

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
ÉLETTANI, SZERVEZETTANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI
TANSZÉK



Tudományos Diákköri Dolgozat

36. OTDK Biológia Szekció

Az éber striátum iktális heterogenitása

Zsigri Nikolett

Biológia MSc

Témavezető: Dr. Lőrincz László Magor

Egyetemi Docens

2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés	4
Absence epilepszia.....	4
1.1. Absence epilepszia és társbetegségei	4
1.2. Kortiko-thalamo-kortikális hálózat és a striátum.....	4
1.3. Rohamok emberben és Stargazer egérben	6
2. Bazális ganglionok	7
2.1. Anatómiai áttekintés	7
2.2. Bazális ganglionok afferensei és efferensei.....	8
2.2. A törzsdúcok intrinsic és extrinsic kapcsolatai.....	9
2.3. Direkt és indirekt útvonal.....	9
4. A kortiko-bazális ganglionáris-thalamo-kortikális hálózat egérben	10
3.1. Dorsalis striatum	10
3.2. CBTC-hálózat	11
3.3. Striatális neurontípusok funkcionális jellemzői	11
3.3.1. MSN sejtek.....	11
3.3.2. Interneuronok - FS, LTS és TAN sejtek.....	12
3.4. Törzsdúci neuronok iktális aktivitása	14
Célkitűzés	16
Anyagok és módszerek	17
1. Intrakortikális és epidurális elektródák készítése.....	17
2. A műtét kivitelezése.....	17
3. Elektrofiziológiai mérések kivitelezése	20
4. Kiértékelési módszer.....	20
Eredmények és kiértékelésük.....	22
Közepes tüskés sejtek	22
Gyorsan tüzelő interneuronok	24
Tranziensen aktív neuronok	27
Összefoglalás.....	29
Köszönetnyilvánítás	31
Irodalomjegyzék	32

Rövidítések jegyzéke

AE - absence epilepszia

EEG - elektroencefalogram

SWD - tüske-hullám kisülés (spike-wave discharge)

CTX - agykéreg, cortex

CP - caudoputamen

dSTR - dorsalis striátum

SNC - substantia nigra pars compacta

SNr - substantia nigra pars reticulata

STN - nucleus subthalamicus

GPe - globus pallidus pars externa

GPI - globus pallidus pars interna

nRT - nucleus reticularis thalami

PF - nucleus parafascicularis

VM - nucleus ventromedialis

CT - kortiko-thalamikus

TC - thalamo-kortikális

CS - kortiko-striatális

NRT - nucleus reticularis thalami sejt

nRT - nucleus reticularis thalami

MSN - közepes tüskésejt (medium spiny neuron)

TAN - tranziensen aktív interneuron (tonically active interneuron)

LTS - alacsony küszöbű interneuron (low threshold-spiking interneuron)

FS - gyorsan tüzelő striatális interneuron (fast spiking interneuron)

AP - akciós potenciál

AP - antero-posterior

ML - medio-laterális

DV - dorso-ventrális

DA - dopamin

ACh - acetilkolin

Bevezetés

Absence epilepszia

1.1. Absence epilepszia és társbetegségei

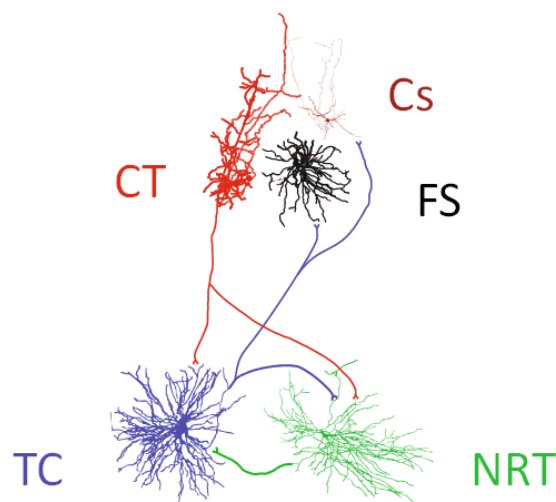
Az absence epilepszia (AE) hirtelen jelentkező, viszonylag rövid tudatvesztéssel (~ 10 s) járó állapot, mely az akaratlagos mozgások teljes hiányával, valamint a kisebb vizuális ingerekre való érzéketlenséggel társul. Áltatában 3-8 éves korban kezdődik, naponta többször, akár 200 roham előfordulhat. Jellemzője a roham alatti (iktális) elektroencefalogramon (EEG) megjelenő, kétoldali, szinkron tüske-hullám kisülések (SWD), melyek 2,5-4 Hz frekvenciájú, nagy amplitúdójú oszcillációk (Panayiotopoulos 1999, Crunelli, Lőrincz és mtsai. 2020).

A generalizált, nem görcsös természetű AE megnehezíti a fiatal egyed kognitív fejlődését, a szenzoros információk különböző funkciókba való átültetését - epizodikus, szenzoros memória formálódását, az emóciók kifejezését, a szinaptikus szelekciót és a szinaptogenezist (Silbereis és mtsai. 2016, Meyer és mtsai. 2018, Fonseca és mtsai. 2019). Az absence epilepsziás gyermekeknek ~ 60%-a neuropszichiátriai társbetegségben szenved - figyelemzavarok, hangulatzavarok és depresszió (Caplan és mtsai. 2008, Lee és mtsai. 2018). Számos tanulmány született a betegségben érintettek tanulmányi teljesítményének romlásáról, a tudatvesztéses állapot kognitív funkciókra gyakorolt hatásáról. A széles spektrumú károsodás különböző vizsgálati módszerekkel közvetlenül tetten érhető, ennek súlyossága a neuronális aktivitás intenzitásával és szinkronitásával függ össze. Antiepileptikus kezelés esetén a figyelemzavar fennmaradhat a farmakológiailag kontrollált esetekben (Crunelli, Lőrincz és mtsai 2020).

1.2. Kortiko-thalamo-kortikális hálózat és a striátum

Az absence rohamok a kortiko-thalamo-kortikális hálózat zavaraiából adódnak, benne foglalva az agykérget, a thalamust, a nucleus reticularis thalami (nRT) gátló sejtjeit és e neuronok kapcsolatait (Crunelli, Lőrincz és mtsai. 2020).

A thalamo-kortikális sejtek kölcsönös serkentő kapcsolatban vannak az agykérgi neuronokkal, ami a neuronális szinkronizáció és a kérgi aktivitás alapja. Ez olyan funkciók alapjául szolgál, mint a munkamemória (Guo és mtsai 2017, Crunelli, Lőrincz és mtsai. 2020).



1. ábra. A koritko-thalamo-kortikális rendszer szerveződése (Crunelli, Lőrincz és mtsai. 2020) TC: thalamo-kortikális sejt; NRT: nucleus reticularis thalami sejt; CT: kortiko-thalamikus sejt; Cs: kérgi tüskés csillagsejt; FS: kérgi gyorsan tüzelő interneuron

A kölcsönös thalamo-kortikális kapcsolat a primer szenzoros és motoros thalamikus magokra jellemző szerveződés, az asszociációs magok döntő bemenete kérgi eredetű, thalamo-kortikális projekciói nem korlátozódnak a nekik bemenetet adó kérgi régióra, lehetővé téve így egy transz-thalamikus kortiko-kortikális kommunikációt (Sherman 2016, Crunelli, Lőrincz és mtsai. 2020).

Az agykéreg 6.-ik rétegében található CT neuronok glutamáterg innervációval látják el a különböző primer szenzoros és motoros thalamikus magok TC neuronjait, míg az 5.-ik kérgi rétegből az asszociációs thalamikus magvak kapnak bemenetet. A TC neuronok kérgi projekciói szintén glutamátergek és főleg a 4.-ik rétegben végződnek, ahol tüskés csillagsejteket, piramissejteket és különböző lokális interneuronokat serkentenek (1. ábra.).

Mind a CT, mind pedig a TC neuronok axonkollaterálisaik által a thalamust kapszulaként körülvevő nRT GABAerg interneuronjaival (NRT) is szinaptizálnak. A CT bemenetet a TC neuronok közvetlenül is és - az NRT neuronokon keresztül - előrecsatolt gátlás formájában is megkapják. Az NRT neuronok TC neuronok általi serkentése visszacsatolós gátlást okoz az utóbbiakban (Crunelli, Lőrincz és mtsai. 2020).

A törzsdúcok egyedül a striátumban fogadnak bemeneteket. Ezek glutamáterg kérgi valamint olyan thalamikus serkentő inputok, melyek elsőként vetítenek szubkortikálisan, majd csak

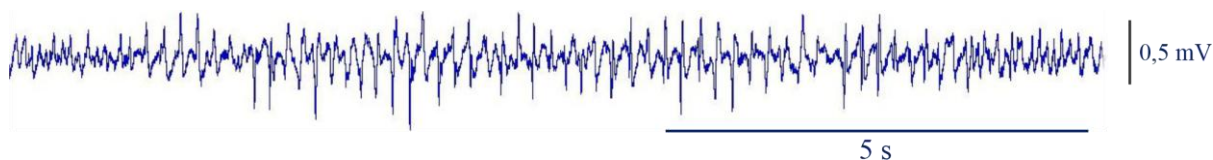
később kortikálisan. Ilyen thalamikus mag a parafascicularis mag (PF). A PF-CTX projekciók szintén mutatták a korábban leírt kortiko-thalamikus rekurrens hálózat jelenlétét. Ezért joggal feltételezhető, hogy a CTX-PF-CTX facilitálja és alakítja későbbi striatális kimenet által a célzott asszociatív kérgi régiókat. A parafascicularis magot még különlegesebbé teszi a tény, hogy a magban nincs belső kapcsoltság, hanem a már jól ismert nRT koordinálhatja bizonyos alrégióit (Mandelbaum és mtsai. 2019).

Fontos megemlíteni azt is, hogy a piramidális traktus kortikális neuronjai nem projektálnak kontralaterálisan a striátumba (Harris és mtsai. 2021). Vélhetően prefrontális kérgi projekciók szinkron érnek a striátumba a PF magon keresztül, a bilaterális intraencephalikus típusú kortikális projekció helyett (Mandelbaum és mtsai. 2019).

1.3. Rohamok emberben és Stargazer egérben

Az absence rohamok funkcionális betekintést nyújtanak az észlelés és akarat összekapcsolódásába. Ennek a roham típusnak a sejtes, hálózati alapjának feltárásához különböző modellállatok tanulmányozására van szükség. Az egyik, kutatásban használt genetikai egérmodell, a Stargazer egér (Noebels és mtsai. 1990, Letts és mtsai. 2005, Meyer és mtsai. 2018).

Az absence rohamok fémjele az EEG-n megjelenő gyakori, visszatérő tüske-hullám kisülések, melyet a Stargazerekben is megfigyeltünk (2. ábra). Hasonlóság a humánban és Stargazerekben, mint a legtöbb absence epilepszia állat modellben, a rohamok hirtelen megjelenése, néhány másodperces időtartama, majd hirtelen megszűnése. A humán 2,5-4 Hz-től eltérően a Stargazerekben 6-9 Hz frekvenciával jelentkeznek az SWD-k (Barad és mtsai. 2017, Depaulis és Charpier 2018).



2. ábra. Stargazer iktális tüske-hullám kisülések

Stargazer egerek A/J beltenyésztésből származnak, amelyet elsőként az 1980-as években a The Jackson Laboratóriumban hajtottak végre. Az egerek egyetlen, recesszív mutációt szenvedtek a 15-ös kromoszómájukon. A legfontosabb fenotípusos vonásaik a következők: ataxiás járás, paroxizmális dyskinézia, mely a végtagokat és a nyakukat érníti. A Stargazer egerek a feszültségfüggő kalcium csatornák subunit génjeiben hordoznak hibát.

