30. ábra). Első sorban azért ezekre a markerekre esett a választás, mert mindkettő Golgi jelöléshez hasonló módon festi az interneuronok sejttestjét és dendritjeit, axonok nélkül. Az SPR tartalmú sejtek között mindhárom funkcionális interneuron típus – vagyis periszomatikus, dendritikus és interneuron-szelektív interneuronok – is megtalálható (Acsády *et al.*, 1997; Sloviter *et al.*, 2001). Az mGluR1 α pedig egy jól meghatározott dendritikus interneuron csoportot jelöl, a GD hilusában elhelyezkedő, jellegzetes, tüskés dendritekkel rendelkező ún. HIPP- és a cornu Ammonis str. oriens rétegében található O-LM sejteket (Freund & Buzsáki, 1996). Az SPR-pozitív sejtek nagy része sima dendritű interneuron, egy kis része, főleg a hilusban és a CA3 régió str. lucidumában elhelyezkedők pedig tüskés dendritekkel rendelkezik. A vizsgálataink azt mutatták, hogy a CA3 piramissejtek az gátló idegsejteket szelektíven idegzik be. A hippocampus minden régiójában szelektíven a sima dendritű sejtekre adnak szinapszisokat, míg a tüskés interneuronokon csak elvétve láttunk axon terminálisokat. Ha mégis, akkor is a dendrittörzsön végződtek, sosem a dendrittüskén (31. ábra). Az interneuron célsejtekre adott szinapszisok jelentős többsége egyszeres szinapszis volt (86%), bár többszörös szinapszisokat (akár hatszorost) is találtunk. Ezeknek az eredményeknek a jelentősége abban áll, hogy úgy tűnik, a CA3 piramissejtek adott gátló interneuron csoportokat beidegeznek, míg másokat elkerülnek. A sima dendritű interneuronok között jelentős számban találhatóak mind PV-, mind CCK-pozitív periszomatikus gátlósejtek, amelyeknek fontos szerepét láttuk a SPW-ek kialakításában az elektrofiziológiai kísérleteinkben (lásd fentebb).

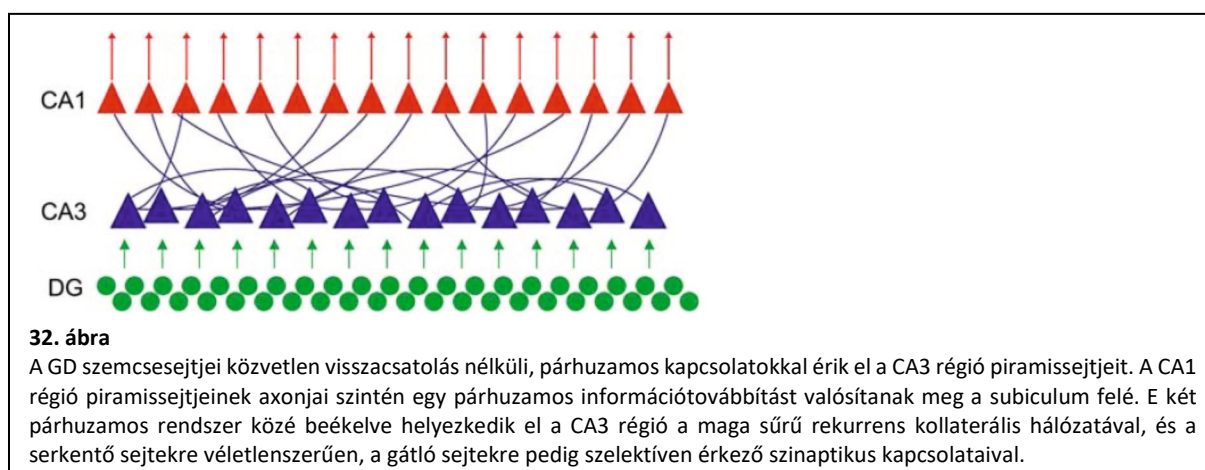




31. ábra

A) CA3 piramisesejt axonja beidegez egy sima dendritű SPR+ interneuront a CA1 régióban, amely a tipikus, horizontális str. oriens-beli sejt alakját mutatja. Camera lucida rajz mutatja az interneuron elhelyezkedését, a CA3 sejt axonja piros. A jobb oldalon nyíl mutatja a szinapszis fénymikroszkópos (**B**) és elektronmikroszkópos (**D**) képét, valamint a sejttestet (**C**). **E)** A CA3 piramisettek ritkán adnak szinapsziszokat az mGluR1 α -pozitív tüskés interneuronokra. Camera lucida rajz mutatja a hilusban elhelyezkedő tüskés dendritű mGluR1 α -tartalmú interneuront, a CA3 piramisesejt axonja piros. Az alsó sorban fénymikroszkópos képek mutatják az interneuron sejttestjét (**F**) és a szinapszist (nyíl a **G** ábrán), valamint elektronmikroszkópos kép ábrázolja az interneuron dendritjét a szinapszissal (**H**), illetve a szinapszist kinagyítva (**I**).

A CA3 régió speciális összeköttetési rendszere és kimeneti mintázata kiemelt szereppel bír a hippocampus információáramlási mechanizmusában. A hippocampus bemeneti régiója a gyrus dentatus, amelyben a szemsesejtek közvetlen visszacsatolás nélküli, párhuzamos kapcsolatokkal érik el a CA3 régió piramisait. Hasonlóképpen, a hippocampus kimenetét adó CA1 régióban szintén nagyon ritka a CA1 piramisait közötti direkt, serkentő kapcsolat, a CA1 piramisait 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 (32. ábra). 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

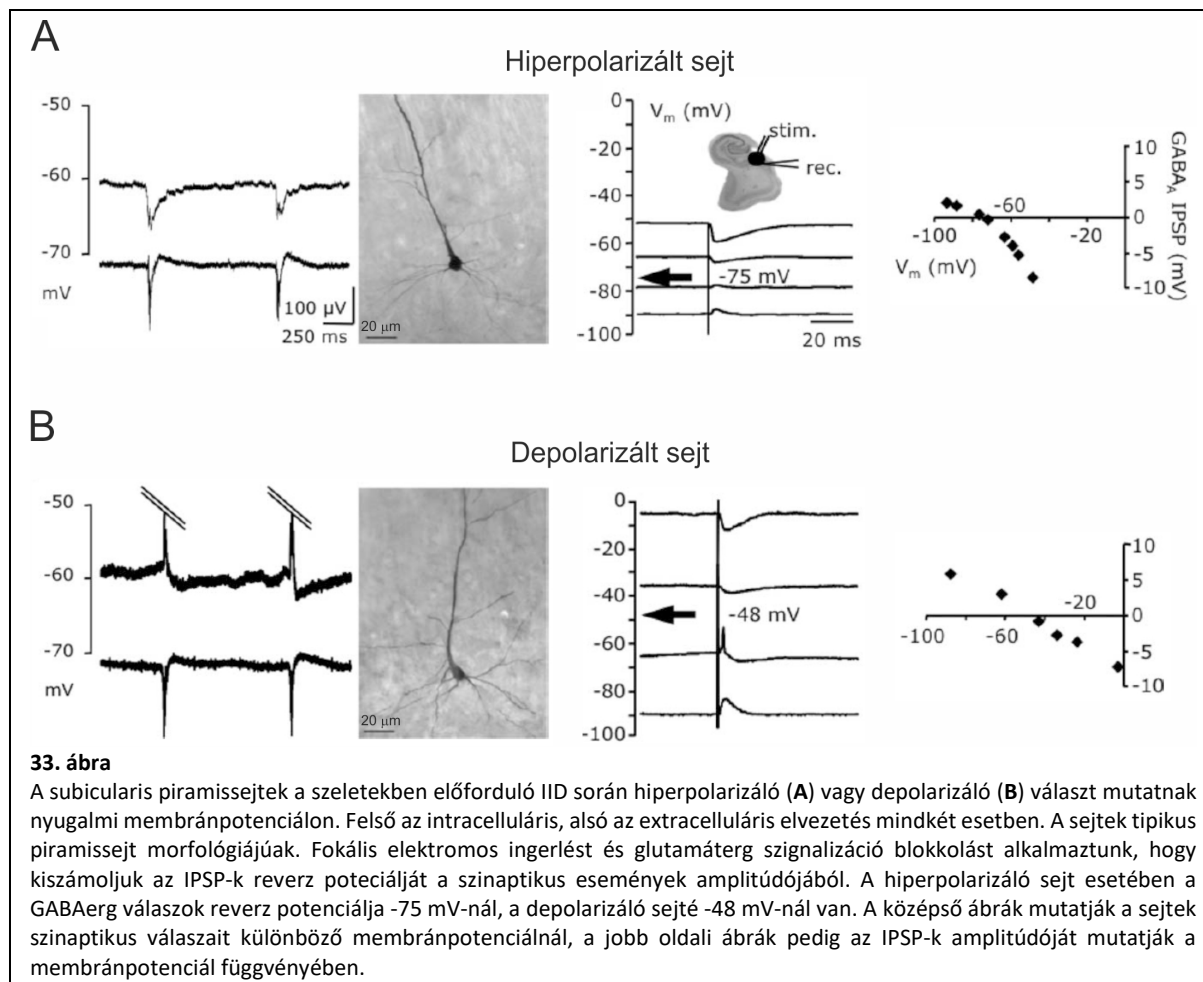
A temporális lebeny eredetű epilepszia az egyik leggyakoribb parciális epilepsziás tünetegyüttes, amely többnyire egyszerű és komplex parciális rohamokkal jár (Fisher *et al.*, 2017). Az epileptogén terület a temporális lebenyben található, és az esetek nagy többségében a hippocampusnak vitathatatlanul fontos szerepe van az epilepsziás aktivitás generálásában. A hippocampalis sclerosis jelensége, mely gyakori patológiája a temporális lebeny eredetű epilepsziáknak, jó ideje kutatott és relatíve részletesen leírt komplex változásokat takar (Thom, 2014). Jellegzetes sejtpusztulási mintázat jellemzi a scleroticus hippocampust: míg a gyrus dentatus, a CA2

régió és a subiculum nagyrészt megőrződött, addig a CA1 régióban szinte teljes, a CA3 régióban pedig részleges sejtpusztulás látható, mely MR felvételekkel is kimutatható. Az epilepsziás betegek egy részének – annak ellenére, hogy akár hosszú éveken keresztül fennálló rohamaik vannak – nem scleroticus a hippocampus. Az MR felvételen egészségesnek tűnő hippocampusban ugyanakkor anatómiai vizsgálatokkal kimutatható a főleg gátlósejteket érintő sejtpusztulás, és egy jellegzetes szinaptikus reorganizáció (összefoglalóként lásd (Maglóczky & Freund, 2005)). A betegeinket a hippocampusuk érintettsége alapján a jelentősen scleroticus, sHS (severe hippocampal sclerosis) és gyengén scleroticus, mHS (mild hippocampal sclerosis) csoportokba osztottuk. Az interiktális tüskék kialakulási mechanizmusait a hippocampus kimeneti régiójára, a subiculumra, valamint a szintén megőrződött CA2 régióra fókuszáltuk. Annak megértése, hogy az epilepsziás aktivitás hogyan keletkezik ezeken az agyterületen, elősegítheti, hogy esetlegesen olyan beavatkozási pontokat találjunk, amelyekre új terápiák fejleszthetők ki a jövőben.

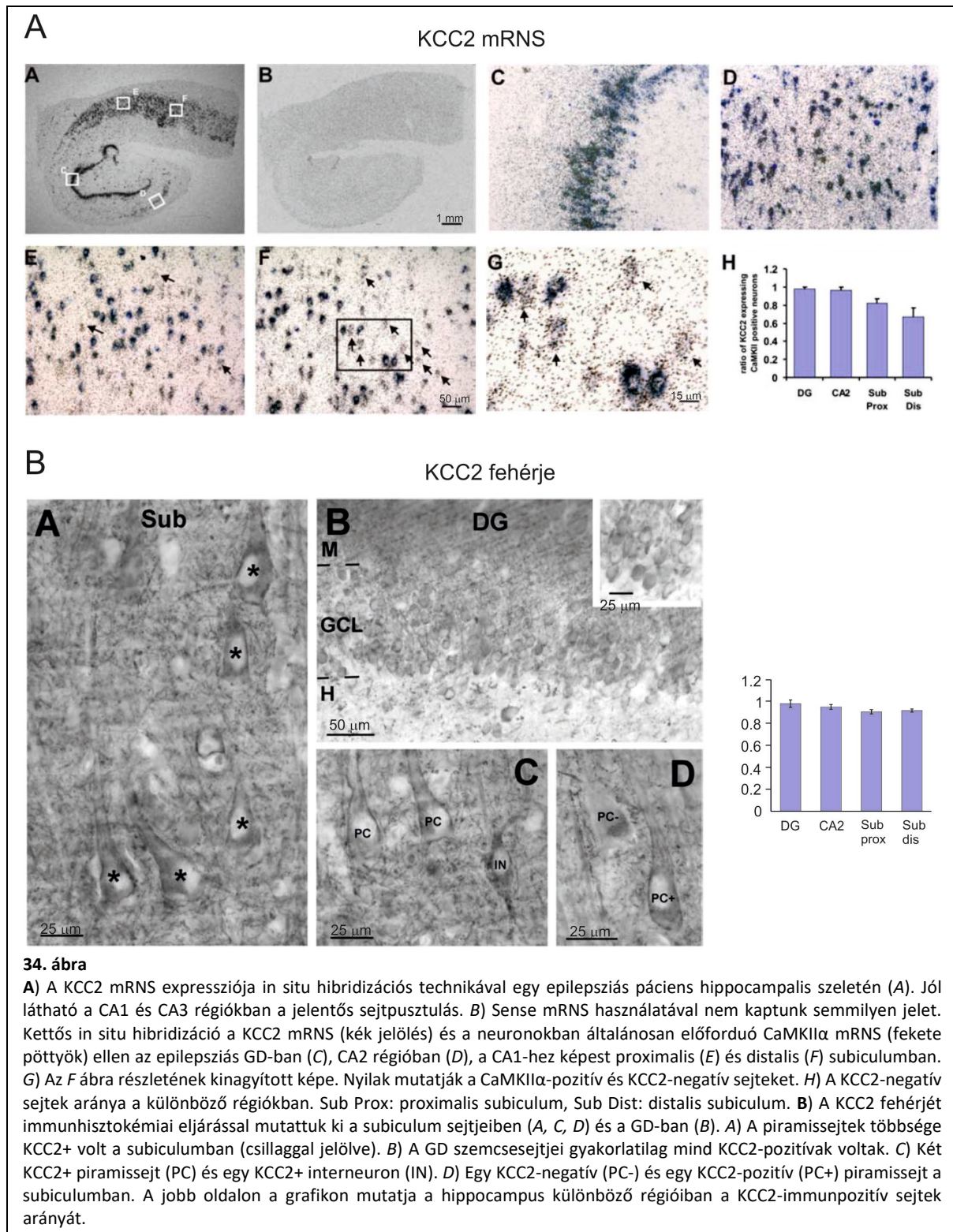
4.2.1 A subiculumban keletkező interiktális tüskék (Huberfeld *et al.*, 2007)

Epilepsziás betegek temporális lobectomia műtétje során eltávolított hippocampalis szövetből szeleteket készítettünk, és *in vitro* körülmények között vizsgáltuk az interiktális tüskék kialakulását a subiculumban. Az *in vitro* körülmények között, fiziológias oldatban keletkező populációs események nagyon hasonlítanak az *in vivo* regisztrált interiktális tüskékhez. Richard Miles csoportjának korábbi munkája nyomán (Cohen *et al.*, 2002) kiderült, hogy ezen interiktális-jellegű események során a GABA a megszokott hiperpolarizáló hatásával szemben depolarizációs választ válthat ki a subicularis piramis sejtek kb. 20%-ában. Jelen kísérletsorozatunkban arra szerettünk volna fényt deríteni, hogy milyen molekuláris folyamatok lehetnek a GABÁ-ra adott depolarizáló válasz hátterében. Fiziológiásan a GABA_A receptorokon keresztül a sejt belsejébe folyó negatív töltésű kloridionok hiperpolarizálják a membránokat. A sejtmembrán két oldala között a kation-klorid kotranszporterek állítják fel a kloridion grádiensét, az egyes típusú Na-K-Cl kotranszporter (NKCC1) viszi be az intracelluláris térbe a kloridionokat, míg a kettes típusú K-Cl kotranszporter (KCC2) juttatja ki az extracelluláris térbe. Ha a felállított gradiens megváltozik, mert pl. a KCC2 nem fejeződik ki a sejtben, akkor előfordulhat, hogy a kloridionok a GABA receptorok aktivációja nyomán nem befelé, hanem kifelé áramlanak, és ez depolarizációt okoz (ld. 12. ábra). Intracelluláris elvezetések és anatómiai módszerek segítségével próbáltuk feltárni, hogy vajon a megváltozott klorid homeosztázis lehet-e a felelős a depolarizációt okozó GABA-válaszért. Kimutattuk, hogy a piramis sejtek morfológiája, vagy az elhelyezkedése

(piramissejt réteg külső vs. belső felén) nem mutatott különbséget a két sejtcsoport között. Továbbá a sejtek alapvető elektrofiziológiai paraméterei (nyugalmi membránpotenciál, input rezisztencia, burst vagy szabályos tüzelési mintázat) is hasonlóak voltak a depolarizáló és a hiperpolarizáló választ adó sejtekben. A GABA reverz potenciál azonban különbözött: a depolarizáló sejtek esetében ez kevésbé volt negatív (33. ábra).

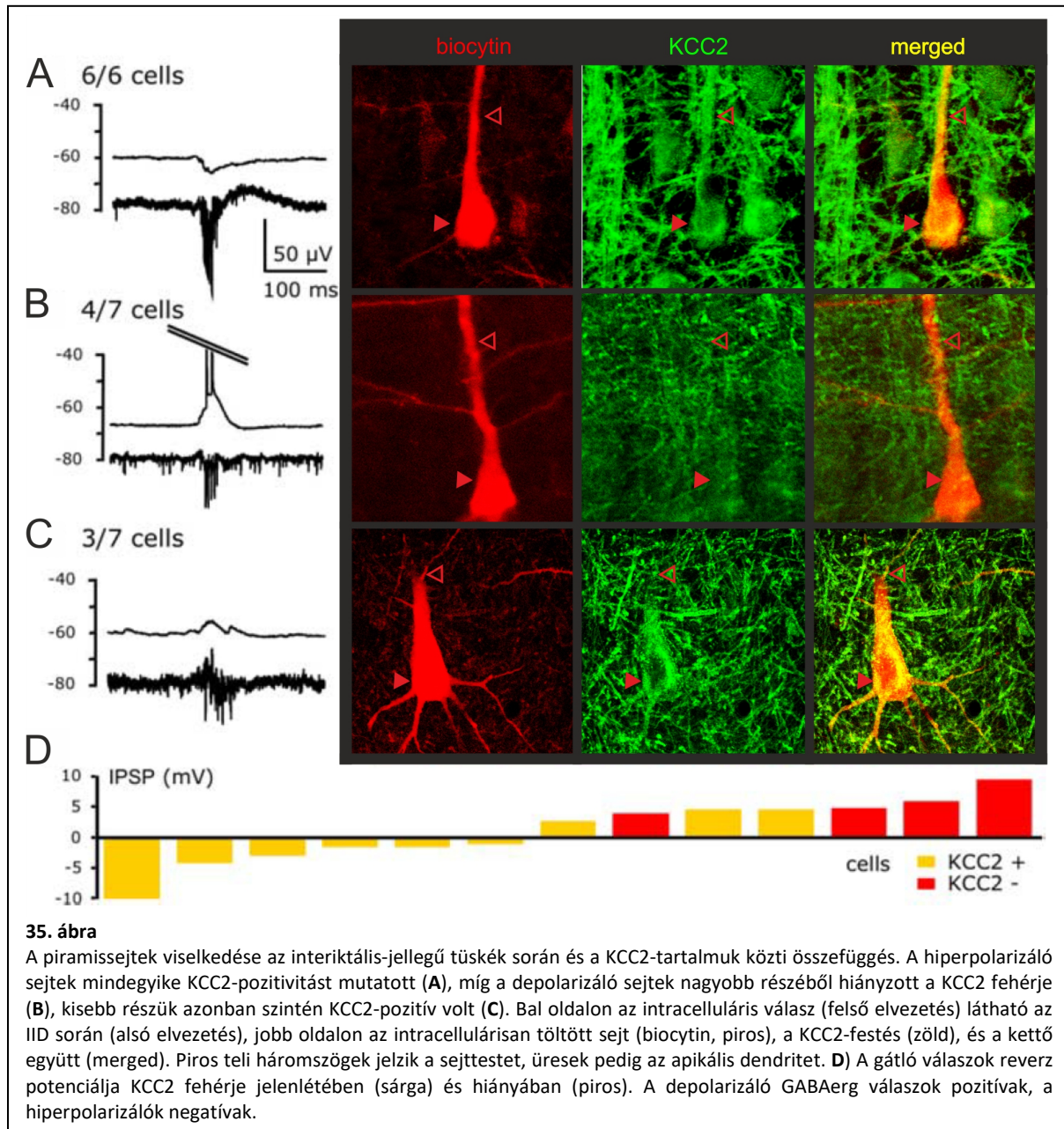


A KCC2 transzporter expressziójának vizsgálata alátámasztotta a feltevésünket, hogy a klorid homeosztázis megváltozása lehet a GAB_A-ra adott depolarizáló válasz hátterében a subiculumban. A KCC2 mRNS-ének in situ hibridizációs módszerrel történő vizsgálata kimutatta, hogy a subiculumban a piramissejtek 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 (34. ábra). További immunhisztokémiai vizsgálattal a subicularis piramissejtek kb. 10%-ában nem tudtunk KCC2 fehérjét kimutatni, míg a gyrus dentatusban ez az érték kb. 3%, a CA2 régióban pedig kb. 6% volt (34. ábra). Kontrollnak egészséges makákó majom hippocampusában vizsgáltuk mag a KCC2 fehérje kifejeződését, és azt találtuk, hogy szinte minden sejt tartalmaz KCC2-t: a subiculumban kb. 0,2%, a CA2 régióban pedig 1,8% volt csak a KCC2-negatív sejtek aránya.

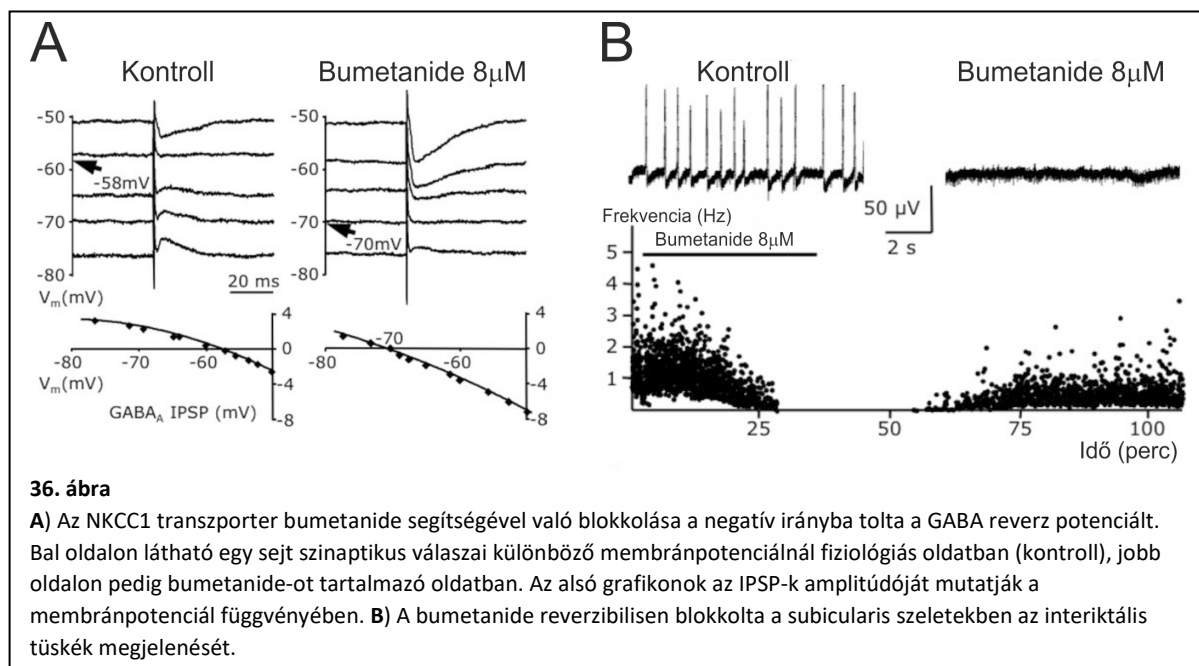


Ahhoz, hogy a KCC2 transzporter fehérje kifejeződése és a depolarizáló GABA válasz közötti kapcsolatot kimutassuk, komplex intracelluláris elvezetést, sejtöltést és post hoc immunfestést végeztünk. Megállapítottuk, hogy minden hiperpolarizáló választ adó sejt KCC2 pozitív volt (n=7), míg a depolarizáló választ adó sejtek nagyobb részében (n=4/7) hiányzott a KCC2 fehérje (35. ábra). Ez arra

utal, hogy a kloridion grádiens regulációja valóban kapcsolatban van a GABÁ-ra adott depolarizáló válasszal.



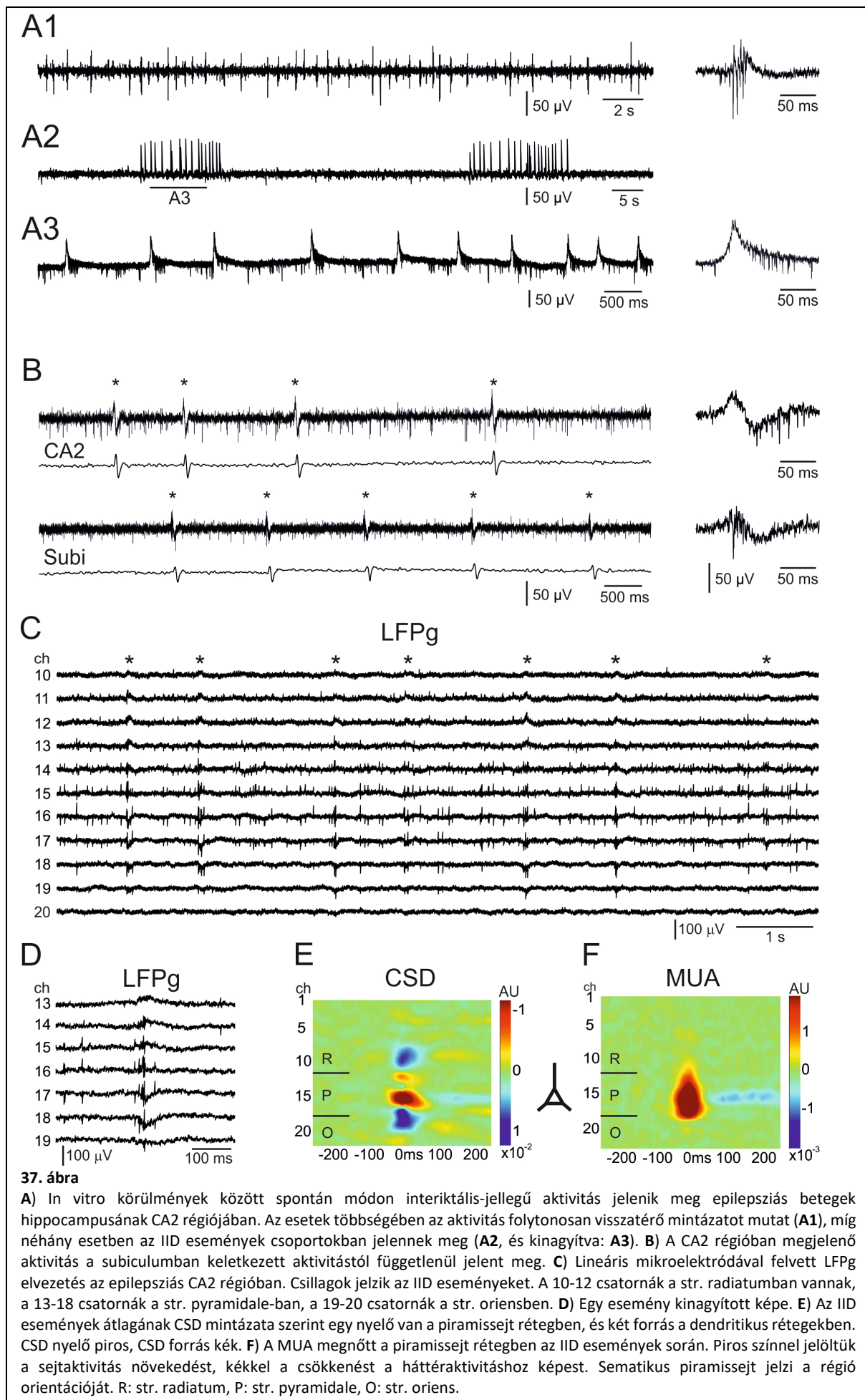
Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy az NKCC1 transzporter farmakológiai blokkolása eltolja az IPSP reverz potenciált a negatív irányba és visszaállítja a hiperpolarizáló választ (36. ábra), valamint reverzibilisen blokkolja az interiktális tüskék megjelenését. Összességében tehát elmondhatjuk, hogy a kation-klorid kotranszporterek (NKCC1 és KCC2) által felállított kloridion grádiens megváltozása okozhatja azt, hogy a GABA a szokásos hiperpolarizáció helyett depolarizáló választ vált ki a subicularis piramisisejtekben az interiktális tüskék során.



