

37. OTDK Biológia Szekció

Tüske-hullám aktivitás modulációja egér abszensz epilepszia modellben

Készítette:

Juhász Zsombor

Eötvös Lóránd Tudományegyetem, biológus alapszak, 3. évfolyam

Témavezető:

Dr. Borbély Sándor

Tudományos munkatárs

HUN-REN Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Dr. Mátyás Ferenc

Tudományos főmunkatárs

HUN-REN Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet



Budapest, 2025

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítésjegyzék.....	3
1.Bevezetés	4
Talamokortikális rendszer.....	4
Az oszcillációk kialakulásának és terjedésének hálózati mechanizmusai	5
A gátló neurotranszmitter rendszer	6
A GABAerg rendszer szerepe a talamikus oszcillációk kialakulásában	7
Célkitűzések.....	8
2.Anyagok és módszerek	9
Kísérleti állatok.....	9
Műtési eljárás	9
Elektrofiziológiai mérések	11
Hisztológia	12
Adatelemzés.....	13
Statisztikai elemzés	14
3. Eredmények	15
Az epilepszia modell igazolása.....	15
Megváltozott alvási mintázat	16
A kortikotalamikus pálya optogenetikai aktiválása	17
A rohamtevékenység direkt modulációja.....	19
4. Megvitatás.....	22
Irodalomjegyzék	24
Összefoglaló.....	27
Tételes szerzői hozzájárulás.....	28
Köszönetnyilvánítás.....	29

Rövidítésjegyzék

CT	kortikotalamikus (Corticothalamic)
EMG	elektromiogram
ETX	ethosuximide
FFT	gyors Fourier-transzformáció (Fast Fourier Transformation)
IPSP	gátló posztzinaptikus potenciál (Inhibitory Postsynaptic Potential)
LFP	lokális mezőpotenciál (Local Field Potential)
NREM	nem gyors szemmozgással kísért alvás (Non-Rapid Eye Movement)
nRT	retikuláris talamikus mag (Reticular Thalamic Nucleus)
REM	gyors szemmozgással kísért alvás (Rapid Eye Movement)
RMS	négyzetes középérték (Root-Mean Square)
S1BF	elsődleges szomatoszenzoros kéreg bajuszmező területe (primary Somatosensory cortex Barrel Field)
SWD	tüske hullám kisülés (Spike-and-Wave Discharge)
TC	talamokortikális (Thalamocortical)
VPM	ventrális poszteromediális talamikus mag (Ventral Posteromedial Nucleus)

1.Bevezetés

Az abszensz epilepszia a generalizált epilepsziás betegségek egy olyan formája, ahol a talamokortikális (TC, thalamocortical) hálózatok túlzott szinkronitása áll a rohamok hátterében, egy jellegzetes oszcillatorikus aktivitást, a tüske hullám kisülést (SWD, spike-and-wave discharges) előidézve. A talamokortikális rendszer kiemelt fontosságú számtalan érzékelési folyamatban, a szaglópályát leszámítva az összes érzőpálya átkapcsolódik a talamuszban, mielőtt az agykéregbe érkezne. Ennek visszacsatolását szolgáló kortikotalamikus (CT corticothalamic) bemenetek képesek az érzőpályák működését finomhangolni, sajátos ritmikus aktivitási mintázatai révén az alvás-ébrenléti ciklust is meghatározni, illetve egyes magok kiterjedt kapcsolataik révén az agykéregből visszaérkezett információk generalizált szétosztásában is kulcsszerepet játszanak (Alloway, 2008).

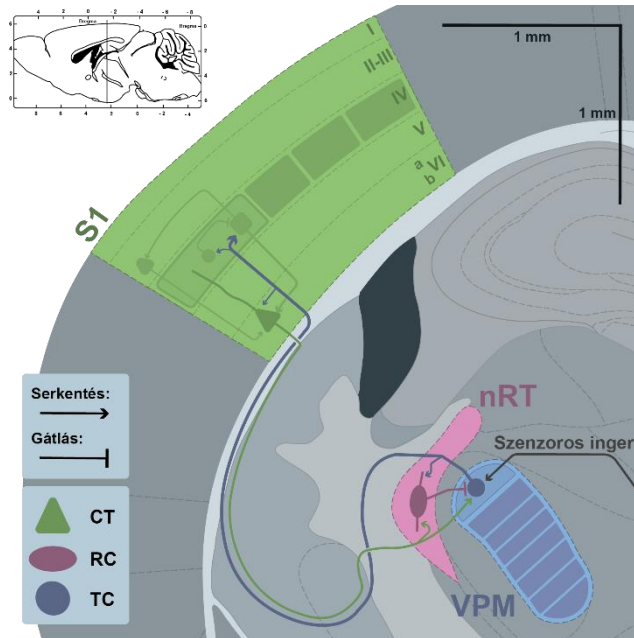
Ugyanaz a hálózat, ami képes az alvás nélkülözhetetlen ritmikus aktivitásformáit létrehozni, - az erre hajlamos betegekben - áthangolódva részt vehet a kóros tüske-hullám kisülések szabályozásában is. Ezen dolgozat célja, egy új abszensz epilepszia állatmodell bemutatása, illetve ennek felhasználása révén annak vizsgálata, hogy a talamo-kortiko-talamikus rendszerben milyen változások eredményezhetik és modulálhatják a patológiás aktivitás létrejöttét.

Az abszensz epilepsziás rohamok generalizált jellegük miatt teljes tudatvesztéssel, emlékezetkieséssel járnak, amit gyakran kísér a fej-nyak tájék izmainak rángása. Kialakulásukban a genetikai komponens fontos szerepet játszik, számos mutációt kapcsolatba hoztak már a betegséggel, ennek megfelelően több típusát is megkülönböztetik. Ilyenek a gyermekkori abszensz epilepszia (CAE), juvenilis abszensz epilepszia (JAE), vagy juvenilis mioklonusos epilepszia (JME). A dolgozat elsősorban a gyermekkori abszensz epilepszia homológiájával foglalkozik, ami 100000 gyermekből körülbelül 6-8-at érint. A CAE-ben szenvedőknél akár napi több, 3-20 másodperces roham is előfordulhat. Ezek jellemzően gyermekkorban alakulnak ki és általában serdülőkorban abbamaradnak, esetenként átalakulhatnak egyéb generalizált epilepszia formává (Albuja és mtsai., 2024).

Talamokortikális rendszer

A talamokortikális hálózat nem egységes. Modalitások, funkció, szerveződési elvek és kapcsolati sajátosságok révén sokféle felosztása létezik (Jones, 2001; Sherman, 2022; Sherman

és Guillery, 2011). A dolgozat szempontjából fontos primer szomatoszenzoros TC rendszer a trigeminális érző afferenseket feldolgozó ventrális poszteromediális talamikus magból (VPM) és a primer szomatoszenzoros kéregből (S1) áll, feladata a test felületére érkező szenzoros ingerek feldolgozása. Rágcsálókban ez a pálya kiemelt fontossággal bír, hiszen a legfontosabb érzékszervükből, a bajuszokból származó tapintási információt dolgozza fel. A VPM glutamaterg TC sejtjein átkapcsolva jutnak el a bajusz által generált információk az S1 egyik különleges, a negyedik rétegében hordószzerű struktúrákat tartalmazó területére (S1BF, primer somatosensory cortex barrel field), melyben egy adott bajuszból származó ingert a topografikusan megfeleltetett kérgi oszlop dolgoz fel (1.1 ábra). Emellett a TC pályák egy axonális kollaterálist adnak a talamuszt héjszerűen körülvevő retikuláris talamikus mag (nRT) GABAerg sejtjeinek is. A kortikális jelfeldolgozást követően, az agykéreg hatodik rétegében lévő glutamaterg CT piramisisejtek modulátoros pályákon képesek befolyásolni a topografikusan elhelyezkedő, serkentő TC és a gátló nRT sejtjeinek aktivitását (Feldmeyer és mtsai., 2013).