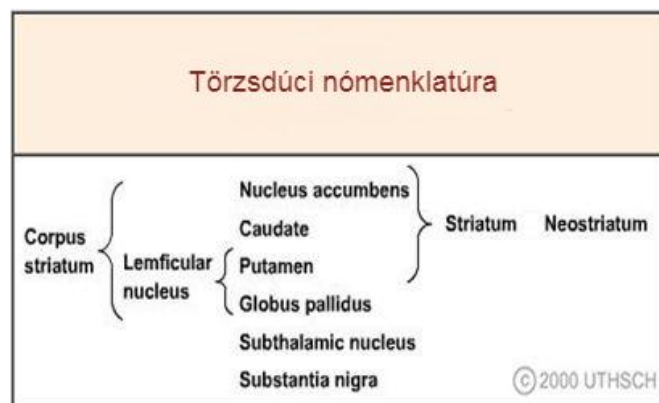
A mutációt retrovirális transzpozon inszercióval azonosították, ami jelentősen csökkentette a Cacng2 expressziót. A Cacng2 fehérjével kapcsolatban, melyet stargazinaként is említene a szakirodalomban, megfigyelték, hogy in vitro körülmények között a feszültség függő kalcium csatornában hiperpolarizáció eltolódást okoz az akciós potenciál inaktivációban (Noebels és mtsai. 1990, Letts és mtsai. 2005).

2. Bazális ganglionok

A bazális ganglionok, vagy törzsdúcok egymással szoros kapcsolatban álló magvak összessége, ahová a kéreg összes területéről érkezik projekció, így válnak fontos szubkortikális egységgé. Motoros működés mellett részt vesznek a megerősítéses tanulás, végrehajtó funkció, vizuális feldolgozás és az idő telésének tudatosulásában (Meyer és mtsai. 2018, Foster és mtsai. 2021).

2.1. Anatómiai áttekintés

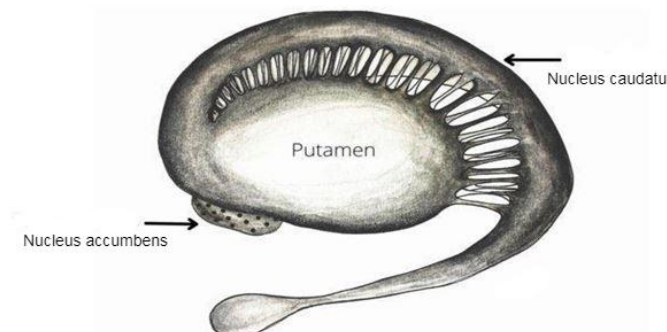
A törzsdúcok az előagyi eredetű telencephalonban (nagyagy), diencephalonban (köztiagy), valamint a mesencephalonban (középagy) is tartalmaznak struktúrákat. Humánban az előagyi struktúrákhoz tartozik a nucleus caudatus, a putamen, a nucleus accumbens (más néven ventrális striatum) és a globus pallidus. Összesített nevük a corpus striatum (3. ábra).



1. ábra. Angolszász törzsdúci nómenklátúra (Texasi Egyetem Egészségtudományi Centruma)

A putamen hasonlóan nagy struktúra, mely a nucleus caudatustól a capsula interna anterior részével van elválasztva. A nucleus caudatus és a putamen együttesen striatumként vagy neostriátumként említett a szakirodalomban. A nucleus accumbens gyakran ventrális striátumként említett (3. ábra).

A nucleus caudatus a striátum aszociációs áréája, míg a putamen a szenzorimotoros része. A putament és a globus pallidust együttesen lenticularis vagy lentiform magnak hívjuk. A globus pallidus két szegmensre osztott: interna (mediális) és externa (laterális) szegmensekre. A subthalamikus mag a diencephalon része, a neve is elárulja, a thalamus alatt helyezkedik el (3. ábra).



3. ábra. Humán striátum szerkezete. A c-alakú nucleus caudatus az oldalsó kamra laterális falával szorosan összekapcsoltan helyezkedik el (James Knierim, Johns Hopkins Egyetem 2020).

A substantia nigra középgyi struktúra, két különálló része van: pars compacta és pars reticulata. A középgy ventrális részén, a nucleus ruber és az agykocsány (crus cerebri) között található. Az SNc fontos dopaminerg útvonalforrás, mely a striátumban végződik.

2.2. Bazális ganglionok afferensei és efferensei

A fő törzsdúci bemenetek a striátumba érkeznek. Ezek a serkentő afferenések az összes kérgi területről és a thalamus intralamináris magvaiból (nucleus centromedialis és parafascicularis) érkeznek. A különböző kérgi és thalamikus árékból érkező afferensek elkülönültek, topológiát mutatnak (Hintiryan és mtsai. 2016, Mandelbaum és mtsai. 2019). A primer motoros és szomatoszenzoros kéreg főként a putamenbe, míg a premotoros és suplementer motoros áréák a nucleus caudatus fejbe vetítenek. A primer motoros kéreghez hasonlóan a törzsdúci motoros régióiban is felrajzolhatunk egy homunculust (Simonyan és mtsai. 2019). A fő törzsdúci kimeneti struktúrák a GPi valamint a SNr neuronok GABAerg, gátló efferensei. A motoros és szomatoszenzoros kéregből érkező szenzorimotoros információt feldolgozó hálózatok a thalamus ventro-anterior (VA) és ventrolaterális (VL) magjában végződnek. Azok a törzsdúci hurkok melyek egyéb neokortikális információt dolgoznak fel a thalamus dorsomediális, intralamináris és ventro-anterior magvaiba projektálnak (Foster és mtsai. 2021).

2.2. A törzsdúcok intrinsic és extrinsic kapcsolatai

A törzsdúcok az agykéregből induló és visszatérő hurokpályák állomásai. A striatopallidális projekció egy GABAerg, gátló útvonal a striátum és a globus pallidus mindkét szegmense között. A striatonigrális pálya szintén GABAerg kapcsolat a striátum és SNr között. A GPe a subthalamikus magba küld gátló bemenetet.

A subthalamikus mag glutamáterg, serkentő bemenetet küld a globus pallidus mindkét szegmensébe valamint az SNr-be, ez az egyetlen tisztán serkentő útvonal a törzsdúci belső pályák között.

A nigrostriális útvonal hozza létre a striális neuronok dopaminerg szinapszisait. Ez egy kevert útvonal gátlással és serkentéssel (Middleton és Strick 2000, Foster és mtsai. 2021).

2.3. Direkt és indirekt útvonal

Abban az esetben, ha a striátum nem kap tranziens serkentő bemenetet, az MSN sejtek nyugalomban vannak, nem fejtenek ki gátlást a globus pallidusra. Ott a sejtek tehát tónusosan aktívak maradnak és folyamatos gátlás alatt tartják a thalamikus komplexet, így a leszálló primer motoneuronok serkentés nélkül maradnak (Middleton és Strick 2000).

Ha kortikofugális tranziens serkentő bemenet érkezik a striátumba, a neuronok gátló szinapszist küldenek a GP-be, ahol a pallidális neuronok tranziens gátlás alá kerülnek. Ennek eredményeként a pallidothalamikus neuronok a TC neuronokat felszabadítják a gátlás alól, diszinhibíció jön létre, aminek következtében a thalamokortikális sejtek serkentik a kérgi primer motoneuronokat (Middleton és Strick 2000).

Az utóbbi törzsdúci működés kétféle módon, különböző struktúrák részvételével valósulhat meg. Egyik a direkt útvonal, amely hatása a motoros aktivitás fokozódása. A serkentett MSN neuronok a GPi-ba küldenek erős gátlást. A thalamusba így kevésbé erős gátlás érkezik, mely a TC neuronokon gátlástoldást okoz, így a TC neuronok kérgi serkentést váltanak ki.

A másik, indirekt útvonal legfontosabb ismérve, hogy a tónusos gátlás szintjét növeli, valamint biztosít egy második corpus striátumhoz kapcsolódó útvonalat, GPi- és SNr-val. Célja a nem kívánatos motoros aktivitás gátlása. Az indirekt útvonalban a nucleus caudatus és a putamen tranziensen aktív gátló neuronjai, a GPe tónusosan aktív gátló neuronjaihoz vetít. Fontos megjegyeznünk, hogy a nigrális dopaminerg bemenet gátló hatást gyakorol ezekre a neuronokra. A GPe neuronjai a ventrális thalamusba és subthalamikus magba vetítenek. A GPe visszavetít a GPi-be, ahol a tranziens serkentő aktivitás megakadályozza a direkt útvonal diszinhibícióját. Így az indirekt útvonal modulálni tudja a direkt útvonal hatását. A subthalamikus mag visszavetít a GPi-be és az SNr-be. A GPi és SNr kifelé is

vetítenek, ami lehetővé teszi hogy az indirekt útvonal a felső motoneuronok működését befolyásolja.

A nigrostriatális útvonal a direkt és indirekt útvonalak modulálását végzi. A direkt útvonal esetén D1-es dopaminerg receptorokon keresztüli serkentést, az indirekt útvonal esetén pedig D2 receptorokon keresztüli gátlást eredményez (Middleton és Strick 2000).

4. A kortiko-bazális ganglionáris-thalamo-kortikális hálózat egérben

A kortiko-bazális ganglionáris-thalamo-kortikális hurok az egyik legalapvetőbb hálózati motívum az agyban. A bazális ganglionok három fontos kimeneti csatornája a motoros, a limbikus és az asszociatív. A dorsalis striátumban bemeneteit alkotó kb 65 kérgi área és kéttucatnyi thalamikus mag ékes bizonyítékai a struktúra szubkortikális integráló szerepének (Foster és mtsai. 2021).

3.1. Dorsalis striatum

A caudoputamen dorsalis részébe érkező kérgi projekciók, kortiko-striatális afferensek meghatározzák a törzsdúcokban a kérgi információ áttevődését, integráltságát majd feldolgozását, ezért hatással vannak a szenzomotoros, kognitív és emocionális funkciókra (Hintiryan és mtsai. 2016).

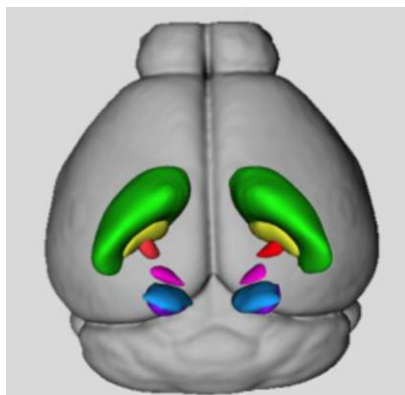
CP-t konvergens és divergens kérgi-, valamint thalamikus afferensei szerint 11 egységre osztották, amelyeket további 29 kisebb doménra tagoltak (Hintiryan és mtsai. 2016, Foster és mtsai. 2021). A CP kvadránsokra felosztása: ventromediális rész az autonóm és neuroendokrin aktivitásban, a halló információ feldolgozásban, viszcerális fájdalom feldolgozásban vesz részt. A dorsomediális striátum főként vizuális, hallókérgi és motoros kérgi afferenseket kap. A dorsolateralis és ventrolateralis striátumba az összes szomatoszenzoros, és motoros kéreg ad bemenet (Hintiryan és mtsai. 2016).

A cortex néhány áréája szubkortikális területek csomópontjaként szolgál pl. a secunder motoros kéreg, mely a különböző alhálózatok közötti kommunikációt biztosítja (Foster és mtsai. 2021). A CP három centrális doménje e kérgi csomópontok terminális mezői. A perifériás CP domének ettől eltérően, rengeteg más kérgi terület terminálisai, integráló funkciót töltenek be. A centrális domének tehát kevésbé számítanak integratívnak, ehelyett

csomóponti kérgi bemenetet, vagyis erősen feldolgozott információt kapnak (Foster és mtsai. 2021).

3.2. CBTC-hálózat

A thalamus 12 kimeneti csatornával kapcsolódik a hálózatba: 6 a parafascicularis magon és szintén 6 a ventromedialis magon keresztül. A két thalamikus mag teljesen különböző thalamo-kortikális innervációval rendelkezik. Ezek, a kéregbe visszacsatoló szinapszisok közvetlenül a kortiko-striatális neuronokhoz jutnak, melyek így az alhálózati hurkokba épülve egy valós zárt kört hoznak létre. Legalább 55 különálló kérgi terület formál összekapcsolódó kortiko-kortikális alhálózatokat és mindegyik küld nagymértékben összetartó kortiko-striatális kollaterálist az egyik striatális doménbe. A CP domének és a ventrális thalamus az SNr és GPe törzsdúci magvakba projektálnak (Hintiryan és mtsai. 2016, Foster és mtsai. 2021) (5. ábra.).



