

Tézisfüzet

Pázmány Péter Katolikus Egyetem

Információs Technológiai és Bionikai kar

Kerekes Bálint Péter

**A HUMÁN AGYKÉREG IN VITRO VIZSGÁLATA
KOMBINÁLT KÉT-FOTON IMAGING,
ELEKTROFIZIOLÓGIAI ÉS ANATÓMIAI MÓDSZEREKKEL**

Témavezető Ulbert István



Budapest

2015

1 Bevezetés

Az epilepszia az egyik leggyakoribb neurológiai betegség. A WHO definíciója szerint az epilepszia egy krónikus agyi rendellenesség, mely sokféle etiológiával rendelkezhet, melyek közös jellemzője az ismétlődő spontán rohamaktivitás, melyeket neuronok nagy populációjának patológiás, hiperszinkron aktivitása okozza.

Annak ellenére, hogy napjainkban számos antiepileptikum létezik, a páciensek jelentős része gyógyszer rezisztens. Ezeknél a betegeknél amennyiben az epilepsziás fókuszt jól lokalizálható az epilepszia műtéti kezelése jó lehetőség a rohamok megszüntetésére.

Tumoros (nem epilepsziás) páciensek műtete esetén számos alkalommal egy kisméretű egészséges agykérgi szövetet is eltávolítanak, ha a patológiás szövet rész szubkortikálisan helyezkedik el. Az egészséges, és epilepsziás human agyszövet működésének összehasonlítása jó lehetőséget biztosít az egészséges és károsodott neuronális folyamatok vizsgálatában idegi hálózatok, az egyes sejtek szintjén és sejten belüli léptékben.

A Spontán szinkron Populációs Aktivitás (SPA – spontaneous population activity) megfigyelhető in vitro extracelluláris mezőpotenciál (LFP - local field potential) mérések során, mesterséges agyfolyadékban tárolt epilepsziás human agyszeletekben. E szinkron populációs jelenségek ritmikusan jelentkező LFP hullámokkal, magas frekvenciás oszcillációkkal és emelkedett sejtaktivitással jellemezhetőek. Mind a serkentő glutamáterg, mind a gátló GABAerg jelenségek részt vesznek a kialakításában. A SPA alatt a piramis sejtek depolarizáló, hiperpolarizáló, de még kevert válaszokat is mutathatnak.

A kalcium imaging technikát széles körben alkalmazzák az idegi aktivitás monitorozására állat modellekben (szelet preparátumokban), de a human neuronok kalcium koncentrációjának változásairól sajnos csak keveset tudunk. Kalcium imaging vizsgálatokat eddig többnyire pluripotens sejtekből differenciált human neuronokon és enterális idegrendszeri sejt kultúrákon végeztek. A közelmúltban leírták a human agykérgi, és hippocampális asztrociták spontán kalcium válaszait is, de a központi idegrendszerből származó neuronok intracelluláris kalcium jelenségeiről jelenleg semmilyen információ nem áll rendelkezésre.

Amíg a két-foton mikroszkópia magas térbeli felbontással rendelkezik ($<1 \mu\text{m}$), sajnos csak kis területet lehet vele vizsgálni ($<1 \times 1 \text{ mm}$). Másrészről többcsatornás extracelluláris elektrofiziológiai mérésekkel nagy kortikális területeket is lefedhető (3-4 mm), de a térbeli felbontása rovására (100 μm). Két-foton mikroszkópiával mindössze egy-két agykérgi réteg neuronjainak aktivitása ($<1 \text{ mm}$) vizsgálható, de ahhoz hogy a teljes mélységében vizsgáljuk a human agykérget, sokcsatornás extracelluláris elektródokra van szükség (3-4 mm). A két technika időbeli felbontása sem azonos: a neuronális aktivitásokat jelző elektrofiziológiai változások gyorsabban lezajlanak ($<1 \text{ ms}$) mint az

intracelluláris kalcium jelenségek (általában több, mint 100ms). A két technika kombinációja számos előnnyel járhat.

Elsősorban segít több információt nyerni a populációs aktivitás kialakulásában szerepet játszó neuronokról. A lineáris multielektrodokkal kiegészített mérések a SPA gyors elektrofiziológiai változásairól szolgálnak információkkal az összes agykérgi rétegből, míg a kalcium imaging egy relatíve nagy neuron csoport (több tíz festett idegsejt) aktivitását jellemzi illetve, mutatja e neuronok hozzájárulását az SPA generálásához. A két-foton mikroszkópia feltárhatja az inaktív idegsejtek jelenlétét is, amelyek az extracelluláris mérésekkel nem detektálhatóak.

Másodszor a kalcium imaging és az intracelluláris whole cell patch clamp mérések szimultán alkalmazása lehetőséget adhat a humán neuronok elektrofiziológiai és kalcium jeleinek korreláltatásához. Az intracelluláris patch clamp mérések alatt lehetőségünk van a humán neuronok membránpotenciál változásainak megfigyelésére és módosítására, és ezt összehasonlíthatjuk a közben lezajló kalcium koncentráció változásokkal. Ezeket az információkat az extracelluláris mérésekkel kiegészítve összehasonlíthatjuk a SPA közben aktív neuronok elektrofiziológiai és kalcium jeleit. Továbbá a két-foton uncaging alkalmazásával megfigyelhetjük a sejtek bemenet-kimenet függvényeit, és a poszt-szinaptikus jelintegrációt.