1.1. ábra. A talamokortikális rendszer anatómiája. Az agytörzs felől érkező szenzoros ingerek elsődleges feldolgozását egy három elemből felépülő rendszer végzi. VPM: ventrális poszteromediális talamikus mag. nRT: retikuláris talamikus mag, S1: elsődleges érzőkéreg, CT: kortikotalamikus, RC: retikuláris sejt, TC: talamokortikális relésejt

Az oszcillációk kialakulásának és terjedésének hálózati mechanizmusai

A TC és nRT sejtet állapotfüggő tüzelési mintázat jellemzi. Ébrenlét és REM (Rapid Eye Movement, gyors szemmozgással kísért alvási szakasz) alvás alatt a tónusos, egyedi tüzelések, míg a NREM alvás során burst-ös tüzelési mintázat jelenik meg. A tüzelési mód a sejtet érő hiperpolarizáló hatás erősségének függvényében változik, gyengébben hiperpolarizált sejt tónusosan, míg az erősen hiperpolarizált sejt burst-ösen fog tüzelni (McCormick és Bal, 1997). A TC sejt és az nRT sejt reciprok kapcsolataik révén képesek önálló oszcillációs aktivitás kialakítására. Ez a szabályosan ismétlődő TC aktivitás elengedhetetlen az alvás egyes fázisaira jellemző ritmikus működések fenntartásához is. Ilyen oszcillációs mintázatok egyike az alvási

orsó (8-16 Hz), ami többek között szerepet játszik a szinaptikus plaszticitás, memória konszolidáció és neuronális fejlődés folyamataiban (Lüthi, 2013; McCormick és Bal, 1997). A talamikus oszcillációk az érző kéreg területekbe futó kiterjedt TC pályarendszer révén szinte azonnal megjelennek az agykéregben, ahol a piramidális sejtek és gyorsan-tüzelő (fast-spiking) interneuronok is bekapcsolódnak, tovább szinkronizálva a hálózatot (Lüthi, 2013). Ugyanakkor a TC rendszerben van egy felülről lefelé irányuló szabályozás is (Thomson, 2010). Az agykéreg 6. rétegéből kiinduló serkentő CT pálya kiterjedt modulációs hatással bír az nRT, VPM és kisebb részben az egyéb (magasabbrendű) talamikus magokra. Az nRT sejtjei, mind a TC-, mind a CT sejtek axonkollaterálisai felől serkentő bemenetet kapnak. Mivel ezen gátló sejtek a VPM (és számos egyéb talamikus mag) TC sejtjein szinaptizálnak, feltételezhető, hogy ezen kapcsolatok révén az nRT előrecsatolós és visszacsatolós gátló mechanizmusokban központi szerepet játszva alapvetően képes befolyásolni és összehangolni a TC hálózatok működését (Crabtree és mtsai., 2018). Ráadásul az nRT sejtek reciprok kapcsolatban állnak több TC sejtrel, amely révén akár egy retikuláris sejt is képes számos TC sejtet toborozni (Huguenard és McCormick, 2007), nem-specifikus (nem topografikusan megfeleltetett) kapcsolataival pedig képes egyéb talamikus területeket is bevonni az oszcillatorikus működésbe, kialakítva az alvási orsót.

Fontos kiemelni, hogy jelen tudásunk szerint az abszensz epilepszia során megjelenő SWD-k ugyanazon hálózati mechanizmus eredményei, mint az alvási orsók. Azonban míg az orsózó aktivitás során a hálózat működésébe beépített fékek szabályozzák a szinkronitás mértékét, addig patológiás körülmények között ezek részleges vagy teljes hiánya utat adhat a tüske-hullám fenotípus és az abszensz epilepsziás betegség kialakulásának.

A gátló neurotranszmitter rendszer

Az említett féket a központi idegrendszerben elsősorban a GABAerg rendszer biztosítja. Neurotranszmitterként γ -amino-vajsavat használ, ami ligandvezérelt ionotrop klorid-ion csatornához (GABAA) vagy G-fehérje kapcsolt metabotróp (GABAB) receptorhoz tud kötődni. A GABAA-receptor a Cys-loop csatornacsalád tagja, jellemzően 5 alegységből épül fel, minden alegység 4-4 transzmembrán régiót tartalmaz. A tipikus receptor két α , két β , és általában egy γ - vagy δ -alegységből áll. Ennél jóval több alegység típus létezik, az ismertett típusoknak is több izoformáját leírták, de ezek részletes jellemzésétől eltekintünk. A γ -alegység tartalmú receptorok szinaptikus elhelyezkedésűek, míg a δ -alegységet tartalmazók peri- vagy extraszinaptikus lokalizációjúak (Olsen és Li, 2012).

A transzmitter-rendszer másik receptor típusa a GABAB-receptor, ami 7 transzmembrán régiót tartalmazó alegységekből felépülő heterodimér molekula. A GABA-B1 alegységen van neurotranszmitter kötőhely, míg a GABA-B2 alegységen az efféktorként működő G-fehérje (Olsen és Li, 2012).

A GABAerg rendszer szerepe a talamikus oszcillációk kialakulásában

GABAerg rendszer hatással van az oszcillációk periódusidejére és fontos szerepet játszik az orsózó aktivitás terminációjában, ahogy azt korábban már többen felvetették (Huguenard és McCormick, 2007; McCormick és Bal, 1997). Az oszcillációk periódusideje leginkább a TC sejtek válaszána gyorsaságától függ, amit az nRT sejt által kifejtett IPSP, (inhibitory postsynaptic potential) hossza szab meg. Alvási orsók esetében a TC sejtekre gyakorolt gátlás döntő része az ionotróp (intra- és extraszinaptikus) GABAA-receptorok aktivációjának hatására következik be, ami így viszonylag gyors (akár 8-16Hz) oszcillációt eredményezhet, ahogy azt az alvási orsók esetén látjuk. A GABAA receptorok farmakológiai gátlásával – penicillin vagy bikukullin (Avoli, 1995; Kleiman-weiner és mtsai., 2009) alkalmazásával- a lassabban, de elnyújtottabban aktiválódó metabotróp és extraszinaptikus GABAB-receptorok működése kerülhet előtérbe (Huguenard és McCormick, 2007), ezáltal lassabb ritmust, például tüske-hullám aktivitást, eredményezve.

Ennek egyik bizonyítéka lehet egy ausztrál család kórtörténete, melyben magas volt az abszensz epilepszia előfordulása. Megállapítást nyert, hogy a GABAA receptor $\gamma 2$ -alegységében egy pontmutáció révén arginin/glutamin csere jelenik meg, s feltehetően ennek eredménye lehet a csökkent gátló szinaptikus funkció (Eugène és mtsai., 2007) és az alvási orsónál (8-16 Hz) lassabb SWD (rágcsálóban 6-8 Hz, emberben 3-4 Hz) hullám megjelenése. Ezt egy olyan transzgenikus egértörzsen igazolták, mely a kutatási témám alapja is, a GABA $\gamma 2$ (R43Q) knock-in mutáns egértörzs (továbbiakban csak R43Q) (Petrou és Reid, 2012; Tan és mtsai., 2007).

Ennek az elméletnek némileg ellentmond, hogy egyes kutatások agykérgi iniciációt feltételeznek az abszensz rohamok esetében (Meeren és mtsai., 2002), azonban e mögött is a gátló mechanizmusok sérülése állhat. Erre utal az is, hogy az R43Q mutációt hordozó betegekben a transzkraniális mágneses ingerlés csökkent intrakortikális gátlást jelez, amely fokozott agykérgi szinkronizációhoz vezethet (Fedi és mtsai., 2008). Az így kialakuló hiperszinkronitás az agykéreg a 6. rétegből eredő modulátoros pályákon (Sherman és Guillery,

2011) keresztül érheti el a VPM-et. Jelen dolgozat e kapcsolatrendszer szerepét igyekszik tisztázni.

Célkitűzések

A bevezető alapján a következő kérdésekkel foglalkozik a dolgozat:

1. Az általunk előállított R43Q egértörzs megfelelő genetikai állatmodellje az abszensz epilepsziának?
2. Milyen jellegzetes különbségek lelhetők fel az R43Q és vad típusú állatok alvási mintázatában? Ennek alapja az, hogy feltehetően ugyanazon TC mechanizmusok játszanak szerepet az alvási orsók és az SWD-k megjelenésében.
3. A kortikotalamikus pályák spontán történő szelektív aktiválása milyen hatást vált ki a talamokortikális rendszer működésére?
4. Abszensz epilepsziás roham alatt a kortikotalamikus pályák szelektív vagy nem-szelektív aktiválása milyen hatást fejt-e ki a rohamokra? Van-e különbség a kétfajta ingerlés hatásában?