5. ábra. Törzsdúci magvak egérben. Zöld: CP, Piros: GPe, Ciklámen: STN, Kék: SNc, Lila: SNr (Kim és mtsai. 2020).

A kortiko-bazális ganglionáris-thalamo-kortikális rendszer számos párhuzamos alhálózatból épül fel, minden egyes egység egymással gazdagon összekapcsolt, minden egyes párhuzamos alhálózat egy-egy újabb csomópontot, új információt hoz magával (Foster és mtsai. 2021).

3.3. Striatális neurontípusok funkcionális jellemzői

Anatómiai szinten megkülönböztetünk tüskés projektáló neuronokat és nem-tüskés interneuronokat.

3.3.1. MSN sejtek

A striátum principális sejtjei a közepes tüskés neuronok (MSN, medium spiny neuron), az összes striatális neuron > 95%-aként az egyetlen törzsdúci kimenetet adják a többi törzsdúci

mag felé. A GABAerg sejteket, axonvégződésük szerint osztályozhatjuk: striatonigrális és striatopallidalis. Előző SNr-ben, utóbbi GP-ben végződik. Az MSN sejtek glutamáterg bemeneteket kapnak a kéreg és a thalamus felől is, a kérgi bemenetek többsége a dendrittüskékre érkezik (Kreitzer és mtsai. 2009).

Neurokémiai osztályozásuk szerint a striatonigrális MSN sejtek D1 dopamin és muszkarinos M4 receptor expresszióban mutatnak többséget, dynorphin és substance P receptorok mellett. A striatopallidális MSN neuronok dopamin D2, adenosin A2 és enkefalin receptorokat expresszálnak (Kreitzer és mtsai. 2009).

Fiziológiásan a közepes tüskés sejtípusok hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek, azonban a striatopallidális útvonal sejtjei megnövekedett serkentést mutatnak, emellett mindegyik MSN típus különböző modulációt mutat DA és ACh hatására.

Az MSN sejtekre hiperpolarizáltabb nyugalmi membránpotenciál és alacsony bemenő ellenállás jellemző (6. ábra.). MSN sejtek szinaptizálódnak egymással, szinapsztis fogadnak FS, TAN és LTS interneuronoktól, de vissza nem szinaptizálnak (Kreitzer és mtsai. 2009).

Éber, egészséges, fej befogott patkányok MSN sejtjeiből intracelluláris elvezetéssel ritmikus 3,-3,5 Hz-es sejt aktivitást regisztráltak. Az alap aktivitásra sporadikus depolarizált-hiperpolarizált állapotváltozás jellemző, változó amplitúdóval és időtartammal, valamint nagy frekvenciájú, kis amplitúdójú zajszerű ingadozásokkal. Ez valószínűleg a több ezer kortikostriatális és thalamo-striatális bemenetnek köszönhető (Mahon és mtsai. 2006). A közepes tüskés neuronok akciós potenciál átlagos szélessége ~0,7 ms, in vivo rágszáló modellből történő regisztrálás során (Planert és mtsai. 2013).

3.3.2. Interneuronok - FS, LTS és TAN sejtek

A nem-tüskés sejtek az összes striatális neuron csupán 5%-át teszik ki, anatómiai tulajdonságaik szerint közepes méretű GABAerg és nagyméretű kolinerg sejtekre oszthatóak (Kawaguchi és mtsai. 1995, Kreitzer és mtsai. 2009)

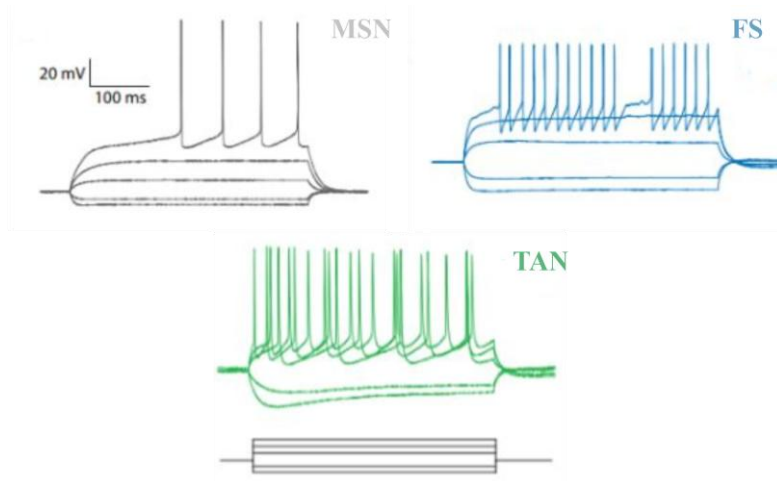
Fiziológiai szempontok szerint három GABAerg interneuron típust különböztetünk meg. A parvalbumin-pozitív neuronok depolarizáló áram injekcióra gyors, nem akkomodáló akciós potenciál leadással válaszolnak, ezeket gyorsan tüzelő interneuronokként ismerjük (FS). A szomatosztatin-pozitív interneuronok alacsonyabb tüzelési rátával rendelkeznek és plató potenciáljukról ismertek, ezeket alacsony-küszöbű interneuronoknak (LTS) nevezzük. Végül, a kolinerg interneuronokra (transziensen aktív neuronok, TAN) jelentős hiperpolarizáció-aktivált áramok és spontán aktivitás jellemző (Kreitzer és mtsai. 2009) (6. ábra.).

Mint az MSN sejtek, a striatális interneuronok is kapnak serkentő kérgi és thalamikus bemeneteket. Az interneuronok egyedül az MSN sejtekre, és szomszédos interneuronokra adnak közvetlen kimenetet, így mikrohálózatokat hoznak létre a striátumban (Tepper és mtsai. 2004, Choi és mtsai. 2018).

Az FS sejtekre jellemző a serkentő kérgi bemenetek mellett, hogy egymással szoros rés kapcsolatokon keresztül is szinaptizálnak, és periszomatikus GABAerg szinapszist adnak a környező projekciós sejtekre (MSN).

Az FS sejtek nagyon változatos tüzelési mintázatokat mutathatnak. Megfigyeltek kisülés-sorozatos tüzelést, szabályos, szabálytalan és spontán tüzelést is. Az éber striátumban tranziensen aktívak (átlagos tüzelési ráta ~12 Hz, szabálytalan tüzelés), amely megnehezítheti az FS és TAN sejtek elkülönítését. Fontos jellemzője az FS sejteknek az alacsony időtartamú AP, és kis AP szélesség. Az FS neuronok AP átlagos szélessége 0,31-0,43 ms közé tehető (Ma és mtsai. 2006).

Lassú-hullámú alvásban a striatális FS sejtek nagy része kisülés sorozatosan tüzel (Klaus és mtsai. 2011, Berke 2011). In vitro regisztrációkban gyors, akár 200 Hz-es tüzelési rátával is tüzelhetnek, az AP szélesség agyszeletekben átlagosan 0,5 ms (Taverna és mtsai. 2007).



6. ábra. Striatális sejttypusok membrántulajdonságai (Kreitzer 2009). Az MSN sejt alacsony bemenő ellenállással és késleltetett tüzeléssel jellemezhető. Az FS sejt jellemzője az alacsony bemenő ellenállás és gyors tüzelés. A tranziensen aktív kolinerg interneuron (TAN) prominens hiperpolarizáció aktivált áramot mutat, tüzelésre széles akciós potenciálok és hossz utóhiperpolarizáció jellemző.

Van egy fajta reciprocitás az FS és MSN neuronok működésében. Éber rágcshálók striatális FS neuronjainak átlagos tüzelési rátája 10-30 Hz körülire tehető. Lassú hullámú alvásban nagyfrekvenciás kisülés-sorozatos tüzelés volt megfigyelhető, ~20 Hz-es tüzelési rátával.

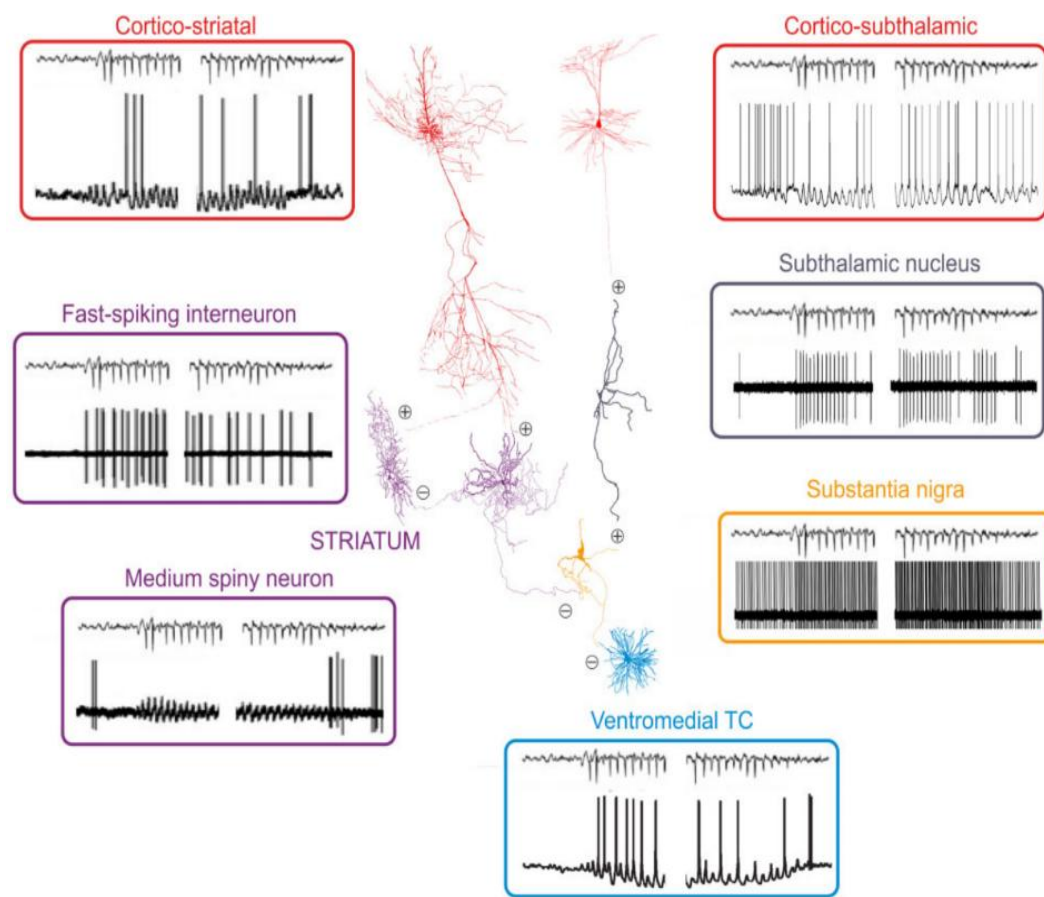
Ezzel szemben az MSN sejtek magasabb frekvenciájú tüzelési rátával rendelkeznek lassú-hullámú alvásban, mint éber állapotban. Szabadon mozgó állatokban végzett vizsgálatok során kiderült, hogy az FS sejtek erős időbeni kontrollt gyakorolnak az MSN neuronok tüzelésére. Egy MSN sejt hozzávetőlegesen 4-27 FS sejttől kap szinapszist, míg egy FS sejt 135- 140 MSN sejtnek küld bemenetet (Kreitzer és mtsai. 2009, Berke 2011) (6. ábra.).

Szabadon mozgó állatokban az FS sejtek erős, eseményhez-kapcsolódó tüzelésbeni változást mutattak, gyakran MSN aktivitás megváltozással egyidejűleg. Ennek oka az FS-MSN periszomatikus szinapszisban keresendő. Ez okozhatja a korábban említett zajos MSN depolarizált állapotváltozásokat (Berke 2011, Russo és mtsai. 2013).