4.2.2 A hippocampus CA2 régiójában megjelenő interiktális tüskék (Wittner *et al.*, 2009)

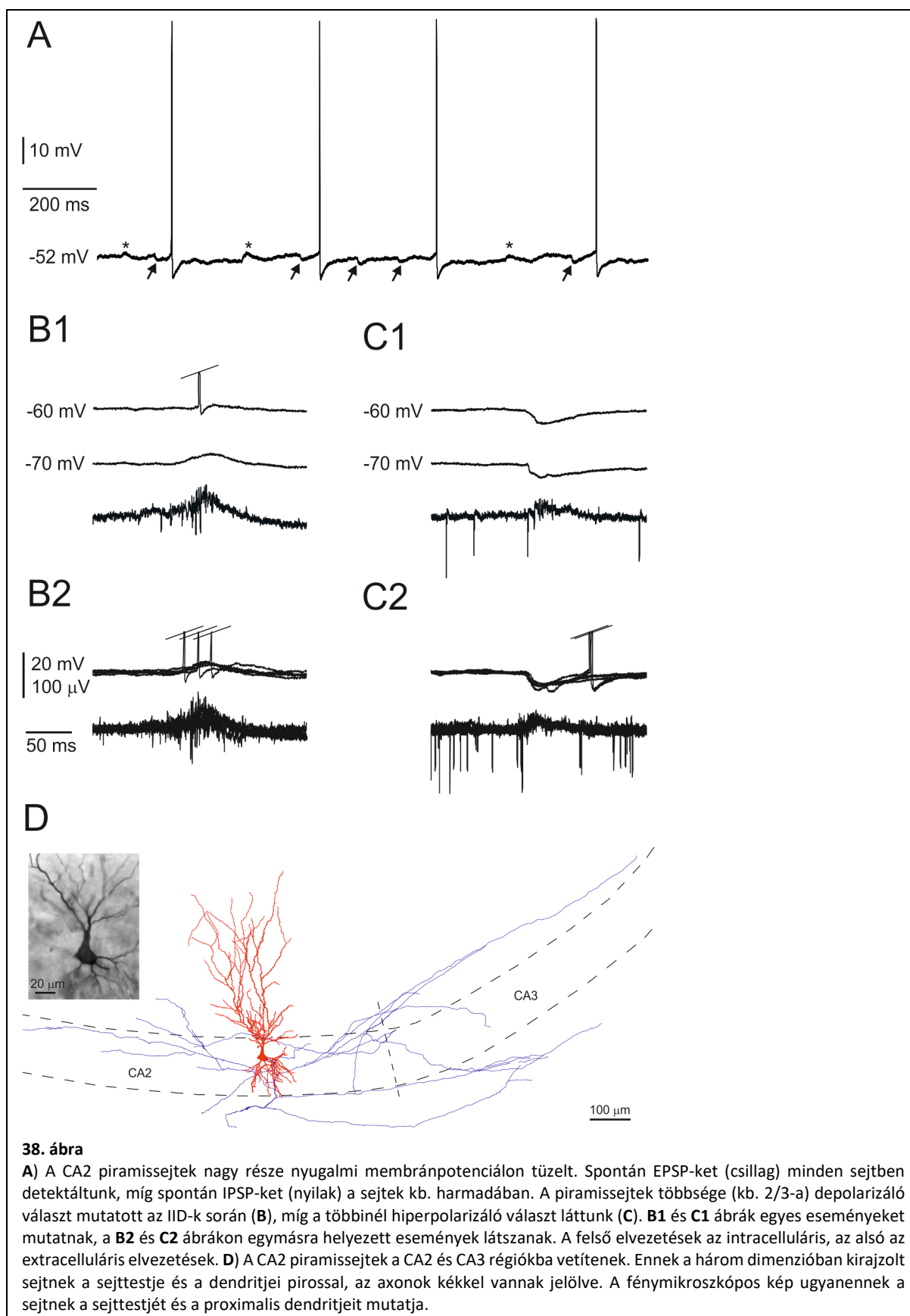
A hippocampalis sclerosis jelensége során jól megfigyelhető, hogy míg a CA1 és CA3 régióban jelentős a sejtpusztulás, addig a gyrus dentatus, a CA2 régió és a subiculum jobban megőrződött területei az epilepsziás hippocampusnak. Míg a subiculumban spontán módon megjelenik (lásd fenn, illetve (Cohen *et al.*, 2002), addig a gyrus dentatusban nem sikerült interiktális tüskéket kimutatni in vitro körülmények között, fiziológias oldatban (Gabriel *et al.*, 2004; Wozny *et al.*, 2005). A kérdés az, vajon a CA2 régió képes-e hasonló populációs aktivitás generálására, és ha igen, vajon hasonló mechanizmusok állnak-e a háttérben, mint a subiculumban. Ennek vizsgálatára in vitro elektrofiziológiai elvezetéseket és hozzá kapcsolódó anatómiai vizsgálatokat végeztünk.

A CA2 régióban is keletkeztek interiktális-jellegű tüskék mind sHS, mind mHS betegekben, in vitro körülmények között, fiziológias oldatban (37. ábra). A subiculumban és a CA2 régióban végzett szimultán elvezetések azt mutatták, hogy a CA2 régióban a subiculumtól függetlenül keletkeznek a tüskék, illetve olyan hippocampalis szeletekben is tapasztaltuk a tüskék megjelenését, amelyek tartalmazták a subiculumot. Ugyanazokban a mintákban, ahol a CA2 régióban tüskéket láttunk, a gyrus dentatusban nekünk sem sikerült interiktális tüske jellegű populációs aktivitást kimutatni. Sokcsatornás lineáris mikroelektródával is végeztünk elvezetést in vitro körülmények között és az interiktális jellegű tüskék során a CA2 piramissejt rétegben egy CSD áramnyelő jelenlétét, valamint a soksejt aktivitás (MUA) emelkedését tapasztaltuk. Ez serkentő folyamatokra utal, ami nem egyezik a subiculumban kimutatott gátláson alapuló mechanizmussal.



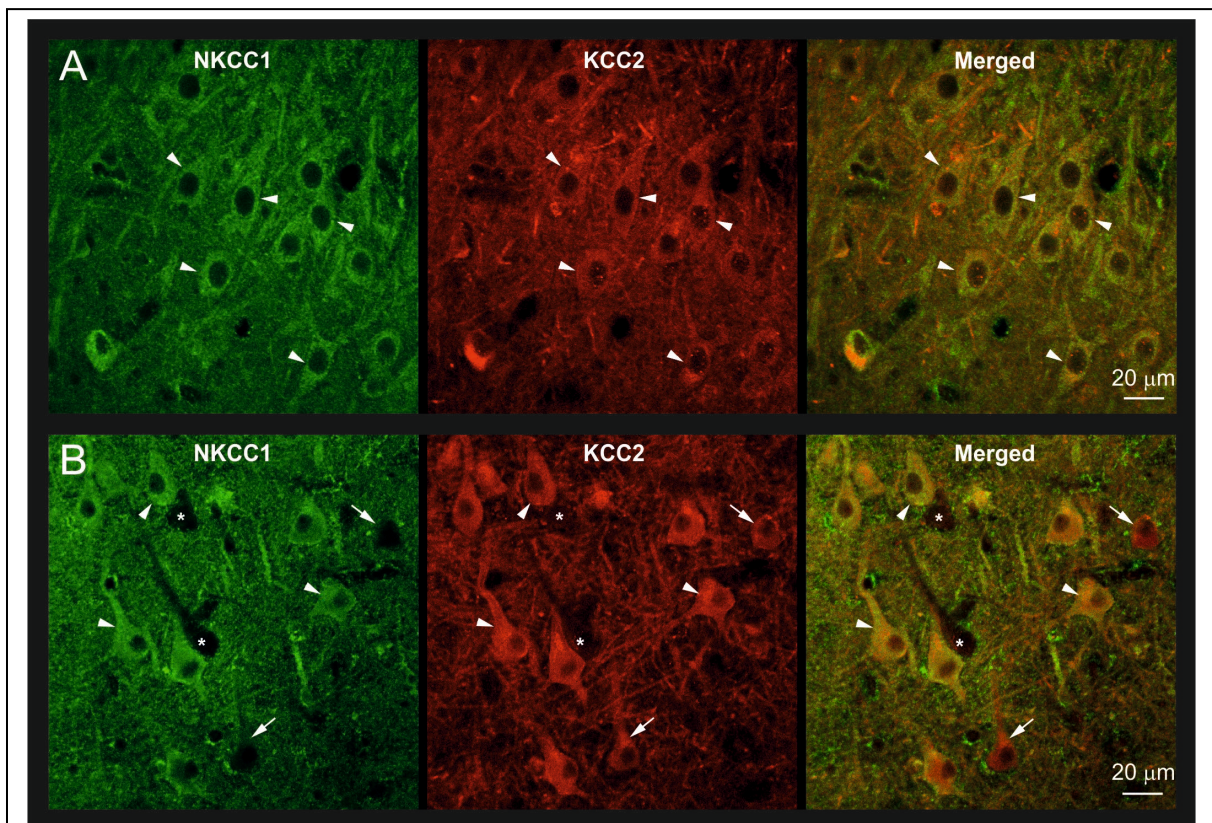
Régi elmélet, hogy a gátlás hiányzik a humán szövetben, és ez összefüggésbe hozható az epilepsziás aktivitás kialakulásával (Williamson *et al.*, 2003). Mivel a CSD adataink is a serkentő folyamatok túlsúlyára utaltak, ennek mindenképp szerettünk volna utánajárni. Intracelluláris elvezetéseket végeztünk, hogy feltárjuk, milyen idegsejtek és hogyan vesznek részt az interiktális jellegű tüskék kialakításában a CA2 régióban. A piramis sejteken láttunk gátló szinaptikus potenciálokot (38. ábra), tehát a gátlás nem tűnik el arról a hippocampalis területről, amely interiktális tüskéket generál. Azt is kimutattuk, hogy a subiculummal ellentétben (ahol a piramis sejtek kb. 80%-a hiperpolarizáló választ ad az interiktális jellegű tüskékre), a CA2 régióban a piramis sejtek kb. 3/4-e depolarizáló válasz mutat, sőt, gyakran tüzelnek is a populációs események során.

A rágcsáló hippocampus sejtjeinek összeköttetéseiről sokat tudunk, de mivel a CA2 régió rágcsálókban relatíve kicsi a CA1 és CA3 régiókhöz képest, így erről a hippocampalis régióról jóval kevesebb információnk van, mint a többiről (lásd Freund & Buzsáki, 1996). Jelentőségét mostanában kezdik felfedezni, és azóta a SPW-ek kialakulásában (Oliva *et al.*, 2016b), valamint a téri információ kódolásában (Oliva *et al.*, 2016a) való szerepét is kimutatták már. Rágcsálókban az elmúlt évtizedben elég részletesen feltárták a CA2 régió szinaptikus kapcsolatait (Robert *et al.*, 2018), de emberben még mindig alig tudunk valamit erről a régióról. Munkánk során intracelluláris sejtöltést, illetve 3 dimenziós rekonstrukciót végeztünk, és kimutattuk, hogy a CA2 piramis sejtek morfológiájukban nagyon hasonlóak a CA3 és CA1 sejtekhez (38. ábra). Axonjaik a CA2-ben arborizálnak, illetve egy sejt-nél kimutattuk, hogy átvetít a CA3 régióba is. A szeletkészítési technika hátránya, hogy távolabbi szinaptikus kapcsolatok nem megállapíthatók, így továbbra sem tudjuk pontosan, hogy emberben is hasonlóak-e a CA2 régió be- és kimeneti kapcsolatai, mint rágcsálókban.



Mivel a subiculumban kimutattuk, hogy a piramissejtek depolarizáló válasza összefüggésben van a sejt kloridion homeosztázisával, így ebben a régióban is megvizsgáltuk a klorid gradiens kialakításáért

felelős két transzporter jelenlétét (39. ábra). A depolarizáló sejtek ilyen aránya mellett azt váránk, hogy a sejtek nagy részében hiányzik a KCC2, de ezzel szemben azt találtuk, hogy majdnem az összes CA2 piramisisejt (kb. 94%) KCC2+ volt, akárcsak a kontrollnak használt makákó majom esetében (kb. 99% KCC2+). Ugyanakkor jelentősebb számban találtunk minden epilepsziás mintában NKCC1-negatív sejteket (átlagosan kb. 12,5%), amely a majomnál elenyésző hányad volt (0,6% NKCC1-). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a kloridion gradiens nem játszik fontos szerepet az interiktális tüskékre adott válaszok kialakításában. Ebben azonban nem lehetünk egészen biztosak, lévén, hogy a fluoreszcens festéssel nem feltétlenül lehet megállapítani, ha egy transzporter (pl. az NKCC1) expressziója és vele együtt az aktivitása megnő, valamint, ha egy jelenlevő transzporter (pl. a KCC2) nem működik. Mégis, mivel egészen más adatokat kaptunk, mint a subiculumban, azt gondoljuk, hogy a CA2 régióban más mechanizmusok játszanak inkább szerepet a depolarizáló válasz és az interiktális-jellegű tüskék kialakításában.

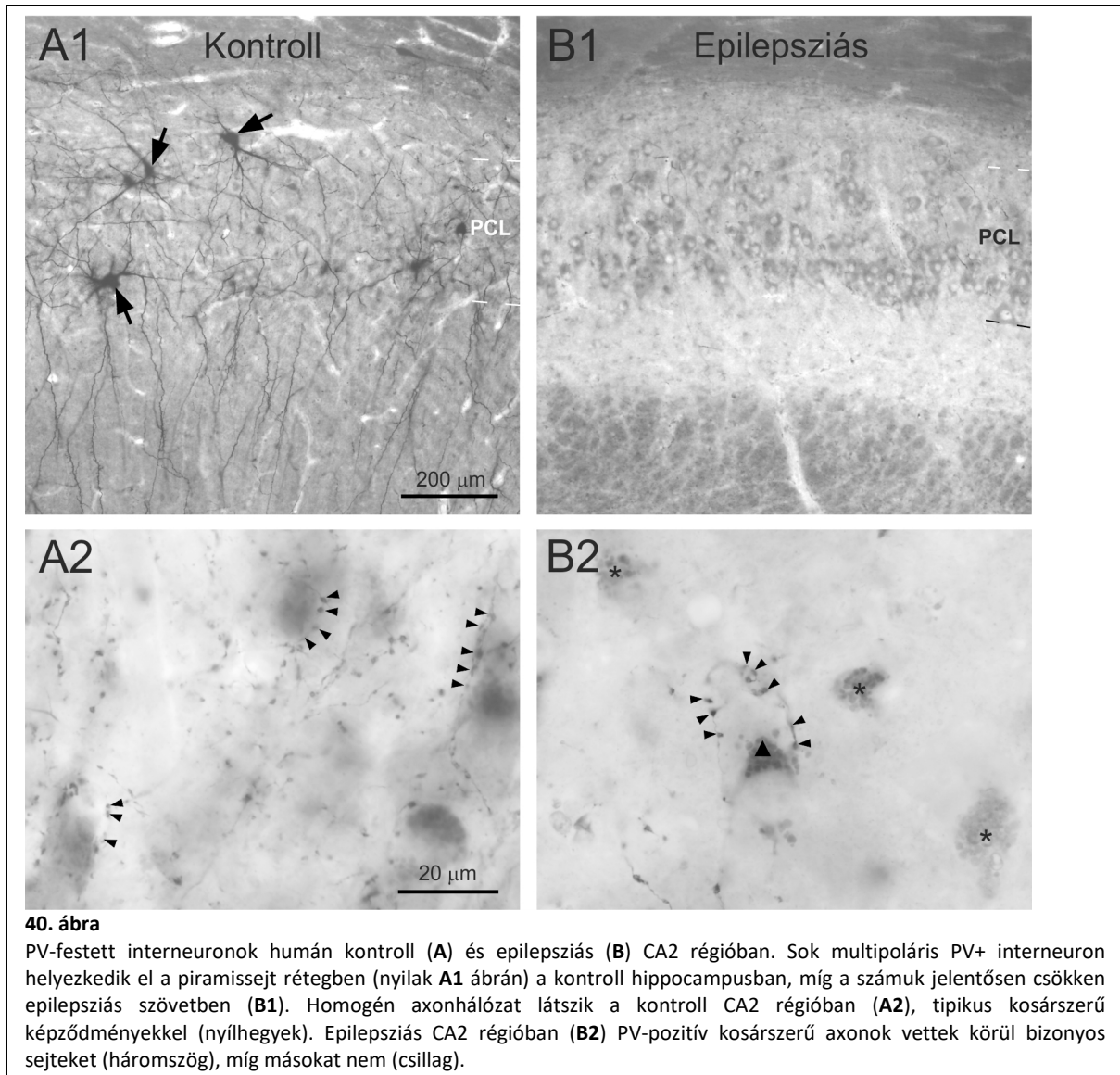


39. ábra

A) Kettős fluoreszcens immunfestés mutatja, hogy a majom hippocampusának CA2 régiójában a sejtek szinte mindegyike kifejezi a kloridiont a sejtbe bejuttató NKCC1 (zöld) és a kifelé juttató KCC2 (piros) transzportereket. Nyílhegyek jelzik az NKCC1+/KCC2+ kettős pozitív sejteket. **B)** A humán epilepsziás CA2 régióban mindkét transzporter downregulálódott, bár különböző mértékben: a CA2 piramisisejtek 13%-a NKCC1-negatív volt (nyilak), míg 6%-a KCC2-negatív volt. Sok kettősen negatív sejtet is (csillag) detektáltunk.

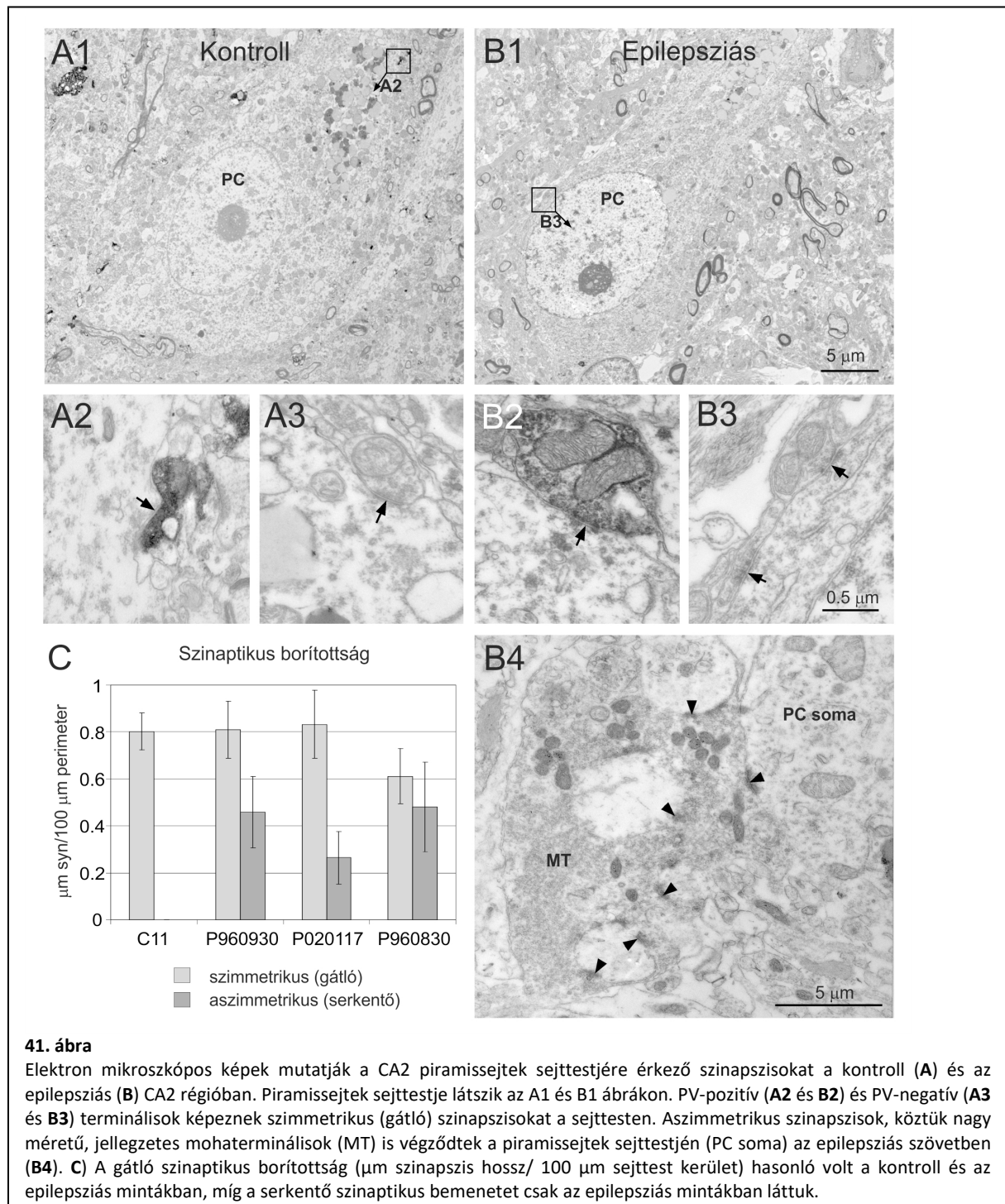
A depolarizáló választ adó sejtek nagy aránya arra is utalhat, hogy a serkentés-gátlás egyensúlya felborulhatott a CA2 régióban, így ezt a lehetőséget is megvizsgáltuk további anatómiai módszerekkel. A parvalbumin (PV) immunfestéssel láthatóvá tett periszomatikus gátlósejtek vizsgálata azt mutatta,

hogy a PV-pozitív sejtek száma nagyon lecsökkent az epilepsziás CA2 régióban a humán post mortem kontrollhoz képest (40. ábra). A sejtek eltűnése mellett ugyanakkor az axonkötegek 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.



Ezek a fénymikroszkópos adatok arra utalnak, hogy a CA2 piramissejtek periszomatikus gátlása lecsökkent. Ugyanakkor ismert tény, hogy maga a PV molekula eltűnik a sejttestekből és a dendritekből több epilepszia modellben (Sloviter *et al.*, 1991; Maglóczky & Freund, 1995; Scotti *et al.*, 1997) és humán epilepsziás szövetben is (Wittner *et al.*, 2001). Így elektron mikroszkóppal is megvizsgáltuk a piramissejtek periszomatikus régiójára érkező szinaptikus bemenetet (41. ábra). Azt találtuk, hogy a CA2 sejtek gátló bemenete nem változott jelentősen a kontrollhoz képest, viszont megjelent egy serkentő bemenet, amely kontrollban nem volt jelen. A jellegzetes morfológiai tulajdonságai alapján

ezt a bemenetet a gyrus dentatus szemcsesejtjeitől érkező moharostokként azonosítottuk. Tehát kimutattuk, hogy a CA2 piramisisejtek sejttestjén a gátló bement nem csökkent, bár valószínűleg funkcionálisan módosult azáltal, hogy a kosár- és csillársejtekből eltűnt a PV. Ezzel egyidejűleg a gyrus dentatus moharostjai sarjadzanak, benőnek a CA2 régióba, ahol a piramisisejtekre adnak egy extra serkentő bemenetet. A serkentés-gátlás egyensúlyának illetően felborulása eredményezheti azt, hogy a CA2 régió képes interiktális-jellegű tuskéket generálni, és hogy a piramisisejtek nagy része depolarizáló választ mutat ezen események során.



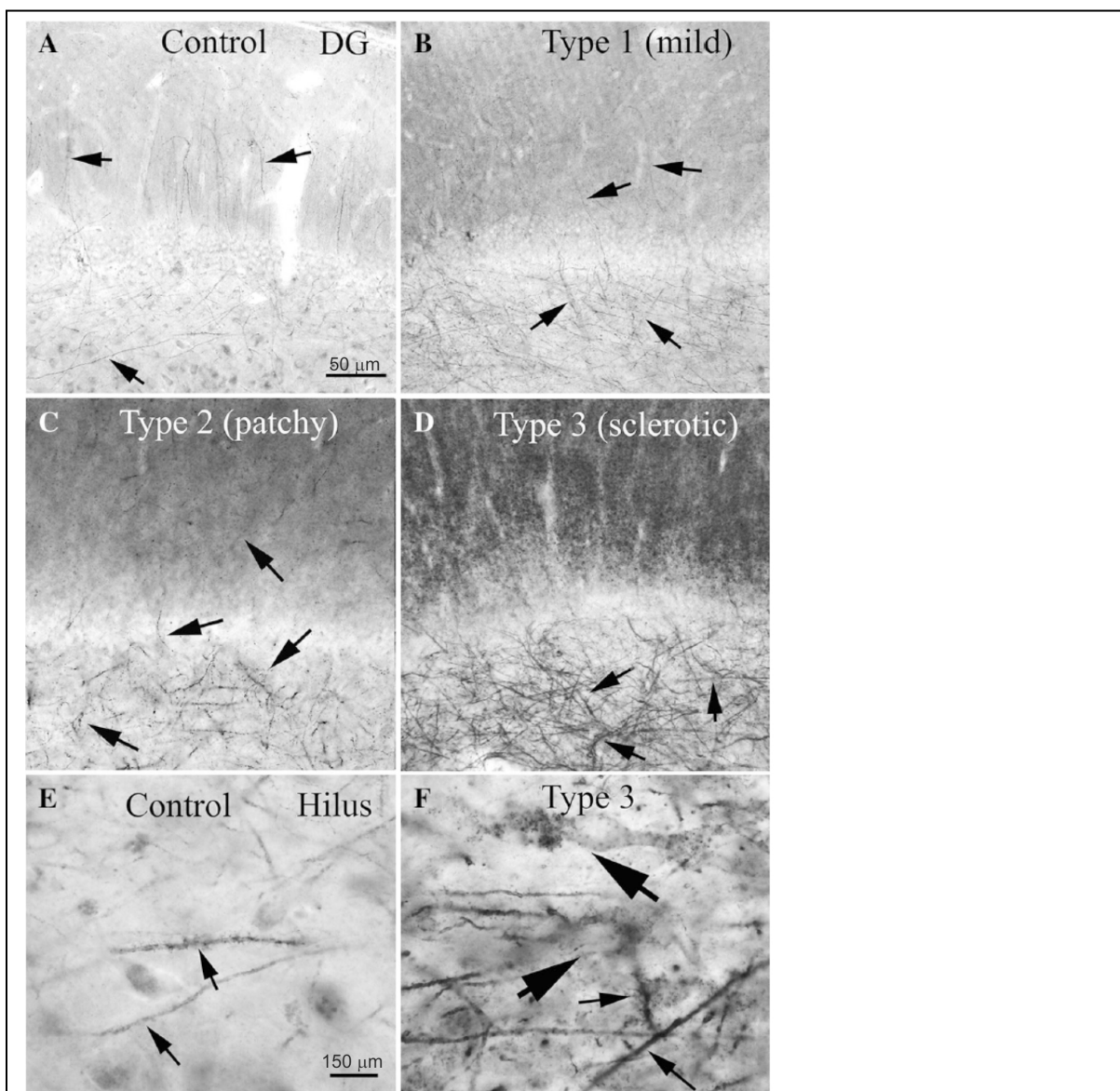
4.2.3 A humán hippocampusban megjelenő epilepsziás aktivitás anatómiai háttere

Az epilepsziás rohamok és az interiktális aktivitás kialakulási mechanizmusai régóta foglalkoztatják a kutatókat. Az elmúlt időszak adatai arra utalnak, hogy az interiktális-jellegű tüskék kialakulásában – hippocampalis régiótól függően – két feltételezett mechanizmus is szerepet játszhat. Egyik a klorid homeosztázis felborulása, amely a GABA által közvetített szinaptikus választ a hiperpolarizációból depolarizációba fordítja, másik pedig a serkentés-gátlás egyensúlyának a megváltozása. Ezt a két hipotézist vizsgáltuk anatómiai módszerekkel a további munkáinkban, a fent említetteken túl.