2.Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok

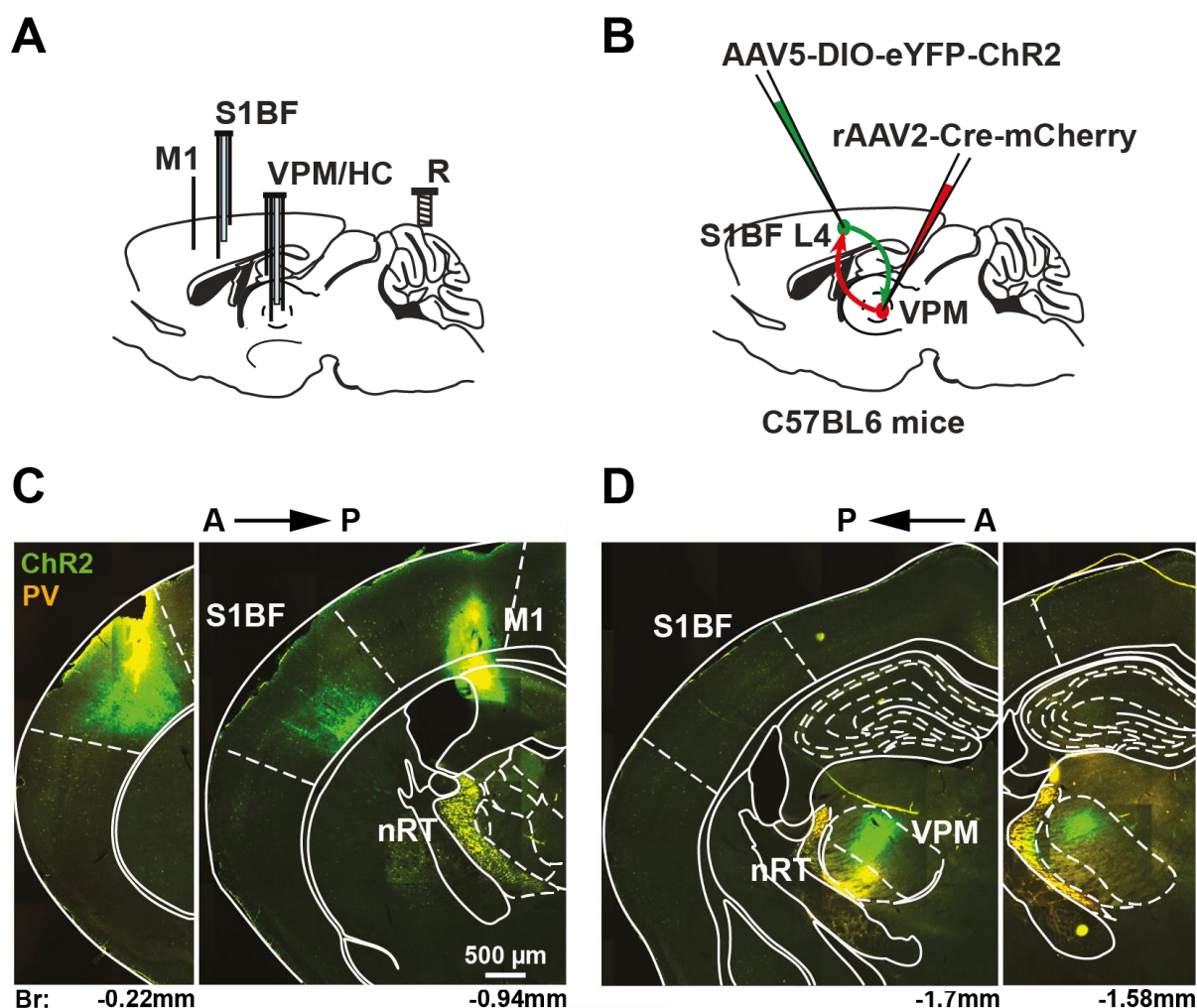
A kísérletekhez felnőtt, hím és nőstény C56BL/6 egereket (n=18) használtunk, melyek között vad típusú (n=6), illetve GABAA γ 2(R43Q) knock-in mutáns (n=12) egyedek is voltak. A kísérletek az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (p.n.: 22.1/829/003/2007) által megszabott módon, a Magyar Állatvédelmi Törvény (1998. évi XXVIII. törvény) előírásainak megfelelően, illetve az Európai Unió irányelvek (Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU) mentén lettek elvégezve. Az egerek standard megvilágítási körülmények (12h sötét, 12 óra világos) között, nyugodt környezetben voltak elhelyezve. Ivóvíz és élelem állandóan szükségleteiknek megfelelően elérhető volt számukra.

Műtéti eljárás

Az elektrofiziológiai mérésekhez szükséges elektródok beültetését 8-9 hetes állatokon végeztük, ketamin-xylozin (100mg/kg, illetve 4mg/kg, i.p.) narkózisban, előzetesen isofluránnal rövid időre elbódítva őket. Az állatokat sztereotaxisban (RWD Life Science, California, USA) rögzítettük, az alattuk elhelyezett fűtőpad (RWD Life Science, Temperature Controller) a kísérlet teljes időtartama alatt biztosította a 37 ± 0.2 °C testhőmérsékletet.

A VPM-S1 topografikus kapcsolat megteremtése érdekében a vírus beadáshoz kraniotómiát készítettünk a primer szomatoszenzoros kéreg bajuszmező területe (S1BF; AP/L: -1/3.5 mm) és a talamusz ventrális poszteromediális (VPM; AP/L: -1.8/1.6 mm) magja felett. A vírusokat WPI Nanoliter Injector (WPI, Sarasota FL, USA) segítségével juttattuk be, az S1BF (AAV5-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP-WPRE-hGH) esetében 900 μ m, míg a VPM (AAVrg-Ef1a-IRES-Cre-mCherry, 55632-AAVrg) esetében 3300 μ m mélységbe. A beadás mindkét területen 1 nl/s sebességgel történt, 50 nl térfogattal, 5 perc várakozási idővel.

Az injektálási területekre, továbbá a primer motoros kéregbe (M1; AP/L: 0.8/2 mm), és a hippocampus CA1 területére saját készítésű volfrám sztereotródokat (d: 25 μ m, California Fine Wire) ültettünk be, az előbbi esetében 900 μ m, míg utóbbinál 1500 μ m mélységbe. Az S1BF és VPM sztereotródok mellé poliid mikrotubusok (0.008 ID, 0.0135ID, Neuralynx) segítségével optikai szálakat (105- μ m core diameter, NA = 0.22; Thorlabs) erősítettünk (200–300 μ m távolságot hagyva az optikai szál vége és a sztereotródok végei között).



2.1. ábra. A kettős vírusbeadás módszere és ellenőrzése. **A:** A kísérleti módszer, a beültetett elektródokkal és optikai szálakkal **B:** az alkalmazott vírusok injektálása. **C:** a ChR2 agykérgi kifejeződése. A sárga területek az elektród helyzetét jelzik. **D:** a ChR2 kifejeződése a CT terminálisokban a VPM-ben. A sárga jelölés az nRT-ban parvalbumin pozitív sejtekre.

Referencia elektródát csavartunk a beültetéshez képest kontralaterálisan a cerebellum fölé. Az állatok nyakizmába rozsdamentes acél EMG elektródot helyeztünk. Az állat koponyáját fogorvosi primerrel (Dental Etching Solution, SUN MEDICAL Kft., Moriyama, Shiga, Japán) előkészítettük, majd ehhez rögzítettük a beültetett eszközöket három komponensű fogorvosi cement (dental adhesive resin cement, Super-Bond, SUN MEDICAL Kft., Moriyama, Shiga, Japán), illetve fogorvosi hidegpolymerizátum (Paladur, Heraeus Kulzer) segítségével.

Az elektródákat egy electrode interface board-ba (EIB-16, Neuralynx) fűztük be, arany elektród kontakt pinekkel (Neuralynx) rögzítettük, míg a referencia és EMG elektródokat az interface board megfelelő pontjaihoz forrasztottuk. Az interface board helyzetét is fogorvosi

cementtel stabilizáltuk, majd az implantátumot rézhálóval (JUROTISSE Kft., Budapest) vettük körbe.

A kezelést követő 7 napban az állatok Panadolos® (Paracetamol, 5-15 mg/kg) vizet kaptak, gyulladás esetén rimadylal (Carprofen, 1.4 mg/kg) voltak kezelve.

Elektrofiziológiai mérések

A mérésekhez 3-8 hónapos állatokat használtunk. A vírusbeadás/beültetés és az első mérés között legalább egy hónap telt el, hogy a vírusok kifejeződésének és a műtéttől történő felépülésnek elegendő időt adjunk.

A krónikus szabadon mozgó elektrofiziológiai adatrögzítéshez az állatok lakóketrecét behelyeztük a kísérleti hangszigetelt dobozba. A spontán aktivitást rögzítő, illetve szabályos időközökben végzett optogenetikai stimulációt alkalmazó kísérletekben egy hangszigetelt dobozban egyidejűleg három állatból vezettünk el. Ezen kísérletekben az állatok fején lévő EIB portjához csatlakoztattunk egy 16 csatornás előerősítőt, amit az Intan RHD-2000 interface board-ba kötöttünk be. A felvett elektromos jelet erősítettük (gain: 192×) és 20 kHz-en digitalizáltuk. Az állatokat 30 másodpercenként 473 nm-es kék fényű lézerimpulzusokkal (20ms; 500ms; 5s 12 Hz; ~10 mW) ingereltük (Laserglow Technologies, Toronto, Kanada). A lézer vezérléséhez egy NI USB-6343 (National Instruments, Austin, Texas) adatgyűjtő és vezérlő egység adta ki az analóg feszültségjeleket. A mérés folyamán az állatok mozgását videokamera segítségével követtük (5 fps).

A tüske-hullám tevékenység modulációját vizsgáló direkt visszacsatolással végzett ingerléses mérésekben az állatokból egyesével vezettünk el. A fejükön lévő csatlakozóhoz ebben az esetben is egy 16 csatornás előerősítőt kötöttünk be, ami az OpenEphys központi adatgyűjtő egység megfelelő portjához csatlakozott. A mérések során a valós idejű rohamaktivitást a S1BF-ben monitoroztuk. A felvett elektromos jelet erősítettük (gain: 192×) és 5 kHz-es mintavételezési frekvenciával digitalizáltuk. Az OpenEphys software segítségével a beérkező nyers lokális mezőpotenciál (LFP) jelet rögzítettük, illetve a theta frekvenciájú (4-8 Hz) sávszűrt jelet integráltuk, majd az integrált jelen saját fejlesztésű Mathworks Matlab alapú programmal detektáltuk a küszöb teljesítményt (~3mV/s) meghaladó eseményeket. Amennyiben ilyen esemény következett be, abban az esetben előre meghatározott késleltetési idő elteltével ingerlést végeztünk. Ebben a kísérletben is egy NI USB-6343 adatgyűjtő végezte a stimulus vezérlését, ami kétféle lehetett: a kiadott jelre egy 473 nm-es kék fényű lézer (Laserglow Technologies, Toronto, Kanada), vagy egy 1550 nm-es infravörös lézerdióda

kapcsolódott be. Ez utóbbi esetben a lézerdióda meghajtását biztosító stabil áramimpulzust egy stabilizált áramgeneráló eszköz (Keithley 2611B SYSTEM SourceMeter) biztosította. Két ingerlés között minimálisan 30 másodpercre el kellett telnie, így két, egymást fél percen belül követő, küszöbértéket meghaladó esemény során csak az elsőre adtunk ingert. A küszöbteljesítményt meghaladó eseményeket tízesével csoportosítottuk, minden tíz esemény közül öt valós ingerlés és öt kontroll (lézer aktivációs küszöbét nem meghaladó feszültségű) történt, melyek véletlenszerű sorrendben követték egymást. A minimális interstimulus intervallum betartását és az ingerlések véletlenszerűségét az ingerlő szoftverünk felügyelte.