3.4. Törzsdüci neuronok iktális aktivitása

A morfológiailag és elektrofiziológiailag azonosított törzsdüci neuronok iktális tüzelési mintázatát és időbeni dinamikáját már alaposan megvizsgálták neurolept anesztéziában, GAERS patkányokban (Slaght és mtsai. 2004, Paz és mtsai. 2005, 2007) (7. ábra.).

A kortiko-striatális neuronok iktális aktivitására jellemző a ritmikus depolarizáció, mely egy akciós potenciál formájában fáziskapcsoltságot mutat az SWD-k tüske komponensével. Striátumban a GABAerg FS sejtek rövid, nagy frekvenciájú kisülés-sorozatokban tüzelnek iktálisan, míg a striátum output neuronjai, az MSN sejtek, egyedül nagy ritmikus küszöb alatti depolarizáltságot mutatnak és akciós potenciál leadásuk az interiktális szakaszokra korlátozódik (Slaght és mtsai. 2004) (7. ábra). A kortiko-striatális és kortiko-thalamikus sejtekkel ellentétben a kortiko-szubthalamikus neuronokra robosztus aktivitás jellemző, mely két külön periódusra osztható, egyik jóval az SWD tüske előtt, a másik a tüske komponens körül mutat akciós potenciált. A glutamáterg szubthalamikus sejtek erős iktális tüzelés növekedése látható. Az SNr GABAerg neuronjai szintén megnövekedett iktális tüzelést mutatnak (Paz és mtsai. 2005).



7. ábra. Sematikus ábra a direkt és indirekt törzsdúci útvonalban résztvevő neuronok iktális aktivitásáról. Az FS, SNr és STN neuronok extracelluláris elvezetéssel, a többi sejt intracelluláris elvezetéssel regisztrált. A körben elhelyezett mínusz és pluszjelekkel szinaptikus kapcsolatok gátló illetve serkentő természete jelölt. A morfológiai rekonstrukciók relatív mérete a szemléltetés miatt módosult (Crunelli, Lőrincz és mtsai 2020)

Célkitűzés

Célunk az absence epilepsziás rohamok alatti striatális neuronaktivitás jellemzése, különös tekintettel a különböző neurontípusokra. Kísérleteinkben az iktális és interiktális striatális neuron aktivitásokat vizsgáljuk éber, immobilizált Stargazer egerekben. A következő specifikus kérdésekre kerestünk válaszokat:

1. MSN, FS és TAN neuronok elektromos aktivitása hogyan változik iktálisan?
2. MSN, FS és TAN neuronok elektromos aktivitása hogyan változik pre- és postiktálisan?
3. MSN, FS és TAN neuronok elektromos aktivitása éber absence epilepsziás agyban eltér-e a normál agyban, illetve az irodalomban már vizsgált neurolept anesztéziában találtaktól?

Anyagok és módszerek

1. Intrakortikális és epidurális elektródák készítése

Primer motoros kéreg (M1) helyi mezőpotenciál (LFP) regisztrálásához tripoláris elektródákat készítettünk. Egy elektródához három darab 50 μm átmérőjű polyimid szigetelt tungsten drótot (Tungsten 99.95%, California In Wire, Grover Beach, CA, USA) vezetünk át egy 180 μm belső átmérőjű, rozsdamentes acélból készült tubuson. A három drótot vertikálisan egymástól 400 μm távolságban helyeztük el. (8. ábra.)



8. ábra. Tripoláris elektróda készítés egyik pillanatfelvétele (Absence epilepszia vizsgálata szabadon mozgó Long-Evans patkányokban. Kozák Gábor & Berényi Antal 2019)

A szigetelés a tungsten drótok hegyéről valamint a tubus és a hárompólusú csatlakozó (Heilind electronics, USA) közötti részről volt eltávolítva. Az LFP elektróda föld és referencia elektródáit rozsdamentes acél csavarokból és csatlakozókból forrasztással készítettük (8. ábra.)

Az egy-sejt aktivitáshoz boroszilikát (Harvard Apparatus 10-30 M Ω ellenállású üveg elektródákat használtunk. Ennek referenciáját szigeteléssel együtt 330 μm átmérőjű ezüstszálból (A-M Systems Inc. USA) és apa típusú csatlakozóból (Heilind electronics, USA) állítottuk össze. A szigetelés eltávolítása után az ezüstszálat nátrium-hipoklorit (NaClO) oldatba helyeztük, hogy a felületen ezüst-klorid (AgCl) váljon ki. A forrasztás az alábbi ábra alapján készült.

2. A műtét kivitelezése

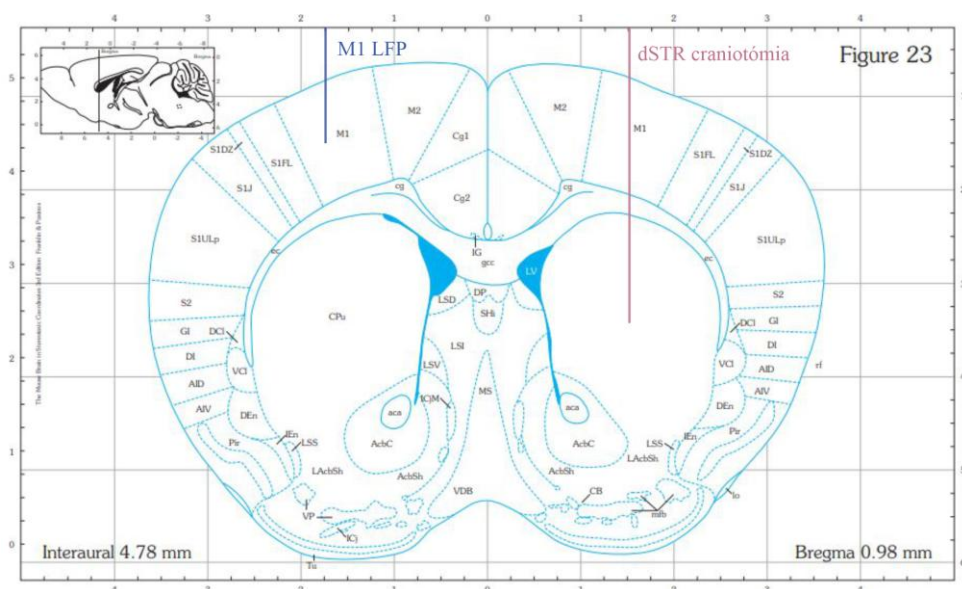
A beavatkozást fiatal felnőtt 20 g tömegű egereken végeztük izofluránnal, inhalációs altatásban. A tripoláris LFP elektróda a primer motoros kéregbe került, kontralaterálisan jelöltük a jövőbeni craniotómia, dorsalis striátum helyét. A föld és referencia elektródák a cerebellum fölé, epidurálisan kerültek.

A műtét kb. kettő- három órán át tartott, mely során a kezdeti magasabb izoflurán koncentrációt az idő előrehaladtával fokozatosan csökkentettük. A kisállatok műtete rezgésmentes asztalon elhelyezett, sztereotaxiás (David Kopf Small Animal Stereotaxic Model 902) készülék segítségével történt. A műtendő állat fejét két fémrúddal, az állat csontos hallójáratnál rögzítettük, fém rudak (ear-bar) végére 2%-os lidocain helyi érzéstelenítő kenőcs került. A szemeire szemkenőcsöt kentünk. A beavatkozás egy Leica M320 típusú sztereo mikroszkóp segítségével valósult meg. A egerek fiziológiás testhőmérsékletének műtét alatti fenntartása érdekében fűtőpadot használtunk.

Az állat szőrét ollóval majd Veet szőrtelenítő krémmel távolítottuk el, a fejbőrét povidon-jód oldattal (Betadine) fertőtlenítettük. A fejbőr alá 50 µl 2% lidocain oldatot fecskendeztünk majd elmasszíroztuk. Ezután 1-1,5 cm-es szagittálisan, a csupasz fejbőr középvonala mentén bemetszést ejtettünk a bőrön, anterior-posterior (AP) irányban használva a pengét. A bemetszésnél figyelembe vettük, hogy anterior irányban ne nyúljon túl a szemek vonalánál, valamint posterior irányban elegendő hely legyen a referencia elektródák implantálásához. A felmetszett fejbőrt medio-laterális (ML) irányban, két retraktor pálca segítségével ideiglenesen rögzítettük az ear-barokhoz.

A fejbőr alatti kötőszöveti állományt és csonthártyát eltávolítottuk, a vérzéseket elektromos kauterizálóval állítottuk el. A sztereotaxiás készülékkel az állat fejét AP és ML irányban is vízszintesre állítottuk. Ezt a készülék karjába fogott tűvel a koponyavarratok mentén tájékozódva ellenőriztük, és meghatároztuk a bregma valamint a lambda koordinátáit, amelyek támpontként szolgáltak a vizsgálandó agyterületek pontos meghatározásához. Az egér sztereotaxikus atlaszból (Paxinos és Watson 2006) korábban meghatározott koordinátákat bejelöltük a koponyacsont felszínén: unilaterálisan M1: AP: 1 mm ML:-1,65 mm DV: 1,2 mm (leghosszabb tungsten drót); és unilaterálisan dSTR: AP:1 mm ML:1,5 mm DV:2 mm-től (9. ábra).

Ezt követően a csont felszínét érdesítettük és Activatorral porózussá tettük, majd a koponyacsont megerősítéséért a Superbond nevű többkomponensű fogászati cementtel bevontuk a koponya felszínét. Ezután a föld és referencia elektródák, valamint a M1 koordinátáknál fogászati fűró segítségével, körkörös mozdulatokkal, vigyázva az agyhártyák épségére és az erősebb vérzések elkerülésére, craniotómiát végeztünk. A szabad agyfelszín kiszáradásának megakadályozásáért és a vérzések csillapításáért 4 °C-os fiziológiás sóoldatot (0,9 % Ringer) és lycostypt-t használtunk.



9. ábra. Egér agy coronalis metszete. Kékkel az primer motoros kérgi LFP elektróda helye, rózsaszínnel a dorsalis striatum craniotomia, majd a mérő üvegelektroda haladási útvonala látható (Paxinos és Franklin 2013).

A sztereotaxiás állvány karjának segítségével a dura mater-ig leengedtük a befogott tripoláris elektródát. Ekkor a készülék háromdimenziós karjainak segítségével óvatosan, dorsoventrálisan (z tengely) 1200 μm mélyre (leghosszabb drót) engedték az LFP elektródát. Ezután elhelyeztük a headfixáláshoz használatos acéllemezt és Pattern Resin fogászati műgyantával rögzítettük ezeket. Majd a föld és referencia elektródák epidurális behelyezése után az üvegelektrodával regisztrálni kívánt terület kivételével, egységesítettük a műgyanta bevonatot a koponya felszínén.

Postoperatív gyulladás csökkentéséért és a hegyszövet képződésének megelőzéséért intramuszkulárisan szteroid injekciót adtunk (Dexametazon 5 mg/ttkg). Egy hetes felépülési időszak mellett ivóvizükhöz carpofen fájdalomcsillapítót (Rycarfa 70 ml/dl) és baytril antibiotikumot (Enrofloxacin 20 mg/dl) adtunk. A felépülési időszak után elvégeztük a dSTR craniotómiát, egy hajlított tűvel feltártuk a dura matert és az agy felszínre kétkomponensű szilikon géllel réteget képeztünk, mellyel elkerülhető az agyfelszín kiszáradása és szennyeződése, ugyanakkor üvegelektrodával áthatolható. Ezek után pár egymást követő napon tudtunk regisztrálni, szükség esetén a craniotómiát tisztítottuk és a szilikon gél réteget cseréltük.

3. Elektrofiziológiai mérések kivitelezése

Az LFP regisztrálásához egy számítógép által vezérelhető erősítőt (CyberAmp 380, Axon Instrument) használtunk, az analóg jelek 10000-szeresen voltak erősítve. Az erősítő szűrőit 0,1-500 Hz-re állítottuk. Az erősített jeleket Spike2 szoftver által vezérelt CED 1401 (Cambridge Electronic Design) A/D konverter segítségével voltak digitalizálva 5kHz-es mintavételi frekvenciával.