4.2.3.1 Kloridion gradiens kialakításáért felelős transzporterek vizsgálata (Huberfeld *et al.*, 2007; Wittner *et al.*, 2009; Karlócai *et al.*, 2016)

A kloridion gradiens felállításáért felelős kation-klorid-kotranszporterek közül a kloridion sejtből való kijutásáért (és ezzel együtt a GABÁ-ra adott válasz hiperpolarizáló voltáért, lásd Rivera *et al.*, 1999) felelős KCC2 transzporter eloszlását vizsgáltuk kontroll és epilepsziás hippocampusban. A humán hippocampus azon régióit, amelyek interiktális-jellegű tüskéket generálnak *in vitro* körülmények között, tehát a subiculumot és a CA2 régiót az elektrofiziológiai elvezetésekkel összefüggésben (részletesen ld. fent) vizsgáltuk. A GD, CA1 és CA3 régiókban a KCC2 fehérje eloszlást önmagában, sejt- vagy populációs aktivitás nélkül vizsgáltuk, humán szövetben és pilocarpine-os egér modellben is (Karlócai *et al.*, 2016). A subiculumban – az elektrofiziológiai adatoknak megfelelően – mind *in situ* hibridizációs, mind immunhisztokémiai módszerekkel azt tapasztaltuk, hogy a sejtek kb. 10-30%-a nem fejezi ki a KCC2 mRNS-t és a fehérjét (Huberfeld *et al.*, 2007). Ez összecseng azzal, hogy a sejtek kb. 20%-ában láttunk depolarizációt az interiktális-jellegű tüskék során. A CA2 régióban azonban az elektrofiziológiai eredményeket (miszerint a sejtek kb. 2/3-a depolarizáló választ mutat) nem támasztotta alá az anatómiai megfigyelés: a sejtek kb. 94%-a kifejezte a KCC2 fehérjét, csak a maradék 6% volt KCC2-negatív (Wittner *et al.*, 2009). Hozzá kell tenni, mind a subiculumban, mind a CA2 régióban csak epilepsziás humán szövetet vizsgáltunk és sejtszintű változásokat néztünk, nem hasonlítottuk az eredményeket megfelelő humán kontrollhoz. A hippocampus többi részében (GD, CA3 és CA1 régiók) az epilepsziás szövetet humán kontrollhoz hasonlítottuk, de nem végeztünk sejtszámolást, hanem Western blot segítségével határoztuk meg a KCC2 fehérje mennyiségét a hippocampusban, illetve peroxidáz reakción alapuló és arany jelöléses immunfestést végeztünk a KCC2 eloszlás kvalitatív leírására. Azt tapasztaltuk, hogy a humán kontroll hippocampusban, mindhárom vizsgált régióban egy gyenge, homogén háttérfestés jellemezte a serkentő sejteket, és sötétebbre festődő, jól elkülönülő, dendritek mutatták a gátló sejteket (42. ábra). Az epilepsziás humán mintákban

(mind az mHS és az sHS betegeknél) 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.

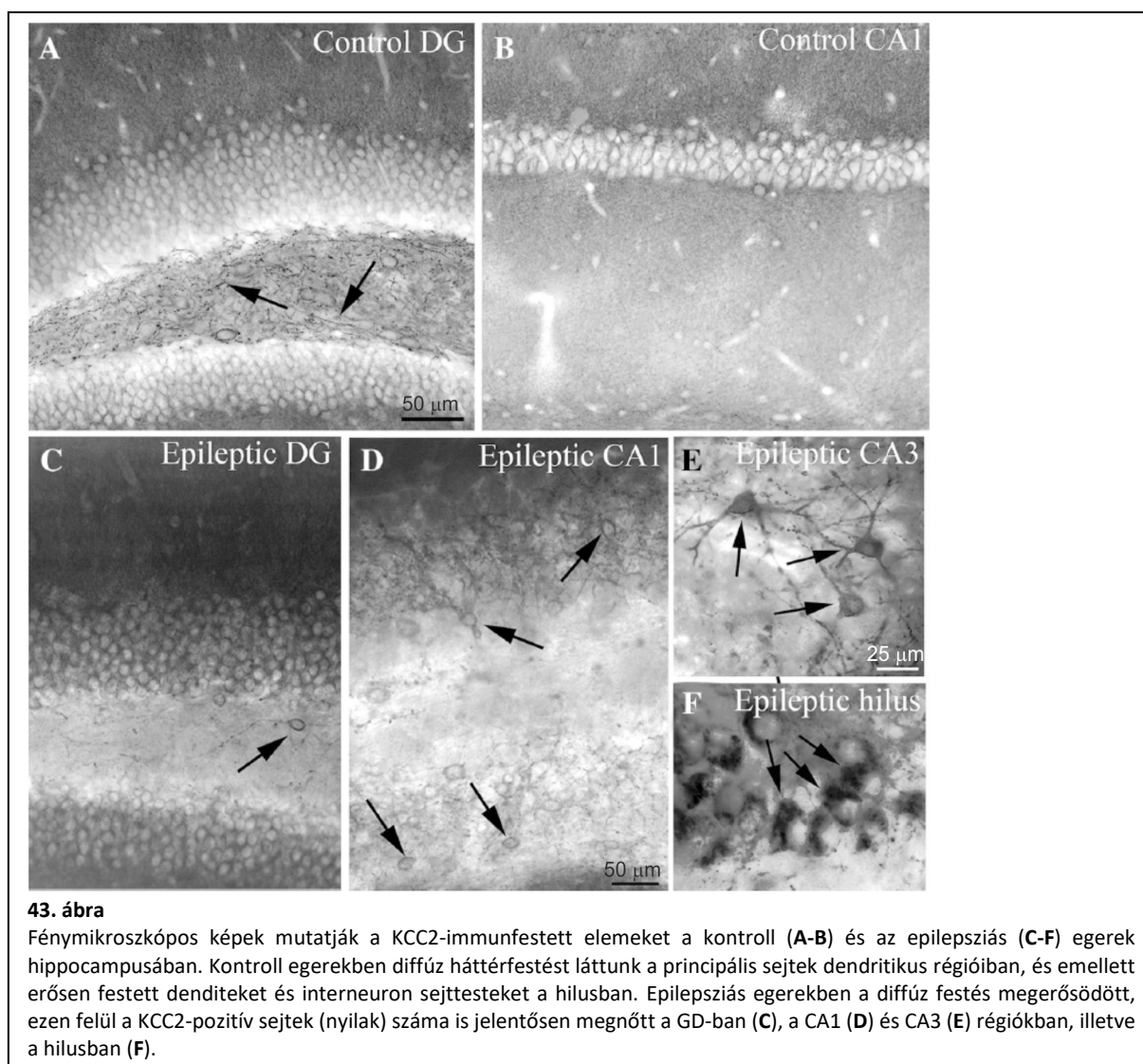


42. ábra

KCC2-immunopozitív elemek a gyrus dentatusban humán kontroll (A), mHS (B), mHS foltos sejtpusztulással (C) és sHS (D) betegeknél. Erősen festődő interneuron dendritek (nyilak) látszódnak a str. moleculare-ban és a hilusban, valamint egy háttérfestés a str. moleculare-ban. Mind az erősen festett dendritek száma, mind a háttérfestés erőssége nő az epilepsziás mintákban, a sclerosis mértékével arányosan. E) Nagy nagyítású fénymikroszkópos ábra mutatja a sima és tüskés dendriteket a kontroll hilusban. F) A scleroticus betegek hilusában a túlélő mohasejt sejttest (nagy nyilak) és nagy számú tüskés dendrit (kis nyilak) volt KCC2-pozitív.

A pilocarpine egér modellben a humánhoz nagyon hasonló eredményeket kaptunk, kontrollban itt is diffúz háttérfestést láttunk, de a gátlósejtek dendritjei mellett a serkentő sejt sejttestjei is kirajzolódtak (43. ábra). Epilepsziás egerek hippocampusában jelentősen megnőtt a pozitív

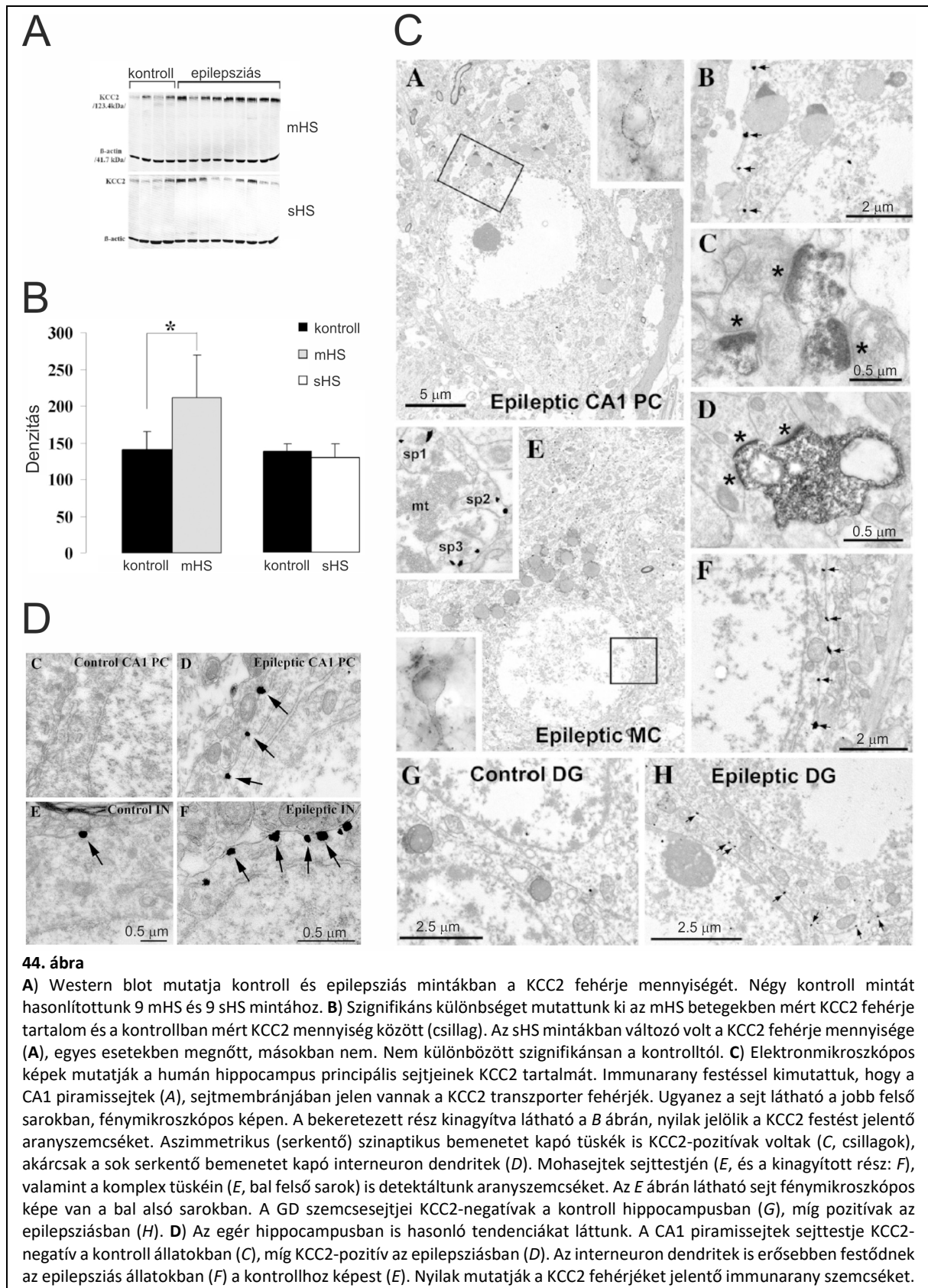
elemek száma és a diffúz festés, valamint jelentős számú sejttestet (mind serkentő, mind gátló sejteket) is tudunk detektálni.



Elektron mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk, hogy a KCC2 subcellularis eloszlását megállapíthassuk. Mind DAB kromogénnel, mind immunarany jelöléses technikával azt tapasztaltuk, hogy a KCC2 transzporter a humán kontroll hippocampus serkentő sejteinek tuskéiben van leginkább jelen, valamint a gátlósejtek dendritjeiben (44. ábra). A KCC2 a sejteket nem festette ki homogén módon, hanem klaszterekben volt található a membránban. Epilepsziás humán mintákban az immunpozitív elemek száma megnőtt, több dendritet és tuskét láttunk, valamint megjelent a jelölés mind a serkentő, mind a gátló sejtek sejttestjein. Axonokban nem láttunk jelölést sem kontroll, sem epilepsziás szövetben. Az egér hippocampusban hasonló KCC2 jelölési mintázatot láttunk, mint a humán hippocampusban. 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. Western blot segítségével kvantifikáltuk a KCC2 upregulációját mind humán, mind egér szövetben. 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. Az egér hippocampusban 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.

Kimutattuk tehát, hogy a KCC2 fehérje mennyisége megemelkedik a humán hippocampusban epilepsziás betegekben 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.



44. ábra

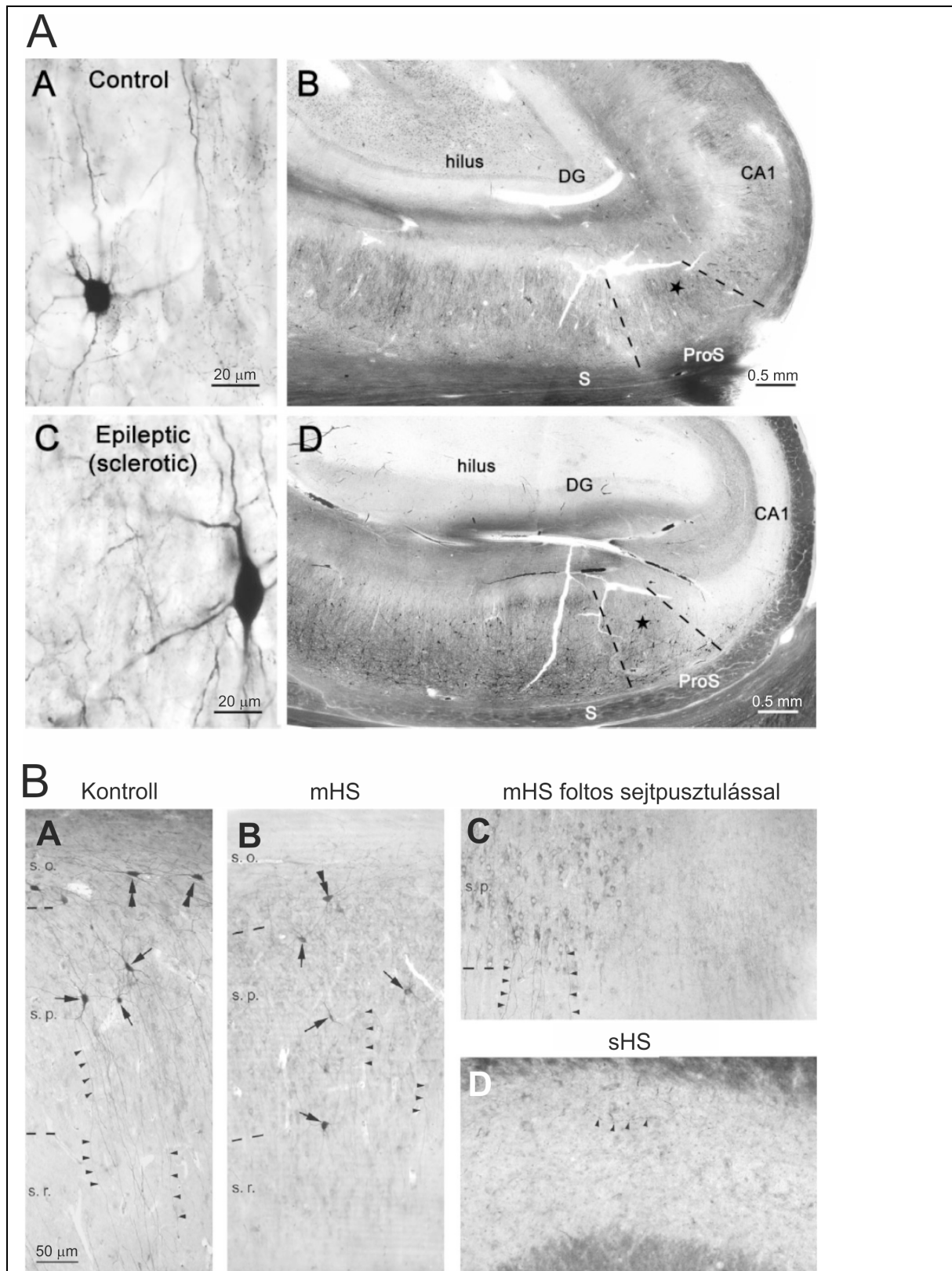
A) Western blot mutatja kontroll és epilepsziás mintákban a KCC2 fehérje mennyiségét. Négy kontroll mintát hasonlítottunk 9 mHS és 9 sHS mintához. **B)** Szignifikáns különbséget mutattunk ki az mHS betegekben mért KCC2 fehérje tartalom és a kontrollban mért KCC2 mennyiség között (csillag). Az sHS mintákban változó volt a KCC2 fehérje mennyisége **(A)**, egyes esetekben megnőtt, másokban nem. Nem különbözött szignifikánsan a kontrolltól. **C)** Elektronmikroszkópos képek mutatják a humán hippocampus principális sejtjeinek KCC2 tartalmát. Immunarany festéssel kimutattuk, hogy a CA1 piramis sejtek **(A)**, sejtmembránjában jelen vannak a KCC2 transzporter fehérjék. Ugyanez a sejt látható a jobb felső sarokban, fénymikroszkópos képen. A bekeretezett rész kinagyítva látható **a B** ábrán, nyilak jelölik a KCC2 festést jelentő arany szemcséket. Aszimmetrikus (serkentő) szinaptikus bemenetet kapó tüskék is KCC2-pozitívak voltak **(C)**, csillagok), akárcsak a sok serkentő bemenetet kapó interneuron dendritek **(D)**. Mohasejtek sejttestjén **(E)**, és a kinagyított rész: **F)**, valamint a komplex tüskéin **(E)**, bal felső sarokban) is detektáltunk arany szemcséket. Az **E** ábrán látható sejt fénymikroszkópos képe van a bal alsó sarokban. A DG szemcsesejtjei KCC2-negatívak a kontroll hippocampusban **(G)**, míg pozitívak az epilepsziásban **(H)**. **D)** Az egér hippocampusban is hasonló tendenciákat láttunk. A CA1 piramis sejtek sejttestje KCC2-negatív a kontroll állatokban **(C)**, míg KCC2-pozitív az epilepsziásban **(D)**. Az interneuron dendritek is erősebben festődnek az epilepsziás állatokban **(F)** a kontrollhoz képest **(E)**. Nyilak mutatják a KCC2 fehérjéket jelentő immunarany szemcséket.

4.2.3.2 Gátló rendszerek változásainak vizsgálata

(Wittner *et al.*, 2005; Wittner *et al.*, 2009; Wittner & Maglóczky, 2017)

A másik folyamat, amelyet az interiktális jellegű tüskék kialakulásával összefüggésben néztünk, a serkentés-gátlás egyensúlyának felborulása. A serkentő és gátló pályák módosulásait régóta vizsgálják, és ez az epilepsziás reorganizációs folyamat igen komplex képet mutat a humán hippocampusban. A serkentő sejtek egy része elpusztul (pl. CA1 piramissejtek, valamint a mohasejtek és a CA3 piramisok egy része), a többi principális sejt pedig nagyrészt túlél még a scleroticus hippocampusban is (pl. szemcsesejtek, CA2 és subicularis piramissejtek). A serkentő pályák közül több is sarjadzik: a gyrus dentatusba érkező supramammillaris pálya (Maglóczky *et al.*, 2000), a Schaffer kollaterálisok a CA1 régióban (Lehmann *et al.*, 2000), továbbá a szemcsesejtek axonjai benőnek a str. moleculare-ba és magukkal a szemcsesejtekkel szinaptizálnak (Houser, 1990), valamint kimutattuk, hogy átnőnek a CA2 régióba is, ahol a piramissejtek sejttestjére nagy mohaterminálisok adnak serkentő szinapszisokat (Wittner *et al.*, 2009). A gátló interneuronok változásai még talán ennél is összetettebbek. Korábbi munkák, köztük a sajátjaink is alátámasztják, hogy egyes sejtípusok szelektíven eltűnnek (pl. somatostatin-pozitív sejtek, de Lanerolle *et al.*, 1987), calretinin-pozitív sejtek, (Tóth *et al.*, 2010), míg mások megmaradnak, de jelentős morfológiai elváltozásokat mutatnak (pl. calbindin-pozitív interneuronok, Maglóczky *et al.*, 2000; Wittner *et al.*, 2002). Az interneuronok közül a principális sejtek kimenetét leghatékonyabban gátolni tudó periszomatikus interneuronokra, vagyis a parvalbumin (PV)- és a cholecystokinin (CCK)/cannabinoid receptor 1 (CB1)-pozitív gátlósejtekre koncentráltunk.

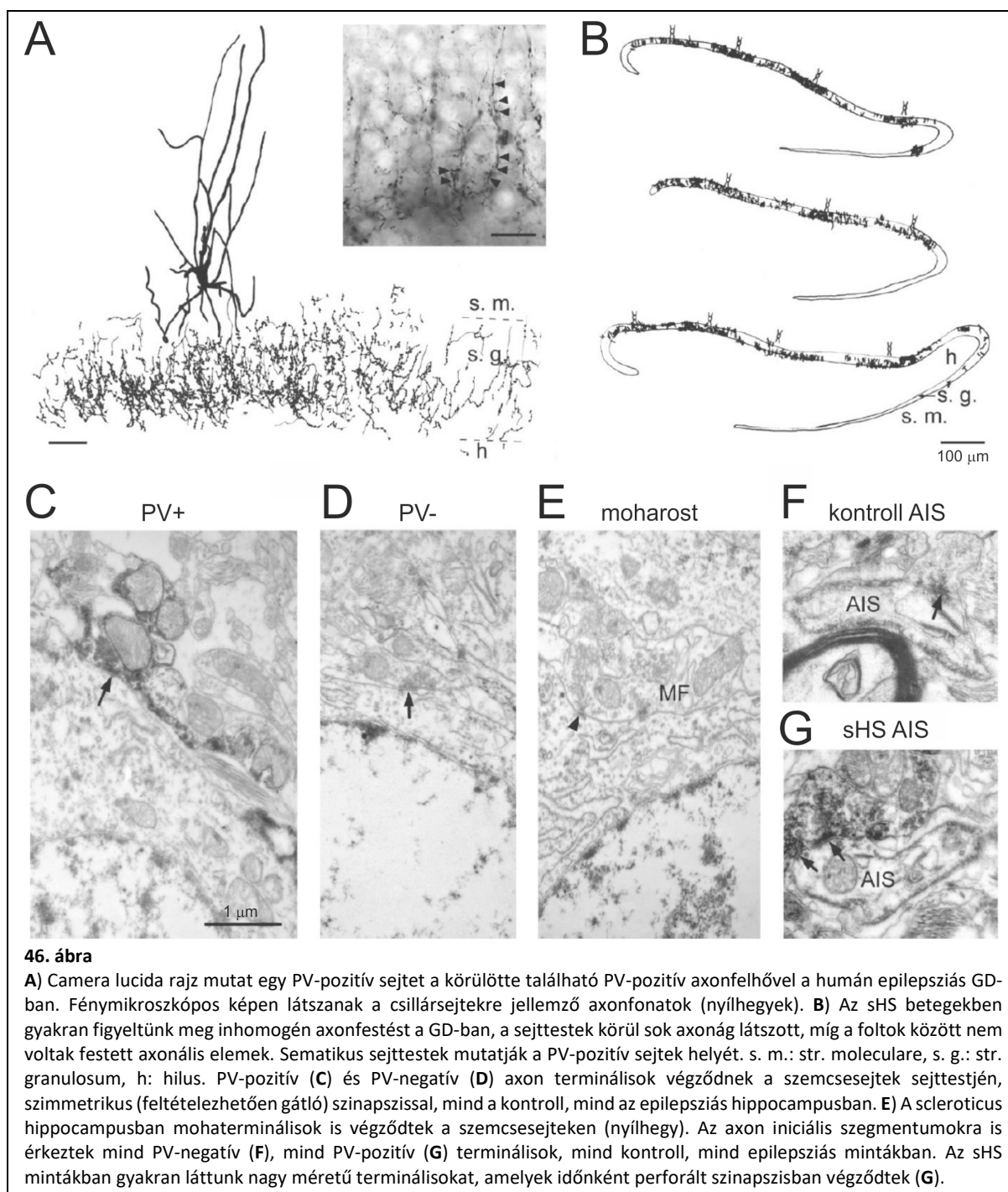
A PV-tartalmú interneuronok változásait a hippocampus két túlélő régiójában, a GD-ban (Wittner & Maglóczky, 2017), a CA2 régióban (Wittner *et al.*, 2009), valamint a scleroticus hippocampusban legjobban károsodott CA1 régióban (Wittner *et al.*, 2005) vizsgáltuk. A PV-pozitív sejtek száma az epilepsziás betegekben, mindhárom vizsgált régióban lecsökkent a kontrollhoz képest (45. ábra). Az mHS betegekben kisebb mértékben, míg az sHS betegekben a túlélő régiókban is jelentősen lecsökkent a PV+ interneuronok száma. Az sHS betegcsoportban a GD-ban jellegzetes axonfelhők látszottak a megmaradó sejtek körül (46. ábra), míg a CA2 régióban inkább homogén axon eloszlást láttunk (40. ábra). A scleroticus CA1 régióban csak néhány dendrit, sejttest elvétve, axon pedig gyakorlatilag egyáltalán nem volt megfigyelhető (45. ábra).



45. ábra

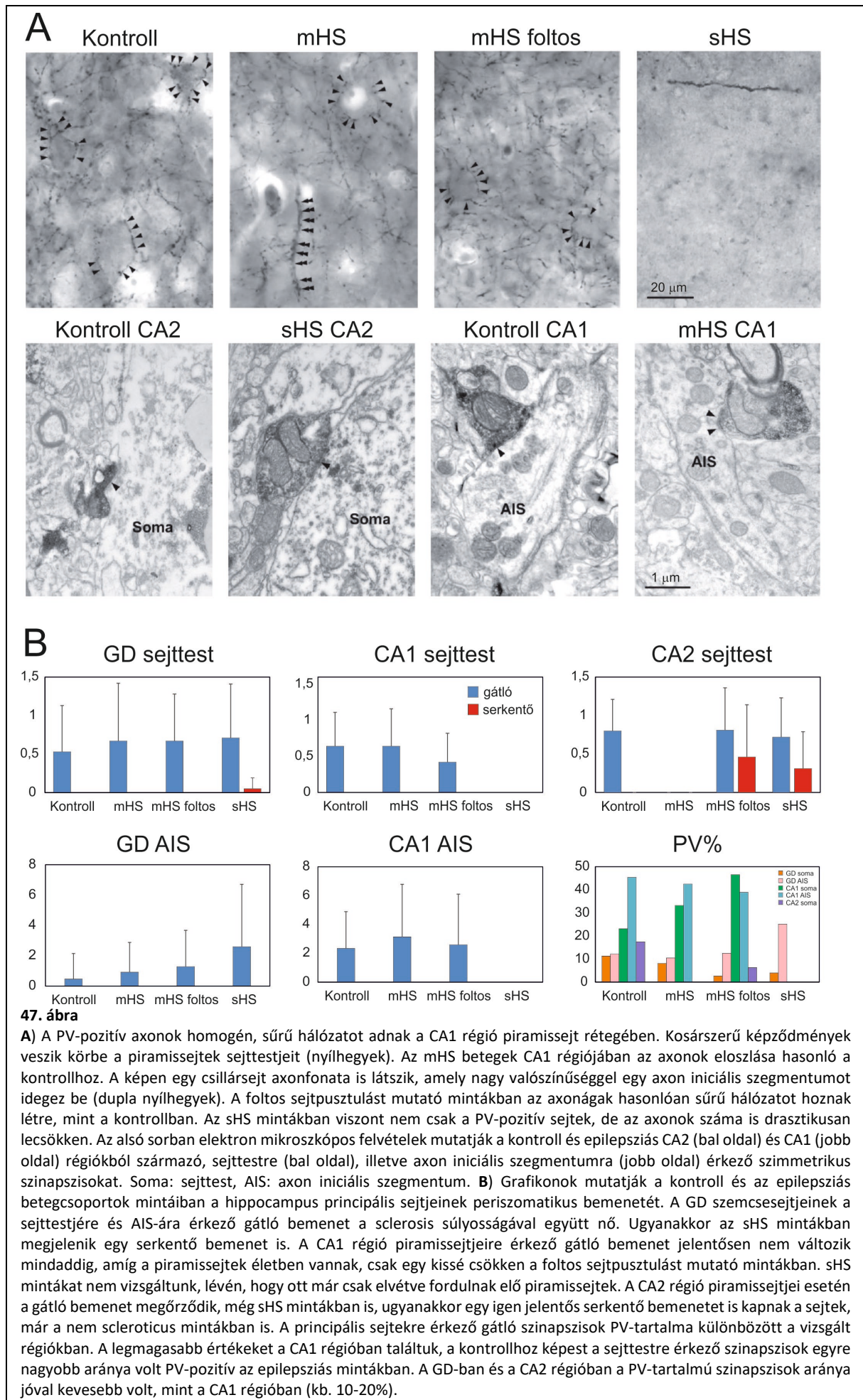
A) Parvalbumin-festett metszetek humán kontroll (A-B) és epilepsziás (C-D, sHS) betegek hippocampusából. A kis felbontású képeken (B, D) jól látszik az sHS hippocampusra jellemző sejtpusztulás, ugyanakkor a subiculum (S) és a prosubiculum (ProS) megőrzöttsége. Az sHS CA1 régióban alig látható PV-pozitív sejt, míg a PV-festett elemek száma és eloszlása a prosubiculumban nem változik. A nagy nagyítású képeken (A, C) a prosubiculum csillaggal jelölt része látszik.