A sejtek megtöltése, és az anatómiai rekonstrukciója (fény- és elektronmikroszkópos szinten) fontos morfológiai információkat adhat a humán neokortikális neuronok szubcelluláris, sejtés, és hálózati tulajdonságairól.

2 SPA

Fokális epilepsziában szenvedő gyógyszerrezisztens betegek számára a megfelelő műtéti beavatkozás jó kezelési alternatívaként szolgál. Az eltávolított epilepsziás góc vizsgálata forradalmasította az epilepszia kutatást, mivel lehetőséget biztosított az egyes neuronok fiziológiás, vagy kvázi-fiziológiás állapotbeli vizsgálatára. A disszertációban leírt kísérletekben ez kifejezetten fontos, mert nem csak a sejtek összegződött lokális mezőpotenciál jelenségeit szerettük volna megfigyelni és analizálni, hanem a SPA generálásában résztvevő mechanizmusokra és sejtes folyamatokra is fényt szeretnénk deríteni. Ezért megvizsgáltuk, hogy az egyes sejtek hogyan válaszolnak a lamináris multielektróddal mért populációs aktivitásokra.

A patológiásnak tekintett interiktális aktivitástól megkülönböztethető, spontán szinkron populációs aktivitás detektálható műtéti úton eltávolított humán agyszövetben (agykéreg, szubikulum, hippokampusz) in vitro. Az agykéregben a szinkronizált események létrejöttéért valószínűsíthetően a neuronális hálózatok serkentő és gátló komponenseinek komplex interakciója felelős.

Köhling és munkatársai munkájukban leírják a műtéti (epilepszia műtét) eltávolított humán neokortikális agyszövet vizsgálatát. Tanulmányozták a glutamáterg és a GABAerg szinaptikus transzmisszió, és a feszültségfüggő kalcium csatornák szerepét az általuk leírt spontán aktivitás generálásában. Extracelluláris mezőpotenciál gradiens méréseket végeztek a második, és ötödik kérgi rétegben. Meg kell említeni, hogy Köhling és munkatársai kizárólag csak epilepsziás páciensekből származó szövetet vizsgáltak. Bár többen érvelnek amellett, hogy az SPA különbözik az epilepsziás betegekben jelentkező patológiás interiktális eseményektől, még mindig nem tisztázott, hogy az SPA epilepsziához kapcsolódó jelenség-e, vagy fiziológiás körülmények közt is megtalálható.

Munkacsoportunk előzetes eredményei azt mutatják, hogy egy interiktális tüskézéshez hasonló jelenség detektálható nem epilepsziás szövetben is (mélyagyi tumoros betegekből származó, nem epilepsziás, tumorsejtek által nem infiltrált területről származó).

Jelen tanulmányban a SPA eredetének további vizsgálatát végeztem. Extracelluláris multielektróddal jól mérhetőek a különböző rétegek válaszainak térbeli eloszlásai. Sajnos e megközelítés nem sokat mond az egyes sejtek aktivitásról. Ennélfogva a celluláris mechanizmusok kérdését elég nehéz vizsgálni lévén képtelenség minden sejtől intracelluláris méréseket végezni a sejt specifikus információk eléréséhez. Az általunk feltett kérdések a következők: Hogyan játszanak szerepet a sejtek a SPA generálásában? A sejtek mely hányada aktív a SPA alatt? Milyen típusú sejtek aktívak (neuronok/ interneuronok/ gliális sejtek) a SPA alatt? Mikor a leginkább aktívak a sejtek (a LFP csúcs előtt/ közben/ után)?

Mivel a SPA epilepsziás és egészséges szövetben is detektálható, ezért meg szerettem volna vizsgálni az egyes különbségeket, hogy átlássam hogyan generál az egészséges és patológiás szövet nagyon hasonló aktivitást. A fenti kérdések megválaszolásához két-foton mikroszkópiás méréseket használtam. Továbbá a sejteket hisztológiai vizsgálatoknak is alávettem (sejt jelölés, festés, majd fény-

és elektronmikroszkópos vizsgálatok, 3D rekonstrukció), hogy megvizsgálhassam, van e morfológiai különbség az epilepsziás és nem epilepsziás szövet sejtjei közt.

3 Új tudományos eredmények

A SPA detektálható elektrofiziológiai mérésekkel műtétilag eltávolított humán agyszövetben in vitro. Céлом az volt, hogy térbeli információkat gyűjtsék a hálózati jelenségekről melyek a SPA generálásában részt vesznek, így egy új metódusra volt szükségem.

E metódus kidolgozása során kombináltam a sokcsatornás extracelluláris elektrofiziológiai méréseket szimultán intracelluláris, és két-foton kalcium imaging vagy uncaging mérésekkel, amiket magas térbeli felbontású morfológiai analízissel egészítettem ki.

Tézis I.: Kidolgoztam a humán agykérgi szövet két-foton kalcium imaging metódusát.

Beszámolok az első műtétilag eltávolított human agykérgi epilepsziás és nem-epilepsziás idegsejteken végzett kalcium imaging mérésekről.