A farmakológiai kísérletekben ~0,2 ml térfogatban intraperitoneálisan adtunk be az állatoknak fiziológiás sóoldatban oldott ethosuximide (ETX)-et. A kontroll kísérletekben azonos térfogatú fiziológiás sóoldatot kaptak. A beadást követően legkevesebb 2 óra időtartamban rögzítettünk LFP-t, a kontroll és ETX kísérletek között legalább 72 óra telt el.

Hisztológia

A mérések elvégzésével az állatokat intrakardiálisan perfundáltuk, 2 percen keresztül fiziológiás sóoldattal, majd húsz percen keresztül 0.1 M-os foszfátpufferben (PB) feloldott 4%-os paraformaldehid (PFA) fixálóval rögzítettük. Az állatok agyát a koponyából kiemeltük, a beavatkozást követő éjszakán posztfixáltuk (4% PFA), majd háromszor 0.1M-os PB-ben történő átmosást követően azidos (0,05%) PB-ben tároltuk a további feldolgozásig.

Az agyakat vibratóm (VT1200S Vibratome, Leica) segítségével 50 µm-es koronális szeletekre metszettük. Az agyszeleteket egy éjszakára krioprotektív 30%-os szacharóz oldatba helyeztük, majd folyékony N₂ felett háromszor fagyasztottuk, majd PB-ben átmostuk (3x10'). Kettős immunfluoreszcens jelöléseket végeztünk a vírus-jelölések megerősítésére, s azok, valamint az elektródák helyzetének azonosítása céljából. 1:2000 hígítású mPV (egér parvalbumin antitest), illetve 1:2000 chGFP (csirke GFP antitest) PB oldatban történő kezelés következett egy éjszakán keresztül. A következő napon 2 óra időtartamban metszeteket szekunder antitesttel (1:300 bHAM, lóban termeltetett biotinilált anti-egér ellenanyag), majd 90 percen át avidin-biotin peroxidáz komplex-szel. (Ezen lépéseket a PV elleni immunfestés amplifikációja végett hajtottuk végre.) Utolsó lépésben fluoreszcens-jelölt-szekunderekkel inkubáltuk a mintákat (1:500 GACH-A488, kecskében termeltetett csirke-elleni ellenanyag; SA-647 1:2000 sztreptavidin) 2 órán keresztül. Minden egyes kezelés között 3x10'-es 0,1M-os PB átmosást alkalmaztunk. Az immunfestést követően az agyszeleteket tárgylemezre

húztam, majd Vectashield-del fedtem le. A metszetek vizsgálata és a fényképek rögzítése epifluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss Axioplan 2, ZEISS, Berlin, Németország) történt.

Adatelemzés

Az 5, illetve 20 kHz-en mintavételezett adatokat a különféle spektrális elemzésekhez alul mintavételeztük 1000 Hz-re, majd gyors fourier transzformációval, illetve különböző sávszűrőkkel (0.3-4Hz delta; 4-8 Hz SWD, ill theta; 9-16 Hz szigma-sáv; 40-80Hz alsó-gamma; 70-300Hz elektromiogram) határoztuk meg az egyes komponensek teljesítményét. Ezen kívül wavelet elemzéssel idő-frekvencia spektrumot is előállítottunk.

A túske-hullám kisülések detektálásához a szigma- és SWD-frekvenciasávok teljesítményét vetettük össze, illetve ezzel párhuzamosan vizsgáltuk a multiunit (soksejt) aktivitást is. Ez utóbbihoz az eredeti 20 kHz-es LFP adatokat használtuk fel, 400-7000Hz közötti sávszűrés után egy adott feszültségküszöböt átlépő eseményeket tekintettünk unit (sejtes) aktivitásnak, amit aztán az adott agyterületen lévő 2-4 csatorna adataiból összesítettünk és 10 ms-os időablakban simítottunk.

A hypnogram elkészítéséhez egy gépi tanuláson alapuló algoritmust használtunk. Ehhez először egy tanító adatbázist építettünk fel, amihez minden kísérleti állat egy-egy véletlenszerűen kiválasztott regisztrátumát használtuk fel. Ezen mérési fájlok az LFP meghatározó spektrális komponenseinek relatív teljesítményéhez tartozó küszöbértékeket manuálisan állítottuk be egyedileg, majd az így kapott általunk ellenőrzött hypnogram a hozzá tartozó relatív teljesítményadatokkal bekerült a tanító adatbázisba. A gépi tanulás modellt ezek után minden regisztrátumon lefutattuk. A validálási tesztek alapján ezen modell ~90% pontossággal tudja meghatározni az alvási állapot.

Az állatok viselkedését az elektrofiziológiai mérések során folyamatosan nyomon követtük, egy a lakóketrecük felett elhelyezett CCD kamera segítségével. A videófelvételt ritmikus felvillanások révén szinkronizáltuk az LFP mérésekkel, így a viselkedés és az agyi aktivitás egyidejűleg vizsgálhatóvá vált. Az állatok lakóketrecben elfoglalt pozícióját online határoztuk meg egy általunk fejlesztett programmal.

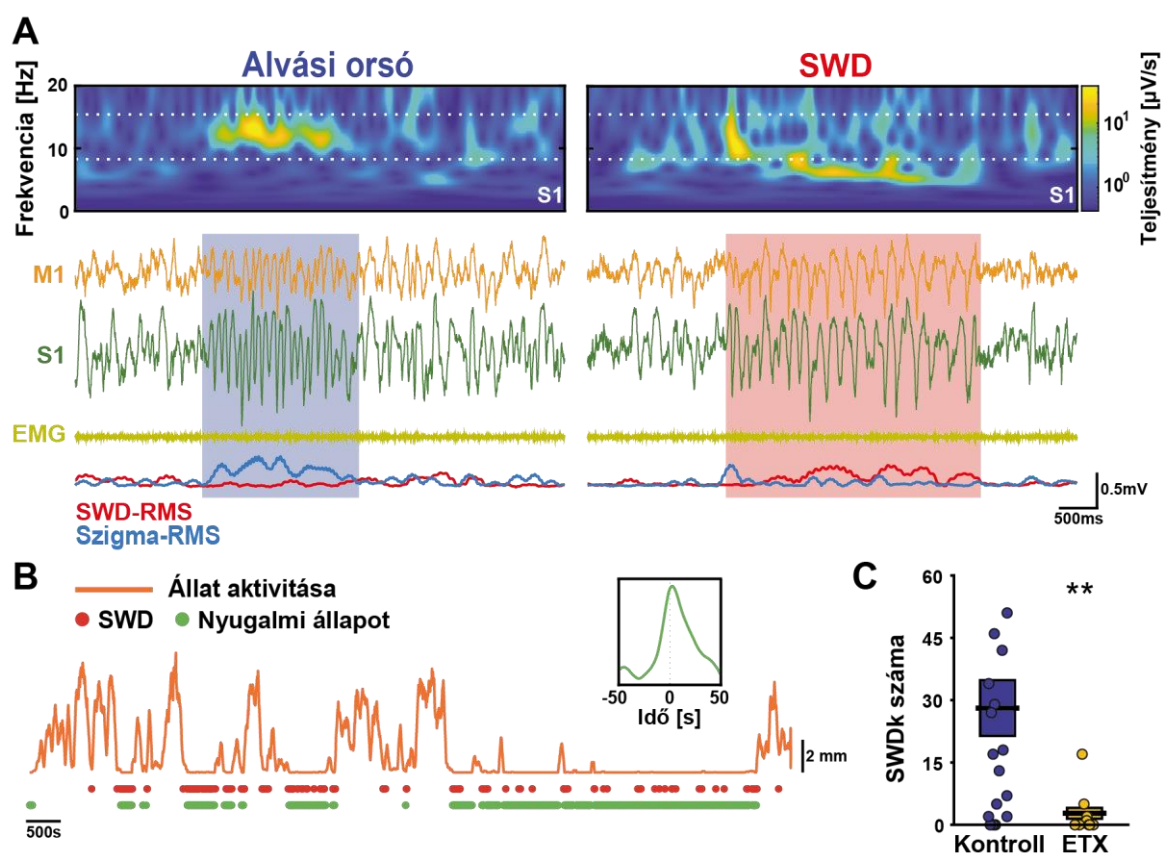
Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzésekben párosítatlan Student t-tesztet végeztünk, az adatsor varianciájának eltérés F-próbával ellenőriztük előzetesen. Az ábrákon, ha - másként nincs jelezve - Átlag $\pm$ SE adatok kerültek ábrázolásra.