B) A CA1 régió PV-pozitív elemei kontroll (A), mHS (B), mHS foltos sejtpusztulással (C) és sHS (D) betegcsoportokban. A) A kontrollban jelentős számú multipoláris PV+ sejt látható a str. pyramidale-ban (nyílak), valamint jellegzetes horizontális sejtek (kettős nyílhegyek) a str. oriensben. A PV-festett dendritek hosszan lenyúlnak a str. radiatumba (nyílhegyek). B) Az mHS betegek CA1 régiójában a PV+ sejtek számában nincs drasztikus változás, csak a horizontális sejtek száma kevesebb. C) A foltos sejtpusztulást mutató hippocampusban a PV-pozitív sejtek száma jelentősen lecsökken, bár dendritek megfigyelhetők (nyílhegyek). A piramis sejteket kirajzoló háttérfestés mutatja a foltos sejtpusztulást. D) A scleroticus CA1 régióban alig találni PV-festett elemeket.



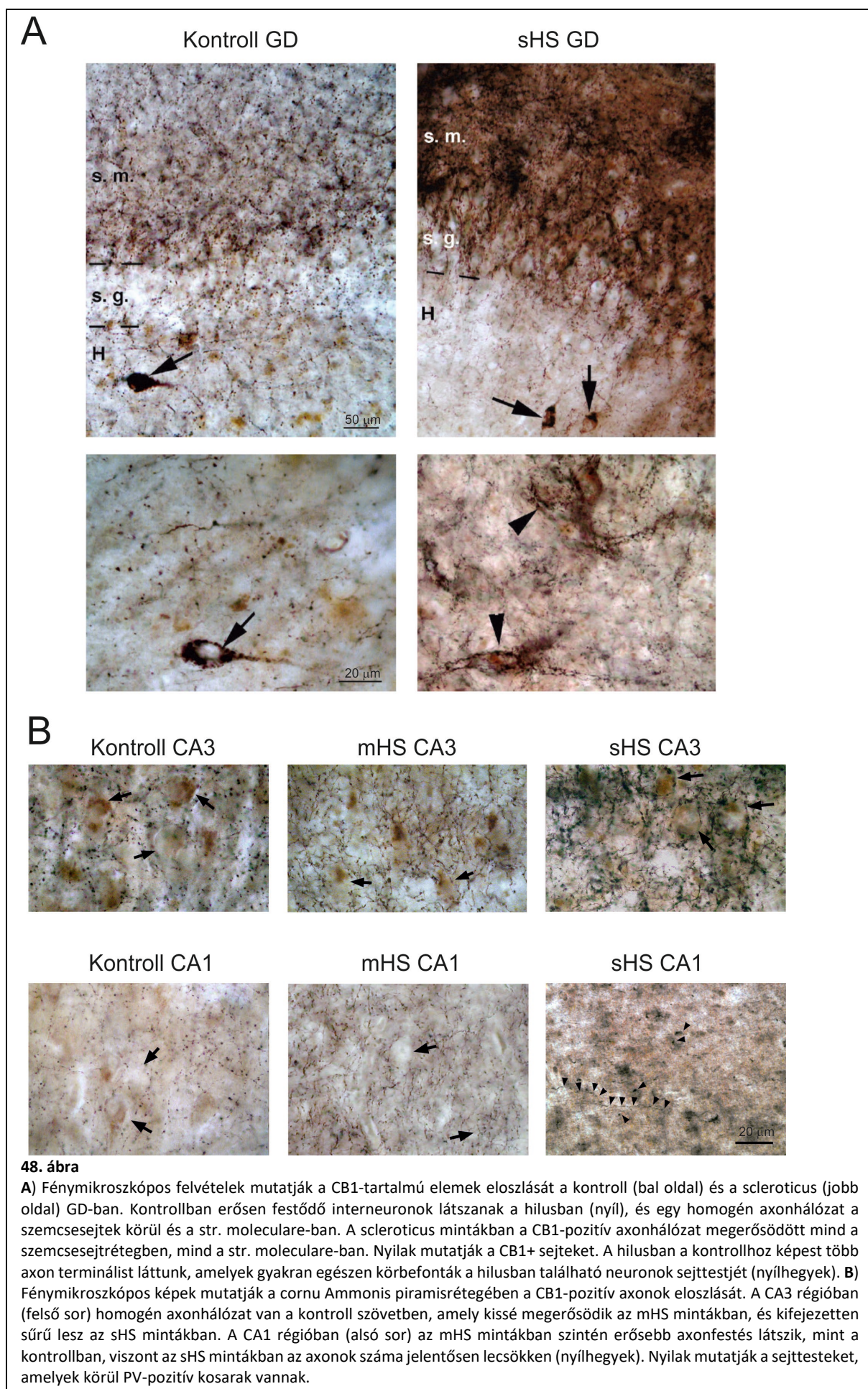
Ismert tény, hogy a PV molekula hypoxiát és epilepsziás rohamokat követően eltűnhet a sejtekből (Scotti *et al.*, 1997), így a PV-sejtek funkciójának változásait kizárólag fénymikroszkópos elemzés alapján nem lehet megfelelően megítélni. Ezért a hippocampusban a periszomatikus gátlórendszer változásait elektron mikroszkópos szinten is vizsgáltuk, ahol nemcsak a PV-festett, hanem a festetlen szinapszisok is látszanak (46., 47. ábrák). Szétválasztottuk a sejttestek és az axon iniciális szegmentumok vizsgálatát, hogy képet kaphassunk a kosársejtek és az axo-axonikus sejtek módosulásairól. 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 (46., 47. ábrák), mindhárom epilepsziás csoportban (mHS, mHS foltos sejtpusztulással és sHS). A CA1 és CA2 régiókban viszont a sejttestek és az axon iniciális szegmentumok gátló szinapszissokkal való borítottsága nem változott, csak a CA1 régióban a foltos sejtpusztulást mutató mintákban csökkent (49. ábra). Ugyanakkor, az sHS mintákban a GD-ban (46. ábra) és a CA2 régióban a principális sejtek sejttestjén megjelent egy serkentő bemenet (41. ábra), amely kontrollban nem volt megfigyelhető. A gátló szinapszissok PV-tartalma a különböző régiókban és a különböző célelemekkel összefüggésben másképp változott. A kosársejtek boutonjai között a PV-pozitívok aránya a GD-ban és a CA2 régióban csökkent epilepsziás szövetben a kontrollhoz képest, míg a CA1 régióban nőtt. A csillár- vagy axo-axonikus sejtektől érkező PV+ terminálisok aránya az összeshez képest a GD-ban nőtt, a CA1 régióban pedig nem változott (47. ábra). Összességében tehát azt mondhatjuk, hogy a GD-ban a PV-tartalmú periszomatikus gátlósejtek megőrződnek epilepsziában, de eltűnik belőlük a PV, az axonjaik sarjadzanak, és egy megnövekedett gátló bemenetet adnak a szemcsesejtekre. 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 csoportját, a CCK és CB1-tartalmú interneuronok változásait a GD-ban, a CA1 és CA3 régiókban vizsgáltuk (Wittner & Maglóczy, 2017). Erről a sejttypusról kimutatták, hogy főleg a principális neuronok sejttestjén és proximális dendritjein végződnek (Katona *et al.*, 1999). A CB1-pozitív gátlósejtek megőrződését tapasztaltuk mindhárom területen, még a scleroticus CA1 régióban is látszottak sejttestek. Az axonhálózat megnövekedett a GD-ban a str. moleculare-ban az epilepsziás szövetben (48. ábra), és a boutonok eloszlása – fénymikroszkópos szinten – nem változott a kontrollhoz képest. A GD hilusában, valamint a CA1 és CA3 régiókban viszont azt tapasztaltuk, hogy a kontroll szövetben homogén eloszlású axonhálózat epilepsziában inhomogénné változik, egyes mohasejtek és piramissejtek körül nagyon sűrű CB1+ axonfelhő alakul ki (48. ábra).

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.



Anatómiai vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy mind a klorid homeosztázis, mind a serkentés-gátlás egyensúlya megváltozik epilepszia során a humán hippocampusban. A hippocampus több régiójában (GD, CA1 és CA3 régiók) a KCC2 transzporter expressziójának növekedését tapasztaltuk epilepsiás szövetben. Ugyanakkor a subiculumban a principális sejtek egy kis csoportja nem expresszálja a kloridion gradiens fenntartásáért felelős KCC2 transzportert, amely miatt e sejtekben a GABA depolarizáló posztzinaptikus potenciált válthat ki. E mechanizmus alapot adhat az interiktális tüskék kialakulásának ebben a régióban. A hippocampus többi régiójában pedig kimutattuk, hogy a serkentés-gátlás egyensúlya sérül epilepszia során. A megnövekedett serkentő bemenetek mellett a periszomatikus gátlósejtek megőrződnek ugyan, de funkcionálisan meg is változnak. Egyrészt működésük megváltozik az eltűnt kalciumkötő fehérje PV miatt, másrészt axonjaik sarjadzanak, amely kompenzációt jelenthet a túlzott serkentés ellen, de egy túlzott szinkronizációt is közvetíthet a principális sejtek felé. A CA2 régióban ez a mechanizmus lehet inkább az alapja az interiktális-jellegű tüskék kialakulásának.

4.3 Az emberi nagyagykéregben megjelenő fiziológiás és epileptiform aktivitás

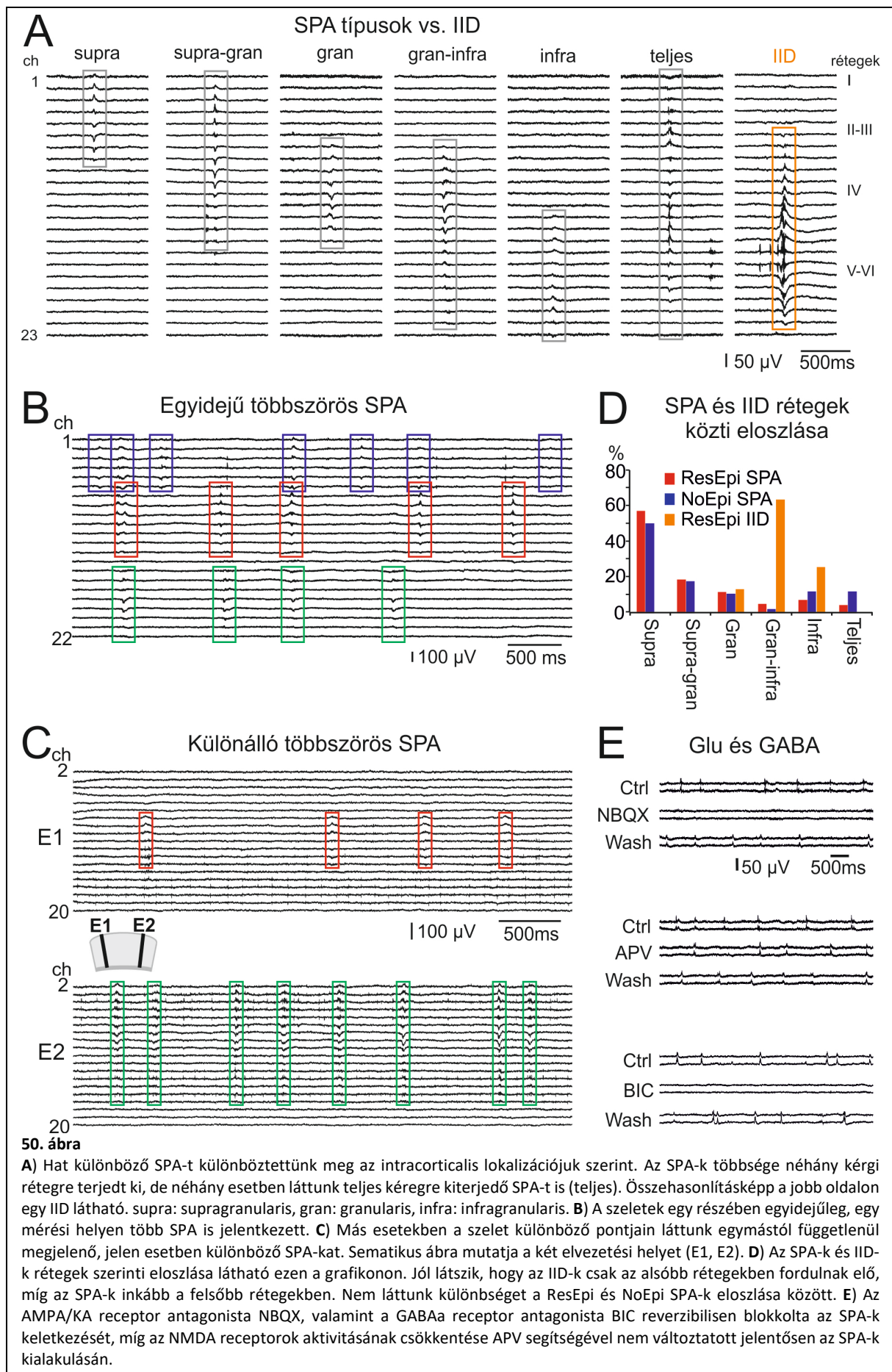
4.3.1 Fiziológiás szinkron populációs aktivitás és spontán interiktális tüske (Kerekes *et al.*, 2014; Tóth *et al.*, 2018)

Humán neocorticalis (Köhling *et al.*, 1998) és hippocampalis túlélő szeletekben (Cohen *et al.*, 2002) spontán megjelennek szinkron események, melyeket az interiktális tüskék *in vitro* modelljének tekintenek. Mi is ezt a modellt használtuk, hogy megvizsgáljuk a megjelenő populációs aktivitásokat, azok celluláris és hálózati sajátosságait, és ezzel közelebb kerüljünk az epilepsiás szinkronizációs folyamatok mechanizmusainak megértéséhez. Míg korábban a humán *in vitro* epilepsziakutatásban dolgozó munkacsoportok nagy része csak epilepsiás páciensekből származó mintákat vizsgált, mi tumoros, de nem epilepsiás betegekből származó mintákkal vetettük össze az epilepsiás nagyagykérgi szöveteket. Az epilepsiás pácienseket három csoportra osztottuk: 1) terápiarezisztens epilepsiában 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 két utóbbi csoportba tartozó betegeket az agyi daganataik miatt operálták meg, de mivel volt rohamuk, így epilepsiásnak tekintettük őket. A negyedik, epilepszia szempontból kontrollnak tekinthető csoportba soroltuk azokat a tumoros pácienseket, akiknek nem volt rohamuk (no epilepsy, NoEpi). A

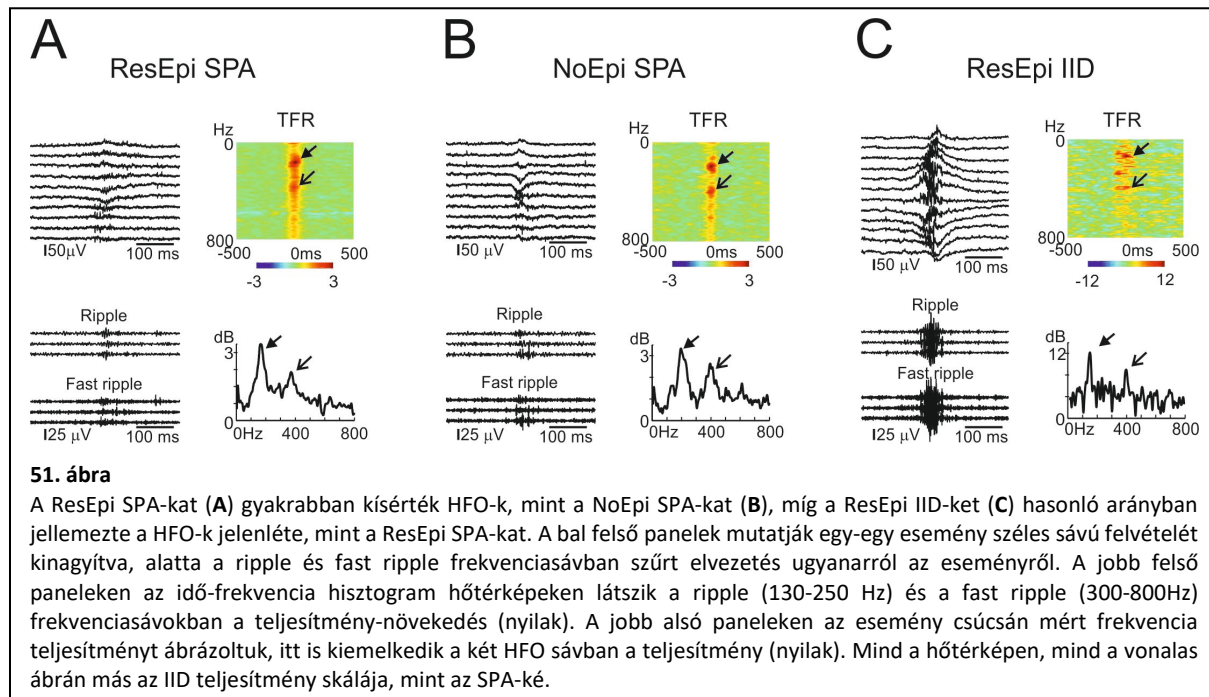
nem epilepsziás betegek egy csoportjánál preoperatív klinikai EEG vizsgálatot is végeztünk, mely során nem láttunk semmilyen epilepsziára utaló jelet.

Fiziológiás oldatban spontán megjelenő szinkron populációs aktivitást (synchronous population activity, SPA) figyeltünk meg mind epilepsziás, mind nem epilepsziás betegekből származó szeletekben (Tóth *et al.*, 2018). Ezek a jelenségek egy mezőpotenciál tranziensből álltak, melyhez egy magas frekvenciás oszcilláció és megemelkedett tüzelés csatlakozott (49. ábra). Az epilepsziás betegekből (ResEpi és TreatEpi betegcsoportokban) ezen felül egy szintén spontán, az SPA-nál jóval nagyobb amplitúdójú, gyakran komplex aktivitás is előfordult, amely az akut 4AP modellben keletkező interiktális tuskékra hasonlított. Ez utóbbiakat spontán interiktális-jellegű tuskéknek (interictal-like discharges, IID) tekintettük és külön analizáltuk. Egy SPA vagy egy IID a teljes regisztrátum során fennálló, spontán visszatérő SPA vagy IID események összessége. Megvizsgáltuk az SPA-k előfordulását a betegek aetiológiája szempontjából, és azt tapasztaltuk, hogy epilepsziás betegekből több szeletben fordul elő SPA ($46.8 \pm 28.9\%$), mint nem epilepsziásokban ($29.7 \pm 26.3\%$). A különböző lebenyekből származó minták között nem találtunk szignifikáns különbséget. A dysgenesis-sel vagy hippocampalis sclerosis-sal diagnosztizált páciensek mintáiban gyakrabban fordult elő SPA (kb. a szeletek 56-58%-ában), míg a tumoros epilepsziás betegek mintáiban a szeletek csak kb. 35%-ában fordult elő SPA. A NoEpi betegeknél is volt különbség az SPA-k előfordulásában a patológia tekintetében: leggyakrabban a gliális tumorral rendelkező betegek mintáiban láttunk SPA-t (szeletek kb. 38%-a), míg a carcinoma metastasis-sal diagnosztizált betegeknél ez az arány jóval alacsonyabb volt (kb. 20%).

Az SPA-kat lokalizációjuk szerint 6 csoportra osztottuk (50. ábra): 1) supragranuláris, 2) supragranularis+granularis, 3) granularis, 4) granularis+infragranularis, 5) infragranularis rétegeket, és 6) a teljes neocortexet átérő SPA. Bizonyos esetekben ugyanabban a szeletben több SPA-t, illetve egyes ResEpi szeletekben SPA+IID aktivitást is láttunk (50. ábra). A többszörös SPA-k két csoportját különítettük el: ugyanabban a szeletben két különböző helyen mért (esetenként különböző) SPA, illetve egy mérési helyen, de a neocortex különböző rétegeiben, egymástól elkülönülten jelentkező többszörös, egyidejű SPA-k. A ResEpi csoportban jóval többször láttunk többszörös SPA-t, mint a NoEpi csoportban. Lokalizáció tekintetében nem voltak egyformák az SPA-k és az IID-k. Az SPA-k többsége (mind a ResEpi, mind a NoEpi szövetben) a nagyagykéreg felsőbb, supragranularis rétegeiben jelentkeztek, míg az IID-eket az in vivo mért eredményekhez hasonlóan (Ulbert *et al.*, 2004a) a granularis-infragranularis rétegekben detektáltuk. Jelentős különbségeket tudtunk kimutatni az SPA-k és az IID-k hálózati tulajdonságai között (49. ábra). 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 és NoEpi csoportok között is láttunk különbséget, az LFP és CSD amplitúdók magasabbak voltak a ResEpi csoportban. Farmakológiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy mind a glutamáterg, mind a GABAerg rendszerek fontos szerepet játszanak az SPA-k kialakításában (50. ábra). A GABA_A receptor antagonistá bicuculline és az AMPA receptor blokkoló NBQX hatására reverzibilisen eltűnt az SPA mind ResEpi, mind NoEpi szeletekben. Ugyanakkor az NMDA blokkoló D,L-APV csak lecsökkentette az SPA-k előfordulási frekvenciáját, kb. 80%-ra.

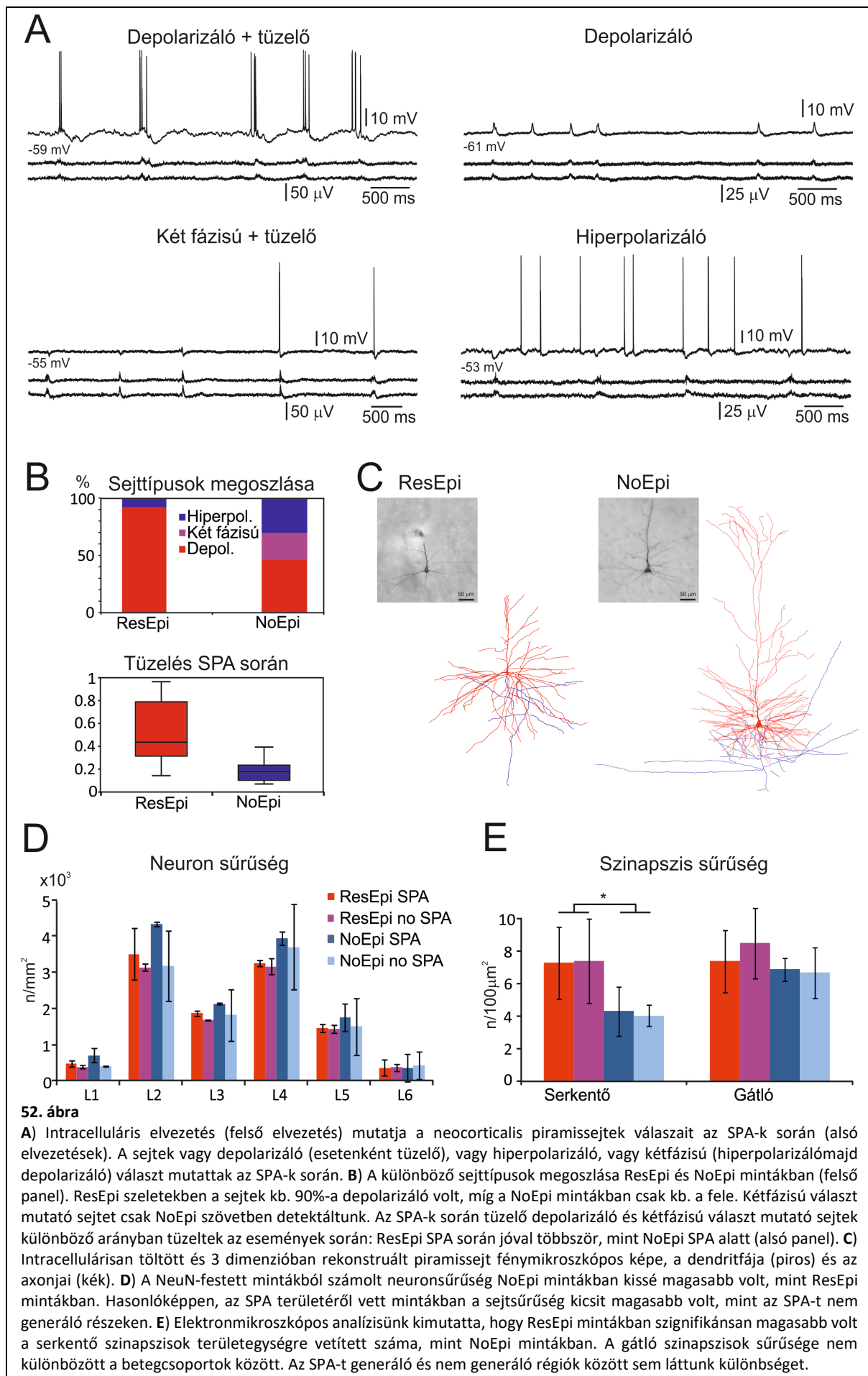


Megvizsgáltuk a magas frekvenciás oszcillációk, a HFO-k előfordulását is a szinkron események során, és mind a ripple, mind a fast ripple sávban láttunk teljesítménynövekedést (51. ábra). A ResEpi és NoEpi SPA-k között nem volt jelentős különbség, míg a ResEpi IID-k során szignifikánsan magasabb volt mindkét HFO típus teljesítménye az SPA-kénál.