A műtétilag eltávolított epilepsziás és nem-epilepsziás agyszövetet egy úgynevezett kettős perfúziós kamrában tartottam fenn mesterséges agyfolyadékban (ACSF). A LFP-t 24 csatornás extracelluláris lineáris mulielektrodával mértem lefedve az összes agykérgi réteget.

Az elektrofiziológiailag aktív régiók azonosítása után az agyszövetbe üveg kapillárisból való injektálással („bulk loading”) neuronális, és gliális markeranyagot juttattam.

Két-foton mikroszkóp segítségével környéki idegsejtek nagy populációjából sikerült SPA asszociált kalcium tranzienseket mérnem, mellyel egy időben rögzítettem az intra- és extracelluláris idegi aktivitást is.

Az intracellulárisan mért sejteket feltöltöttem későbbi anatómiai vizsgálatokhoz. Az így megtöltött sejteket 3-dimenziósan rekonstruáltam és fény- illetve elektron mikroszkópiai vizsgálatnak vettem alá.

E komplex metódus –a magas térbeli felbontású két-foton mikroszkópia kombinálva a magas időbeli felbontású extra- és intracelluláris elektrofiziológiai mérésekkel és anatómiai vizsgálatokkal- alkalmas a SPA-ban résztvevő human agykérgi neuronok sejten belüli, sejt szintű, és hálózati tulajdonságainak vizsgálatára, és lehetőséget adhat a strukturális, és funkcionális összefüggések mélyebb megértésében a humán agykéregben.

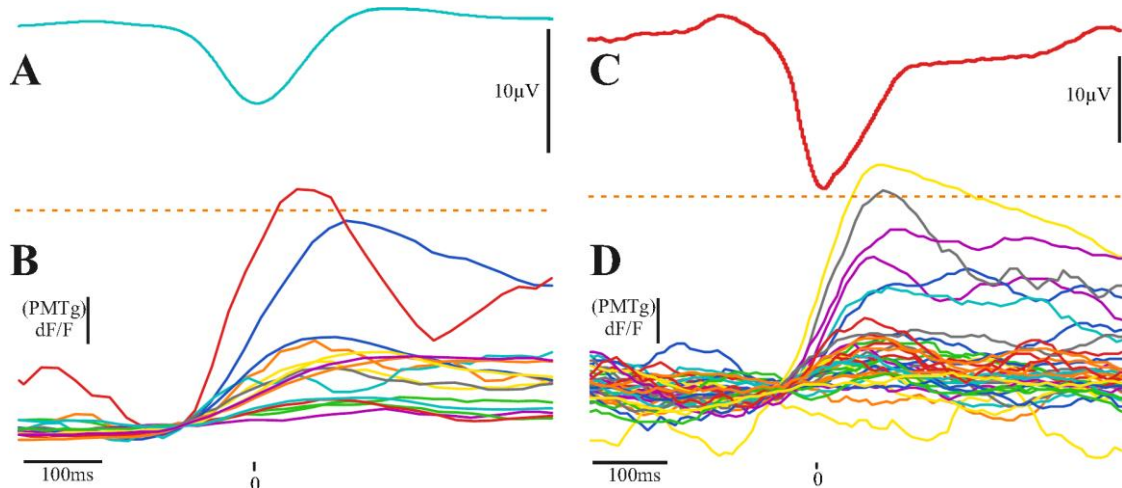
Tézis II.: Sikeresen kombináltam az extracelluláris mérőrendszert a két-foton mikroszkóp rendszerével, így lehetővé téve, hogy összehasonlítottam az epilepsziás és nem epilepsziás humán agykérgi szövetben lejátszódó kalcium válaszokat a SPA alatt.

A spontán hálózati aktivitást regisztráltam epilepsziás és nem epilepsziás humán agyszövetben, szimultán kalcium imaging és mezőpotenciál mérésekkel.

17 páciensből származó 69 humán agykérgi szeletben mértem mezőpotenciált (32 szelet 8 tumoros páciensből, 17 szelet 5 epilepsziás páciensből, és 20 szelet 4 tumor asszociált epilepsziás páciensből). 15 szeletben detektáltam SPA-t (9 szelet 4 tumoros páciensből, 4 szelet 3 epilepsziás páciensből, és 2 szelet 1 tumor asszociált epilepsziás páciensből) a következő protokollt alkalmazva. A multielektroda az agyszövetre lett helyezve a piális felszínre merőlegesen, lehetővé téve az elektrofiziológiai méréseket az összes agykérgi rétegből. A szeleteket feltérképeztem lokalizálendő a SPA generáló régiókat, 300-400 μm távolságonként a szövet egyik végétől a másikig.

A szövetek multielektroddal történő feltérképezése után a legnagyobb SPA választ produkáló régiókat további két-foton kalcium imagingnak és intracelluláris patch clamp méréseknek vettem alá. Bulk loading-ot alkalmaztam a legnagyobb SPA-t generáló területeken (a mezőpotenciál gradienseken nézve), majd mérendő a mezőpotenciál változásokat, extracelluláris ACSF-el töltött mikropipettát is helyeztem a területre. Ily módon hatékonyan tudtam mérni a SPA generálásban résztvevő kalcium jeleket két-foton imaging alkalmazásával humán idegsejt populációkon (1. ábra).