A juxtacelluláris egysejt-aktivitás detektálása szintén számítógép által vezérelt erősítővel (Axoclamp 900A, Axon Instruments) történt, 20-100-szoros erősítést alkalmazva, 0,1-10000 Hz-re állítva a szűrőket. Az erősített jelek digitalizálása a CED 1401 A/D konverterrel történt, 25 kHz-es mintavételi frekvencián. Egy-sejt aktivitás mérőelektroda egy 1,2 mm átmérőjű, boroszilikát üvegből húzott, fiziológias sóoldattal feltöltött mikropipetta (a hegy átmérője 0,5-2 μm) volt, a kapcsolatot a fejerősítővel egy Ag/AgCl elektroda biztosította. Az elektroda polarizációja gátolná a rendszeren keresztül folyó pozitív áramot, ezért az ezüstszálat a regisztrálást megelőzően nátrium-hipoklorit (NaClO) oldatba helyeztük, hogy a felületen ezüst-klorid (AgCl) váljon ki. Az így létrejött ezüst/ezüst-klorid (Ag/AgCl) szálát tartalmazó elektrodok ellenállásának értéke 5-35 $\text{M}\Omega$ érték közé esett. Egy mágneses talpú tartóhoz rögzített háromtengelyes makromanipulátor segítségével a dSTR craniotómia fölé pozicionáltuk a boroszilikát elektrodát benne az Ag/AgCl szállal. Az agyfelszín elérésekor záródott az áramkör, megjelentek helyi mezőpotenciálok a feszültség-idő regisztrátumokon. Ekkor 0-ra állítottuk a mikromanipulátor pozícióját, ezáltal a későbbi regisztrált sejt agyfelszíntől való távolsága hozzávetőlegesen meghatározható volt. Ezután egy egy-tengelyes manipulátorral dorsoventrális (DV) tengely mentén 10 μm -es lépésenként áthaladtunk az agykérgen, majd 2000 μm -tól elérve a striátumot, 2 μm /lépés sebességgel vadásztunk a sejtekre. Egy 300 Hz-es felüláteresztő, szoftveres szűrővel voltak láthatóak az akciós potenciálok. Amint egy akciós potenciál amplitúdója meghaladta a zajszint 2-3 szorosát, a manipulátorral megálltunk az adott pozícióban, és elkezdődhetett a regisztrálás.

4. Kiértékelési módszer

Az LFP 50 Hz-es zaját szükség esetén Spike2 (Cambridge Electronic Design Ltd. Data Acquisition and Analysis) hum remove offline funkciójával távolítottuk el.

Az LFP jelen az iktális (roham alatti) SWD ciklusok kezdetét és végét amplitúdó és frekvencia változás alapján határoztuk meg. Az összes regisztrátumon az SWD ciklusokat 2 s időtartam felett ítéltük rohamnak. Az 1 s-nál hosszabb rohammentes állapotot interiktális (rohamok közötti) szakasznak tekintettük.

A neuronokat három csoportba osztottuk átlagos tüzelési ráta (Hz), akciós potenciál szélesség és variációs koefficiens (CV) alapján (1. táblázat.) Az egy-sejt aktivitásokról hullámjeleket készítettünk, amellyel meghatározható volt a roham alatti és rohamok közötti átlagos tüzelési ráta, mely Hz/s-ban értendő. Ezekből minden egyes neuronra modulációs indexet (MI) számoltunk, az alábbi képlet szerint.

$$MI = \frac{(\text{Iktális tüzelési ráta} - \text{interiktális tüzelési ráta})}{(\text{Iktális tüzelési ráta} + \text{interiktális tüzelési ráta})}$$

Az akciós potenciálok szélességét az amplitúdó 50%-os értékénél határoztuk meg.

A variációs koefficiens az adott neuron interiktális tüzelésének szórása és az interiktális átlagos tüzelési rátájának hányadosa adta.

$$CV = \frac{(\text{Interiktális tüzelés szórása})}{(\text{Interiktális átlagos tüzelési ráta})}$$

A sejteket ezen paramétereik alapján osztottuk közepes tuskés sejtekre (MSN), tranziensen aktív neuronokra (TAN) gyorsan tüzelő interneuronokra (FS).

sejttípus	AP szélesség (ms)	CV
TAN	>0,45	<1,5
MSN	>0,45	>1,5
FS	<0,4	

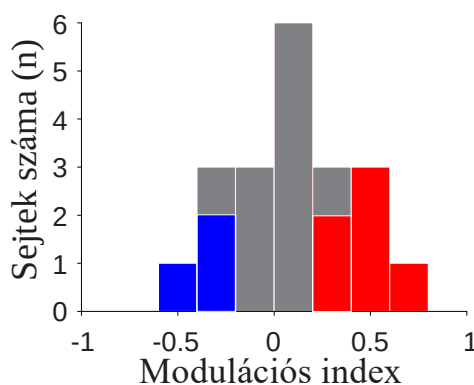
1. táblázat. Táblázat a neuronok csoportosításáról akciós potenciál szélesség és variációs koefficiens szerint

A sejteket iktális és interiktális tüzelés változás szignifikanciája alapján is csoportosítottuk, miszerint vagy csökkentették vagy növelték a tüzelésüket.

Eredmények és kiértékelésük

Kísérleteink során 5 db Stargazer egérből 30 db striátum sejtet regisztráltunk, ebből 20-at mutatunk be, regisztrált neuronként említve. A regisztrált neuronok mindegyike kiváló jel/zaj aránnyal rendelkezett és legtöbbször egyetlen neuron akciós potenciáljai voltak láthatók a regisztrátumon, de két esetben két striatális neuront regisztráltunk egyidejűleg.

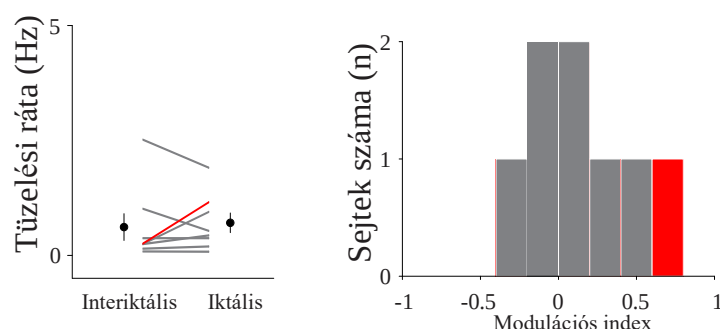
A regisztrált sejtek közül 6 db roham alatt növelte tüzelését, 4 db csökkentette és 12 db esetén nem változott szignifikánsan a tüzelés.



10. ábra. A regisztrált striatális sejtek modulációs indexeinek eloszlása. Kékkel a szupresszált sejteket, szürkével a tüzelésüket nem változtató sejteket, pirossal pedig a roham alatt megnövekedett tüzelési rátával jellemezhető sejteket ábrázoltuk.

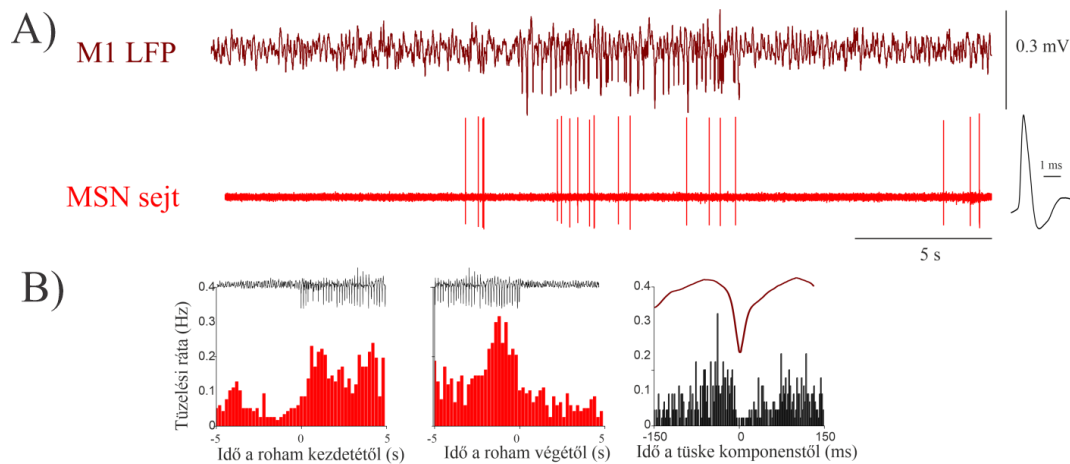
Közepes tüskés sejtek

A 20 db regisztrált sejt közül 8 db-ot határoztunk közepes tüskés sejtnek, 1 esetben tüzelés serkentettségét valamint 7 esetben nem találtunk szignifikáns változást (12. ábra.).



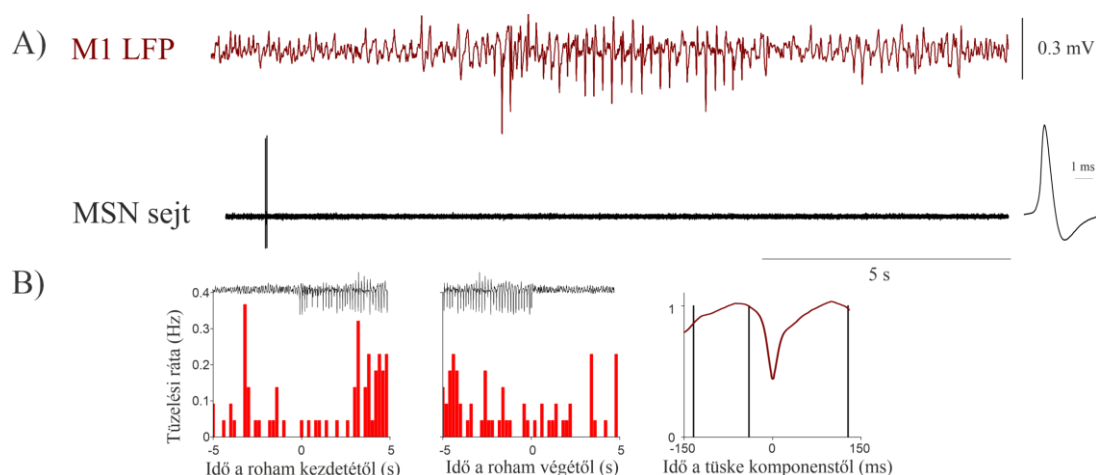
11. ábra. Regisztrált MSN sejtek átlagos tüzelési rátája és modulációs indexe. Bal oldalon interiktális és iktális tüzelési ráta Hz-ben (n=8). Pirossal látható a roham alatt serkentetten tüzelő közepes tüskés sejtek, szürkével a tüzelését szignifikánsan nem változtató sejtek. Feketével látható az átlagos tüzelési ráta iktálisan és interiktálisan. Jobb oldalon a modulációs index hisztogramja látható, a regisztrált 8 db közepes tüskés sejtről.

Az MSN neuronok (serkentett + szignifikánsan nem változó) átlagos tüzelési rátája iktálisan 0,7 Hz, interiktálisan 0,6 Hz. Az átlagos AP szélesség $\sim 0,66$ ms volt. A serkentett MSN sejt AP szélessége: 0,6 ms volt (12. ábra.). Ez éber patkányból regisztrált MSN sejtektől csupán 0,7 ms (Planert és mtsai. 2013).



12. ábra. Serkentett MSN neuron. A) Felül a primer motoros kérgi LFP, alatta az iktálisan serkentett közepes tüskés sejt elektromos aktivitása. Jobb oldalon a sejt akciós potenciáljainak átlaga látható finomabb beosztású időskálán. B) A roham kezdete és vége pirossal, és a neuron átlagos tüzelésének változása közötti összefüggés. Jobb oldalon, a vörös görbe az átlagolt tüske-hullám kisülés. Az oszlopdiagram a serkentett MSN neuron tüzelési rátájának eloszlása a tüske-hullám kisüléshez viszonyítva.