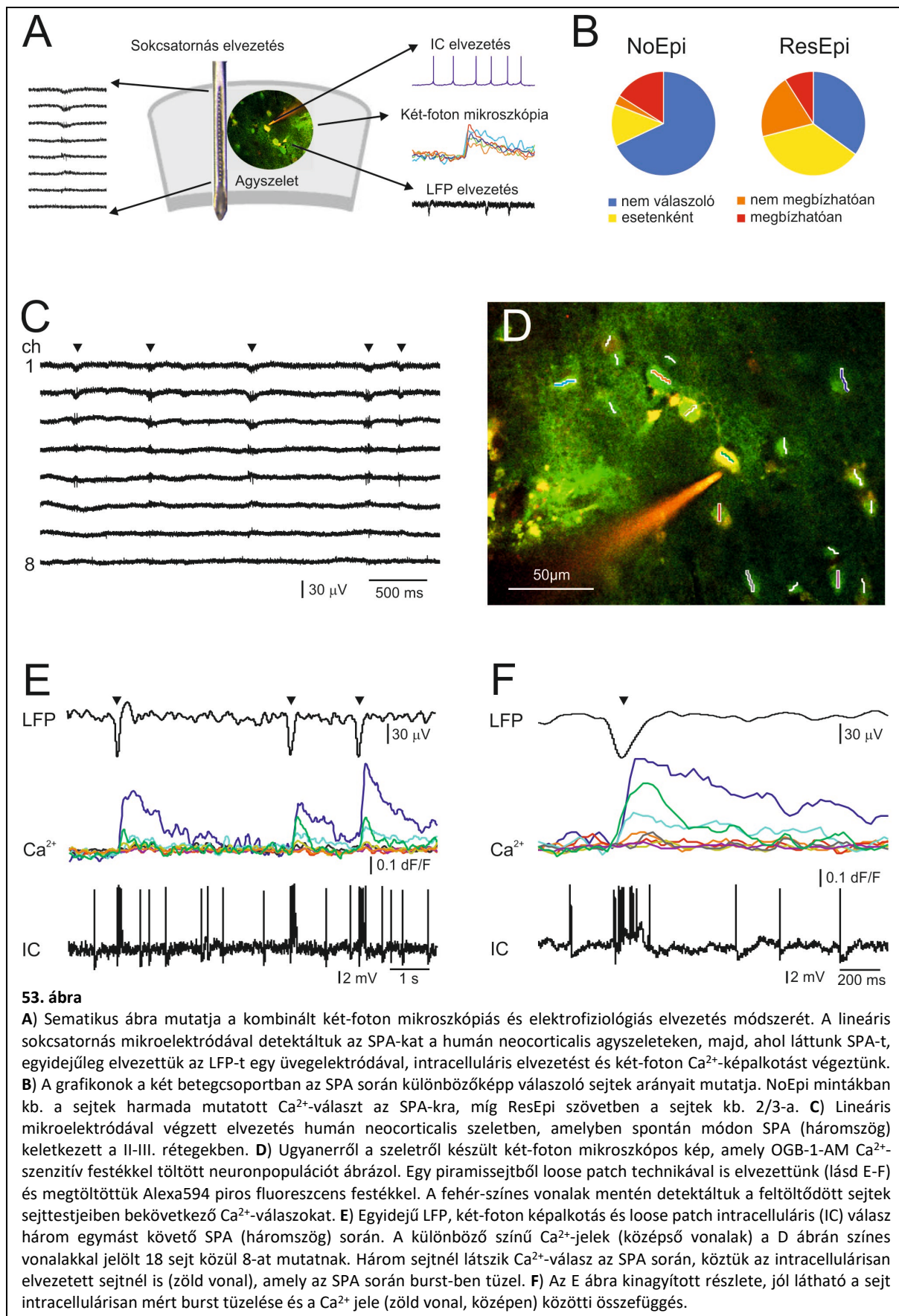
Intracelluláris elvezetésekkel kimutattuk, hogy míg nem epilepsziás esetekben a sejtek kb. egyenlő arányban válaszolnak az SPA-kra depolarizáló, hiperpolarizáló, illetve hiper- majd depolarizáló bifázisos válasszal, addig az epilepsziás esetekben a sejtek kb. 90%-a depolarizálódik az SPA-k során (52. ábra). Ezen kívül az intracellulárisan elvezetett sejtek szignifikánsan többet tüzeltek az SPA-k alatt ResEpi, mint NoEpi mintákban. Anatómiai analízissel kimutattuk, hogy mind epilepsziás, mind nem epilepsziás szövetben nem szignifikánsan, de több neuron található azokban a régiókban, amelyekben SPA keletkezik, mint ahol nem (54. ábra). A sejt számokban a ResEpi és NoEpi minták között nem láttunk különbséget, ugyanúgy, ahogy az elektronmikroszkópos vizsgálatokkal megállapított szinapszisszámban sem. Ugyanakkor az kimutatható volt, hogy az epilepsziás neocortexben nagyobb volt a serkentő szinapszisok sűrűsége, mint nem epilepsziásban, míg a gátlóké ugyanannyi (52. ábra).

Az intracelluláris sejtöltést követő 3 dimenziós rekonstrukció során kiderült, hogy a humán neocorticalis sejtek átlagos dendritikus hossza kb. 34 mm, amely több, mint háromszorosa a patkány V. rétegi piramissejtek 9 mm-es teljes dendrit hosszának. És hozzá kell tenni, hogy a humán neocorticalis sejtek valós dendrit hossza ennél még több, mivel a rekonstruált sejtek egy részénél egyértelműen levágtuk az apikális dendrit distalis részét a szelet készítésekor (52. ábra)

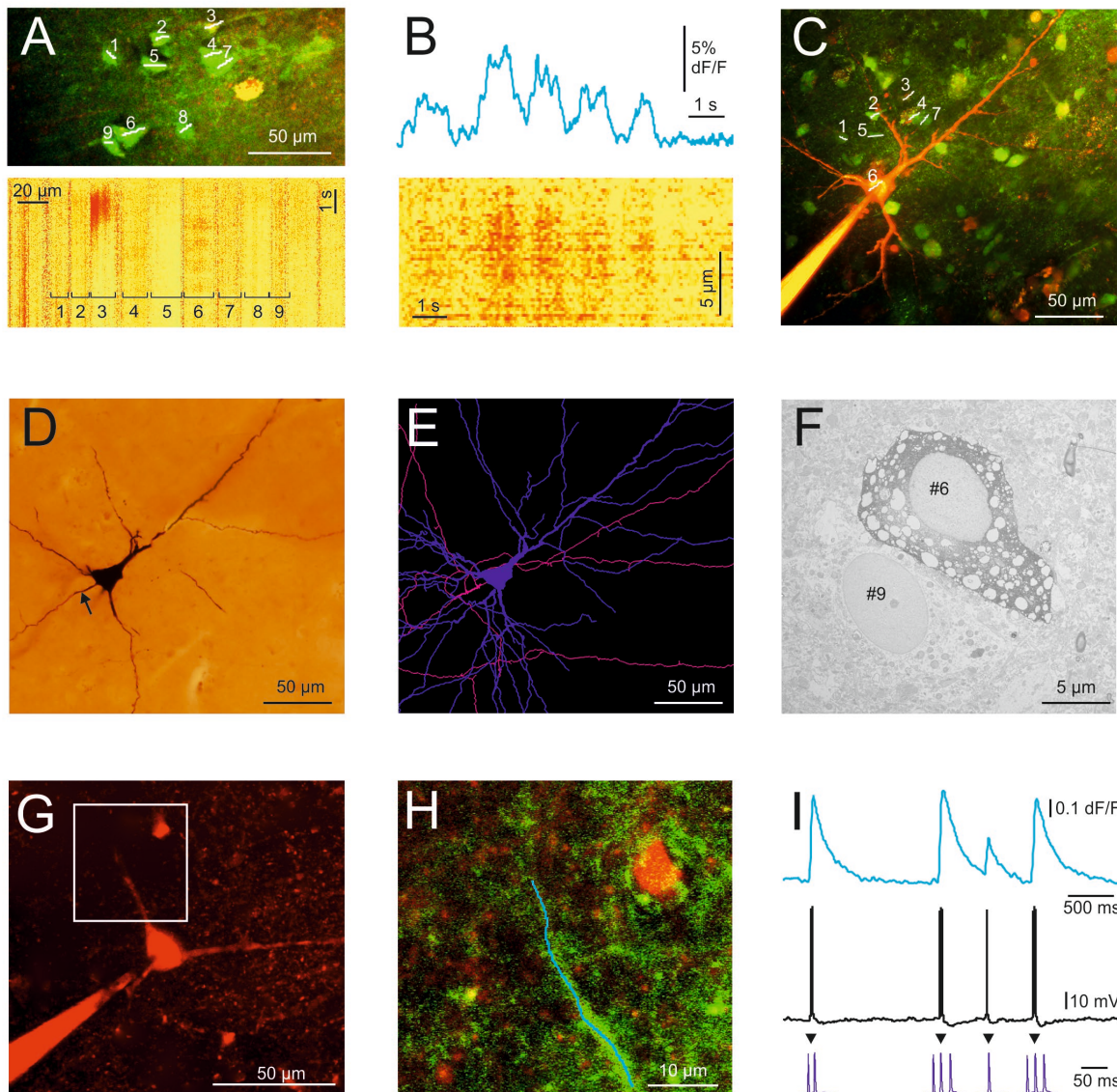


Mindezekből az eredményekből több fontos következtetést vontunk le. Kétféle spontán szinkron aktivitás keletkezik a humán neocortexben: SPA és IID. Az SPA, mivel nem epilepsziás betegekben is előfordul, valószínűleg nem köthető össze epilepsziás folyamatokkal. IID-eket csak epilepsziás betegekben láttunk, megjelenésük és tulajdonságaik alapján ezek valószínűleg patológiás folyamatok. Jól tetten érhető az epilepsziás mintákban a jellegzetes hiperexcitabilitás: az SPA-k magasabb LFP és CSD amplitúdója arra utal, hogy több sejt vesz részt benne, és 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, a kiugróan magas HFO teljesítmény.

Egy másik kísérletsorozatunkban egy elektrofiziológiai méréssel kombinált két foton mikroszkópos rendszer segítségével vizsgáltuk az SPA-k kialakulását, és a sejtek viselkedését (Kerekes *et al.*, 2014). Bulk loading technika segítségével a neuronok nagyobb csoportját megjelöltük a sejt-permeábilis Ca^{2+} -szenzitív OGB-1-AM (Oregon Green 488 BAPTA-1-AM) festékkel, így láthatóvá vált, hogy a megjelölt sejtek közül melyek azok, amelyekben megemelkedik az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció SPA-k során, tehát részt vesznek az SPA-k generálásában (53. ábra). 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. Az SPA-kra választ adó sejteket három csoportra osztottuk, aszerint, hogy mennyire megbízhatóan válaszoltak az SPA-kra: 1) esetenként válaszoló sejtek (az SPA események kevesebb, mint 20%-ában válaszoltak), 2) nem megbízhatóan válaszoló sejtek (az SPA események 20-40%-ában válaszoltak), és 3) megbízhatóan válaszoló sejtek, melyek az SPA események több, mint 40%-ánál mutattak Ca^{2+} -választ. Összességében a ResEpi mintákban jóval több válaszoló sejt volt (65%), mint a NoEpi mintákban (32%), de több volt az esetenként (36%) és a nem megbízhatóan válaszoló (20%) sejt, mint a megbízhatóan válaszoló neuron (9%). Ezzel szemben NoEpi mintákban főleg esetenként (13%) és megbízhatóan válaszoló (16%) sejteket láttunk. Ezzel a módszerrel is ki tudtuk tehát mutatni azt, hogy az epilepsziás neocortexben nagyobb a serkenthetőség, és több neuron vonódik be az SPA-k generálásába, mint NoEpi mintákban.



Ezek az eredményeken felül szinkron intracelluláris elvezetést és Ca^{2+} képződést is végeztünk mind serkentő piramisneuronokból (54. ábra), mind gátló interneuronokból. 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 (ld. feljebb is) azt mutatta, hogy az emberi neocorticalis piramisneuronok dendritfája jóval nagyobb (akár háromszor akkora), és jóval komplexebb, mint a rágcsálóké (Ascoli *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2014). Ennek nagy jelentősége lehet a corticalis jelfeldolgozási folyamatokban, lévén, hogy a hosszabb és komplexebb dendritfára sokkal több szinapszis érkezik, 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 (Fourcaud-Trocme *et al.*, 2003; Ilin *et al.*, 2013; Eyal *et al.*, 2014).



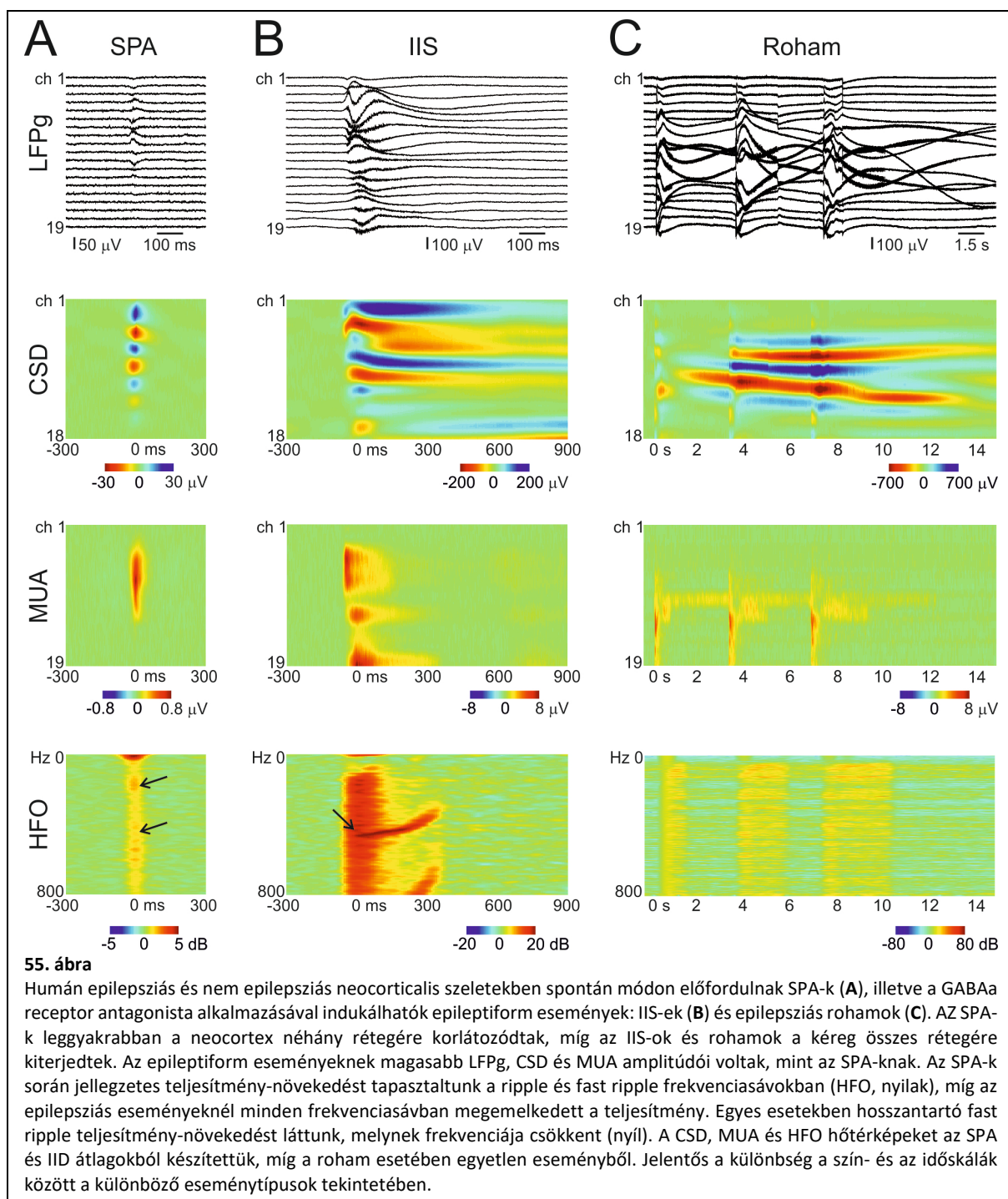
54. ábra

A) Két-foton mikroszkópos Ca^{2+} -képalkotás egy olyan neocorticalis szeletből, amelyben a sejteket OGB-1-AM és SR-101 fluorofóros bulk loading-ot alkalmaztunk. A neuronok csak a zöld OGB-1-AM-et, a gliasejtek a piros SR101-et is felveszik. A fehér vonalak és számok jelzik a helyeket, ahonnan a Ca^{2+} -képalkotást végeztük. Az alsó ábrán látszanak ebből a kísérleti elrendezésből mért Ca^{2+} -jeleket. Bejelöltük a fent megjelölt területeknek megfelelő Ca^{2+} -válaszokat. A 3-as és a 6-os sejt mutat aktivitást (piros jelzi a Ca^{2+} -koncentráció emelkedést). B) A 6-os számú sejt Ca^{2+} -válasza lineáris formában, illetve az A ábrán található formában, kinagyítva és 90° -kal elforgatva. C) Egy nagyobb terület két-foton mikroszkópos képe, az A és B ábrákon 6-os számmal jelölt sejtéből „whole cell” intracelluláris elvezetést is végeztünk, és megtöltöttük Alexa594 piros jelölőanyaggal. A fehér vonalak és számok ugyanazokat a sejteket jelölik, mint az A képen. D) Fénymikroszkópos kép mutatja a C képen levő, 6-os számú sejtet, az anatómiai feldolgozást követően. Nyíl jelöli az axon iniciális szegmentumot. E) A C képen levő 6-os számú sejt dendritjeit (kék) és axonjait (rózsaszín) 3 dimenzióban rekonstruáltuk. F) Elektron mikroszkópos felvétel mutatja, hogy a 6-os számú sejt sejttestjében sok nagy vacuolum van. A mellette levő, 9-es számú sejté azonosított neuron egészségesnek tűnik, sejttestjében nincsenek vacuolumok. G) Egy másik, intracellulárisan elvezetett neocorticalis piramis sejt két-foton mikroszkópos képe, csak a piros csatorna adata látszik. H) A G ábrán bekeretezett rész kinagyított képe. A kékkel jelölt vonal mentén mértük a sejt dendritjének Ca^{2+} -jeleit, miközben a szomatikus membránpotenciál válaszokat rögzítettük. I) A H ábrán levő dendrit Ca^{2+} -jelei (felső, kék vonal) a sejttesten mért elektromos jelekkel (középen, fekete) egyidejűleg. Az alsó sorban az akciós potenciálok és burst-ök ki vannak nagyítva. A dendritben mért Ca^{2+} -jel amplitúdója összefüggést mutat a szomatikusan mért akciós potenciálok számával.

A mi kísérleteinkben látott SPA-k nagyon hasonlítanak a más csoportok által a hippocampusban (Cohen *et al.*, 2002; Wozny *et al.*, 2005; Huberfeld *et al.*, 2007; Wittner *et al.*, 2009) és a neocortexben (Köhling *et al.*, 1998; Roopun *et al.*, 2010; Pallud *et al.*, 2014) leírt szinkron aktivitásokra. Akárcsak ezek a kutatócsoportok, a hippocampust érintő munkáinkban mi magunk is (Huberfeld *et al.*, 2007; Wittner *et al.*, 2009) 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 (Schwartzkroin & Haglund, 1986; Molnár *et al.*, 2008; Szegedi *et al.*, 2016). 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.

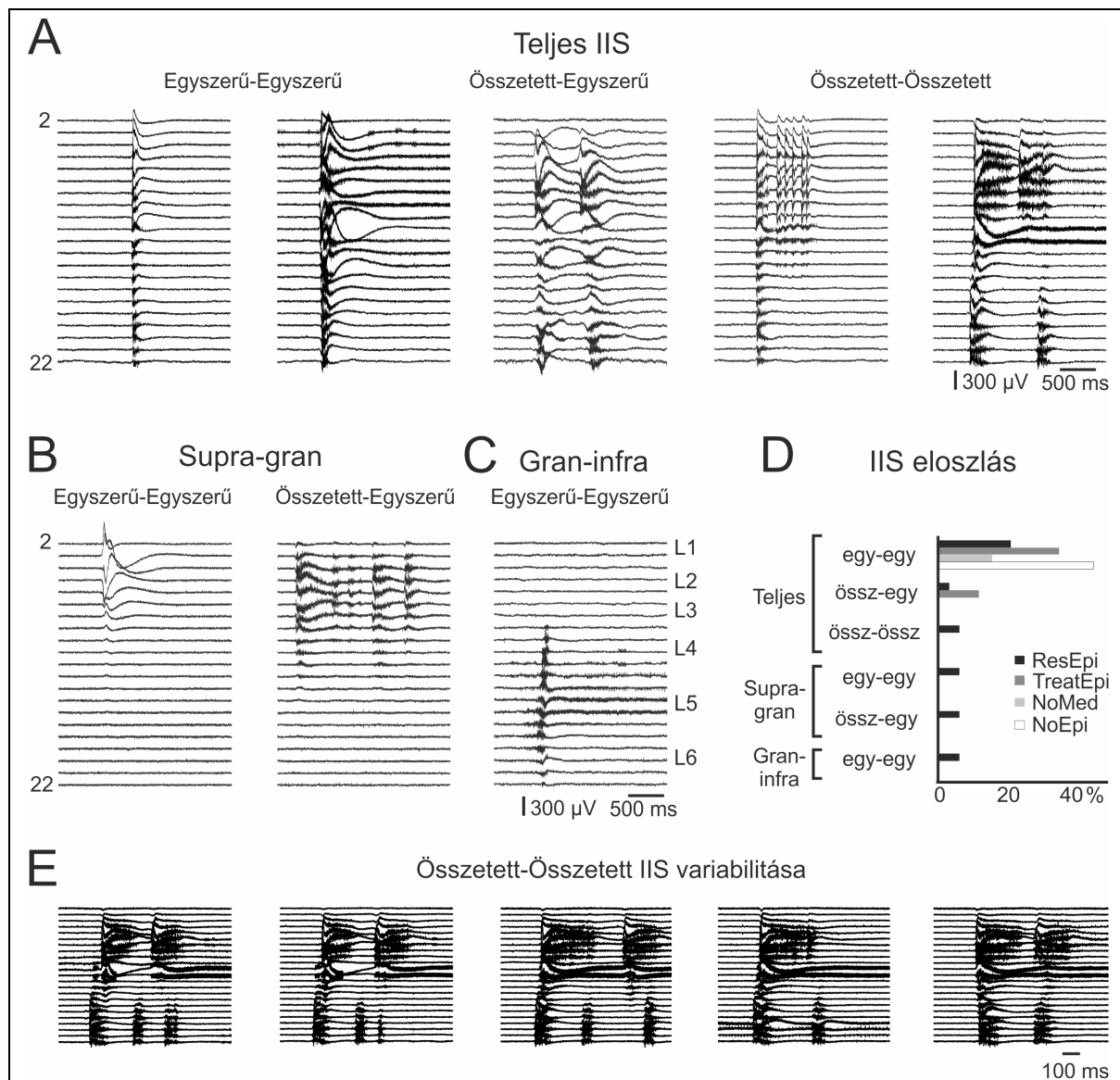
4.3.2 Epileptiform aktivitások keletkezési mechanizmusai (Kandrács *et al.*, 2019)

Epilepsziás és nem epilepsziás (tumoros) betegekből származó neocorticalis szeletekben vizsgáltuk a GABAerg jelátvitel blokkolását követően megjelenő epilepsziás eseményeket. A GABAa receptor antagonistá bicuculline hozzáadásával indukáltuk az interiktális tüskék és a rohamok kialakulását a túlélő szeletekben (55. ábra). A fent leírt négy betegcsoportot vizsgáltuk ebben a kísérletsorozatban is. Bicuculline hatására interiktális tüskék (interictal-like spikes, IIS) jelentkeztek spontán módon 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 tüskéket (IID, ld. fentebb) a diszinhíbiós modellben indukált tüskékkel (IIS), különböző névvel jelöltük.



Az interiktális tuskék nagy része a teljes neocortexet átérte, de láttunk kevesebb rétegre kiterjedő tuskéket is (56. ábra). Megkülönböztettünk időben és térben egyszerű és összetett eseményeket. Egyes esetekben egy túske-hullámból álló IIS-t láttunk, ezek voltak az időben egyszerű események, míg más esetekben az alapvonalra való visszatérés előtt több hullám is követte egymást, ez utóbbiakat neveztük időben komplex IIS eseményeknek. A teljes nagyagykérget átérő IIS-ek során előfordult, hogy a neocortex felsőbb (supragranularis) és alsóbb (infragranularis) rétegei külön-külön (is) aktiválódtak, ezek voltak a térben összetett tuskék. Az időben és térben összetett IIS-ek esetén az

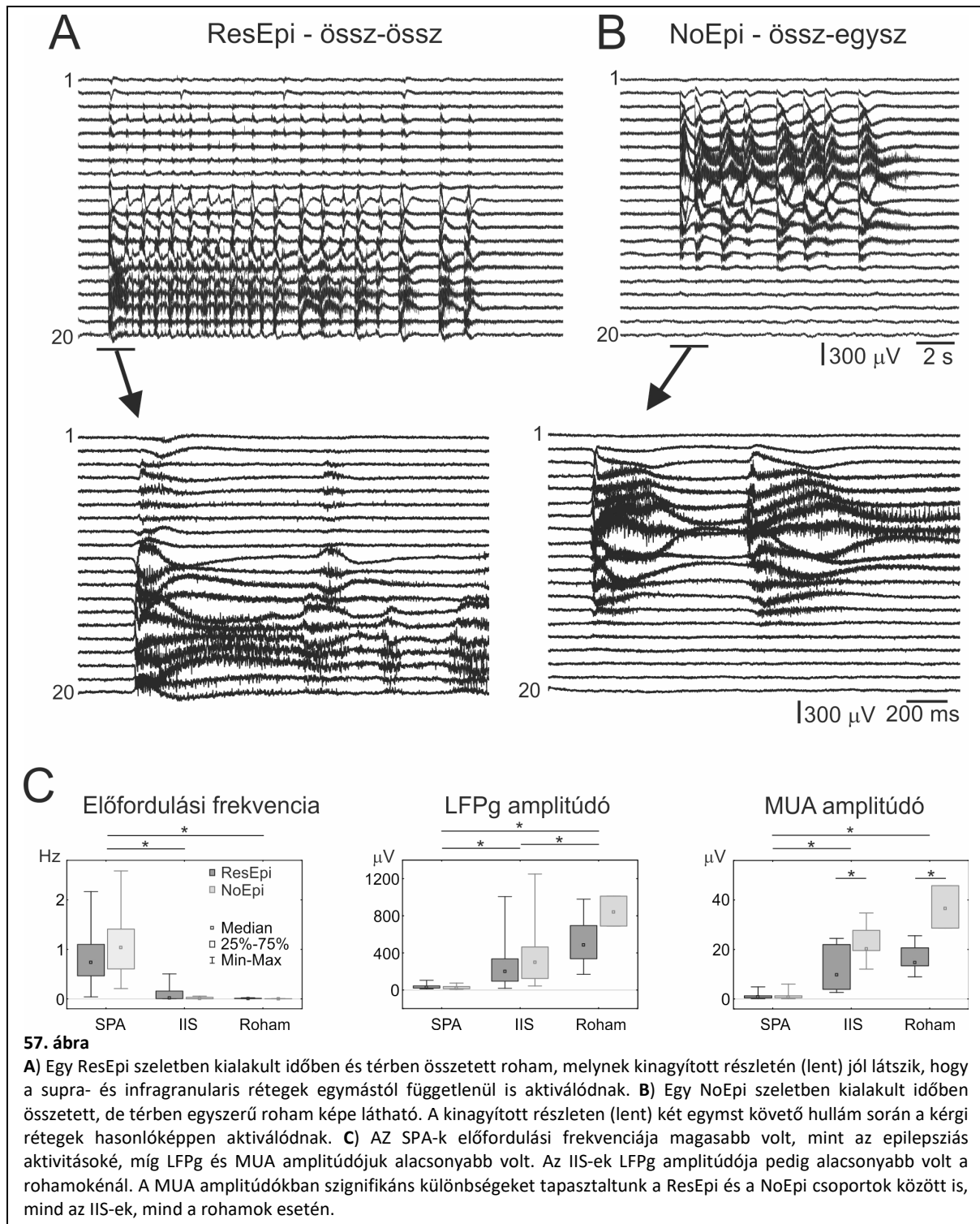
egymást követő események alatt a supra- és infragranularis rétegek gyakran másképp aktiválódtak. Nem epilepsziás (NoEpi) mintákban csak teljes neocortexet átérő, térben és időben egyszerű IIS-ek fordultak elő, míg epilepsziás mintákban, főleg a ResEpi páciensekből származó szövetekben kisebb területre kiterjedő, térben és időben egyszerű, komplex IIS-ek, illetve ezek különböző variációi is kialakultak (56. ábra).