Szimultán vezettem el a LFP jeleket a festett neuron kalcium jeleivel. Azon szeletekben ahol a SPA detektálható volt frame scan-t alkalmaztam, és kiválasztottam a sejteket melyekben gyors multiple line scan módszerrel kalcium jeleket mértem.



1. ábra A) A teljes mérésből vett összes SPA esemény átlaga az LFP-ben, egy nem-epilepsziás páciens egyik agyszeletéből. B) A-hoz kapcsolódó szimultán mért sejtek kalcium válaszainak átlaga. Jól láthatóan olyan sejt is van, amely az átlag alapján rendszeres választ mutat. A LFP 30Hz-es aluláteresztő szűrővel volt szűrve, a kalcium jeleken gauss simítást végeztem. A szaggatott narancssárga vonal jelzi a 2SD határt.

C) A teljes mérésből vett összes SPA esemény átlaga az LFP-ben, egy epilepsziás páciens egyik agyszeletéből. D) C-hez kapcsolódó szimultán mért sejtek kalcium válaszainak átlaga. Jól láthatóan két olyan sejt is van, amely az átlag alapján rendszeres választ mutat. A LFP 30Hz-es aluláteresztő szűrővel volt szűrve, a kalcium jeleken gauss simítást végeztem. A szaggatott narancssárga vonal jelzi a 2SD határt.

Szimultán mértem a SPA-t az LFP-n és a kapcsolódó szomatikus kalcium válaszokat 31 neuronon 2 szeletben tumoros páciensből, 55 neuronon 4 szeletből, epilepsziás páciensből.

A SPA kapcsolt sejtek kalcium válaszait akkor tekintetem szignifikánsnak, ha az alapvonal standard deviáció kétszeresét meghaladták, az ilyen kalcium válaszokatszignifikánsnak tekintetem. Azon neuronokat melyek akár már egy szignifikáns választ mutattak válaszoló sejteknek tekintetem. Alkalmanként válaszoló sejtek közé tartoznak azok, melyek kevesebb, mint a SPA események 20%-nál válaszoltak, nem megbízhatóan válaszoló sejteknek tekintetem azon sejteket, melyek a SPA események 20-40%-ban válaszoltak, és megbízhatóan válaszoló sejteknek tekintetem azokat a sejteket, melyek a SPA események 40%-nál többször válaszoltak. E metódussal 21 csendes sejt (68%), 4 alkalmankénti (13%), 1 nem megbízható (3%) és 5 megbízhatóan válaszoló (16%) sejtet azonosítottam tumoros szövetben. Az eloszlás jelentősen más epilepsziás szövetben: 19 csendes sejt (35%), 20 alkalmankénti (36%), 11 nem megbízható (20%) és 5 megbízhatóan válaszoló (9%) sejtet találtam (1. táblázat).

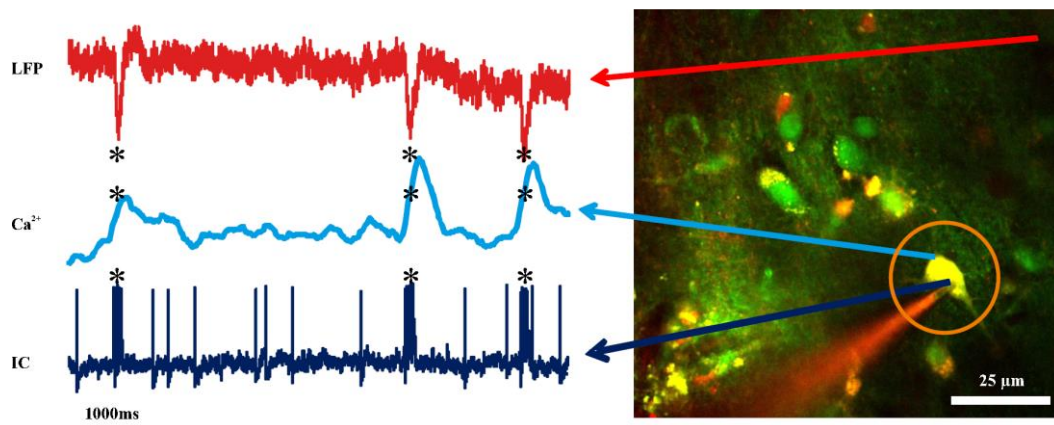
1. táblázat

A sejtaktivitások vizsgálata SPA alatt két-foton kalcim képalkotással epilepsziás, és nem epilepsziás szövetben.

Páciens/Szelet	SPA db	Mért sejtek száma	Csendes sejtek száma (0%)	Alkalmanként válaszoló sejtek száma (<20%)	Nem megbízhatóan válaszoló sejtek száma (20-40%)	Megbízhatóan válaszoló sejtek száma (≥40%)
Pt 1 (tumor) szelet 1	8	13	7	2	1	3
Pt 2 (tumor) szelet 1	15	18	14	2	0	2
Pt 4 (epi) szelet 2	79	26	4	16	3	3
Pt 4 (epi) szelet 3	13	15	5	3	6	1
Pt 5 (epi) szelet 1	15	4	2	0	2	0
Pt 5 (epi) szelet 2	12	10	8	1	0	1
Pt 8 (t asszociált e) szelet 4	7	23	11	6	3	3
Tumor		31	21 (68%)	4 (13%)	1 (3%)	5 (16%)
Epilepsziás		55	19 (35%)	20 (36%)	11 (20%)	5 (9%)
T asszociált E		23	11 (48%)	6 (26%)	3 (13%)	3 (13%)