3. Eredmények

Az epilepszia modell igazolása

Jelen vizsgálat tárgyát képező R43Q egértörzs, egy teljesen új modell, melyet a HUN-REN KOKI OGR-ben dr Erdélyi Ferenc laboratóriumában állítottunk elő. Ezért igazolnunk kellett, hogy valóban mutatja az abszensz epilepszia tüneteit. Szabadon mozgó állatokból, LFP elvezetésével kimutattuk, hogy az R43Q állatokban, mind az M1, mind az S1BF területen megjelennek olyan oszcillációs események, amelyek az SWD jellemző frekvenciatartományában (6-8 Hz) vannak, de a vad típusú állatokban hiányoznak.



3.1. ábra. Az R43Q egértörzs validálása, mint az abszensz epilepszia állatmodellje. **A:** tipikus oszcilláció wavelet spektrogramja (fent), szűrt LFP jelei (M1 és S1BF), EMG jele és sávszűrt RMS görbéi (lent). Jól látható, hogy az SWD-k és az alvási orsók (szigma) mind a waveletben, mind pedig a szűrt RMS-kben jól elkülöníthetők. **B:** az állat mozgása és az SWD-k kapcsolata. Kis ábra: megtorpanás - SWD keresztkorrelogram. Az SWD megjelenése szorosan kapcsolódik a nyugalmi állapothoz. **C:** ETX kezelés hatása: megszünteti az SWD-k kialakulását. **: $p < 0,01$ Student t-teszt

Az SWD-k a spontán kialakuló alvási orsóknál (9-16 Hz) lassabbak. Így az R43Q állatokban e

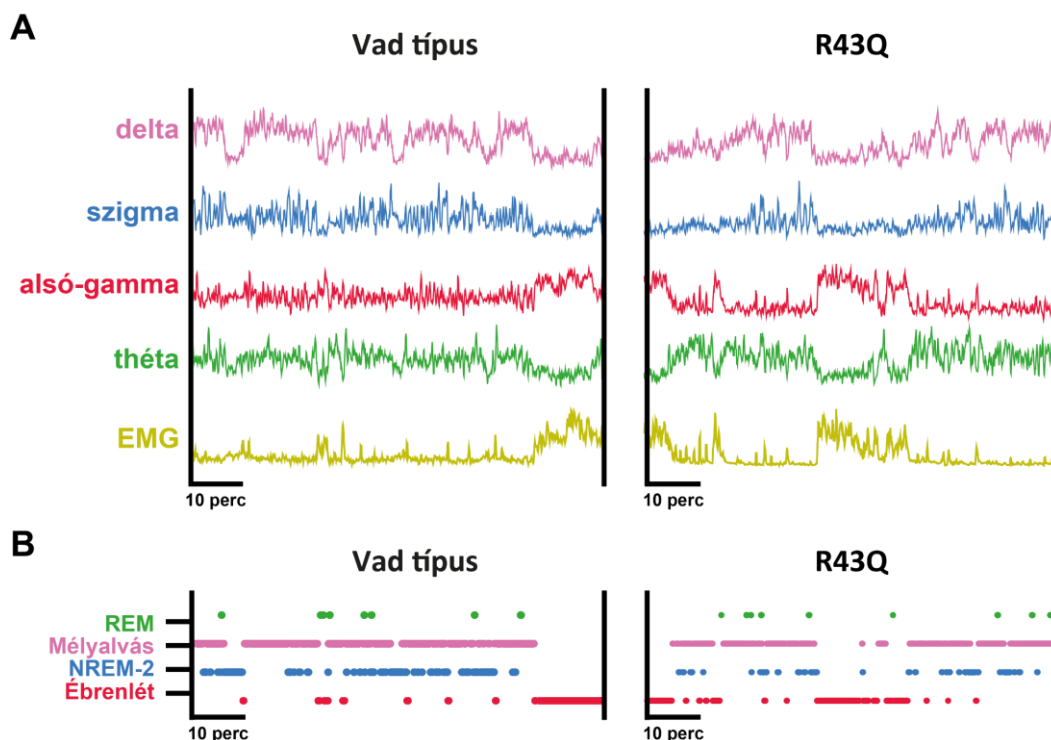
két oszcillációs tevékenység spektrális tulajdonságaik alapján jól elkülöníthető volt (3.1A ábra).

Abszensz epilepsziás rohamok során nincsenek görcsös rángások, helyette a viselkedés megtorpanása és a mozgás teljes hiánya észlelhető. A videofelvétellel kombinált LFP méréseink alapján kijelenthető, hogy a detektált SWD-k alatt csökkent az állatok aktivitása. A viselkedés megtorpanása és az SWD megjelenése erőteljes korrelációt mutatott (3.1B ábra). A rohamok farmakológiai érzékenysége is megfelelt az elvárásoknak, az állatok - abszensz epilepsziás betegeknél is alkalmazott - ethosuximide kezelésre kevesebb SWD-t mutattak, mint a gyógyszer beadását megelőzően (3.1C ábra).

Ezek alapján kijelenthető, hogy az általunk használt R43Q egértörzs ideális modellje az abszensz epilepsziával kapcsolatos további kutatásainknak.

Megváltozott alvási mintázat

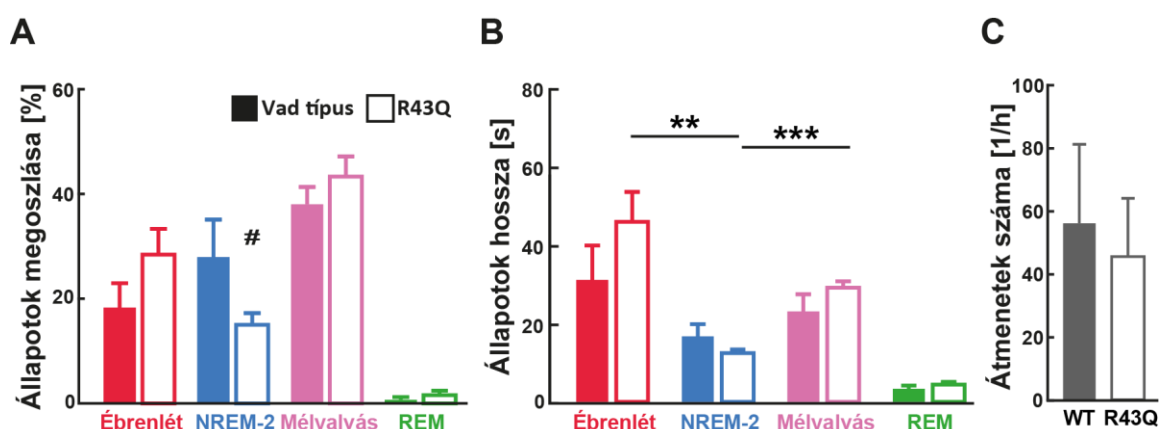
Irodalmi adatok szerint a TC hálózati mechanizmusok kóros megváltozása hozzájárul az abszensz epilepsziára jellemző aktivitás kialakulásához. Ezért arra is kíváncsiak voltunk, hogy R43Q egértörzsben változnak-e a TC-függő alvás-ébrenléti mintázatok a vad típusú alomtestvérekéhez képest.



3.2. ábra. Az alvási mintázat megváltozása. **A:** relatív teljesítménygörbék (delta, szigma, alsó-gamma, théta, EMG) **B:** hipnogramok (REM-mélyalvás-NREM-2-Ébrenlét) vad típusú és R43Q egerekben.

Az LFP egyes hullámkomponenseinek teljesítménye, illetve az EMG alapján (3.2A ábra) négy állapotot különítettünk el, mely állapotoknak a megoszlását hypnogramon vizsgáltuk (3.2B ábra). A hypnogram meghatározása az egyes hullámkomponensek relatív teljesítménye alapján történt, mely adatsorokat aztán részletes numerikus elemzésnek vetettük alá.

Az R43Q állatok összesítve kevesebb időt töltöttek NREM-2 állapotban (3.3A ábra), mint a vad típusú alomtársaik, amely jelenség hátterében az egyedi NREM-2 állapotban töltött szakaszok lerövidülése áll (3.3B ábra). A csökkent NREM-2 terhére az egyedi ébrenlétben és mélyalvásban töltött szakaszok hossza szignifikánsan növekedett ($p = 0.0016$, ill. $p = 4.38 \cdot 10^{-6}$). A vad típusú állatok esetében a fent említett három ébrenléti fázis egyedi szakaszainak hossza nem mutat különbséget ($p = 0.1623$, ill. $p = 0.2704$). Mindezen változások ellenére az R43Q állatok alvási mintázata nem válik fragmentáltabbá (3.3C ábra).



3.3. ábra. Az alvási mintázatváltozás elemzése. **A:** az alvás-ébrenléti szakaszok megoszlása az R43Q (n=6) állatokban és vad-típusú (n=5) alomtársaikban. **B:** az egyedi alvás-ébrenléti szakaszok hossza az R43Q (n=6) állatokban és vad-típusú (n=5) alomtársaikban. **C:** az egy óra alatt bekövetkező állapotok közötti egyedi átmenetek száma az R43Q (n=6) állatokban és vad-típusú (n=5) alomtársaikban. #: $0.05 < p < 0.1$; **: $0.001 < p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Mivel az R43Q állatokban nemcsak a patológiás jellegű SWD-k jelennek meg, hanem az alvás-ébrenlét állapotuk is sérült, megállapítható, hogy a TC hálózatokban bekövetkezett változások állhatnak ezek hátterében.