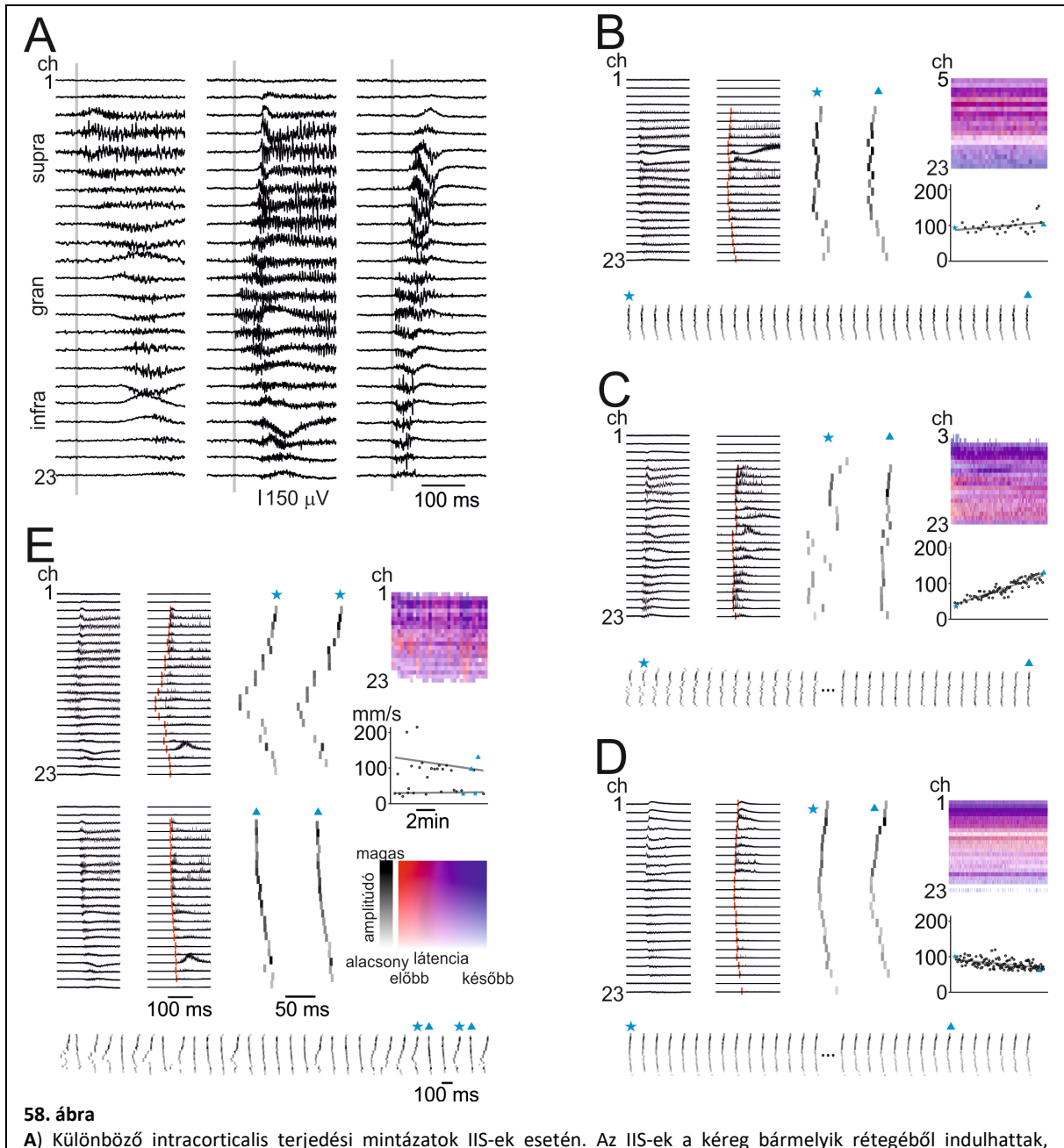
56. ábra

A diszinhibíció-indukálta IIS-eket az idő- és térbeli komplexitásuk alapján csoportosítottuk. A legtöbb esetben az IIS átérte a neocortex teljes vastagságát (A), de néhány esetben kevesebb kérgi rétegre korlátozódó IIS-eket is láttunk (B-C). A) Két időben és térben egyszerű esemény látszik a bal oldalon, feltűnő, hogy az egyik jóval hosszabb időtartamú, mint a másik. Középen egy időben összetett, térben egyszerű IIS látható, míg a jobb oldalon két időben ér térben összetett IIS látszik. Mindkettőnél feltűnő, hogy a supra- és infragranularis rétegek külön is aktiválódnak, bár az első hullám alatt szinkronizáltak. B) Egy időben és térben egyszerű (bal oldal) és egy időben összetett, de térben egyszerű (jobb oldal), supra-granularis előfordulású IIS. C) Egy granularis és infragranularis rétegekre kiterjedő időben ér térben egyszerű IIS. D) A különböző IIS típusok eloszlása a betegcsoportokban. A NoEpi csoportban csak egyszerű-egyszerű IIS-ek fordultak elő, míg epilepsziás mintákban, de főleg a ResEpi csoportban az időben és térben egyszerű és összetett IIS-ek mindenféle variációit detektáltuk. E) Az időben és térben összetett, egymást követő események során a supra- és infragranularis rétegek másképp aktiválódtak.

Az epilepsziás mintákban gyakrabban fordultak elő rohamok, mint nem epilepsziás mintákban (57. ábra). A ResEpi szeletekben láttunk egyszeres ($n=1/29$ szelet) és visszatérő ($n=6/29$ szelet) rohamokat, míg NoEpi mintákban csak egyszeres rohamok fordultak elő ($n=3/26$ szelet). 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 (SPA: kb. 1 Hz; IIS: 0.2-0.01 Hz; rohamok: 0.002-0.007 Hz, 57. ábra). 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 (57. ábra), 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. Az SPA-k ~ 100 ms hosszúságú események voltak, az IIS-ek átlagosan ~ 400 ms, a rohamok pedig 5-28 sec hosszúak. Az SPA-k LFPg amplitúdója $\sim 20-30 \mu\text{V}$, az IIS-eké $\sim 200-300 \mu\text{V}$, a rohamoké pedig $\sim 400-800 \mu\text{V}$. Hasonló tendenciákat észleltünk a MUA amplitúdókban: SPA: $\sim 0.8 \mu\text{V}$, IIS: $\sim 10-20 \mu\text{V}$, rohamok: $\sim 15-35 \mu\text{V}$.



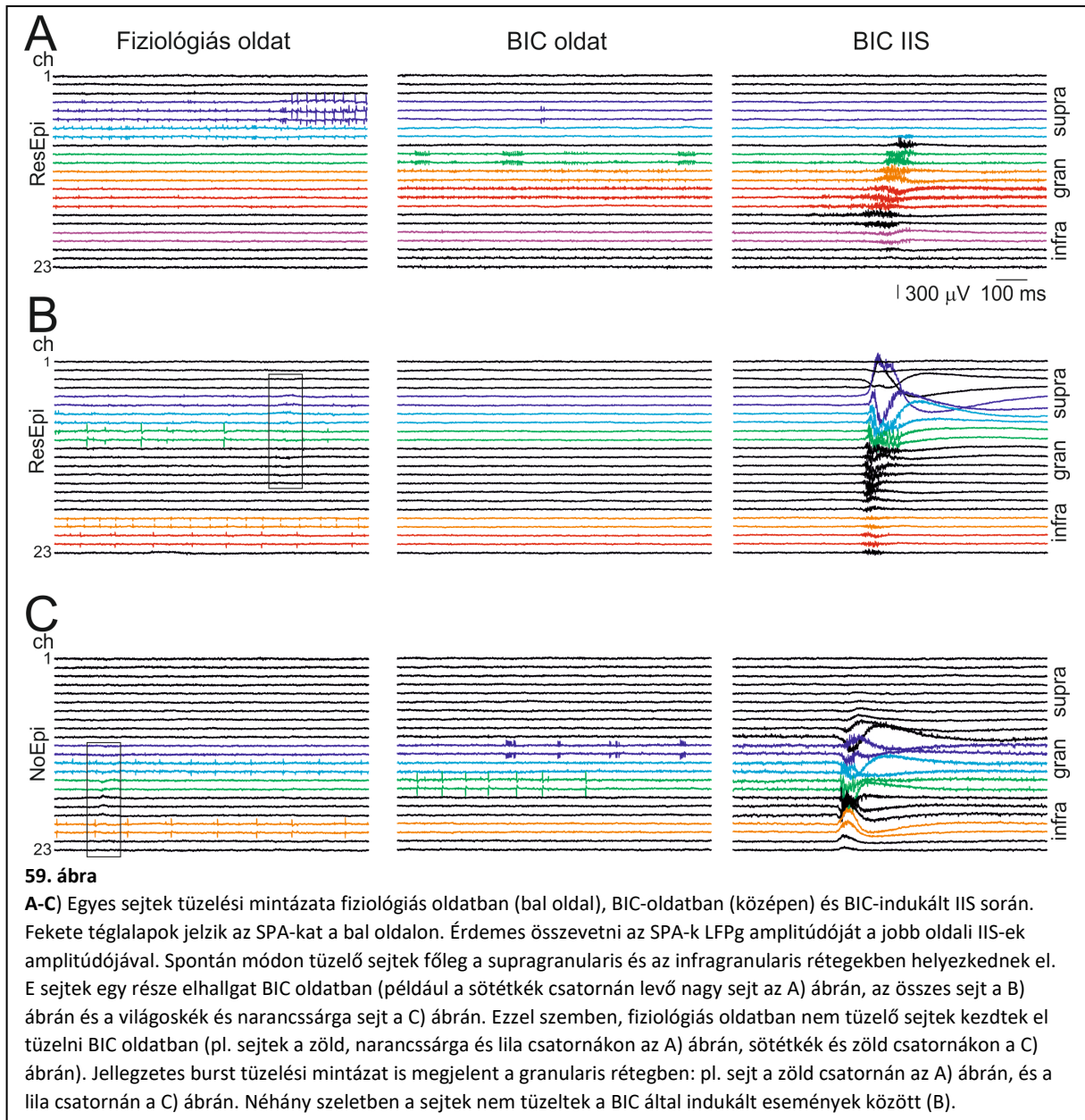
Megfigyeltük azt, hogy míg az SPA-k és a spontán IID-k egyszerre jelentkeznek a neocortex különböző rétegeiben, addig a bicuculline-indukálta IIS-ek egy adott rétegben keletkeznek, és onnan terjednek a neocortex többi rétegébe (58. ábra). Mind a supragranularis, granularis és infragranularis rétegekben keletkeztek IIS-ek, és terjedtek tovább a többi rétegbe. Két olyan esetet is láttunk, amikor egy szeletben kétféle terjedési mintázatú IIS-t detektáltunk, illetve előfordultak olyan esetek is, amikor a terjedési sebesség nőtt, csökkent, illetve változatlan maradt a felvétel során (58. ábra).



58. ábra

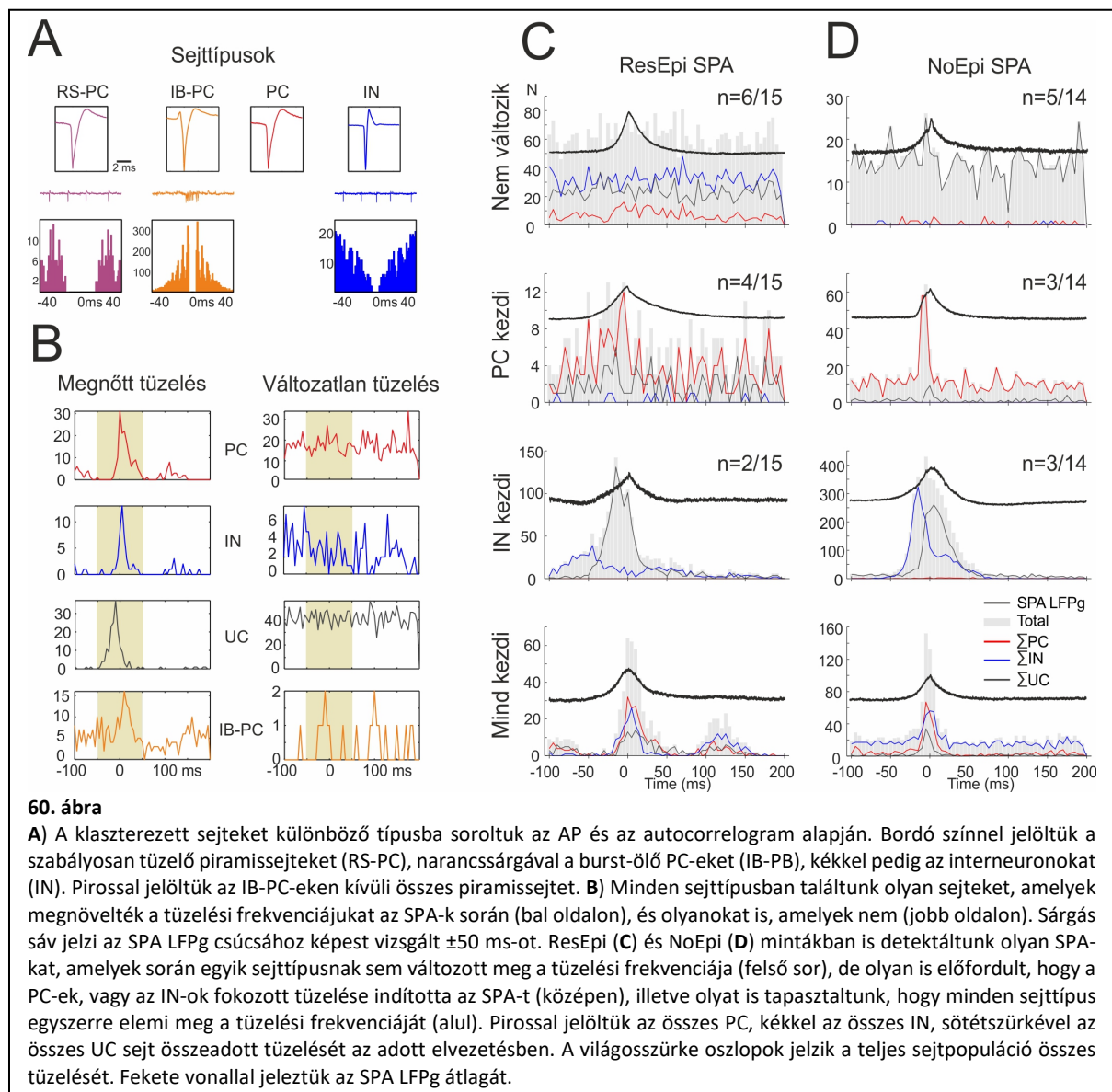
A Különböző intracorticalis terjedési mintázatok IIS-ek esetén. Az IIS-ek a kéreg bármelyik rétegéből indulhattak, supragranularis (bal oldal), granularis (középen), vagy infragranularis (jobb oldal) rétegekből. **B** Egy IIS, amelynek a terjedési sebessége nem változott az elvezetés során. Bal oldalon látszik egy esemény LFPg képe (1-23. csatornák), mellette piros vonallal jelezve az esemény kezdete minden csatornán. Középen a szürke színkódolású raszter két esemény csatornánkénti aktiválódását mutatja. A kék csillaggal és háromszöggel jelölt két esemény az elvezetés első és utolsó eseményét jelöli (alul). A hőterképen a sorok a csatornákat jelölik, az oszlopok pedig az egymást követő eseményeket. Pirossal a hamar, kézzel a később aktiválódó csatornákat jelöltük, a színintenzitás pedig az amplitúdóval arányos. A jobb alsó grafikon mutatja az esemény terjedési sebességének időbeli változását. **C** Egy IIS, amelynek a terjedési sebessége nő. Jól látszik, hogy az elején a csatornák aktiválódásában vagy egy nagyobb „lötyögés”, amely idővel kisebb lesz, emiatt nő az esemény terjedési sebessége. **D** Egy IIS, amelynek a terjedési sebessége csökken. **E** Egy olyan szeletből történt elvezetés látszik, amelyben kétféle terjedési mintázatú IIS-t látunk. Az egyik mintázat során az IIS a granularis rétegből indult (felső), a másik során pedig a supragranularis rétegekből. Vonalas raszter ábra mutat két-két különböző mintázatú eseményt (csillaggal és háromszöggel jelölve). Az alsó sorban a szeletben az egymást követő események raszter mintázata látható, a csillaggal és háromszöggel jelölt események kinagyított képe van fent. Jobb oldalon színkóddal jelölve látszanak az egymást követő események, a középső grafikon mutatja a kétféle IIS terjedési sebességét. Jobb oldalon alul látható a színskála.

Régóta kutatott terület, hogy mely sejtípusok aktiválódása indítja be az interiktális tuskéket. A különböző állatmodellek eredményei mind arra utalnak, hogy a burst-ölő piramissejteknek fontos szerepe van a tuskék iniciálásában (összefoglalásként lásd McCormick & Contreras, 2001). Ugyanakkor humán in vitro adatok azt jelzik, hogy az interneuronok tüzelése indítja be a folyamatot, amelyet aztán követ a piramissejtek aktivitás-emelkedése (Pallud *et al.*, 2014). Ahhoz, hogy megvizsgáljuk ezt a kérdést a humán diszinhíbiós in vitro modellben, sejtklaszterezési technikával elkülönítettük az egyes sejtekhez tartozó akciós potenciálok jeleit a regisztrátumokban. Fiziológias oldatban 193 (ResEpi) és 182 (NoEpi) sejtet klaszterezünk, bicuculline oldatban pedig 191 (ResEpi) és 167 (NoEpi) neuront különítettünk el. Amikor összehasonlítottuk a fiziológias oldatban tüzelő sejteket a BIC oldatban levőkkel, néhány érdekes tüzelési mintázat változást tapasztaltunk. Fiziológias oldatban főleg a supragranularis és az infragranularis rétegben található sejtek voltak aktívak. Az SPA-k is legtöbbször ezekben a rétegekben keletkeztek. Bicuculline hozzáadására a spontán módon aktív sejtek nagy része elhallgatott, és előtte nem tüzelő (ezáltal nem is klaszterezhető) sejtek kezdtek el tüzelni más csatornákon (59. ábra). A granularis rétegben gyakran jelent meg egy jellegzetes, burst tüzelésre emlékeztető sejtípus, amelyet kontrollban nem láttunk. Bicuculline-t tartalmazó oldatban bizonyos szeletekben a sejtek csak a BIC-indukálta események alatt tüzeltek, az események között nem, még akkor is, ha előtte a fiziológias oldatban volt spontán sejtüzelés. Úgy tűnik tehát, hogy a diszinhíbió során más sejtcsoportok aktívak, és alakítják a keletkező populációs aktivitásokat, mint fiziológias oldatban.

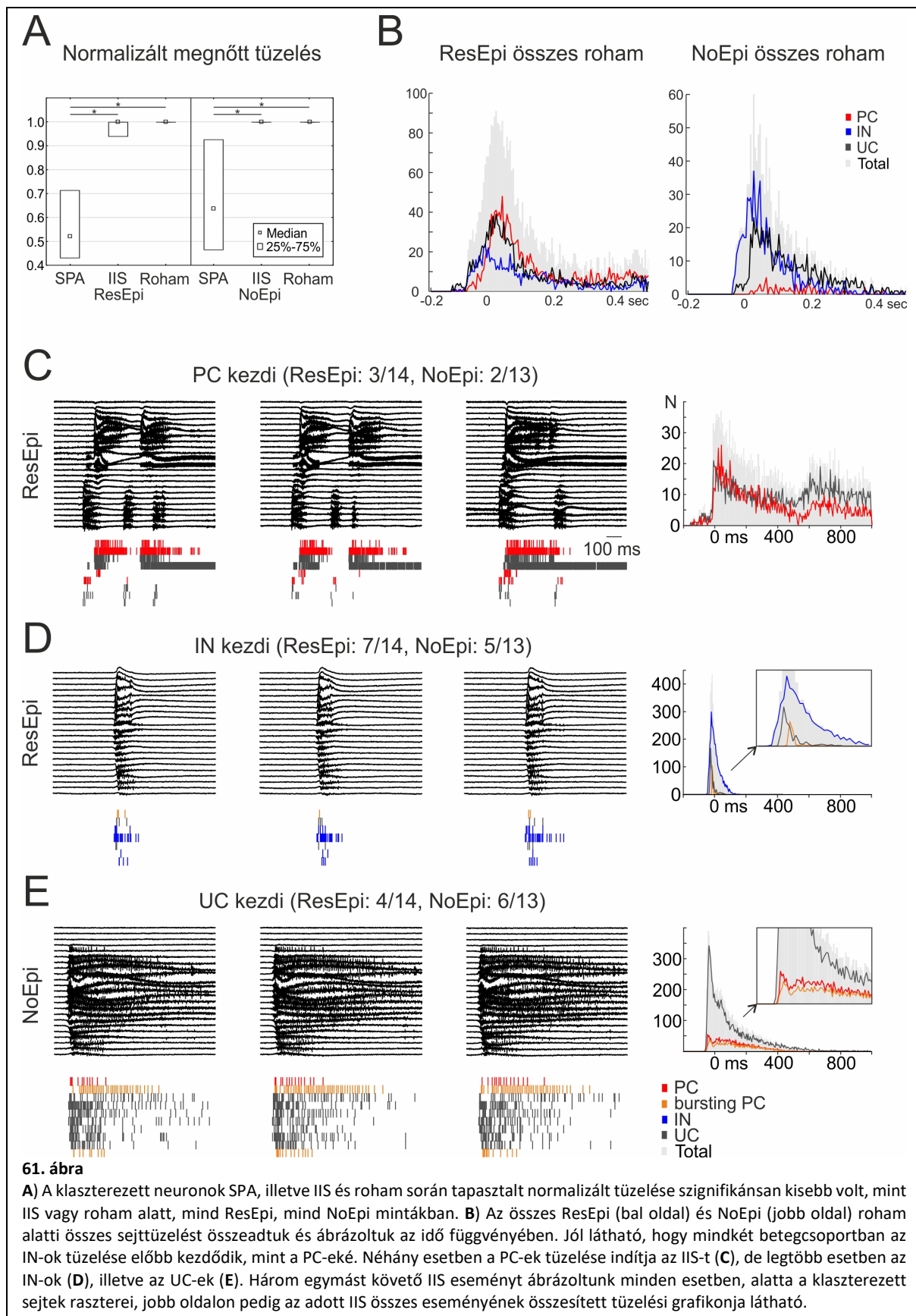


Az akciós potenciál alakja és az adott sejt tüzelési mintázata alapján csoportokba osztottuk a sejteket (60. ábra): 1) principális sejtek (PC), melyek között elkülönítettünk szabályosan tüzelő (regular spiking, RS-PC) és burst-ölő (intrinsically bursting, IB-PC) sejteket, 2) interneuronok (IN) és 3) nem klasszifikált (unclassified, UC) neuronok. Azt tapasztaltuk, hogy a fiziológiás oldatban több PC volt aktív, mint IN (ResEpi: a sejtek 39.4%-a PC, 19.7%-a IN, NoEpi: 27.5% PC, 21.4% IN), míg bicuculline oldatban fordítva, több tüzelő IN-t detektáltunk, mint PC-t (ResEpi: 14.7% PC, 36.1% IN, NoEpi: 18% PC, 33.5% IN). Az epilepsiás mintákban a neuronok tüzelési frekvenciája magasabb volt, mint a nem epilepsiás mintákban, bár ez a különbség nem volt jelentős. A következőkben megvizsgáltuk, mely sejtípusok mikor tüzelnek az SPA-k során, az IIS-ek és a rohamok kezdeti szakaszában. Eredményeink azt mutatják, hogy az SPA-k során a sejtek kb. 50-65%-a emeli meg a tüzelési frekvenciáját, míg az IIS-ek során ez az

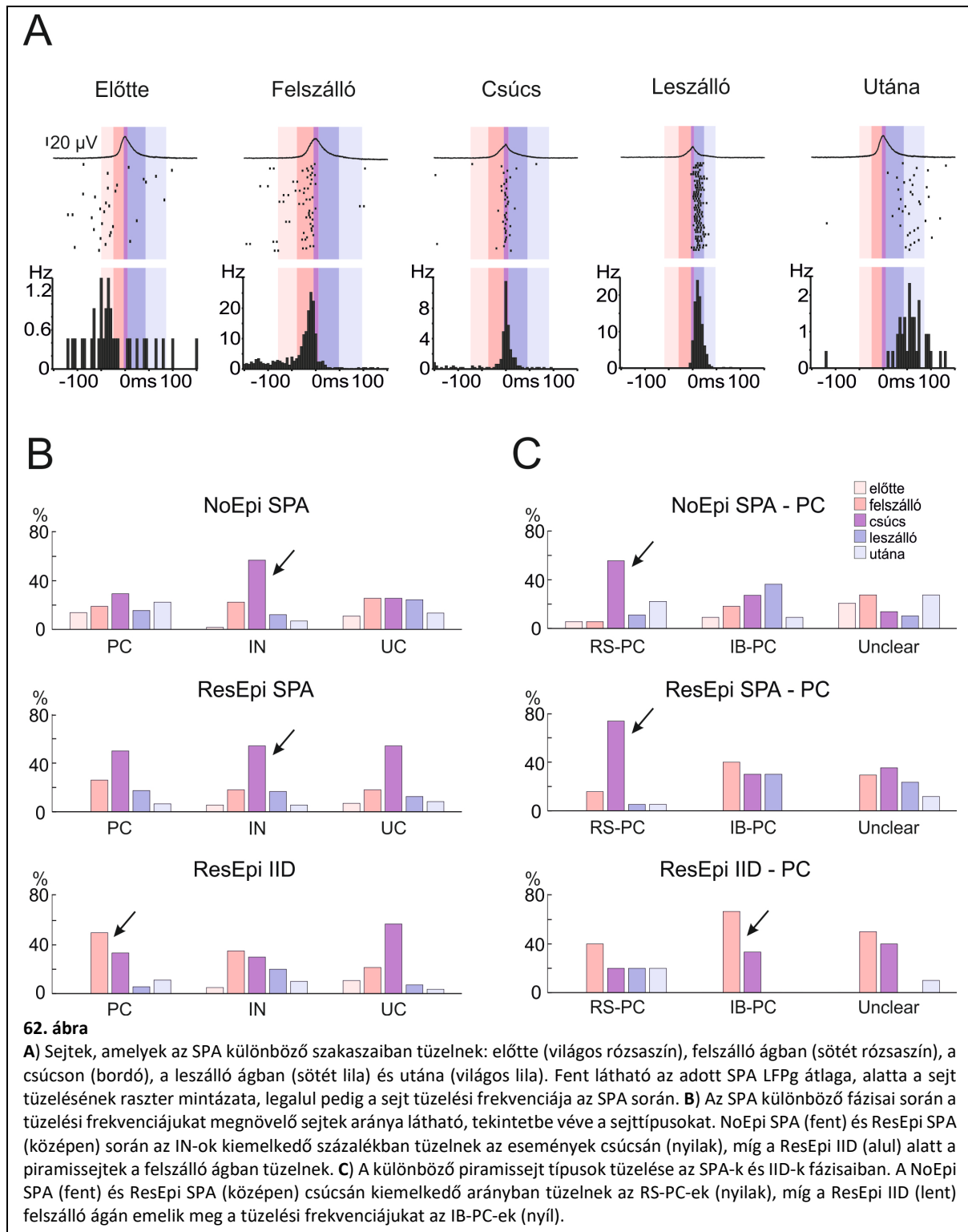
arány 90-100%, a rohamokban pedig 100% volt. Láttunk olyan SPA-t, ahol a PC-ek kezdték a tüzelést, olyat is, ahol az IN-ok, vagy egyszerre az összes sejttípus, de olyan is előfordult, hogy nem láttunk egyáltalán emelkedést a tüzelésben (60. ábra). Összességében az SPA-k során minden sejttípus egyaránt részt vesz a populációs aktivitás kialakításában, bár legfőbb szerepe a PC-eknek van, lévén, hogy arányaiban a legtöbb akciós potenciál e sejtektől érkezik (az összes AP ~30%-a érkezik a PC-ektől, míg csak ~15-24%-a az IN-októl).



Ezzel szemben, az IIS-ek és a rohamok kezdeti szakaszában ugyan (szinte) minden sejt megnöveli az aktivitását (61. ábra), de általában az IN-ok tüzelnek előbb, és arányaiban lényegesen többet, mint a többi sejttípus (IIS-ek során az összes AP ~12-15%-a érkezett PC-ektől, míg ~43-46%-a az IN-októl). Rohamok esetén hasonló eredményeket kaptunk, vagyis az IN-ok jóval több akciós potenciállal (~23-59%) járultak hozzá a rohamkezdethez, mint a piramissejtek (~4-19%).