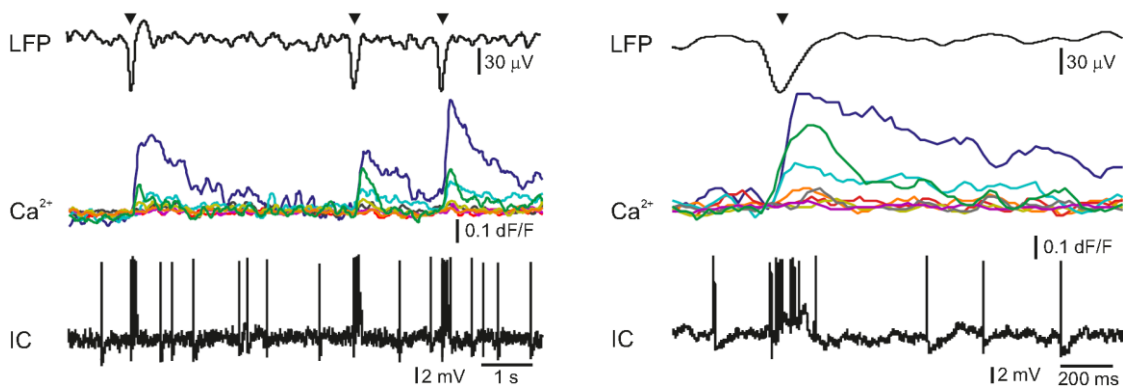
Tézis III.: Funkcionális kapcsolatot mutattam ki a LFP, a kalcium válaszok, és az intracelluláris aktivitás között humán neokortikális interneuronokon és piramis sejteken SPA alatt.

A festékkel töltött régióból kiválasztottam olyan sejteket melyek megbízható, vagy nem megbízható kalcium választ mutattak további intracelluláris mérésekhez. Whole cell (n=7 sejt) vagy loose patch clamp (n=2 sejt) mérést végeztem, hogy megvizsgálhassam a sejt elektrofiziológiai aktivitását. Ilyen esetekben a LFP a kalcium válaszok, és az intracelluláris jelek szinkronban lettek regisztrálva (2, 3 ábra). A fluoreszcens festékek által mutatott morfológia alapján elektrofiziológiai méréseket végeztem 3 piramis sejten, és 6 interneuronon.



2. ábra Bal) Szimultán LFP, Ca^{2+} imaging, és Intracelluláris mérés egy szeletből. * jelöli az SPA csúcsát. Jobb oldalt) a fluoreszcens festékkel (OGB-1) töltött régió, és a patchelt sejt.

Megvizsgáltam az interneuronok (n=4), és piramis sejtek (n=3) szomatikus és dendritikus kalcium válaszait az elektrofiziológiai aktivitásával együtt.



3. ábra Bal oldalt) Szimultán spontán LFP, Ca^{2+} válasz, és loose patch clamp mérés 3 egymást követő SPA eseményről (fekete háromszög). A kalcium tranziensek nyolc sejt kalcium válaszait mutatják a 2. ábrán látható sejtekből. A kalcium jelek különböző szinei az egyes külön sejteket jelölik (középső vonalak). Jól látható hogy jelen esetben 3 sejt is rendszeresen válaszolt, míg a többi sejt nem mutatott megnövekedett kalcium jelet. Az intracellulárisan (IC) mért sejt burst aktivitást mutatott az SPA alatt, és ebben sejt szimultán növekedés figyelhető meg a megfelelő kalcium görbén is (zöld). Jobb oldalt) A bal oldali ábra harmadik SPA eseményének kinagyított verziója.

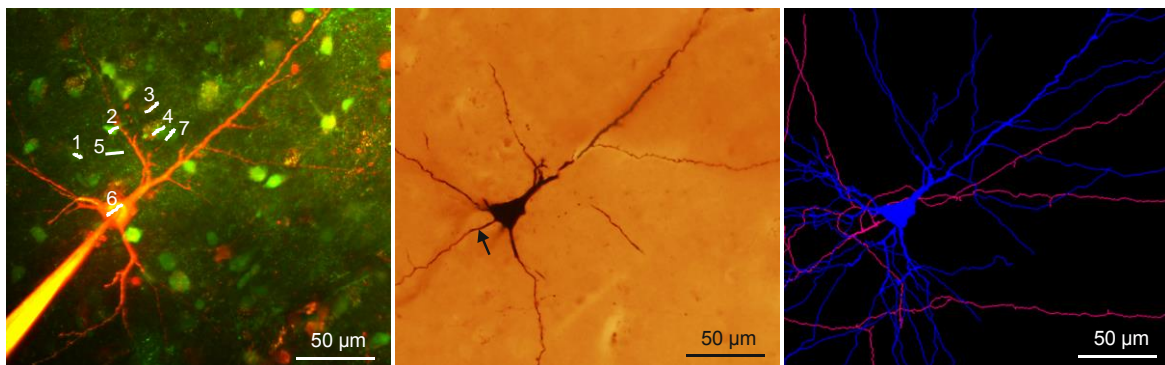
Állatmodellben leírták, hogy pozitív korreláció figyelhető meg a szomatikus akciós potenciálok száma, és a dendritikus kalcium válaszok amplitúdója közt. Röviden a piramis sejtek burstjei, és az interneuronok akciós potenciál sorozatai nagyobb kalcium választ okoztak, mint egy akciós potenciál.