A reprezentált serkentett MSN sejt átlagos tüzelési rátája iktálisan 1,16 Hz, interiktálisan 0,26 Hz. A serkentett MSN sejt megnövekedett iktális tüzelését az offsetet követően szüneteltette 5-6 s-ig, mely érdekes az altatott patkány modellben találtak szempontjából. Patkányban SWD ciklus alatt az aktivitását szüneteltető sejt, interiktálisan kisülés-sorozatos tüzelésbe kezdett (Slaght 2004). A neuron aktivitás preferenciája a hullám - tüske komponens váltásra tehető. Jól látható a tüske komponenssel egyidejű jelentős sejtaktivitás csökkenés (12. ábra. B). A tüzelését szignifikánsan nem változtató sejt tüzelési rátája iktálisan 0,2 Hz interiktálisan 0,15 Hz. Az akciós potenciál szélesség valamint az iktális aktivitás között nem találtunk összefüggést. (Serkentett: 0,6 ms, nem serkentett: 0,65 ms; a nem serkentett itt 0,54-1 ms között változó).



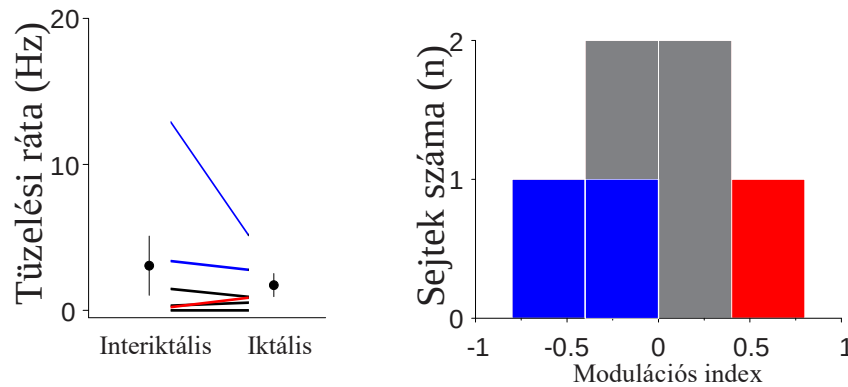
13. ábra. Tüzelését szignifikánsan nem változtató MSN neuron. A) LFP és egy-sejt aktivitás szemléltetése. Jobb oldalon az akciós potenciál alakja. B) A sejt iktális (bal) és interiktális (középső) tüzelési rátájában nem volt szignifikáns változás. Jobb oldalon látható, hogy a túske-hullám kisülések alatt a sejtnak nincs kitüntetett tüzelési preferenciája.

Fiziológiás agyi állapot esetén éber MSN neuron aktivitás csökkenést írtak le a lassú hullámú alváshoz képest (Mahon 2006). A mi regisztrátumainkban egy serkentett esetet kivéve nem volt aktivitás változás iktálisan, $n=7$ esetben. Neurolept anesztéziában vizsgált patkány modellből extracellulárisan regisztrált MSN sejtek kizárólag az interiktális szakaszokban tüzeltek (Slaght 2004). Regisztrációink során nem találtunk iktálisan szupresszált MSN sejtet, sem az SWD ciklus alatt tüzelését szüneteltető sejtet. Figyelembe véve a modellállatbeli, valamint éber/alvó állapotbeli különbségeket, lehetséges, hogy van szupresszált/ tüzelését szüneteltető MSN sejt Stargazer egér modellben is. A serkentett és szupresszált sejtek az SWD ciklusok hullám komponensét kísérik.

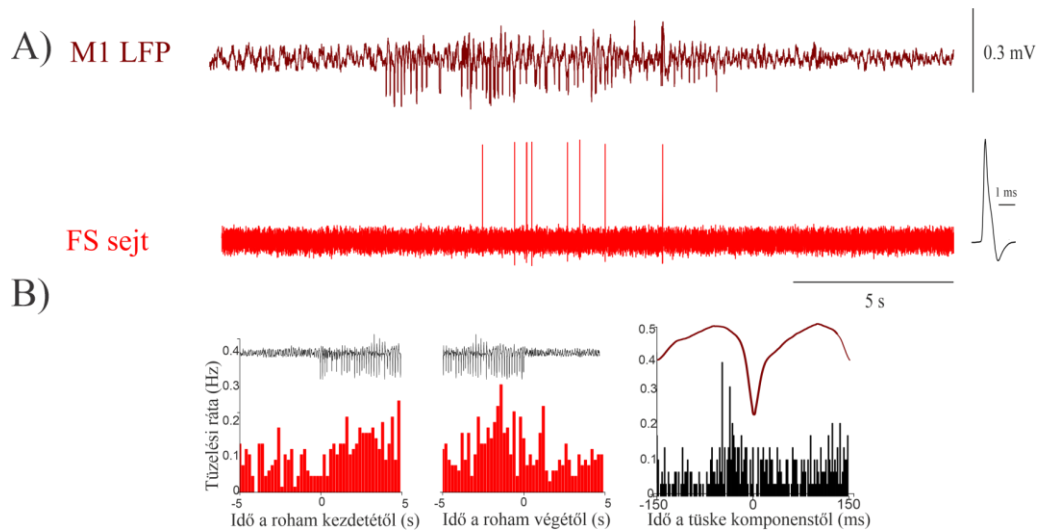
Gyorsan tüzelő interneuronok

A 20 db regisztrált sejtől, 6 db gyorsan tüzelő interneuron. Ebből 1 db a roham alatt serkentetten tüzelt, három db nem változtatta szignifikánsan, kettő db pedig csökkentette tüzelését a rohamok alatt.

Az FS sejtekre változatos tüzelési mintázat és keskeny AP alak jellemző (Ma és mtsai. 2006, Berke és mtsai. 2011), az összes regisztrált FS sejt AP szélessége átlagosan 0,29 ms volt, mely a szakirodalomban 0,31-0,43 ms-nak megfelel. Érdekes, hogy a regisztrált FS sejtekből az iktálisan serkentett sejtnak volt a legszélesebb (0,38 ms), míg az iktálisan szupresszált sejtnak a legkisebb (0,22 ms) AP szélessége (ezek reprezentáltak: 14. ábra. A), 15. ábra. B)). A összes regisztrált FS sejt átlagos tüzelési rátája iktálisan 1,7 Hz, interiktálisan 3 Hz.



14. ábra. Bal oldalon az átlagos tüzelési ráta Hz-ben interiktálisan és iktálisan. Pirossal jelölve a roham alatt serkentetten FS neuronok, szürkével a tüzelését szignifikánsan nem változtató sejteket, kézzel a roham alatt tüzelését csökkentő sejtek. Fekete ponttal jelezve az átlagos tüzelési ráta iktálisan és interiktálisan. Jobb oldalon a modulációs index hisztogramja a regisztrált 6 db FS sejtről.

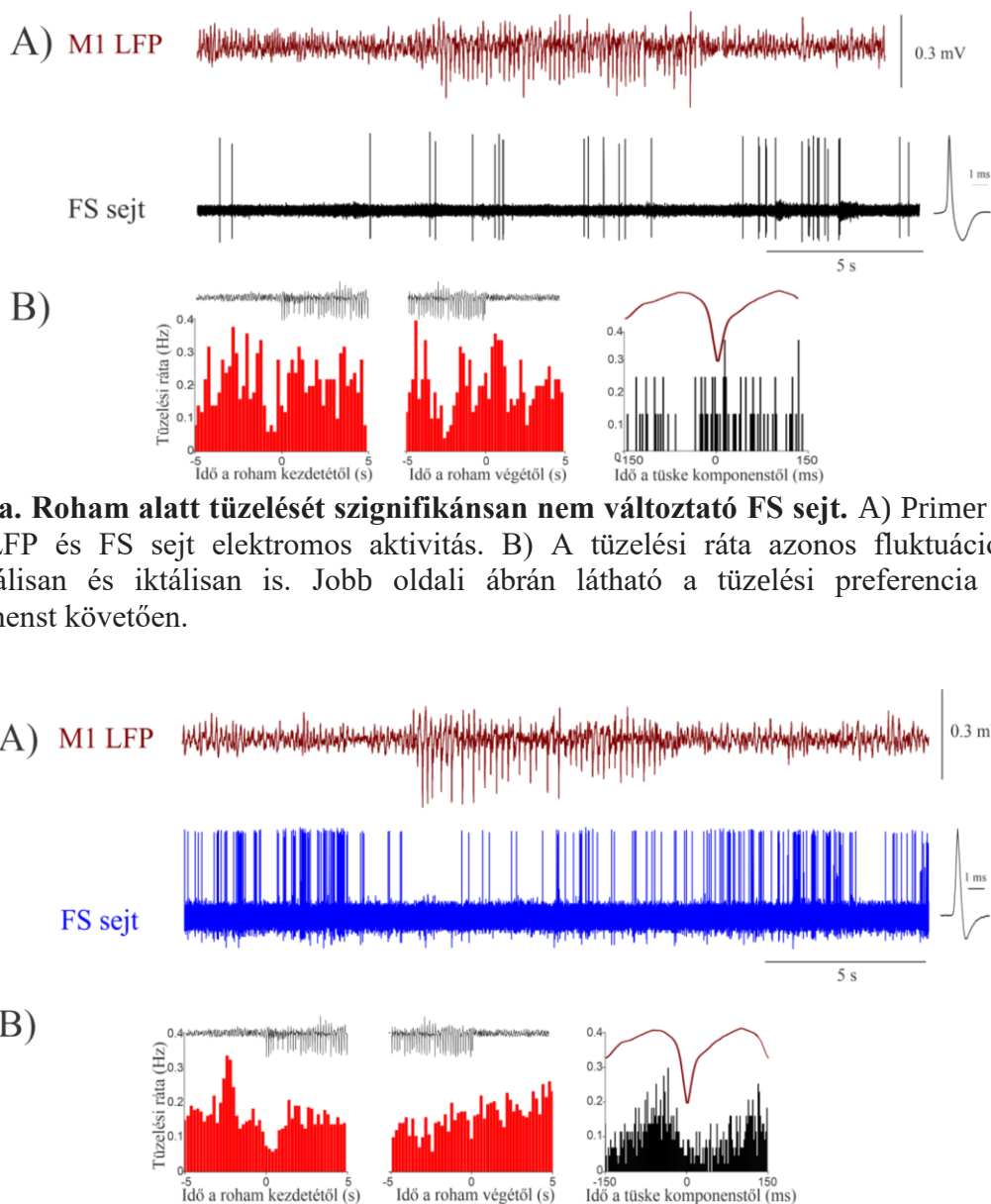


15. ábra. Roham alatt serkentett tüzelésű FS sejt. A) Primer motoros kérgi LFP és FS sejt elektromos aktivitás. B) A sejt iktális és interiktális tüzelési ráta közötti különbség jól látható. Jobb oldali ábrán, a reprezentált neuron az SWD-k hullám komponense alatt preferál tüzelni.

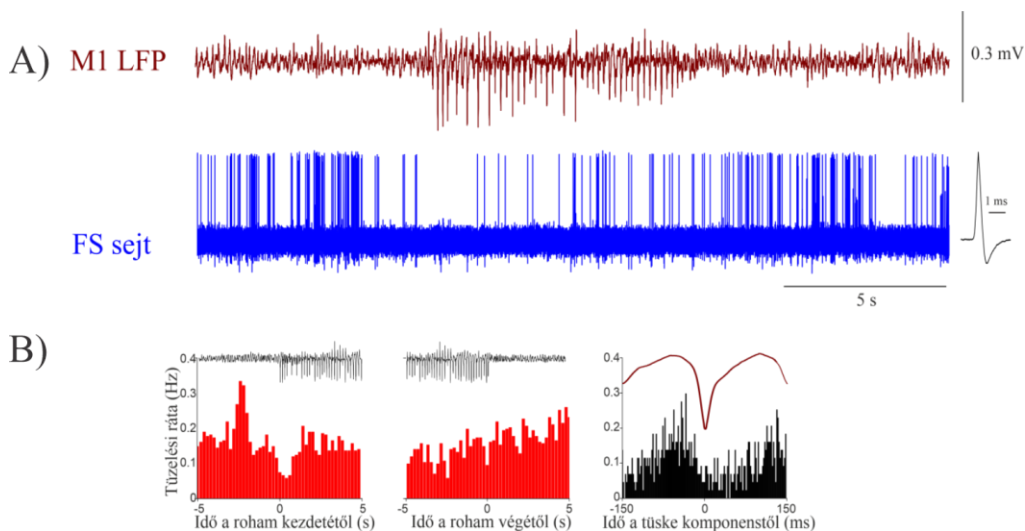
A roham alatt tüzelését szignifikánsan nem változtató FS sejtek ($n=3$) szabálytalan tüzelési mintázatot mutatnak, átlagos tüzelési rátájuk iktálisan 0,5 Hz, interiktálisan 0,6 Hz.