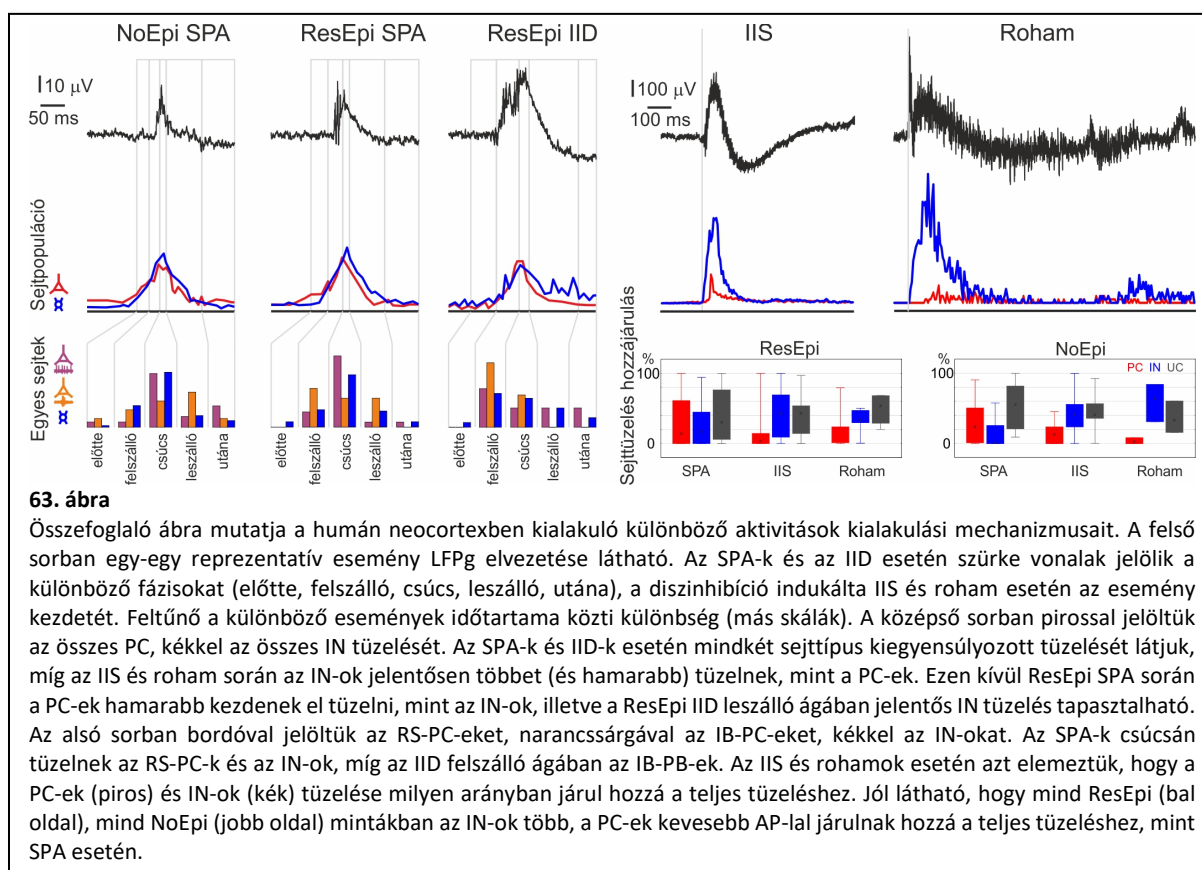


Megvizsgáltuk külön a burst-ölő piramissejteket (IB-PC) abból a tekintetből, hogy hogyan vesznek részt az SPA-k, a spontán IID-k és az indukált IIS-ek kialakításában. A PC-ek 15-16%-a volt IB-PC, mind ResEpi, mind NoEpi mintákban, a jelen levő populációs aktivitásuktól függetlenül. A NoEpi SPA-k során az IB-PC-ek 40%-a, ResEpi SPA során a 67%-a emelte meg a tüzelési frekvenciáját, míg ResEpi IID során 75%, IIS-ek alatt pedig 75% (ResEpi) és 100% (NoEpi) mutatott megemelkedett tüzelést. Azt is elemeztük, hogy a populációs események során mikor tüzelnek a különböző sejttípusok, különös tekintettel az IB-PC-ekre. Az SPA-kat és IID-eket öt szakaszra bontottuk (előtte, felszálló ág, csúcs, leszálló ág, utána), és ezekben vizsgáltuk a sejtek tüzelését. 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 (63. ábra). 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 (62. ábra). A bicuculline-indukálta IIS-ek kezdetén az IN-ok igen erős tüzelését tapasztaltuk, az IB-PC-ek pedig minden esetben később kezdtek tüzelni, mint a felvételen látható többi sejt. Az SPA-kra és az IID-kre vonatkozó ezen sejttüzelési adatok nincsenek benne a disszertáció alapját képező egyik közleményben sem, egy jelenleg közlésre beadott kéziratban szerepelnek. Úgy éreztem, hogy a teljesség, és a megfelelő következtetések levonása kedvéért mégis szót kell ejtenem róla.



Összességében tehát elmondhatjuk, hogy a GABAerg gátlás csökkentésével indukálni tudunk epileptikus eseményeket. Korábbi publikációkban a bicuculline mellett elektromos ingerlést is alkalmazni kellett, hogy interiktális tuskéket tudjanak kiváltani humán neocorticalis szeletekben (Hwa *et al.*, 1991), míg a mi mintáinkban mind az IIS-ek, mind a rohamok spontán módon jelentkeztek. Az epileptikus szövetre jellemző hiperexcitabilitást itt is lehetett mutatni, ResEpi mintákban gyakrabban

jelentkeztek IIS-ek és rohamok, mint NoEpi mintákban. 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. Míg az SPA-k kialakításában a sejtek kb. fele-kétharmada vesz részt, addig az IIS-ek és a rohamok gyakorlatilag az összes neuron bevonásával zajlanak. A különböző sejtípusok szerepéről pedig elmondhatjuk (63. ábra), hogy a nem epileptiform SPA-k során a serkentő és gátló sejtek egy dinamikus egyensúly mentén, egyaránt részt vesznek az események kialakításában. A RS-PC-ek és az IN-ok jelentős aktivitásnövekedést mutatnak az SPA események csúcsán. A spontán megjelenő IID-k során a dinamikus egyensúly eltolódik, és az IB-PC-ek megemelkedett kezdeti tüzelését követi a többi sejtípus aktivitása. A diszinhíbiós modellben megjelenő IIS-ek kezdetén pedig egy jelentős interneuronális aktivitást láttunk, míg az IB-PC-ek csak később kapcsolódtak be az eseményekbe.



A gátlósejtek ilyen fokú aktivitása a diszinhíbió által indukált IIS-ek kezdeti szakaszában felveti a kérdést, hogy milyen mechanizmussal szinkronizálódnak a neuronok, lévén, hogy a GABAerg jelátvitel nagyrészt gátolva van, így az interneuronok tüzelése hatástalan a poszt-szinaptikus sejteken. Felmerül a lehetőség, hogy az egyes interneuron csoportokon levő gap junction kapcsolatok részt vesznek az IIS-

ek generálásában, illetve más nem-szinaptikus kapcsolatok is szóba jöhetnek. Ezeket a hipotéziseket a jövőben még tesztelni szeretnénk. 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 piramissejtek indítják az interiktális tuskéket (Connors, 1984), rágcsálók neocorticalis szeletein a diszinhibíciós (bicuculline) modellt használta. Ezzel szemben a humán neocorticalis szeleteken alkalmazott diszinhibíciós (szintén bicuculline) 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 telencephalon az evolúció során az emlősökben jelentős fejlődésen esett át. Ugyan vannak olyan agyi területek más gerincesekben (hüllőkben, madarakban) amelyek az archicortex és a neocortex előfutárainak tekinthetők, a hat rétegű nagyagykéreg és a három rétegű, speciális szerkezetű hippocampus az emlősökre jellemző agyi struktúrák. 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 Buzsáki, 2015). 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 – egér, patkány (Buzsáki, 2015), tengerimalac (pl. Connors, 1984), vadászgörény (Sanchez-Vives & McCormick, 2000), macska (pl. Ali *et al.*, 2007), Rhesus majom (pl. Schwartzkroin & Haglund, 1986) – 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.

Ha epilepsziás állatokból származó neocorticalis vagy hippocampalis szeleteket vizsgálunk in vitro körülmények között, akkor fiziológiás oldatban spontán módon nem alakulnak ki sem rohamok, sem interiktális tüskék. Ugyanakkor mindkét típusú epilepsziás aktivitás kiváltható az átáramoltatott oldat megváltoztatásával, illetve a megfelelő farmakológiai módszerekkel, nem csak epilepsziás, de kontroll állatok agyából készített preparátumokban is (összefoglalásként ld. Raimondo *et al.*, 2017). E tekintetben a neocorticalis és hippocampalis szeletek közt jelentős különbség nem mutatkozik.

5.2 Ember és állat közti különbségek

Ugyan a kutatáshoz használt állatokból meglehetősen jól lehet extrapolálni az emberi betegségre, 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 rátevéődik 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 (Cohen *et al.*, 2002; Wozny *et al.*, 2005; Wittner *et al.*, 2009), valamint nagyagykérgi szeleteiben (McCormick, 1989; Köhling *et al.*, 1998; Pallud *et al.*, 2014; Florez *et al.*, 2015) lehet regisztrálni *in vitro* körülmények között, szintén fiziológias oldatban. Bár két kutatócsoportban is felvetődött a kérdés, hogy ezek az események mennyire köthetők össze a páciensek epilepsziás megbetegedésével (Schwartzkroin & Knowles, 1984; Köhling *et al.*, 1998), elég hamar (Cohen *et al.*, 2002) 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 (Schwartzkroin & Haglund, 1986), addig emberben mind epilepsziás (McCormick, 1989; Köhling *et al.*, 1998; Florez *et al.*, 2015), mind nem epilepsziás (tumoros) betegek (Molnár *et al.*, 2008; Kerekes *et al.*, 2014; Szegedi *et al.*, 2016; Szegedi *et al.*, 2017; Tóth *et al.*, 2018; Kandrács *et al.*, 2019) nagyagykérgi szövetszeletein spontán megjelenik fiziológias 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 (összefoglalásként lásd Raimondo *et al.*, 2017). E jelenségeken túl több anatómiai és elektrofiziológiai eredmény is alátámasztja a feltevést, hogy az emberi nagyagykéreg jelentősen különbözik az állatok nagyagykérgétől. Nemrég írtak le egy humán-specifikus sejtípust („rosehip” avagy „cspikebogyó” sejt, Boldog *et al.*, 2018), valamint az emberi neocortexre jellemző, speciális sejtes összeköttetéseken alapuló komplex, poliszinaptikus eseményeket (Molnár *et al.*, 2008). 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 Mohan *et al.*, 2015), amely sajátos elektromos tulajdonságokat és egy gyorsabb jelfeldolgozást eredményez (Eyal *et al.*, 2014; Eyal *et al.*, 2016). Az

állatokhoz képest megnövekedett humán nagyagykéreg tehát nem csak több sejtet tartalmaz, de ezek a sejtek nagyobb és komplexebb dendritfával, több szinaptikus kapcsolattal is rendelkeznek, és a jelfeldolgozási képességük is magasabb. Ezek alapján az emberi nagyagykéreg nem tekinthető az állatok nagyagykérgének egy egyszerűen megtöbbszörözött formájának, mert kvalitatív tulajdonságaiban is különbözik azoktól (Eyal *et al.*, 2018). A komplexebb kapcsolati rendszer 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 elősegítette 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 tüskék generálásában. Először egy akut diszinhibíciós modellben, tengerimalac neocorticalis szeleteiben mutatták ki ezt a jelenséget (Connors, 1984), de később más corticalis területeken és különböző modellekben is igazolták: mint pl. patkány entorhinális kéregben akut 4-AP modellben (Lopantsev & Avoli, 1998), a hippocampus CA1 régiójában patkány pilocarpine modellben (Sanabria *et al.*, 2001), tengerimalac CA3 régióban diszinhibíciós modellben (Wittner & Miles, 2007), illetve patkány subiculumban, magnézium-mentes oldatban (Menendez de la Prida & Gal, 2004). A kísérleteinkben kétféle (spontán, és diszinhibíció-indukálta) *in vitro* modellben vizsgáltuk a serkentő és gátló sejtek szerepét az interiktális tüskék kialakításában. Már ebben is láttunk különbséget: míg a spontán megjelenő tüskéket valóban a burst-ölő piramissejtek tüzelése indítja, addig a diszinhibíciós modellben a gátló interneuronok nagyarányú tüzelését láttuk a tüskék kezdeti szakaszában, és a burst-ölő piramissejtek minden esetben csak követték a más sejtek tüzelését (Kandrás *et al.*, 2019). Ugyanaz a humán szelet modell, mégis, spontán módon egészen más

mechanizmussal indul az interiktális túske, mint a diszinhíbiós modellben, ahol a gátlást mesterségesen lecsökkentettük. Ezen kívül az is megjegyzendő, hogy míg a tengerimalac neocortexben a GABA_A receptor antagonistá bicuculline a burst-ölő sejtek tüzelésén keresztül indította be az interiktális tuskéket (Connors, 1984), addig humán neocorticalis szeletben (mind epilepsziás, mind nem epilepsziás betegekben) a bicuculline hatására kialakuló interiktális tuskék a gátló sejtek tüzelésével kezdődnek (Kandrács *et al.*, 2019). 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 epilepszia az egyik leggyakoribb neurológiai megbetegedés, mely a lakosság akár 1%-át is érintheti. Ugyan a betegek többsége a jelenlegi terápiákkal tünetmentessé tehető, még így is sok páciens állapotában nem lehet jelentős javulást elérni. Esetleges új terápiákkal csökkenthető lenne az a szociális és anyagi teher, amit az epilepsziás rohamok előfordulása ró magára a betegre, a családjára és az egész társadalomra.

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 agykérgi szinkronizációk, mint amilyen például a tanulási és memóriafolyamatokhoz köthető éles hullám-ripple komplexum (sharp wave-ripple complexes, SPW), valamint az epilepsziához köthető corticalis szinkronizációk sejtes és hálózati hátteréről, és az elektrofiziológiai, anatómiai és molekuláris változásokról. Ugyanakkor az emberi agyra és betegségre vonatkozó ismereteink hiányosak, pedig a terápiás lehetőségek fejlesztéséhez elengedhetetlen az emberi agy és az emberi betegség 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 és génszignalizációs mechanizmusait, valamint a fiziológiás és epilepsziás események 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 sejtek vezérlik. Farmakológiai kísérleteink azt igazolták, hogy a periszomatikus gátló neuronoknak fontos szerepük van a SPW-ek iniciálásában. Ezzel szemben, az epilepsziás interiktális tüskéket a hippocampus CA3a régiójának serkentő piramissejtjei kezdik, és speciális burst-ölő tulajdonságuk, és sűrűbb összeköttetések révén vonják be a környező sejteket és a többi hippocampalis régió neuronjait. Feltártuk, hogy a kainátot alkalmazó epilepsziamodellben a hippocampus sejtjei a roham elején egy magas frekvenciás tüzelést mutatnak, majd ezt követően depolarizációs blokkba kerülnek, ahonnan

gyakran nem térnek vissza az alapállapotba. Anatómiai módszerekkel egészséges állatokban kimutattuk, hogy míg a CA3 piramis sejtek 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 piramis sejtjei 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, az ipsilaterális, szelektív interneuron pusztulást mutató hippocampalis területek ugyanúgy képesek voltak interiktális aktivitás generálására, mint a contralaterális, sejtpusztulást egyáltalán nem mutató területek. Ezek az eredmények arra utalnak, 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. A subiculumban és a temporális kéregben egyidejűleg megjelenő interiktális tüskék részletes analízise alátámasztotta azt a feltételezést, hogy a subiculumban keletkező epilepsziás aktivitás kijut a temporális neocortexbe. Az in vitro körülmények között spontán megjelenő tüskék kialakulási mechanizmusait is vizsgáltuk temporális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő páciensek hippocampalis mintáiban. Azt tapasztaltuk, hogy a subiculumban bizonyos piramis sejtek serkentő választ adnak az interiktális tüskék során, míg a többség gátlódik. Elektrofiziológiai és morfológiai 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. Anatómiai vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy ebben a régióban inkább a periszomatikus gátlás funkcionális változása és a gyrus dentatus felől érkező serkentő pálya megjelenése állhat a jelenség hátterében. További hisztológiai vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a periszomatikus gátlás – a várakozásokkal ellentétben – nem csökken az epilepsziás hippocampusban. Fénymikroszkópos szinten a parvalbumin-tartalmú kosár- és axo-axonikus sejtek számának csökkenését találtuk, az elektronmikroszkópos vizsgálatok azonban kimutatták, hogy a gyrus dentatusban a periszomatikus sejtek axonjai sarjadzanak, és több szinapszist adnak a szemcsesejtekre, mint kontrollban. A hippocampus cornu Ammonis régiójában pedig a periszomatikus gátlás jelentősen nem változik addig, amíg a célsejtjeik, a piramis sejtek ott vannak. A másik, cholecystokinin-tartalmú kosársejttípus megerősödését tapasztaltuk a hippocampus minden vizsgált régiójában a humán epilepsziás hippocampusban.

Humán neocorticalis szeletekben leírtuk, hogy 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 piramissejtek és a gátló interneuronok tüzelése kiemelkedő az események csúcsán. A spontán megjelenő interiktális tüskékben valamivel több sejt vesz részt, mint az SPA-kban, és egyértelműen a burst-ölő piramissejtek 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 piramissejtekre.

Munkánk során tehát feltártuk a fiziológiás és epilepsziás szinkron események sejt 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 sejtcsoportok, 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 betegségekre vonatkozóan. Az emberi agy és az emberi betegségek körültekintő vizsgálata tehát nélkülözhetetlen, ha új, hatékony terápiákat szeretnénk kifejleszteni a jövőben.

7 Köszönetnyilvánítás

Először is szeretnék köszönetet mondani Freund Tamásnak és Maglóczky Zsófiának, az első mentoraimnak, akik megismertettek az idegtudomány csodálatos világával, különösen az idegsejtek morfológiai szépségeivel. Tőlük olyan szilárd anatómiai tudást és szemléletet kaptam, amellyel úgy gondolom, bárhol, bármikor megállnám a helyem a világban. Szeretném megköszönni Zboray Géza tanár úrnak, Katona Istvánnak és Gulyás Attilának a motivációt, hogy az idegtudományt válasszam szűkebb szakterületnek, és hogy Freund Tamás laboratóriumába menjek szakdolgozni. Nélkülük ma valószínűleg nem lennék itt.

Szeretnék továbbá köszönetet mondani későbbi mentoraimnak, Buzsáki Györgynek és Richard Milesnek, akiktől nagyon sokat tanultam, a tudomány mellett szemléletet is. Buzsáki Györgynek köszönöm, hogy láthattam, hogyan lehet távolabbra mutató, merész hipotéziseket felállítani, és azokra kísérleteket tervezni, végezni. Richard Milesnek pedig köszönöm, hogy megtanított arra az aprólékos, kirakós játékhoz hasonló alaposágra, mellyel felépít és körbejár egy témát.

Köszönetemet szeretném kifejezni közvetlen kollégáimnak, diákjaimnak, akik velem együtt ezt a rengeteg munkát elvégezték. Köszönöm Tóth Kingának, Katharina Hofernak, Kandrács Ágnesnek, Tóth Estillának, Kerekes Bálintnak, Pál Ildikónak, Szabó Csillának, Karlócai Ritának, akikkel mindig öröm volt/van együtt dolgozni. Szintén köszönöm az Integratív Idegtudományi Csoport összes tagjának a segítséget és az inspiráló munkakörnyezetet. Köszönöm Bunford Nórának a motivációt, hogy a kutatómunka pszichológiai hátterén is elgondolkozzak.

Szeretném megköszönni az inspiráló környezetet, a tudományt, a beszélgetéseket, a mindenféle segítséget és a szerteágazó – tudományos és nem tudományos – gondolatokat mindazokban a laborokban, ahol dolgoztam és dolgozom. A KOKI-ban Acsády Lászlónak, Gulyás Attilának, Katona Istvánnak, Emri Zsuzsának, Borhegyi Zsoltnak, Arabadzisz Dimitrulának, Barthó Péternek, Mátyás Ferencnek, Rancz Edének, Hájos Norbertnek, Jelítai Mártának, Holderith Noéminak, Makara Juditnak, Andrásfalvy Bertalannak, Goda Győzőnek, Simon Emőkének, Iványi Katalinnak és Lengyel Katalinnak. A Rutgers Egyetemen Csicsvári Józsefnek, Darrell Henze-nek, Alvaro Duque-nek, Anton Sirota-nak és Hajime Hirase-nak. Az INSERM laborban Jean-Christophe Poncernek, Gilles Huberfeldnek, Liset Menendez de la Prida-nak, Caroline LeDuigounak, Anita Scheubernek, Desdemona Frickernek, Dario Mottinak, Emmanuel Eugene-nek és Viviane Lambert-nek. A KPI-ben és jogelődjeiben Fiáth Richárdnak, Márton Gergelynek, Mészéna Domokosnak, Horváth Domonkosnak, Hillier Dánielnek, Grand Lászlónak, Csercsa Richárdnak, Karmos Györgynek, Czigler Istvánnak, Winkler Istvánnak, Molnár Márknak és Málik Klárának.

Rengeteg köszönet illeti a neurológus és idegsebész kollégákat, akik nélkül a humán kutatások nem folyhatnának. Köszönöm az Országos Idegtudományi Intézetben Erőss Lorándnak, Entz Lászlónak, Fabó Dánielnek, Bagó Attilának, Nagy Gábornak, Kelemen Annának, Halász Lászlónak, Kiss Tímeának, Hajnal Boglárkának, Tóth Emíliának, Bokodi Virágnak, Czirják Sándornak, Vajda Jánosnak, Bognár Lászlónak, Halász Péternek, Rásonyi Györgynek, Jakus Ritának és Szűcs Annának a munkájukat. A Pitié-Salpêtrière kórházban Stéphane Clémenceau-nak, Edouard Dezamis-nak, Michel Baulac-nak, Vincent Navarronak és Sophie Dupont-nak. A New York University idegsebészetén pedig köszönet illeti Werner Doyle-t. És természetesen minden betegnek is köszönöm, akik a tudomány előrehaladása érdekében beleegyeztek a kutatásban való részvételbe.

Végezetül köszönöm a családomnak: férjemnek, Ulbert Istvánnak, gyerekeimnek, szüleimnek, testvéreimnek, anyósomnak és apósomnak, valamint néhai édesanyámnak és nagyszüleimnek, hogy mindig hittek bennem és elfogadták a döntéseimet. Csodálatos dolog egy ilyen szerető és támogató környezetben élni és dolgozni.

8 Irodalom

- Acsády L, Katona I, Gulyás AI, Shigemoto R & Freund TF. (1997). Immunostaining for substance P receptor labels GABAergic cells with distinct termination patterns in the hippocampus. *J Comp Neurol* **378**, 320-336.
- Alexander A, Maroso M & Soltész I. (2016). Organization and control of epileptic circuits in temporal lobe epilepsy. *Prog Brain Res* **226**, 127-154.
- Ali AB, Bannister AP & Thomson AM. (2007). 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.
- Alonso-Nanclares L, Garbelli R, Sola RG, Pastor J, Tassi L, Spreafico R & DeFelipe J. (2005). Microanatomy of the dysplastic neocortex from epileptic patients. *Brain* **128**, 158-173.
- Ascoli GA, Donohue DE & Halavi M. (2007). NeuroMorpho.Org: a central resource for neuronal morphologies. *J Neurosci* **27**, 9247-9251.
- Avoli M, Hwa G, Louvel J, Kurcewicz I, Pumain R & Lacaille JC. (1997). Functional and pharmacological properties of GABA-mediated inhibition in the human neocortex. *Can J Physiol Pharmacol* **75**, 526-534.
- Avoli M, Hwa GG, Lacaille JC, Olivier A & Villemure JG. (1994a). 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.
- Avoli M, Louvel J, Drapeau C, Pumain R & Kurcewicz I. (1995). GABAA-mediated inhibition and in vitro epileptogenesis in the human neocortex. *J Neurophysiol* **73**, 468-484.
- Avoli M, Louvel J, Pumain R & Köhling R. (2005). Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. *Prog Neurobiol* **77**, 166-200.
- Avoli M, Louvel J, Pumain R & Olivier A. (1987). Seizure-like discharges induced by lowering $[Mg^{2+}]_o$ in the human epileptogenic neocortex maintained in vitro. *Brain Res* **417**, 199-203.
- Avoli M, Mattia D, Siniscalchi A, Perreault P & Tomaiuolo F. (1994b). Pharmacology and electrophysiology of a synchronous GABA-mediated potential in the human neocortex. *Neuroscience* **62**, 655-666.
- Avoli M & Williamson A. (1996). Functional and pharmacological properties of human neocortical neurons maintained in vitro. *Prog Neurobiol* **48**, 519-554.

- Babb TL, Wilson CL & Isokawa-Akesson M. (1987). Firing patterns of human limbic neurons during stereoencephalography (SEEG) and clinical temporal lobe seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **66**, 467-482.
- Bear MF, Connors BW & Paradiso MA. (2016). *Neuroscience: exploring the brain*. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA, USA.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R & Gaiarsa JL. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* **416**, 303-325.
- Blumcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Vinters HV, Palmieri A, Jacques TS, Avanzini G, Barkovich AJ, Battaglia G, Becker A, Cepeda C, Cendes F, Colombo N, Crino P, Cross JH, Delalande O, Dubeau F, Duncan J, Guerrini R, Kahane P, Mathern G, Najm I, Ozkara C, Raybaud C, Represa A, Roper SN, Salamon N, Schulze-Bonhage A, Tassi L, Vezzani A & Spreafico R. (2011). 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.
- Boldog E, Bakken TE, Hodge RD, Novotny M, Aevermann BD, Baka J, Borde S, Close JL, Diez-Fuertes F, Ding SL, Faragó N, Kocsis AK, Kovács B, Maltzer Z, McCarrison JM, Miller JA, Molnár G, Oláh G, Ozsvár A, Rózsa M, Shehata SI, Smith KA, Sunkin SM, Tran DN, Venepally P, Wall A, Puskás LG, Barzó P, Steemers FJ, Schork NJ, Scheuermann RH, Lasken RS, Lein ES & Tamás G. (2018). Transcriptomic and morphophysiological evidence for a specialized human cortical GABAergic cell type. *Nat Neurosci* **21**, 1185-1195.
- Bragin A, Wilson CL, Fields T, Fried I & Engel J, Jr. (2005). Analysis of seizure onset on the basis of wideband EEG recordings. *Epilepsia* **46 Suppl 5**, 59-63.
- Buzsáki G. (1986). Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain Res* **398**, 242-252.
- Buzsáki G. (2006). *Rhythms of the brain*. Oxford University Press, New York, NY, USA.
- Buzsáki G. (2015). Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus* **25**, 1073-1188.
- Calvin WH, Ojemann GA & Ward AA, Jr. (1973). 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.
- Chagnac-Amitai Y & Connors BW. (1989). Synchronized excitation and inhibition driven by intrinsically bursting neurons in neocortex. *J Neurophysiol* **62**, 1149-1162.
- Chen JR, Wang BN, Tseng GF, Wang YJ, Huang YS & Wang TJ. (2014). Morphological changes of cortical pyramidal neurons in hepatic encephalopathy. *BMC Neurosci* **15**, 15.