A korreláció pontos kimutatásához egy részletes jövőbeni tanulmány szükséges az elektrofiziológiai, és szomatikus, vagy dendritikus kalcium válaszok összefüggéseiről humán interneuronokban és piramisokban.

A kortikális interneuronok és piramisok bemenet-kimenet függvényeinek vizsgálata fontos a dendritikus integráció, és a neuronális számítások megértéséhez. Mivel a humán neuronok komplexebb dendrit elágazásokkal rendelkeznek az állatokénál (lásd a dendritikus hosszokat a rekonstruált piramisokról lentebb), ebből következően egy komplexebb humán dendritfát várunk. A két-foton uncaging széleskörűen használt módszer a neuronális bemenet-kimenet függvényeinek és a poszt-szinaptikus jelek integrációjának vizsgálatában, ezt humán szövet esetén is kihasználhatjuk glutamát uncaging-nél térben és időben csoportosított ingerléssel.

Tézis IV.: Sikeresen kombináltam elektrofiziológiai és imaging méréseket az intracellulárisan töltött sejtek anatómiai rekonstrukciójával így lehetővé téve a töltött sejtek közti morfológiai összehasonlításokat.

Az intracellulárisan mért sejtek biocitinnel is fel lettek töltve (n=6) és további anatómiai vizsgálatoknak vettem őket alá. A sikeresen megtöltött sejtek piramis sejt (n=2) vagy interneuron (n=2) morfológiát mutattak. A piramis sejt hosszú és vastag apikális dendrittel, és számos vékony bazális dendrittel rendelkeztek (4. ábra), az interneuronok kis multipoláris sejteknek látszottak rövid sima dendritekkel. Az egyik töltött harmadik rétegi piramis sejt teljes dendritikus és axonális fáját rekonstruáltuk 3-dimenzióban (4. ábra). A fentebb említett négy sejtől csak ennek volt teljes (szépen megtöltődött) dendritfája, és axonja. A rekonstruált sejt apikális dendritje 4310 μm hosszú volt, a bazális dendritjei hosszúságának összege 13478 μm , míg az axonális szegmentumok hossza 3875 μm volt. Ez jócskán meghaladja a majom temporális lebeny piramis sejtjének dendritikus hosszát. A rágcsálók agykérgében szintén sokkal rövidebb dendritikus hosszát írtak le (lásd www.neuromorpho.org).



4. ábra Bal oldalt) Egy human agykérgi neuron populáció maximum intenzitású z-projekciója. A szövetbe bulk loading-al OGB-1-AM (zöld), Sulforhodamine-101 (piros) fluoreszcens festékeket juttattam. A #6 régióhoz tartozó neuront whole cell patch clamp-pel mértük, és a pipettán keresztül további Ca^{2+} festéket OGB-1 (zöld), Alexa594 (piros) és biocitint juttattam a sejtbe. Középen) A baloldali #6-os régióhoz tartozó sejt fénymikroszkópos képe, az axon iniciális szegmentuma fekete nyíljal jelölve. Jobb oldalt) A bal oldali képen #6-os sejt dendritikus (kék) és axonális (rózsaszín) fája, 3-dimenziós rekonstrukciós kép.

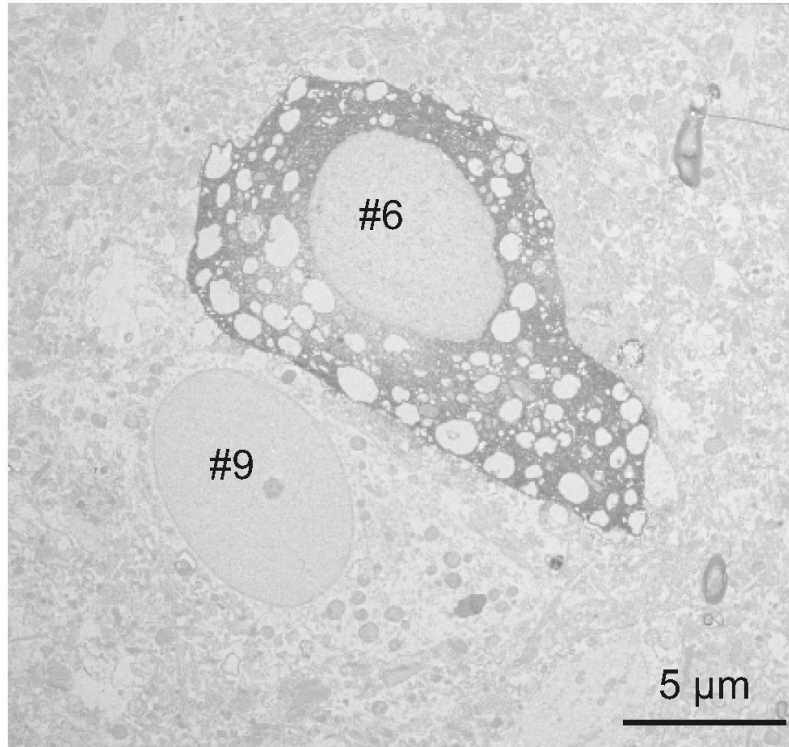
Tézis V.: Ismertetem az elektronmikroszkópos ultrastruktúráját a töltött és rekonstruált piramis sejtnek elektron mikroszkópiai szinten.