A kortikotalamikus pálya optogenetikai aktiválása

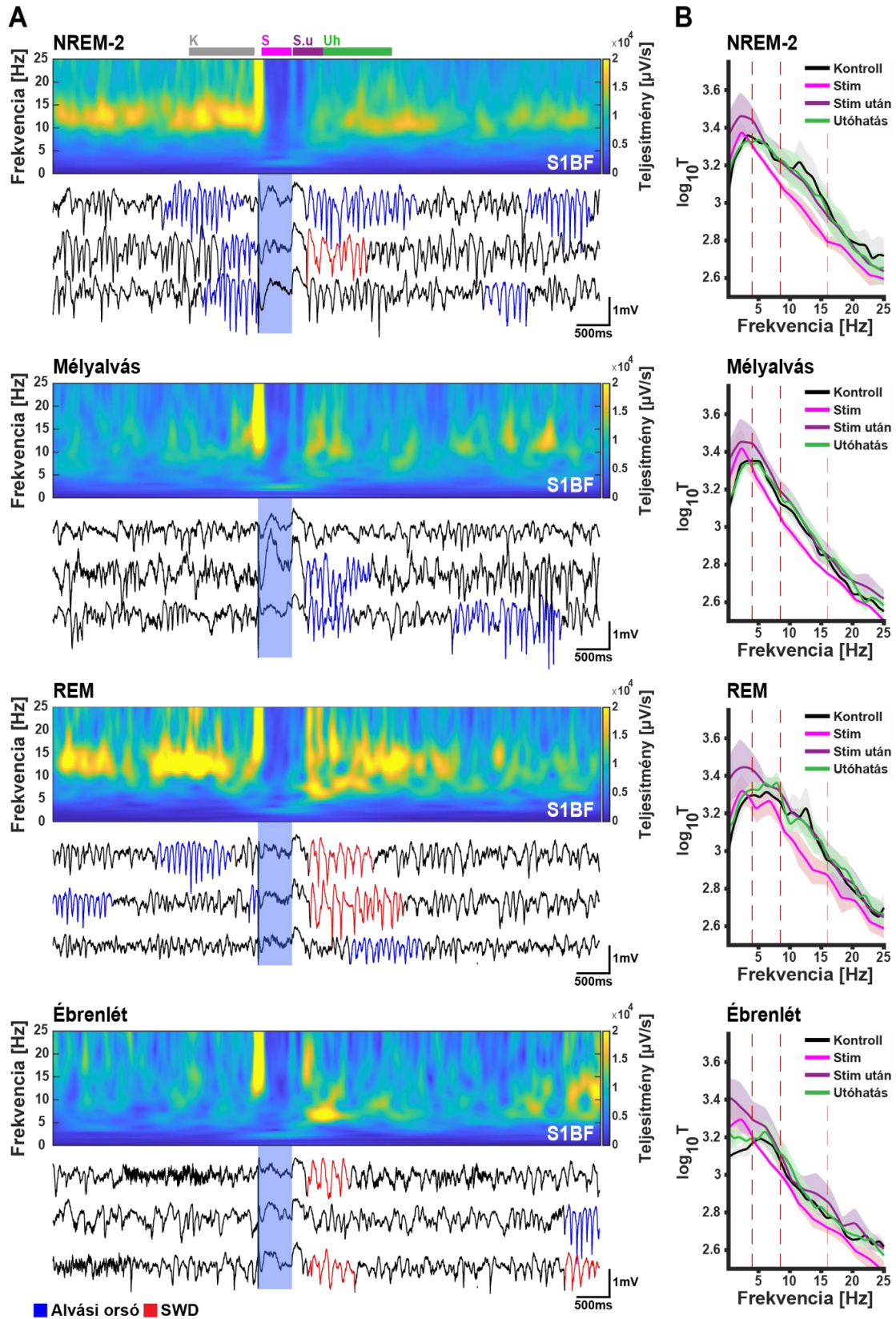
A TC rendszerek egyik szabályozó eleme a 6. rétegből eredő CT által nyújtott visszacsatolás, mely közvetlen serkentésből, illetve az nRT által közvetített gátlásból áll. A CT pálya szerepét optogenetikai aktiválással vizsgáltuk, az S1BF területéről elvezetett LFP változásának monitorozásával. Az ingerlések előtti 10 másodperc alapján meghatároztuk az

alvás-ébrenléti fázist, hogy a válaszokat a már említett négy állapot szerint csoportosítsuk (3.4A ábra).

Mind R43Q, mind vad típusú állatokban a stimuláció alatt a 4-5 Hz-nél nagyobb frekvenciájú hullámkomponensek teljesítménye mindig csökkent, míg a stimulus alatt és az azt közvetlenül követő időintervallumokban a delta-teljesítmény valamelyest megemelkedett (3.4B ábra).

R43Q állatokban azt tapasztaltuk, hogy a CT pályák aktiválása állapotfüggő módon befolyásolta a hálózat működését. NREM-2 állapotban, az alvási orsók megjelenése hosszabb távon is részlegesen gátlódott, a szigma-sáv teljesítménye lecsökkent. Mélyalvásban a szigma-sáv teljesítmény nőtt közvetlenül az ingerlés után és kiváltott alvási orsók is megjelentek. A REM alvásban és ébrenlétben végzett ingerlés közös vonása, hogy SWD-k alakultak ki a stimuláció után, míg REM-alvásban kis valószínűséggel kiváltott orsók is megjelentek (3.4A és B ábra).

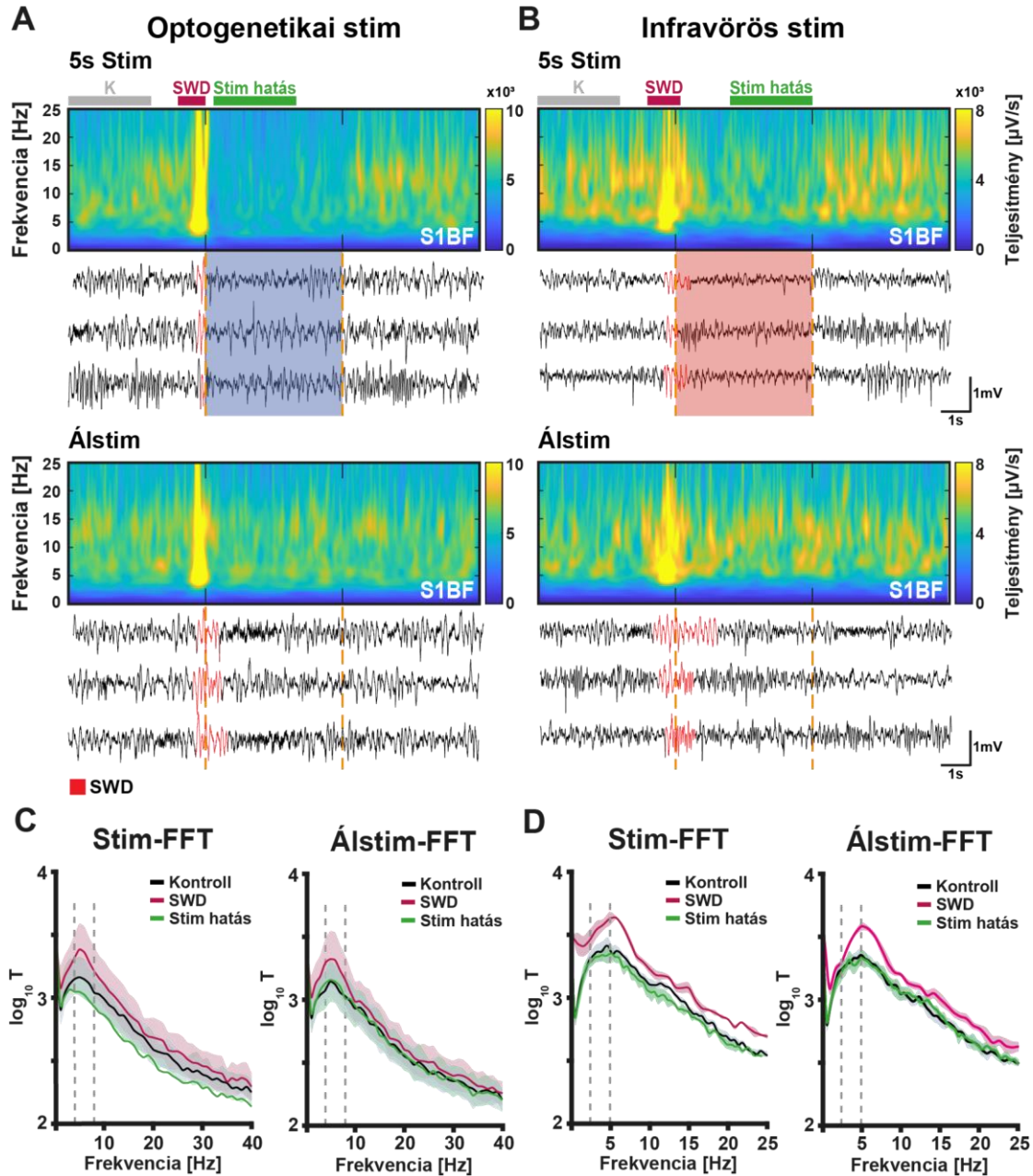
Vad típusú állatokban sem tüske-hullám aktivitást, sem fiziológias alvási orsókat sem sikerült kiváltanunk a CT pályarendszer optogenetikai aktiválásával. Ugyan tapasztaltunk orsószerű oszcillációkat, azonban ezek minden esetben 3-4 ciklus után elhaltak. Mindezek arra utalnak, hogy a 6. rétegi CT visszacsatolás valóban hatással bír az aktuális állapot alatti oszcillációs eseményekre.