- Cohen I, Navarro V, Clémenceau S, Baulac M & Miles R. (2002). On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* **298**, 1418-1421.
- Colder BW, Frysinger RC, Wilson CL, Harper RM & Engel J, Jr. (1996). Decreased neuronal burst discharge near site of seizure onset in epileptic human temporal lobes. *Epilepsia* **37**, 113-121.
- Connors BW. (1984). Initiation of synchronized neuronal bursting in neocortex. *Nature* **310**, 685-687.
- Crino PB. (2015). Focal Cortical Dysplasia. *Semin Neurol* **35**, 201-208.
- de Curtis M & Avanzini G. (2001). Interictal spikes in focal epileptogenesis. *Prog Neurobiol* **63**, 541-567.
- de Lanerolle NC, Thapar K, Partington JP & Robbins RJ. (1987). Comparison of somatostatin immunoreactivity in epileptogenic and normal human hippocampi. *Epilepsia* **28**, 600-601.
- Dehghani N, Peyrache A, Telenczuk B, Le Van Quyen M, Halgren E, Cash SS, Hatsopoulos NG & Destexhe A. (2016). Dynamic Balance of Excitation and Inhibition in Human and Monkey Neocortex. *Sci Rep* **6**, 23176.
- Drake CT & Milner TA. (2002). Mu opioid receptors are in discrete hippocampal interneuron subpopulations. *Hippocampus* **12**, 119-136.
- Duvernoy HM. (1998). *The human hippocampus*. Springer-Verlag, Berlin.
- Elahian B, Lado NE, Mankin E, Vangala S, Misra A, Moxon K, Fried I, Sharan A, Yeasin M, Staba R, Bragin A, Avoli M, Sperling MR, Engel J, Jr. & Weiss SA. (2018). Low-voltage fast seizures in humans begin with increased interneuron firing. *Ann Neurol* **84**, 588-600.
- Eyal G, Mansvelder HD, de Kock CP & Segev I. (2014). Dendrites impact the encoding capabilities of the axon. *J Neurosci* **34**, 8063-8071.
- Eyal G, Verhoog MB, Testa-Silva G, Deitcher Y, Benavides-Piccione R, DeFelipe J, de Kock CPJ, Mansvelder HD & Segev I. (2018). Human Cortical Pyramidal Neurons: From Spines to Spikes via Models. *Frontiers in cellular neuroscience* **12**, 181.
- Eyal G, Verhoog MB, Testa-Silva G, Deitcher Y, Lodder JC, Benavides-Piccione R, Morales J, DeFelipe J, de Kock CP, Mansvelder HD & Segev I. (2016). Unique membrane properties and enhanced signal processing in human neocortical neurons. *Elife* **5**.
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Jr., Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshe SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T,

- Watanabe M & Wiebe S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* **55**, 475-482.
- Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshe SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE & Zuberi SM. (2017). 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.
- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P & Engel J, Jr. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* **46**, 470-472.
- Florez CM, McGinn RJ, Lukankin V, Marwa I, Sugumar S, Dian J, Hazrati LN, Carlen PL, Zhang L & Valiante TA. (2015). In vitro recordings of human neocortical oscillations. *Cereb Cortex* **25**, 578-597.
- Fourcaud-Trocme N, Hansel D, van Vreeswijk C & Brunel N. (2003). How spike generation mechanisms determine the neuronal response to fluctuating inputs. *J Neurosci* **23**, 11628-11640.
- Freund TF & Buzsáki G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* **6**, 347-470.
- Freund TF & Katona I. (2007). Perisomatic inhibition. *Neuron* **56**, 33-42.
- Gabriel S, Njunting M, Pomper JK, Merschhemke M, Sanabria ER, Eilers A, Kivi A, Zeller M, Meencke HJ, Cavalheiro EA, Heinemann U & Lehmann TN. (2004). Stimulus and potassium-induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis. *J Neurosci* **24**, 10416-10430.
- Gallyas F, Gudner FH, Zoltay G & Wolff JR. (1990). Golgi-like demonstration of "dark" neurons with an argyrophil III method for experimental neuropathology. *Acta Neuropathol* **79**, 620-628.
- Gulyás AI, Szabó GG, Ulbert I, Holderith N, Monyer H, Erdélyi F, Szabó G, Freund TF & Hájos N. (2010). Parvalbumin-containing fast-spiking basket cells generate the field potential oscillations induced by cholinergic receptor activation in the hippocampus. *J Neurosci* **30**, 15134-15145.
- 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.
- Hofer KT, Kandrás A, 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* **25**, 169-186.

- Houser CR. (1990). Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* **535**, 195-204.
- Huberfeld G, Menendez de la Prida L, Pallud J, Cohen I, Le Van Quyen M, Adam C, Clémenceau S, Baulac M & Miles R. (2011). Glutamatergic pre-ictal discharges emerge at the transition to seizure in human epilepsy. *Nat Neurosci* **14**, 627-634.
- 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.
- Hwa GG, Avoli M, Oliver A & Villemure JG. (1991). Bicuculline-induced epileptogenesis in the human neocortex maintained in vitro. *Exp Brain Res* **83**, 329-339.
- Ilin V, Malyshev A, Wolf F & Volgushev M. (2013). Fast computations in cortical ensembles require rapid initiation of action potentials. *J Neurosci* **33**, 2281-2292.
- Ishijima B, Hori T, Yoshimasu N, Fukushima T & Hirakawa K. (1975). Neuronal activities in human epileptic foci and surrounding areas. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **39**, 643-650.
- Ishizuka N, Weber J & Amaral DG. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* **295**, 580-623.
- Jefferys JG, Menendez de la Prida L, Wendling F, Bragin A, Avoli M, Timofeev I & Lopes da Silva FH. (2012). Mechanisms of physiological and epileptic HFO generation. *Prog Neurobiol* **98**, 250-264.
- Jiang M, Zhu J, Liu Y, Yang M, Tian C, Jiang S, Wang Y, Guo H, Wang K & Shu Y. (2012). Enhancement of asynchronous release from fast-spiking interneuron in human and rat epileptic neocortex. *PLoS Biol* **10**, e1001324.
- Jiang X, Lachance M & Rossignol E. (2016). Involvement of cortical fast-spiking parvalbumin-positive basket cells in epilepsy. *Prog Brain Res* **226**, 81-126.
- Jiang X, Wang G, Lee AJ, Stornetta RL & Zhu JJ. (2013). The organization of two new cortical interneuronal circuits. *Nat Neurosci* **16**, 210-218.
- Jiruska P, Alvarado-Rojas C, Schevon CA, Staba R, Stacey W, Wendling F & Avoli M. (2017). Update on the mechanisms and roles of high-frequency oscillations in seizures and epileptic disorders. *Epilepsia* **58**, 1330-1339.
- Kaas JH. (2011). Neocortex in early mammals and its subsequent variations. *Ann N Y Acad Sci* **1225**, 28-36.

- Kandrás A, 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* **597**, 5639-5670.
- Karlócai MR, Wittner L, Tóth K, Maglóczy Z, Katarova Z, Rásonyi G, 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* **221**, 3601-3615.
- Katona I, Sperlágh B, Sík A, Kőfalvi A, Vizi ES, Mackie K & Freund TF. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* **19**, 4544-4558.
- Keller CJ, Truccolo W, Gale JT, Eskandar E, Thesen T, Carlson C, Devinsky O, Kuzniecky R, Doyle WK, Madsen JR, Schomer DL, Mehta AD, Brown EN, Hochberg LR, Ulbert I, Halgren E & Cash SS. (2010). Heterogeneous neuronal firing patterns during interictal epileptiform discharges in the human cortex. *Brain* **133**, 1668-1681.
- 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**, 011013(011011-011010).
- Klausberger T & Somogyi P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* **321**, 53-57.
- Köhling R, Lucke A, Straub H, Speckmann EJ, Tuxhorn I, Wolf P, Pannek H & Opel F. (1998). Spontaneous sharp waves in human neocortical slices excised from epileptic patients. *Brain* **121 (Pt 6)**, 1073-1087.
- Lagarde S, Bonini F, McGonigal A, Chauvel P, Gavaret M, Scavarda D, Carron R, Regis J, Aubert S, Villeneuve N, Giusiano B, Figarella-Branger D, Trebuchon A & Bartolomei F. (2016). Seizure-onset patterns in focal cortical dysplasia and neurodevelopmental tumors: Relationship with surgical prognosis and neuropathologic subtypes. *Epilepsia* **57**, 1426-1435.
- Lambreque V, LeHongre K, Adam C, Frazzini V, Mathon B, Clemenceau S, Hasboun D, Charpier S, Baulac M, Navarro V & Le Van Quyen M. (2017). Single-unit activities during the transition to seizures in deep mesial structures. *Ann Neurol* **82**, 1022-1028.
- 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.
- Lehmann TN, Gabriel S, Kovacs R, Eilers A, Kivi A, Schulze K, Lanksch WR, Meencke HJ & Heinemann U. (2000). Alterations of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsia* **41**, S190-194.

- Levesque M, Salami P, Shiri Z & Avoli M. (2018). Interictal oscillations and focal epileptic disorders. *Eur J Neurosci* **48**, 2915-2927.
- Li XG, Somogyi P, Ylinen A & Buzsaki G. (1994). The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol* **339**, 181-208.
- Lopantsev V & Avoli M. (1998). Laminar organization of epileptiform discharges in the rat entorhinal cortex in vitro. *J Physiol* **509 (Pt 3)**, 785-796.
- Lorente de No R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex - II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* **46**, 113-177.
- Maglóczy Z. (2010). Sprouting in human temporal lobe epilepsy: excitatory pathways and axons of interneurons. *Epilepsy Res* **89**, 52-59.
- Maglóczy Z & Freund TF. (1995). Delayed cell death in the contralateral hippocampus following kainate injection into the CA3 subfield. *Neuroscience* **66**, 847-860.
- Maglóczy Z & Freund TF. (2005). Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. *Trends Neurosci* **28**, 334-340.
- Maglóczy 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.
- Maier N, Nimrich V & Draguhn A. (2003). Cellular and network mechanisms underlying spontaneous sharp wave-ripple complexes in mouse hippocampal slices. *J Physiol* **550**, 873-887.
- Mattia D, Olivier A & Avoli M. (1995). Seizure-like discharges recorded in human dysplastic neocortex maintained in vitro. *Neurology* **45**, 1391-1395.
- McCormick DA. (1989). GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. *J Neurophysiol* **62**, 1018-1027.
- McCormick DA & Contreras D. (2001). On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annu Rev Physiol* **63**, 815-846.
- Menendez de la Prida L & Gal B. (2004). Synaptic contributions to focal and widespread spatiotemporal dynamics in the isolated rat subiculum in vitro. *J Neurosci* **24**, 5525-5536.
- Menghi V, Bisulli F, Tinuper P & Nobili L. (2018). Sleep-related hypermotor epilepsy: prevalence, impact and management strategies. *Nat Sci Sleep* **10**, 317-326.

- Miles R, Tóth K, Gulyás AI, Hájos N & Freund TF. (1996). Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* **16**, 815-823.
- Misra A, Long X, Sperling MR, Sharan AD & Moxon KA. (2018). Increased neuronal synchrony prepares mesial temporal networks for seizures of neocortical origin. *Epilepsia* **59**, 636-649.
- Mohan H, Verhoog MB, Doreswamy KK, Eyal G, Aardse R, Lodder BN, Goriounova NA, Asamoah B, Brakspear AB, Groot C, van der Sluis S, Testa-Silva G, Obermayer J, Boudewijns ZS, Narayanan RT, Baayen JC, Segev I, Mansvelter HD & de Kock CP. (2015). Dendritic and Axonal Architecture of Individual Pyramidal Neurons across Layers of Adult Human Neocortex. *Cereb Cortex* **25**, 4839-4853.
- 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.
- Motti D, Le Duigou C, Eugene 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* **32**, 1364-1379.
- Oliva A, Fernandez-Ruiz A, Buzsáki G & Berényi A. (2016a). Spatial coding and physiological properties of hippocampal neurons in the Cornu Ammonis subregions. *Hippocampus* **26**, 1593-1607.
- Oliva A, Fernandez-Ruiz A, Buzsáki G & Berényi A. (2016b). Role of Hippocampal CA2 Region in Triggering Sharp-Wave Ripples. *Neuron* **91**, 1342-1355.
- Pallud J, Le Van Quyen M, Bielle F, Pellegrino C, Varlet P, Labussiere M, Cresto N, Dieme MJ, Baulac M, Duyckaerts C, Kourdougli N, Chazal G, Devaux B, Rivera C, Miles R, Capelle L & Huberfeld G. (2014). Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. *Science translational medicine* **6**, 244ra289.
- Papatheodoropoulos C. (2010). Patterned activation of hippocampal network (approximately 10 Hz) during in vitro sharp wave-ripples. *Neuroscience* **168**, 429-442.
- Perucca P, Dubeau F & Gotman J. (2014). Intracranial electroencephalographic seizure-onset patterns: effect of underlying pathology. *Brain* **137**, 183-196.
- Petilla Interneuron Nomenclature G, Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsáki G, Cauli B, Defelipe J, Fairen A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvarday ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Munoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC & Yuste R. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* **9**, 557-568.

- Raimondo JV, Heinemann U, de Curtis M, Goodkin HP, Dulla CG, Janigro D, Ikeda A, Lin CK, Jiruska P, Galanopoulou AS & Bernard C. (2017). 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.
- Ramón y Cajal S. (1909-1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés.*, vol. I, II. Maloine, Paris.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M & Kaila K. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251-255.
- Robert V, Cassim S, Chevaleyre V & Piskorowski RA. (2018). Hippocampal area CA2: properties and contribution to hippocampal function. *Cell Tissue Res* **373**, 525-540.
- Roopun AK, Simonotto JD, Pierce ML, Jenkins A, Nicholson C, Schofield IS, Whittaker RG, Kaiser M, Whittington MA, Traub RD & Cunningham MO. (2010). A nonsynaptic mechanism underlying interictal discharges in human epileptic neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 338-343.
- Rubio C, Rubio-Osornio M, Retana-Marquez S, Veronica Custodio ML & Paz C. (2010). In vivo experimental models of epilepsy. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* **10**, 298-309.
- Sanabria ER, Su H & Yaari Y. (2001). Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Physiol* **532**, 205-216.
- Sanchez-Vives MV & McCormick DA. (2000). Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* **3**, 1027-1034.
- Schwartzkroin PA & Haglund MM. (1986). Spontaneous rhythmic synchronous activity in epileptic human and normal monkey temporal lobe. *Epilepsia* **27**, 523-533.
- Schwartzkroin PA & Knowles WD. (1984). Intracellular study of human epileptic cortex: in vitro maintenance of epileptiform activity? *Science* **223**, 709-712.
- Scotti A, Bollag O, Kalt G & Nitsch C. (1997). Loss of perikaryal parvalbumin immunoreactivity from surviving GABAergic neurons in the CA1 field of epileptic gerbils. *Hippocampus* **7**, 524-535.
- Sloviter RS. (1991). 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.
- Sloviter RS, Ali-Akbarian L, Horvath KD & Menkens KA. (2001). Substance P receptor expression by inhibitory interneurons of the rat hippocampus: enhanced detection using improved

- immunocytochemical methods for the preservation and colocalization of GABA and other neuronal markers. *J Comp Neurol* **430**, 283-305.
- Sloviter RS, Sollas AL, Barbaro NM & Laxer KD. (1991). Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J Comp Neurol* **308**, 381-396.
- Spinner CB. (2011). Evolution of the telencephalon. <https://science-naturalphenomena.blogspot.com/2011/11/evolution-of-telencephalon.html>.
- Staba RJ, Wilson CL, Bragin A, Fried I & Engel J, Jr. (2002). Sleep states differentiate single neuron activity recorded from human epileptic hippocampus, entorhinal cortex, and subiculum. *J Neurosci* **22**, 5694-5704.
- Szabadics J, Varga C, Molnár G, Oláh S, Barzó P & Tamás G. (2006). Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* **311**, 233-235.
- Szabó GG, Holderith N, Gulyás AI, Freund TF & Hájos N. (2010). Distinct synaptic properties of perisomatic inhibitory cell types and their different modulation by cholinergic receptor activation in the CA3 region of the mouse hippocampus. *Eur J Neurosci* **31**, 2234-2246.
- Szegedi V, Molnár G, Paizs M, Csákvári E, Barzó P, Tamás G & Lamsa K. (2017). High-Precision Fast-Spiking Basket Cell Discharges during Complex Events in the Human Neocortex. *eNeuro* **4**.
- 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.
- Szentágothai J & Réthelyi M. (2003). *Funkcionális anatómia I-II-III*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest.
- Thom M. (2014). Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol Appl Neurobiol* **40**, 520-543.
- Thomson AM & Lamy C. (2007). Functional maps of neocortical local circuitry. *Front Neurosci* **1**, 19-42.
- Tillman L & Zhang J. (2019). Crossing the Chloride Channel: The Current and Potential Therapeutic Value of the Neuronal K(+)-Cl(-) Cotransporter KCC2. *Biomed Res Int* **2019**, 8941046.
- Tóth K, Erőss L, Vajda J, Halász P, Freund TF & Maglóczky Z. (2010). Loss and reorganization of calretinin-containing interneurons in the epileptic human hippocampus. *Brain* **133**, 2763-2777.

- Tóth K, Hofer KT, Kandrács A, Entz L, Bagó A, Erőss L, Jordán Z, Nagy G, Sólyom A, Fabó D, Ulbert I & Wittner L. (2018). Hyperexcitability of the network contributes to synchronization processes in the human epileptic neocortex. *J Physiol* **596**, 317-342.
- Trichlerné Gyimesi C. (2016). Epilepszia. In *Emberi életfolyamatok idegi szabályozása – a neurontól a viselkedésig Interdiszciplináris tananyag az idegrendszer felépítése, működése és klinikuma témáiban orvostanhallgatók, egészség- és élettudományi képzésben résztvevők számára Magyarországon*, pp. 1081-1131. Pécsi Tudományegyetem, Dialóg-Campus Kiadó-Nordex Kft., Pécs, Hungary.
- Truccolo W, Donoghue JA, Hochberg LR, Eskandar EN, Madsen JR, Anderson WS, Brown EN, Halgren E & Cash SS. (2011). Single-neuron dynamics in human focal epilepsy. *Nat Neurosci* **14**, 635-641.
- Ulbert I, Heit G, Madsen J, Karmos G & Halgren E. (2004a). Laminar analysis of human neocortical interictal spike generation and propagation: current source density and multiunit analysis in vivo. *Epilepsia* **45 Suppl 4**, 48-56.
- Ulbert I, Maglóczky Z, Erőss L, Czirják S, Vajda J, Bognár L, Tóth S, Szabó Z, Halász P, Fabó D, Halgren E, Freund TF & Karmos G. (2004b). In vivo laminar electrophysiology co-registered with histology in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* **187**, 310-318.
- Urbach H, Scheffler B, Heinrichsmeier T, von Oertzen J, Kral T, Wellmer J, Schramm J, Wiestler OD & Blumcke I. (2002). Focal cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type: a clinicopathological entity with characteristic neuroimaging and histopathological features, and favorable postsurgical outcome. *Epilepsia* **43**, 33-40.
- Urbán Z, Maglóczky Z & Freund TF. (2002). Calretinin-containing interneurons innervate both principal cells and interneurons in the CA1 region of the human hippocampus. *Acta Biol Hung* **53**, 205-220.
- van Breemen MS, Wilms EB & Vecht CJ. (2007). Epilepsy in patients with brain tumours: epidemiology, mechanisms, and management. *Lancet Neurol* **6**, 421-430.
- Weiss SA, Alvarado-Rojas C, Bragin A, Behnke E, Fields T, Fried I, Engel J, Jr. & Staba R. (2016). Ictal onset patterns of local field potentials, high frequency oscillations, and unit activity in human mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **57**, 111-121.
- Williamson A, Patrylo PR, Lee S & Spencer DD. (2003). Physiology of human cortical neurons adjacent to cavernous malformations and tumors. *Epilepsia* **44**, 1413-1419.
- Williamson A & Spencer DD. (1994). Electrophysiological characterization of CA2 pyramidal cells from epileptic humans. *Hippocampus* **4**, 226-237.

- Wittner L, Erőss L, Czirják S, Halász P, Freund TF & Maglóczy Z. (2005). Surviving CA1 pyramidal cells receive intact perisomatic inhibitory input in the human epileptic hippocampus. *Brain* **128**, 138-152.
- Wittner L, Erőss L, Szabó Z, Tóth S, Czirják S, Halász P, Freund TF & Maglóczy Z. (2002). Synaptic reorganization of calbindin-positive neurons in the human hippocampal CA1 region in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* **115**, 961-978.
- Wittner L, Henze DA, Záborszky L & Buzsáki G. (2006). Hippocampal CA3 pyramidal cells selectively innervate aspiny interneurons. *Eur J Neurosci* **24**, 1286-1298.
- Wittner L, Henze DA, Záborszky L & Buzsáki G. (2007). Three-dimensional reconstruction of the axon arbor of a CA3 pyramidal cell recorded and filled in vivo. *Brain Struct Funct* **212**, 75-83.
- 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* **132**, 3032-3046.
- Wittner L & Maglóczy Z. (2017). Synaptic Reorganization of the Perisomatic Inhibitory Network in Hippocampi of Temporal Lobe Epileptic Patients. *BioMed Research International* **2017**, 13.
- Wittner L, Maglóczy Z, Borhegyi Z, Halász P, Tóth S, Erőss L, Szabó Z & Freund TF. (2001). Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* **108**, 587-600.
- Wittner L & Miles R. (2007). Factors defining a pacemaker region for synchrony in the hippocampus. *J Physiol* **584**, 867-883.
- Wozny C, Knopp A, Lehmann TN, Heinemann U & Behr J. (2005). The subiculum: a potential site of ictogenesis in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **46 Suppl 5**, 17-21.
- Wu C, Asl MN, Gillis J, Skinner FK & Zhang L. (2005). An in vitro model of hippocampal sharp waves: regional initiation and intracellular correlates. *J Neurophysiol* **94**, 741-753.
- Wu CP, Huang HL, Asl MN, He JW, Gillis J, Skinner FK & Zhang L. (2006). Spontaneous rhythmic field potentials of isolated mouse hippocampal-subicular-entorhinal cortices in vitro. *J Physiol* **576**, 457-476.
- Wyler AR, Ojemann GA & Ward AA, Jr. (1982). Neurons in human epileptic cortex: correlation between unit and EEG activity. *Ann Neurol* **11**, 301-308.
- Ylinen A, Bragin A, Nádasdy Z, Jandó G, Szabó I, Sik A & Buzsáki G. (1995). Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J Neurosci* **15**, 30-46.

9 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 Maglóczky 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, Maglóczky 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, Maglóczky 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)
- 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. Maglóczky (2005) Surviving CA1 pyramidal cells receive intact perisomatic inhibitory input in the human epileptic hippocampus. *Brain* 128:138-152 (IF: 7.535)

10 Az értekezéshez fel nem használt, epilepsziával és szinkronizációs folyamatokkal foglalkozó saját publikációk

- Tóth E, Bokodi V, Somogyvári Z, Maglóczky Z, **Wittner L**, Ulbert I, Erőss L, Fabó D. (2020) Laminar distribution of electrically evoked hippocampal short latency ripple activity highlights the importance of the subiculum in vivo in human epilepsy, an intraoperative study. *Epilepsy Res.* 2020 Nov 24;169:106509. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2020.106509. Online ahead of print. PMID: 33310654 (IF in 2019: 2.208) Q2
- Ujma, PP; Hajnal, B; Bódizs, R; Gombos, F; Erőss, L; **Wittner, L**; Halgren, E; Cash, S; Ulbert, I; Fabó, D. (2020) The laminar profile of sleep spindles in humans. *NeuroImage* 2020 Nov 26:117587. doi: 10.1016/j.neuroimage.2020.117587. Online ahead of print. PMID: 33249216 (IF in 2019: 5.902) Q1
- Perczel, Gy ; Erőss, L ; Fabó, D ; Gerencsér, L ; Hajnal, B ; Szabó, Cs ; Vágó, Zs ; **Wittner, L** (2019) Epilepsziás agyi hálózatok egysejt-aktivitásának jellemzése Hawkes-folyamatok segítségével. *ALKALMAZOTT MATEMATIKAI LAPOK* 36 : 2 pp. 213-224. , 12 p. (2019)
- Halgren M, Ulbert I, Bastuji H, Fabó D, Erőss L, Rey M, Devinsky O, Doyle WK, Mak-McCully R, Halgren E, **Wittner L**, Chauvel P, Heit G, Eskandar E, Mandell A, Cash SS. (2019) The generation and propagation of the human alpha rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Nov 19;116(47):23772-23782. doi: 10.1073/pnas.1913092116. Epub 2019 Nov 4. (IF: 9.412) Q1
- Hagler DJ Jr, Ulbert I, **Wittner L**, Erőss L, Madsen JR, Devinsky O, Doyle W, Fabó D, Cash SS, Halgren E. (2018) Heterogeneous Origins of Human Sleep Spindles in Different Cortical Layers. *J Neurosci.* 2018 Mar 21;38(12):3013-3025. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2241-17.2018. Epub 2018 Feb 15. (IF:6.074) Q1
- Fiáth R, Kerekes BP, **Wittner L**, Tóth K, Beregszászi P, Horváth D, Ulbert I. (2016) Laminar analysis of the slow wave activity in the somatosensory cortex of anesthetized rats. *Eur J Neurosci.* 2016 Aug;44(3):1935-51. doi: 10.1111/ejn.13274. Epub 2016 Jun 9. (IF: 2.941) Q1
- Miles R, Blaesse P, Huberfeld G, **Wittner L**, Kaila K (2012) Chloride homeostasis and GABA signaling in temporal lobe epilepsy. In *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 4th edition Oxford University Press 2012. Eds: Jeffrey L Noebels, Massimo Avoli, Michael A Rogawski, Richard W Olsen, and Antonio V Delgado-Escueta.
- Hangya B, Tihanyi BT, Entz L, Fabó D, Erőss L, **Wittner L**, Jakus R, Varga V, Freund TF, Ulbert I (2011) Complex Propagation Patterns Characterize Human Cortical Activity during Slow-Wave Sleep. *J Neurosci.* 2011 Jun 15;31(24):8770-9. (IF: 7.115)

- Csercsa R, Dombovári B, Fabó D, **Wittner L**, Erőss L, Entz L, Sólyom A, Rásonyi G, Szűcs A, Kelemen A, Jakus R, Juhos V, Grand L, Magony A, Halász P, Freund TF, Maglóczky Z, Cash SS, Papp L, Karmos G, Halgren E, Ulbert I. (2010) Laminar analysis of slow wave activity in humans. *Brain*. 2010 Sep;133(9):2814-29. (IF: 9.232)
- Cash SS, Halgren E, Dehghani N, Rossetti AO, Thesen T, Wang C, Devinsky O, Kuzniecky R, Doyle W, Madsen JR, Bromfield E, Erőss L, Halász P, Karmos G, Csercsa R, **Wittner L**, Ulbert I. (2009) The human K-complex represents an isolated cortical down-state. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1084-7. (IF: 29.747)
- Huberfeld G, Clemenceau S, Cohen I, Pallud J, **Wittner L**, Navarro V, Baulac M, Miles R. (2008) Epileptiform activities generated in vitro by human temporal lobe tissue. *Neurochirurgie* 54 (3), pp. 148-158. (IF: 0.355)
- D. Fabó, Zs. Maglóczky, **L. Wittner**, Á. Pék, L. Erőss, S. Czirják, J. Vajda, A. Sólyom, G. Rásonyi, A. Szűcs, A. Kelemen, V. Juhos, L. Grand, B. Dombovári, P. Halász, T. F. Freund, E. Halgren, Gy. Karmos, I. Ulbert (2008) Properties of in vivo interictal spike generation in the human subiculum. *Brain*. 2008 Feb;131(Pt 2):485-99. (IF: 9.603)
- K. Tóth, **L. Wittner**, Z. Urbán, W. K. Doyle, Gy. Buzsáki, R. Shigemoto, T. F. Freund and Zs. Maglóczky (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** (2006) Interneurons of the hippocampus in temporal lobe epilepsy (in French) *Epilepsie pratique* 2006 10, 11 p1-5.
- L. Wittner** (2006) Temporal seizures. Epileptic activity and hypotheses of physiopathology (in French) *Neurologies*, 2006 Octobre Vol. 9, n° 90. p557-559.C.
- L. Wittner**, L. Erőss, Z. Szabó, Sz. Tóth, S. Czirják, P. Halász, T.F. Freund and Zs. Maglóczky (2002) Synaptic reorganization of calbindin-positive neurons in the human hippocampal CA1 region in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 115 (3):961-978. (IF: 3.457)
- D. A. Henze, **L. Wittner** and Gy. Buzsáki (2002) Single granule cells can reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nature Neuroscience* 5(8):790-5. (IF: 14.857)
- Y. Fischer, **L. Wittner**, T. F. Freund, and B. H. Gähwiler (2002) Simultaneous activation of gamma and theta network oscillations in hippocampal slice cultures. *Journal of Physiology* 539 (3):857-868. (IF: 4.65)

L. Wittner, Zs. Maglóczky, Zs. Borhegyi, P. Halász, Sz. Tóth, L. Erőss, Z. Szabó and T.F. Freund (2001) Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 108 (4):587-600. (IF: 3.219)

Maglóczky Zs., **Wittner L.**, Borhegyi Zs., Halász P., Vajda J., Czirják S., Freund T. F. (2000) Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 96 (1):7-25. (IF: 3.563)

11 Publikációs mutatók a tézisek beadásakor

Eredeti közlemények száma: 39

Összesített impact factor: 202.7

Összes független idézetek száma: 1639

h-index: 19