Nagy vakuolumokat találtam a sejttestben, és a dendritekben (5. ábra), míg ezeken kívül a mitokondriumok, és más organellek (pl. endoplazmatikus retikulum) intaktnak tűntek. Számos axon terminális volt látható melyek vagy aszimmetrikus (véltetően serkentő), vagy szimmetrikus (feltehetőleg gátló) szinapszisokat alkottak a töltött sejt dendritjeivel. Nem találtam a töltött sejt szómáját beidegző szinapszist, de számos szimmetrikus szinapszist figyeltem meg az axon iniciális szegmentumán. A töltött piramis sejt axon terminálisai aszimmetrikus szinapszisokat alkottak a nem festett sejtek dendritjein.

Az a hipotézisem, hogy a vakuolumok jelenléte valamely metodológiai lépés következménye lehet.

1. Először is az OGB-1-AM és SR-101 festékek injektálása a szövetbe megváltoztathatja a neuronok struktúráját.
2. Másodsor a hosszú idő, melyet a mérőkamrában tölt a szelet (akár több óra is) befolyásolhatja a sejtek túlélését.
3. Harmadsor a patch clamp procedúra (pipetta által okozott mechanikus sérülés, vagy az intracellulárisan adott magas fluorofór koncentráció) okozhat változásokat a sejt ultrastruktúrájában.

Tesztelendő e hipotéziseket további elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. Először is 62 sejtet (45 neuron, 17 gliális sejt) megvizsgáltunk a biocitin töltött sejt közelében. A kis felbontású frame scan alapján beazonosítható, hogy e sejtek a festékkel töltött régióból származnak. Egyik ilyen festett sejtben sem találtunk vacuolumokat. Következésként megvizsgáltunk 61 nem töltött sejtet (43 neuron, 18 gliális sejt) ugyanabból a szeletből, de nem töltött régióból. Az összes blokk a 7. páciens agykérgi harmadik rétegéből lett újra beágyazva, ~5 mm távolságra. Egyetlen nem töltött sejtben sem találtunk vacuolumokat. További kísérleteket végeztem a hosszú idejű in vitro körülmények között tartás vacuolum okozó hatás hipotézisének megvizsgálására. Egy páciens ugyanarról a területről származó agyszeleteiből egyet rögtön vágás után, egyet 6 órával a mérő kamrában eltöltött idő után fixálva vizsgáltunk. Megvizsgáltunk 35 neuront és 22 gliális sejtet a kamrában hosszú időt töltött szeletből, és 43 neuront és 25 gliális sejtet a rögtön vágás után fixált szeletből. Vacuolumok egyik esetben sem voltak jelen.



Ábra 5. A negyedik ábrán látható #6 jelzésű sejt elektronmikroszkópos vizsgálata nagy vacuolumokat mutatott a sejttestben. A szomszédos sejt #9 jelzéssel egy egészséges piramissejt nagy vacuolumok nélkül.

4 Publikációk

Cikkek

- [1] **Bálint Péter Kerekes**, Kinga Tóth, Attila Kaszás, Balázs Chiovini, Zoltán Szadai, Gergely Szalay, Dénes Pálfi, Attila Bagó, Klaudia Spitzer, Balázs Rózsa, István Ulbert, Lucia Wittner; *Combined two-photon imaging, electrophysiological, and anatomical investigation of the human neocortex in vitro*. *Neurophotonics* 1:(1) pp. 111. (2014)
- [2] Balázs Dombovári, Richárd Fiáth, **Bálint Péter Kerekes**, Emília Tóth, Lúcia Wittner, Domonkos Horváth, Karsten Seidl, Stanislav Herwik, Tom Torfs, Oliver Paul, Patrick Ruther, Herc Neves and István Ulbert*; *In vivo validation of the electronic depth control probes*. *Biomed Tech*, 2013, DOI 10.1515/bmt-2012-0102
- [3] Grand L, Pongrácz A, Vázsonyi E, Márton G, Gubán D, Fiáth R, **Kerekes B P**, Karmos G, Ulbert I, Battistig G, *A novel multisite silicon probe for high quality laminar neural recordings*. *Sensors and actuators A: Physical* 166:(1) pp. 1421. (2011)
- [4] Torfs T, Aarts A A A, Erismis M A, Aslam J, Yazicioglu R F, Seidl K, Herwik S, Ulbert I, Dombovari B, Fiáth R, **Kerekes B P**, Puers R, Paul O, Ruther P, Van Hoof C, Neves H P; *Two-dimensional multichannel neural probes with electronic depth control* *IEEE Transactions on biomedical circuits and systems* 5:(5) pp. 403412. (2011)