Altatózott patkány modellben a robosztus Cl^- dependens gátlással jellemzett FS sejtek interiktálisan szabálytalanul, iktálisan az SWD komponenseket kísérve kisülés-sorozatosan tüzeltek (Slaght 2004). Az általunk regisztrált FS sejtek közül a tüzelésüket szignifikánsan nem változtató sejtek, függetlenül hogy roham alatt, vagy interiktálisan figyeltük meg szabálytalan tüzelést mutattak. Míg a roham alatt tüzelésüket csökkentő FS sejtekre rövid, nagy frekvenciájú kisülés-sorozatos tüzelés volt jellemző, amely iktálisan szupresszált volt

(17. ábra). Ezen FS sejtek ($n=2$) átlagos tüzelési rátája iktálisan 3,9 Hz, interiktálisan 8,1 Hz. Az egyetlen serkentett FS sejt szabályos 0,9-1 Hz-es iktális tüzelést mutat, mely interiktálisan 0,25 Hz-re csökken. A serkentett és szupresszált sejtek az SWD ciklusok hullám komponensét kísérik.



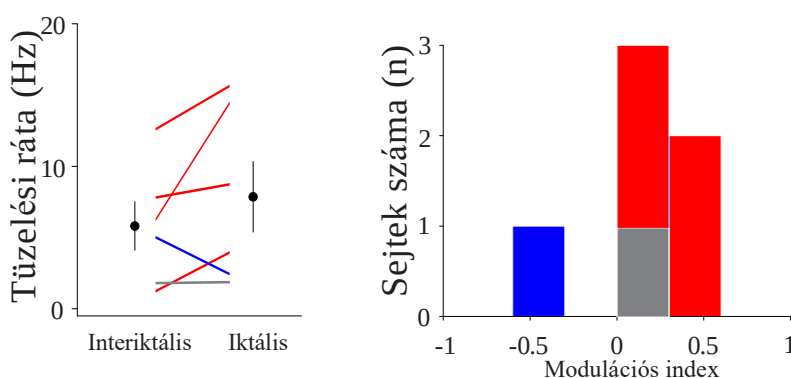
16. ábra. Roham alatt tüzelését szignifikánsan nem változtató FS sejt. A) Primer motoros kérgi LFP és FS sejt elektromos aktivitás. B) A tüzelési ráta azonos fluktuációt mutat interiktálisan és iktálisan is. Jobb oldali ábrán látható a tüzelési preferencia a tüske komponensét követően.



17. ábra. Roham alatt tüzelését csökkentő FS sejt. A) Primer motoros kérgi LFP és elektromos sejtaktivitás. B) Megfigyelhető a megnövekedett interiktális tüzelés a csökkent iktálissal szemben. Jobb oldalon látható a tüzelési preferencia a hullám-tüske komponens átmenet alatt, mely a tüske komponensétől fokozatosan nő a hullám komponens végéig.

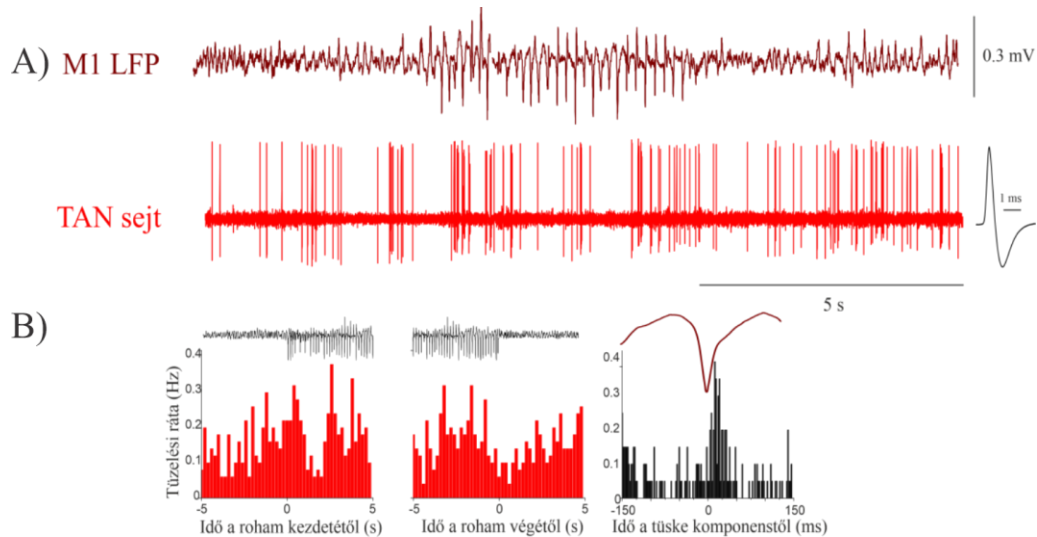
Tranziensen aktív neuronok

A 20 db regisztrált sejtből 6 db tranziensen aktív neuron. Ebből 4 db a roham alatt serkentve tüzel, 1 db nem változtatta szignifikánsan, 1 db pedig csökkentette tüzelését a rohamok alatt. Átlagos tüzelési rátájuk iktálisan 13,7 Hz, interiktálisan 14,9 Hz. Az átlagos AP szélesség 0,64 ms volt, amely az éber, egészséges patkányban 0,7 ms (Inokawa és mtsai 2010). Az AP szélesség valamint az iktális aktivitás között nem találtunk összefüggést (Serkentett átlagosan 0,68 ms, szupresszált: 0,54 ms ; a nem serkentett itt 0,56 ms) (18. ábra).

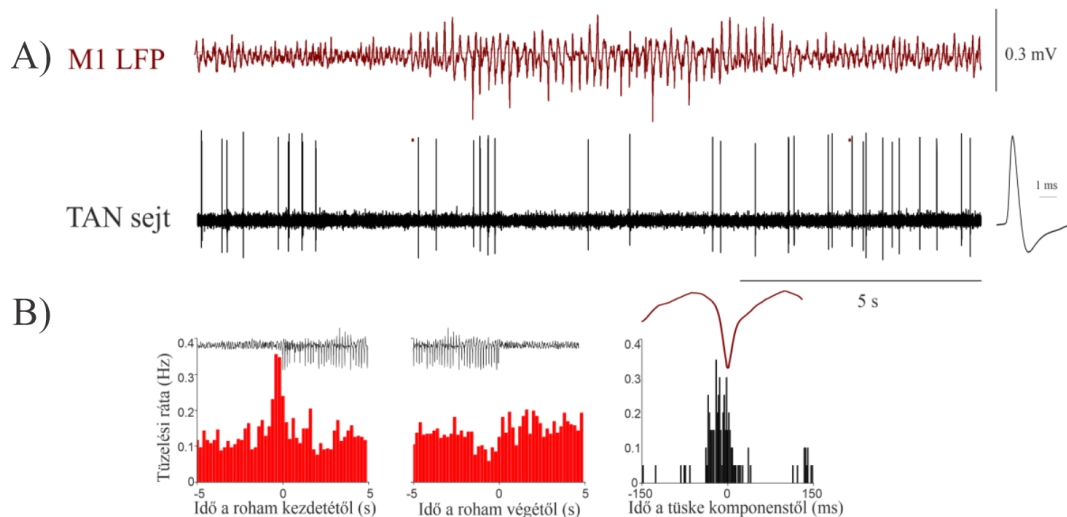


18. ábra. TAN neuronok tüzelési rátája és modulációs indexe. Bal oldalon a TAN neuronok átlagos tüzelési rátája Hz-ben interiktálisan és iktálisan. Pirossal jelölve a roham alatt serkentve, szürkével a tüzelését szignifikánsan nem változtató, kézzel a roham alatt tüzelését csökkentő sejt. Fekete csillaggal az iktális és interiktális átlagokat. Jobb oldalon a modulációs index hisztogramja a regisztrált 6 db TAN sejtről.

A reprezentált tüzelését szignifikánsan nem változtató TAN sejt interiktálisan rövid kisülés-sorozatos, iktálisan tranziens tüzelést mutat. Iktális tüzelésük az SWD ciklus tüske komponensét kísérik (20. ábra). Az irodalomban AE állapotban striatális TAN sejtekről nincs adat. Az éber, egészséges patkányban leírt elnyújtott tranziens tüzelés (Inokawa és mtsai. 2010) a serkentett és tüzelését nem változtató TAN sejtek iktális aktivitásában is részben megfigyelhető.



19. ábra. Roham alatt serkentett tüzelésű TAN sejt. A) Primer motoros kérgi LFP és egysejt aktivitás. Jobb oldalon az AP alakja. B) Tüzelési ráta preiktális, valamint iktális növekedése jól látható, iktálisan 1 s-os aktivitás csökkenéssel. Jobb oldalon az átlagolt tüskehullám kisülés komponens a tüzelési valószínűségben, a tüske komponens után preferál tüzelni.



20. ábra. Roham alatt tüzelését szignifikánsan nem változtató TAN sejt. A) Primer motoros kérgi LFP elektromos sejtaktivitás. Jobb oldalon az AP alakja. B) Tüzelési ráta iktálisan (bal) és interiktálisan (jobb). Érdekes, hogy közvetlenül az onset előtt az átlagos tüzelési ráta megnő, majd változatlan marad iktálisan és interiktálisan. Jobb oldalon látható tüzelési preferencia a tüske komponens előtt illetve alatt.

Összefoglalás

Kísérleteink legfőbb eredményei a következők: 1. MSN sejtek szabályos tüzelést mutatnak 2. a regisztrált MSN neuronok döntő többsége nem változtatja átlagos tüzelési rátáját az iktális szakaszokban; 3. az FS neuronok különböző időskálákon összefüggést mutatnak a tüske-hullám kisülésekkel; 4. az FS három elkülönített aktivitásban szabálytalan és/vagy nagy frekvenciájú kisülés-sorozatos tüzelést mutattak; 5. TAN sejtek tranziens tüzelés mellett kisülés-sorozatos tüzelést is mutatnak 6. a TAN sejtek a tüske-hullám kisülések tüske komponensét követték tüzelésük során.

Munkánk során elsőként regisztráltuk a különböző striatális sejttypusok aktivitását, immobilizált Stargazer egerekben. A tény, hogy egyes sejtek rohamokkal összefüggő aktivitást mutattak nem meglepő, hiszen a striátum az egyik legnagyobb serkentő kérgi bemenetet fogadó szubkortikális mag. Meglepő viszont, hogy a regisztrált MSN neuronokból csupán 1 db mutatott serkentettséget iktálisan, annak ellenére hogy az MSN neuronok a striátum egyetlen kimeneti forrás a többi törzsdüci mag felé. A korábban altatott patkányban leírt striatális iktális és interiktális tüzelési rátákhoz hasonlóan a mi regisztrátumainkban is markáns heterogenitást tapasztaltunk, olykor a leírtaktól eltérő módon. Ennek oka az eltérő állatmodell típusban és éberségi állapotban keresendő. Gyorsabb időskálán szemlélve (minden egyes jellemzett sejt ábrájának B) része) a serkentett MSN sejt a hullám-tüske komponens átmenete előtt tüzelési maximum, de a tüske komponens alatt és közvetlenül előtte, utána jelentős aktivitás csökkenés látható. Ennek oka lehet az MSN sejtekre érkező több tucat GABAerg interneuron bemenet lehet, melyekből az FS sejtek periszomatikusan szinaptizálnak az MSN sejtekkel (Berke 2011). Valamint a TAN sejtek, a parafascikuláris thalamikus mag egyetlen serkentő bemenetet fogadó sejtjei (Pisari és mtsai. 2007). Ezek az MSN sejtekkel ellentétben, az SWD ciklusok tüske komponensénél mutattak tüzelési maximumot, ez igaz a serkentve illetve tüzelését nem változtató sejtekre is. Valószínű az interneuronoktól érkező hullám komponens alatti és tüske komponens körüli gátlás vet véget az MSN iktális aktivitásnak, így a regisztrátumok során nem látunk tüzelésbeni változást.