3.4. ábra. A 6. rétegi kortikotalamikus pálya optogenetikai aktivációja R43Q állatokban állapotfüggő változásokat eredményezett. **A:** Az alvási-ébrenlét fázisok alapján csoportosított L6 CT ingerlésekre adott válasz S1BF területén (lent), illetve wavelet spektrogram (fent). Piros nyíl: kiváltott SWD **B:** FFT spektrogramok az ingerlések különböző szakaszaira (K: kontroll, S: Stim, S.u: Stim után, Uh: Utóhatás), $n=7$.

A rohamtevékenység direkt modulációja

A kortikális modulátoros bemenet SWD-kre kifejtett direkt hatásának vizsgálatához szabadon mozgó állatból elvezetett LFP adatok online kiértékelésével detektáltuk a tüske-hullám kisüléseket. Az SWD-k alatt 250ms késleltetéssel az L6 CT pályák szelektív optogenetikai ingerlésével (3.5A ábra) azonnali erőteljes gátlás alakult ki (3.5A ábra), ami mind a szigma-, mind az SWD-tartományban (3.5C ábra) csökkentette a teljesítményt. Ezen



3.5. ábra. A rohamtevékenység direkt modulációja R43Q állatokban. A, B: A detektált SWD-k optogenetikai/infravörös ingerlése során mért LFP-je és wavelet spektrogramja 5 másodperces stimulusidő (fent) és álstimulus (lent) esetén. C, D: Az ingerlés különböző fázisainak FFT spektrogramja optogenetikai/infravörös ingerlés során. Chr2: n=2, IR n=3.

eredmények arra utalnak, hogy a 6. rétegi visszacsatolás direkt módon képes befolyásolni az SWD-k lefolyását.

Az optogenetikai stimulálás mellett alkalmaztunk egy, nagyobb transzlációs lehetőséggel bíró, infravörös stimulációs eljárást is (Horváth, és mtsai, 2020) Az SWD-k alatti ez a nem-specifikus infravörös stimuláció (3.5B ábra) az optogenetikai ingerlés hatásához képest kisebb gátlást eredményez (3.5B ábra), mind a szigma-, mind pedig az SWD-tartományban is (3.5D ábra). A hatás felépülése lassabb, az 5s ingerlés végén volt a legerőteljesebb.

4. Megvitatás

Az R43Q egértörzs elektrofiziológiai vizsgálatával igazoltuk, hogy valóban kialakulnak spontán tüske-hullám kisülések, ezek minden esetben a viselkedés megtorpanásával járnak, és a rohamaktivitás gátolható a humán abszensz epilepsziában is alkalmazott antiepileptikummal (ethosuximide-del). Az epilepsziás események TC jellegük miatt, az alvási mintázatra is hatással vannak, a felületes alvásban töltött összesített idő is és az egyes felületes alvásban töltött szakaszok hossza is lecsökken a rohamok következtében, azonban az alvás nem vált fragmentáltabbá. Igazoltuk azt is, hogy a CT pálya szelektív aktiválásával egy azonnali gátlást tudunk kialakítani – akár rohamok közben is – amit az alvás-ébrenléti állapot függvényében kiváltott alvási orsó vagy tüske-hullám aktivitás követhet.

Az általunk vizsgált állatmodellt egy ausztrál családban leírt mutáció okozta láz- és abszensz rohamok alapján (Wallace és mtsai., 2001) hoztuk létre. Korábban már létrehoztak egy, ma már nem elérhető egértörzset (Tan és mtsai., 2007) ezzel a mutációval, a Cre-lox rendszert használva, 4 csendes mutációt és egy loxP szekvenciát is beépítve az eltérő genetikai háttérű egerek genomjába. A genetikai eltérések nagy száma miatt, igazolnunk kellett, hogy az abszensz epilepszia tünetei megfigyelhetők az általunk létrehozott új törzs esetében is. Emberi elektroencefalográfiás vizsgálata a rohamok alatt 3-4 Hz-es tüske-hullám komplexeket mutat. Az elfogadott genetikai rágcsláló modellekben is jelen van ez a hullámforma, azonban gyorsabb, egereknél 6-8 Hz (Letts, 2005; Noebels és mtsai., 1990), patkányokban 7-11 Hz (Coenen és Luijtelar, 2003; Depaulis és Luijtelar, 2006) a jellemző frekvencia. A saját R43Q állataink esetében is 6-7 Hz körüli SWD-ket látunk, ami ráadásul minden esetben a viselkedés megtorpanásával jár és ethosuximide-del is gátolható, akárcsak a humán betegség esetében (Panayiotopoulos, 1999).

Az abszensz epilepsziánál első körben alkalmazott gyógyszerek az ethosuximide és a valproát, melyek közös vonása a T-típusú Ca-csatornák gátlása. Ezen feszültségfüggő ioncsatorna határozza meg az intralamikus oszcillációs folyamatokat (McCormick és Bal, 1997), amennyiben aktiválódik, a talamuszban alvási orsó, UP-state, vagy kóros esetben tüske-hullám aktivitás tud megjelenni. A T-áramok kialakulásának előfeltétele, hogy a sejt előtte hiperpolarizálódjon, aminek a TC sejtek esetében az nRT sejtek felől érkező IPSP lehet a forrása (Huguenard és McCormick, 2007). Az alvási orsók esetében bizonyított, hogy az nRT sejtek aktiválódása indítja el a ritmikus aktivitást (Steriade és mtsai., 1987; Steriade és Deschenes, 1984), akár agykérgi bemenet nélkül is, azonban a tüske-hullám esetében nincs elfogadott mechanizmus. A patkány genetikai modelleknél bizonyított az agykérgi iniciáció

(Meeren és mtsai., 2002), de feltételezhetően ez is gyorsan bevonja a talamikus hálózatot a kóros oszcillációba, ahonnan aztán rövid latenciával tud generalizálódni.

A humán abszensz epilepszia jellemzően az alvás-ébrenlét határán alakul ki (Stewart és mtsai., 2006; Zarowski és mtsai., 2011), tehát reggel az ébredés és este az elalvás idején, azt sugallva, hogy a TC rendszer tónusos és burst-ös működési módjai közötti váltás során alakul ki olyan állapot, ami lehetővé teszi a rohamok beindulását. A 6. rétegi CT pályák különféle alvás-ébrenlėti szakaszokban történő szelektív optogenetikai aktiválása minden esetben egy azonnali gátlást mutatott, feltételezhetően az nRT sejtek aktiválásával megakasztva az éppen jelenlévő ritmitást, azonban a rendszer a gátlásból felszabadulva már eltérő válaszokat mutatott. Amennyiben az ingerlés előtt tónusos működési (REM-alvás vagy ébrenlét) módban volt az intratalamikus hálózat, úgy nagy eséllyel tüske-hullám aktivitás alakult ki, míg a burst-ös módban végzett ingerlés esetén főleg alvási orsó alakult ki. Ez utóbbi meglepő eredmény, mert egészséges transzgénikus állatokban egy 6. rétegi piramidális sejtpopuláció (CT pálya) optogenetikai aktiválásával (NTSR-1) semmilyen állapotban sem lehet alvási orsót kiváltani a (Borbely és mtsai., 2025. Ez azt sugallja, hogy a talamokortikális rendszer működése más tekintetben is áthangolódhat, feltételezhetően a gátló folyamatok gyengülnek, utat engedve a rohamaktivitásnak az R43Q állatokban.

Összességében elmondható, hogy beállítottunk egy új abszensz epilepszia modellt, igazoltuk, hogy egy CT pálya képes gátolni a rohamaktivitást, illetve megfelelő körülmények között akár iniciátora is lehet a kóros működésnek. Terveink között szerepel – az elemszám növelés mellett - a CT pályák aktiválása közben egysejt-aktivitást is elvezetni, mind a szomatoszenzoros kéregből, mind a VPM-ből, így pontosabb képet kapnánk a kortikotalamikus pálya rohamaktivitásra gyakorolt hatásáról.