Konferencia poszterek

- [5] Torfs T, Aarts A, Erismis M A, Aslam J, Yazicioglu R F, Puers R, Van Hoof C, Neves H, Ulbert I, Dombovari B, Fiath R, **Kerekes B P**, Seidl K, Herwik S, Ruther P, *Two-dimensional multichannel neural probes with electronic depth control*; 2010 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference, BioCAS 2010
- [6] **Kerekes B P**, Kaszás A, Tóth K, Chiovini B, Szalay G, Pálfi D, Spitzer K, Ulbert I, Lucia W, Rózsa B, *Simultaneous Electrophysiology and Ca-imaging of human cortical synchronous population activity in vitro*, IBRO Workshop 2012. 2012. Jan. 19-21, Szeged, Magyarország
- [7] **Bálint Péter Kerekes**, Kinga Tóth, Attila Kaszás, Balázs Chiovini, Gergely Szalay, Zoltán Szadai, Dénes Pálfi, Klaudia Spitzer, Balázs Rózsa, István Ulbert, Lucia Wittner, *Analysis of the human cortical spontaneous synchronous population activity in vitro based on multimodal experiments*, 8th FENS Forum of European Neuroscience, 2012. Jul. 14-18., Barcelona, Spanyolország
- [8] **Kerekes B P**, Kaszás A, Tóth K, Chiovini B, Szalay G, Pálfi D, Spitzer K, Ulbert I, Lucia W, Rózsa B, *Multimodal analysis of the human cortical synchronous population activity in vitro*, Magyar Idegtudományi Társaság XIV. Konferenciája, 2013. Jan. 17-19., Budapest, Magyarország
- [9] **Bálint Péter Kerekes**, Kinga Tóth, Attila Kaszás, Balázs Chiovini, Gergely Szalay, Zoltán Szadai, Dénes Pálfi, Klaudia Spitzer, Balázs Rózsa, István Ulbert, Lucia Wittner, *Simultaneous Electrophysiology and Ca-imaging of human cortical population activity in vitro*, Neuroscience 2013, Society for Neuroscience, 43rd Annual Meeting, 2013. Nov. 5-15., San Diego, USA
- [10] **Kerekes B P**, Kaszás A, Tóth K, Chiovini B, Szalay G, Pálfi D, Spitzer K, Ulbert I, Lucia W, Rózsa B, *Simultaneous Electrophysiology and Ca-imaging of human cortical synchronous population activity in vitro*, IBRO Workshop 2014. 2014. Jan. 16-17, Debrecen, Magyarország

- [11] **Kerekes B P**, Kaszás A, Tóth K, Chiovini B, Szalay G, Pálfi D, Spitzer K, Ulbert I, Lucia W, Rózsa B, *Simultaneous Electrophysiology and Ca-imaging of human cortical synchronous population activity in vitro*, From Medicine to Bionics 2nd European Ph.D. Conference 2014, 2014 május -10, Budapest, Magyarország
- [12] **Bálint Péter Kerekes**, Kinga Tóth, Attila Kaszás, Balázs Chiovini, Gergely Szalay, Zoltán Szadai, Dénes Pálfi, Attila Bagó, Balázs Rózsa, István Ulbert, Lucia Wittner, *Analysis of the human cortical spontaneous synchronous population activity in vitro based on multimodal experiments*, 8th FENS Forum of European Neuroscience, 2014. Jul. 5-9., Milánó, Olaszország
- [13] **Bálint Péter Kerekes**, Kinga Tóth, Attila Kaszás, Balázs Chiovini, Gergely Szalay, Zoltán Szadai, Dénes Pálfi, Attila Bagó, Balázs Rózsa, István Ulbert, Lucia Wittner, *Spontán populációs aktivitás vizsgálata kombinált két foton és elektrofiziológiai módszerekkel*, A Magyar Idegsebészeti Társaság 2014. évi Nemzeti Kongresszusa, 2014.nov.20-22 Budapest Magyarország
- [14] **Kerekes B P**, Kaszás A, Tóth K, Chiovini B, Szalay G, Pálfi D, Spitzer K, Ulbert I, Lucia W, Rózsa B, *A method to analyze the human cortical spontaneous synchronous population activity in vitro with multimodal experiments*, Magyar Idegtudományi Társaság XV. Konferenciája, 2015. Jan. 22-23., Budapest, Magyarország
- [15] **Bálint Péter Kerekes**, Kinga Tóth, Attila Kaszás, Balázs Chiovini, Gergely Szalay, Zoltán Szadai, Dénes Pálfi, Attila Bagó, Balázs Rózsa, István Ulbert, Lucia Wittner *Multimodal method and analysis of the in vitro human cortical spontaneous synchronous population activity*, 31st International Epilepsy Congress, 2015 szeptember 5-9, Isztanbul, Törökország

Konferencia Előadások

- [16] **Kerekes BP**, Kaszás A, Tóth K, Chiovini B, Szalay G, Pálfi D, Spitzer K, Ulbert I, Lucia W, Rózsa B, *Simultaneous Electrophysiology and Ca-imaging of human cortical synchronous population activity in vitro*, Neuronus 2014 IBRO & IRUN Neuroscience Forum, 2014.ápr.25-28 Krakkow, Lengyelország
- [17] **Kerekes BP**, Kaszás A, Tóth K, Chiovini B, Szalay G, Pálfi D, Spitzer K, Ulbert I, Lucia W, Rózsa B, *A method to analyze the human cortical spontaneous synchronous population activity in vitro*, Kálmán Erika Doktori Konferencia 2014, 2014. december 10-12. Budapest Magyarország