Ebből az következik hogy az interneuronok csupán szelektíven, specifikusan az AE kortiko-thalamikus hálózattól érkező túlserkentettséget modulálhatják. Erre jó példa lehet az altatott AE-ás patkány MSN aktivitásának kizárólag interiktális szakaszokban történő aktivitása is (Slaght 2004). Az FS és TAN neuronok iktális aktivitása ritmikus és szoros összefüggést mutat az EEG ritmikus aktivitásával. Két esetben sikerült két neuront regisztrálnunk egyidejűleg, ebből az egyik egy TAN-MSN pár volt. A serkentett TAN neuron 15 Hz-es

iktális átlagos tüzelési rátával, kisülés-sorozatos tüzelést mutatott, az MSN sejt 0,5 Hz-es iktális átlagos tüzelési rátája, interiktálisan a dupláját mutatta. Ez nagy valószínűséggel egy eredményes parafascikuláris magból érkező, TAN sejt közvetített szelektív MSN gátlás.

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy az absence kortiko-thalamikus rohamok elsősorban a striatális interneuronok aktivitását befolyásolják, majd ezek szinaptikus áttevődése szelektíven gátolja az MSN neuronok működését. Fontos lenne további regisztrációkat folytatni az striátumban Stargazer egérben, valamint az AE kutatásban leggyakrabban használt állat modellben, a GAERS patkányokban is, hogy még pontosabb képet kapjunk az iktális heterogenitásról, valamint a jelen dolgozatban megállapított eredmények korrelatív vizsgálatokkal történő összehasonlításához. Terveink között szerepel a törzsdúci magvak és kérgi áréák LFP jeleinek korrelatív és időbeni vizsgálata, valamint a törzsdúci magvak különböző sejtípusainak iktális jellemzése.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezető tanáromnak, Dr. Lőrincz László Magornak szakmai segítségét, adatelemzésben nyújtott segítségét, segítőkészségét és hogy lehetőséget biztosított dolgozatom elkészítéséhez. Köszönöm nagyszüleimnek, páromnak, testvéreimnek és barátaimnak hogy mindig mellettem állnak.

2022.11.13.

Irodalomjegyzék

Crunelli V, Lőrincz ML, és mtsai Clinical and experimental insight into pathophysiology, comorbidity and therapy of absence seizures. *Brain*. 2020 Aug 1;143(8):2341-2368.

Berke JD. Functional properties of striatal fast-spiking interneurons. *Front Syst Neurosci*. 2011 Jun 20;5:45.

Choi K, Holly EN, Davatolhagh MF, Beier KT, Fuccillo MV. Integrated anatomical and physiological mapping of striatal afferent projections. *Eur J Neurosci*. 2019 Mar;49(5):623-636.

Deransart C és mtsai. Single-unit analysis of substantia nigra pars reticulata neurons in freely behaving rats with genetic absence epilepsy. *Epilepsia*. 2003 Dec;44(12):1513-20.

Foster NN és mtsai The mouse cortico-basal ganglia-thalamic network. *Nature*. 2021 Oct;598(7879):188-194.

Fonseca Wald ELA, és mtsai Towards a Better Understanding of Cognitive Deficits in Absence Epilepsy: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuropsychol Rev*. 2019 Dec;29(4):421-449.

Guo ZV, Inagaki HK, Daie K, Druckmann S, Gerfen CR, Svoboda K. Maintenance of persistent activity in a frontal thalamocortical loop. *Nature*. 2017 May 11;545(7653):181-186.

Harris és mtsai Hierarchical organization of cortical and thalamic connectivity. *Nature*. 2019 Nov;575(7781):195-202.

Hintiryan H és mtsai The mouse cortico-striatal projectome. *Nat Neurosci*. 2016 Aug;19(8):1100-14.

Inokawa H és mtsai Juxtacellular labeling of tonically active neurons and phasically active neurons in the rat striatum. *Neuroscience*. 2010 Jun 30;168(2):395-404.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*. 1995 Dec;18(12):527-35.

Knierim J, Johns Hopkins University 2020 Basal Ganglia Neuroscience

Klaus A, Planert H, Hjorth JJ, Berke JD, Silberberg G, Kotaleski JH. Striatal fast-spiking interneurons: from firing patterns to postsynaptic impact. *Front Syst Neurosci*. 2011 Jul 13;5:57.

Kozák Gábor & Berényi Antal Absence epilepszia vizsgálata szabadon mozgó Long-Evans patkányokban. 2019

Kreitzer AC. Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu Rev Neurosci*. 2009;32:127-47.

Letts VA. Stargazer--a mouse to seize! *Epilepsy Curr.* 2005 Sep-Oct;5(5):161-5.

Ma Y, Hu H, Berrebi AS, Mathers PH, Agmon A. Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice. *J Neurosci.* 2006 May 10;26(19):5069-82.

Mahon S, Vautrelle N, Pezard L, Slaght SJ, Deniau JM, Chouvet G, Charpier S. Distinct patterns of striatal medium spiny neuron activity during the natural sleep-wake cycle. *J Neurosci.* 2006 Nov 29;26(48):12587-95.

Mandelbaum G és mtsai Distinct Cortical-Thalamic-Striatal Circuits through the Parafascicular Nucleus. *Neuron.* 2019 May 8;102(3):636-652.e7.

Meyer J, Maheshwari A, Noebels J, Smirnakis S. Asynchronous suppression of visual cortex during absence seizures in stargazer mice. *Nature Communications* 2018; 9: 1938.

Middleton FA, Strick PL. Basal ganglia output and cognition: evidence from anatomical, behavioral, and clinical studies. *Brain Cogn.* 2000 Mar; 42(2):183-200.

Noebels JL, Qiao X, Bronson RT, Spencer C, Davisson MT. Stargazer: a new neurological mutant on chromosome 15 in the mouse with prolonged cortical seizures. *Epilepsy Res.* 1990 Nov; 7(2):129-35.

Paxinos and Franklin The mouse brain stereotaxic atlas 2013

Paz JT, Chavez M, Saillet S, Deniau JM, Charpier S. Activity of ventral medial thalamic neurons during absence seizures and modulation of cortical paroxysms by the nigrothalamic pathway. *J Neurosci.* 2007 Jan 24;27(4):929-41.

Paz JT, Deniau JM, Charpier S. Rhythmic bursting in the cortico-subthalamo-pallidal network during spontaneous genetically determined spike and wave discharges. *J Neurosci.* 2005 Feb 23;25(8):2092-101.

Planert H, Berger TK, Silberberg G. Membrane properties of striatal direct and indirect pathway neurons in mouse and rat slices and their modulation by dopamine. *PLoS One.* 2013;8(3):e57054. doi: 10.1371/journal.pone.0057054. Epub 2013 Mar 1. PMID: 23469183; PMCID: PMC3585935.

Pisani A, Bonsi P, Picconi B, Tolu M, Giacomini P, Scarnati E. Role of tonically-active neurons in the control of striatal function: cellular mechanisms and behavioral correlates. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2001 Jan;25(1):211-30.

Puig MV, Ushimaru M, Kawaguchi Y. Two distinct activity patterns of fast-spiking interneurons during neocortical UP states. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jun 17;105(24):8428-33.

Russo G, Nieuwenhuis TR, Maggi S, Taverna S. Dynamics of action potential firing in electrically connected striatal fast-spiking interneurons. *Front Cell Neurosci.* 2013 Nov 14;7:209.

Slaght SJ, Paz T, Chavez M, Deniau JM, Mahon S, Charpier S. On the activity of the corticostriatal networks during spike-and-wave discharges in a genetic model of absence epilepsy. *J Neurosci*. 2004 Jul 28;24(30):6816-25.

Sherman, S.M., 2016. Thalamus plays a central role in ongoing cortical functioning. *nature Neuroscience* 19, 533-541

Silbereis JC, Pochareddy S, Zhu Y, Li M, Sestan N. The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron*. 2016 Jan 20;89(2):248-68.

Taverna, Barbara Canciani, Cyriel M.A. Pennartz, Membrane properties and synaptic connectivity of fast-spiking interneurons in rat ventral striatum, *Brain Research*, Volume 1152, 2007, Pages 49-56, ISSN 0006-8993

Tepper JM, Bolam JP. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol*. 2004 Dec;14(6):685-92.

Slaght SJ, Paz T, Chavez M, Deniau JM, Mahon S, Charpier S. On the activity of the corticostriatal networks during spike-and-wave discharges in a genetic model of absence epilepsy. *J Neurosci*. 2004 Jul 28;24(30):6816-25.

Sherman, S.M., 2016. Thalamus plays a central role in ongoing cortical functioning. *nature Neuroscience* 19, 533-541

Silbereis JC, Pochareddy S, Zhu Y, Li M, Sestan N. The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron*. 2016 Jan 20;89(2):248-68.

Simonyan K. Recent advances in understanding the role of the basal ganglia. *F1000Res*. 2019 Jan 30;8:F1000 Faculty Rev-122.

TÉTELES SZERZOI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Zsigri Nikolett** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott **Az éber striátum iktális heterogenitása** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat ^{1*}	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán [#] jellemezve)
<i>A műtétek kivitelezése, elektródák készítése¹</i>	5
<i>A vizsgálandó állatok műtete, gondozása műtét előtt és után²</i>	5
<i>Elektrofiziológiai regisztrációk kivitelezése és végrehajtása³</i>	5
<i>A pályamunkában leírt eredmények kiértékelése⁴</i>	3
<i>Az adatok statisztikai feldolgozása⁵</i>	3

Kelt: Szeged, 2022.11.13.

(Kérjük a dőlttel jelölt részeket értelemszerűen adják meg. A táblázat szükség szerint értelemszerűen módosítható).



Pályamunkát benyújtó hallgató

Zsigri Nikolett

aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető Lőrincz László Magor

Egyetemi Docens

SZTE, TTIK

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

^{1*} Az alábbi lista mintául szolgál, szabadon módosítható / bővíthető.

#Magyarázat:

A munkafolyamatokban való részvétel mértékét ötfokozatú skálán kérjük értékelni. A skála egyes értékeinek jelentése:

5 – Felkészítés után a feladat teljes egészét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

4 – Felkészítés után a feladat több mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

3 – Felkészítés után a részfeladat felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

2 – Felkészítés után a részfeladat kevesebb mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

1 – A részfeladatot folyamatos segítséggel végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

¹*A szerző hallgató BSc-s szakdolgozóként kezdett laborunkban. A műtétek kivitelezését, elektródák készítését és egyéb előkészületeket önállóan végezte, témavezetői egyeztetéssel.*

²*A vizsgálandó állatokat a hallgató önállóan műtötte be, az állatok gondozását a műtétet megelőzően és követően a hallgató önállóan végezte.*

³*Az elektrofiziológiai regisztrációk kivitelezését és végrehajtását a szerző hallgató önállóan végezte, szükség esetén témavezetői egyeztetéssel.*

⁴*A pályamunkához szükséges mennyiségben a szerző hallgató önállóan végezte, témavezetői konzultációkkal.*

⁵*Az adatok regisztrátumokból való számszerű kinyerését és táblázatba rendezését a szerző hallgató önállóan végezte, az adatok interpretálását és azokból szemléltető ábrák készítését a témavezetőjének segítségével végezte.*