Irodalomjegyzék

- Albuja AC, Ighodaro ET, Khan GQ. Absence Seizure. [Updated 2024 Apr 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499867/>
- Alloway, K.D., 2008. Information processing streams in rodent barrel cortex: The differential functions of barrel and septal circuits. *Cerebral Cortex* 18, 979–989. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm138>
- Avoli, M., 1995. Feline generalized penicillin epilepsy. *The Italian Journal of Neurological Sciences* 16, 79–82. <https://doi.org/10.1007/BF02229078>
- Borbely, S., Zalatnai, A., Gulyas, E., Balogh, V., Csernai, M., Bartho, P., 2025. Corticothalamic feedback locally modulates network state. (submitted).
- Coenen, A.M.L., Luijtelar, E.L.J.M.V., 2003. Genetic Animal Models for Absence Epilepsy: A Review of the WAG/Rij Strain of Rats. *Behavior Genetics* 33, 635–655. <https://doi.org/10.1023/A:1026179013847>
- Crabtree, J.W., Garraghty, P.E., Schneider, K., Halassa, M.M., Guido, W., Campbell, P.W., 2018. Functional Diversity of Thalamic Reticular Subnetworks. *Front. Syst. Neurosci* 12, 41. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2018.00041>
- Depaulis, A., Luijtellar, G. van, 2006. Genetic Models of Absence Epilepsy in the Rat. *Models of Seizures and Epilepsy* 233–248. <https://doi.org/10.1016/B978-012088554-1/50020-7>
- Eugène, E., Depienne, C., Baulac, S., Baulac, M., Fritschy, J.M., Guern, E.L., Miles, R., Poncer, J.C., 2007. GABAA Receptor $\gamma 2$ Subunit Mutations Linked to Human Epileptic Syndromes Differentially Affect Phasic and Tonic Inhibition. *The Journal of Neuroscience* 27, 14108. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2618-07.2007>
- Fedi, M., Berkovic, S.F., Macdonell, R.A.L., Curatolo, J.M., Marini, C., Reutens, D.C., 2008. Intracortical hyperexcitability in humans with a GABAA receptor mutation. *Cereb Cortex* 18, 664–669. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm100>
- Feldmeyer, D., Brecht, M., Helmchen, F., Petersen, C.C.H., Poulet, J.F.A., Staiger, J.F., Luhmann, H.J., Schwarz, C., 2013. Barrel cortex function. *Progress in Neurobiology* 103, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.11.002>
- Horváth ÁC, Borbély S, Boros ÖC, Komáromi L, Koppa P, Barthó P, Fekete Z. Infrared neural stimulation and inhibition using an implantable silicon photonic microdevice. *Microsyst*

- Nanoeng. 2020 Jun 1;6:44. doi: 10.1038/s41378-020-0153-3. PMID: 34567656; PMCID: PMC8433474.
- Huguenard, J.R., McCormick, D.A., 2007. Thalamic synchrony and dynamic regulation of global forebrain oscillations. *Trends in Neurosciences* 30, 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.05.007>
- Jones, E.G., 2001. The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends in Neurosciences*. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01922-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01922-6)
- Kleiman-weiner, M., Beenhakker, M.P., Segal, W.A., Huguenard, J.R., 2009. Synergistic Roles of GABA 203–213. <https://doi.org/10.1152/jn.91158.2008>.
- Letts, V.A., 2005. Stargazer—A Mouse to Seize! *Epilepsy Currents* 5, 161–165. <https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2005.00051.x>
- Lüthi, A., 2013. Sleep Spindles: Where They Come From, What They Do. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. <https://doi.org/10.1177/1073858413500854>
- McCormick, D. a, Bal, T., 1997. Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annual review of neuroscience* 20, 185–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.20.1.185>
- Meeren, H.K.M., Pijn, J.P.M., Van Luijtelaar, E.L.J.M., Coenen, A.M.L., Da Silva, F.H.L., 2002. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *Journal of Neuroscience* 22, 1480–1495. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-04-01480.2002>
- Noebels, J.L., Qiao, X., Bronson, R.T., Spencer, C., Davisson, M.T., 1990. Stargazer: a new neurological mutant on chromosome 15 in the mouse with prolonged cortical seizures. *Epilepsy Research* 7, 129–135. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(90\)90098-G](https://doi.org/10.1016/0920-1211(90)90098-G)
- Olsen, R.W., Li, G.-D., 2012. GABA, in: Brady, S., Siegel, G.R., Wayne, A., Donald, P. (Eds.), *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology*. Academic Press, pp. 367–376.
- Panayiotopoulos, C.P., 1999. Typical absence seizures and their treatment. *Archives of Disease in Childhood* 81, 351–355. <https://doi.org/10.1136/adc.81.4.351>
- Petrou, S., Reid, C.A., 2012. The GABA A $\gamma 2$ (R43Q) mouse model of human genetic epilepsy, in: *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).
- Sherman, S.M., 2022. Thalamocortical Circuitry Matters, in: Halassa, M.M. (Ed.), *The Thalamus*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 71–90. <https://doi.org/10.1017/9781108674287.005>

- Sherman, S.M., Guillery, R.W., 2011. Distinct functions for direct and transthalamic corticocortical connections. *Journal of Neurophysiology* 106.
- Steriade, M., Deschenes, M., 1984. The thalamus as a neuronal oscillator. *Brain research* 320, 1–63.
- Steriade, M., Domich, L., Oakson, G., Deschenes, M., 1987. The deafferented reticular thalamic nucleus generates spindle rhythmicity. *Journal of Neurophysiology* 57, 260–273. <https://doi.org/10.1152/jn.1987.57.1.260>
- Stewart, L.S., Bercovici, E., Shukla, R., Serbanescu, I., Persad, V., Mistry, N., Cortez, M.A., Snead, O.C., 2006. Daily rhythms of seizure activity and behavior in a model of atypical absence epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 9, 564–572. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2006.08.019>
- Tan, H.O., Reid, C.A., Single, F.N., Davies, P.J., Chiu, C., Murphy, S., Clarke, A.L., Dibbens, L., Krestel, H., Mulley, J.C., Jones, M.V., Seeburg, P.H., Sakmann, B., Berkovic, S.F., Sprengel, R., Petrou, S., 2007. Reduced cortical inhibition in a mouse model of familial childhood absence epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17536–17541. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708440104>
- Thomson, A.M., 2010. Neocortical layer 6, a review. *Frontiers in neuroanatomy* 4, 13. <https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00013>
- Wallace, R.H., Marini, C., Petrou, S., Harkin, L.A., Bowser, D.N., Panchal, R.G., Williams, D.A., Sutherland, G.R., Mulley, J.C., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., 2001. Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nature genetics* 28, 49–52. <https://doi.org/10.1038/88259>
- Zarowski, M., Loddenkemper, T., Vendrame, M., Alexopoulos, A.V., Wyllie, E., Kothare, S.V., 2011. Circadian distribution and sleep/wake patterns of generalized seizures in children. *Epilepsia* 52, 1076–1083. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03023.x>

Összefoglaló

Az abszensz epilepszia – mint generalizált epilepsziás betegség – gyakran genetikai hibákra vezethető vissza. Egyik formájánál egy családi anamnézis vizsgálat során írták le a GABA_A-receptorok gamma-2 alegységének pontmutációját, mely a talamokortikális (TC) hálózatok kóros oszcillációs tevékenységét, túske-hullám aktivitását eredményezte. Azonban nem ismert a túske-hullámok kialakulásának, terjedésének pontos mechanizmusa. Ennek vizsgálatára létrehozott, az említett pontmutációra épülő egér törzs validálását követően azt tanulmányoztuk, hogy a TC hálózatok visszacsatolását biztosító agykérgi modulációs rendszerek miként hatnak a túske-hullámok megjelenésére, illetve azok paramétereire.

Az elsődleges szomatoszenzoros kéreg topografikusan, virális technikával megjelölt kortikotalamikus sejtjeit optogenetikailag aktiváltuk, miközben talamikus és agykérgi lokális mezőpotenciált vezettünk el szabadon mozgó állatokban. Előzetes eredményeik azt mutatják, hogy az agykérgi visszacsatolás aktiválása megszüntetheti a túske-hullámok megjelenését, továbbá e hatás az alvás-ébrenléti ritmus különböző szakaszaiban jellegzetes oszcillációs mintázatokat indukálhat. A nem specifikus, infravörös fénnel történő kortikotalamikus ingerlés is képes modulálni a túske-hullám aktivitást.

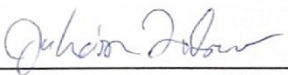
Mindamellett, hogy a létrehozott rágcsló modell lehetőséget biztosít az abszensz epilepszia kialakulásának pontos mechanizmusának megismerésére, kutatásaink rávilágítanak a korábban pusztán modulátor szereppel társított agykérgi visszacsatolások fontos fiziológiás és esetleges terápiás funkcióira is.

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Én, Juhász Zsombor nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott Tüske-hullám aktivitás modulációja egér abszensz epilepszia modellben című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

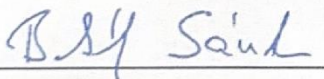
Részfeladat	A részvétel mértéke
Az általam végzett műtétekhez való előkészítés (elektrodák, optrodok elkészítése)	5
Krónikus műtétek	3
Állatok transzkardiális perfúziója	4
Kísérletekből származó minták metszése	4
Metszett minták további feldolgozása	3
Fluoreszcens mikroszkóppal felvett képek készítése	2
Adatok elemzése	4

Kelt: Budapest, 2025.01.15.



Hallgató: Juhász Zsombor

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető: Dr. Borbély Sándor (HUN-REN Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet)

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Borbély Sándornak, a szakmai iránymutatásért és a dolgozat elkészítéséhez nyújtott rengeteg segítségért, valamint köszönet illeti Dr. Mátyás Ferencet, a dolgozatommal kapcsolatban megfogalmazott észrevételeiért és javaslataiért. Továbbá szeretném megköszönni a HUN-REN Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Hálózat és Viselkedés Neurobiológiai Kutatócsoport összes tagjának, külön kiemelve Horváth-Magyar Aletta számos munkafolyamatban és szakmai kérdésben nyújtott segítségét.