

# Optogenetika u animalnim modelima temporo limbicke epilepsije

---

**Delovski, Sanja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:259113>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-27**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Sanja Delovski**

**Optogenetika u animalnim modelima  
temporolimbičke epilepsije**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2019.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za neuroznanost Hrvatskog instituta za istraživanje mozga pod vodstvom mentora, prof. dr. sc. Maria Vukšića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.

## POPIS KRATICA:

SŽS – središnji živčani sustav

MR – magnetska rezonanca

ILAE – eng. *International League Against Epilepsy*

NMDA – N-metil-D-aspartat

MFB – eng. *medial forebrain bundle*

NIST – lat. *nucleus interstitialis striae terminalis*

GABA (eng. *gamma-aminobutyric acid*) – gama-aminomaslačna kiselina

GABRA1 – GABA receptor A1

GABRG2 – GABA receptor G2

GAD – glutamatna dekarboksilaza

EEG – elektroencefalogram

CA – lat. *cornu ammonis*

PPS (eng. *perforant pathway stimulation*) – stimulacija perforantnog puta

sEPSP (eng. *spontaneous excitatory postsynaptic potentials*) – spontani ekscitatorni postsinaptički potencijali

SE (lat. *status epilepticus*) – epileptični status

M1 – muskarinski receptor

IL- $\beta$  – interleukin beta

KA – kainat/kainatna kiselina

AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionska kiselina

BBB (eng. *blood brain barrier*) – krvno-moždana barijera

AAV – eng. *adeno-associated virus*

DNA (eng. *deoxyribonucleic acid*) – deoksiribonukleinska kiselina

Cre – ciklička rekombinaza

FLEX – eng. *flip-excision*

CHR2 – eng. *Channelrhodopsin-2*

VChR – kanal rodopsin deriviran iz *Volvox carteri*

SFO – eng. *step-function opsin*

SSFO – stabilizirani SFO

NpHR – halrodopsin deriviran iz *Natronomonas pharaonis*

HsHR – halrodopsin deriviran iz *Halobacterium salinarum*

STIB – eng. *Stimulus Train-Induced Bursting*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. EPILEPSIJE</b> .....	2
2.1. Temporolimbička epilepsija.....	3
<b>3. ANATOMIJA i FUNKCIJA TEMPOROLIMBIČKOG SUSTAVA</b> .....	4
3.1. Hipokampus .....	4
3.2. Trisinaptički put .....	5
3.3. Papezov krug.....	6
3.4. Središnji limbički kontinuum.....	6
3.5. Amigdala.....	7
<b>4. PATOFIZIOLOGIJA TEMPOROLIMBIČKE EPILEPSIJE</b> .....	9
4.1. Uloga GABA-ergičkih neurona .....	9
4.2. Fascia dentata kao ulazna vrata, ali i izvor ekscitacijskih impulsa .....	10
4.3. Novonastale zrnate stanice nakon epileptogenih ozljeda mozga .....	10
4.4. Uloga mahovinastih stanica .....	11
<b>5. ANIMALNI MODELI</b> .....	13
5.1. Izbor animalnog modela .....	13
5.2. Koje animalne modele poznajemo .....	14
5.2.1. Kainatni model.....	14
5.2.2. Pilocarpinski model.....	15
5.2.3. Stimulacija perforantnog puta.....	16
<b>6. OPTOGENETIKA</b> .....	18
6.1. Opsini.....	19
6.2. Vremenska specifičnost .....	19
6.3. Stanična specifičnost .....	20
6.4. Specifičnost smjera modulacije aktivnosti živčanih stanica.....	21
6.4.1. Aktivacija.....	21

6.4.2. Inhibicija .....	22
6.5. Dostava svjetlosti .....	23
6.6. Rezultati istraživanja .....	24
6.7. Budućnost optogenetike .....	25
<b>7. ZAHVALE .....</b>	<b>26</b>
<b>8. REFERENCE .....</b>	<b>27</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>38</b>

## SAŽETAK

### **Optogenetika u animalnim modelima temporolimbičke epilepsije Sanja Delovski**

Epilepsije su paroksizmalni poremećaji svijesti povezani sa sinkroniziranim, abnormalnim i spontanim izbijanjima koja se mogu pojaviti difuzno ili fokalno. Danas veliki problem predstavljaju farmakorezistentne, inoperabilne epilepsije, koje još uvijek obuhvaćaju znatan dio pacijenata. Najčešći je oblik fokalne epilepsije temporolimbička epilepsija. Epileptogeno žarište temporolimbičke epilepsije najčešće se povezuje s hipokampalnom sklerozom. Postoji više teorija nastanka epileptičnih napadaja, od gubitka GABA stimulacije, preko stimulacije perforantnog puta, do neadekvatne diferencijacije zrnatih stanica iz subgranularne zone, kao i uloge mahovinastih stanica, a posebno njihovog smanjenog broja nakon traumatske ozljede mozga. Stoga je razvijeno više vrsta animalnih modela na kojima se provode istraživanja u svrhu boljeg razumijevanja patofizioloških osnova epilepsije. Njihova važnost leži u činjenici da, zbog etičkih razloga, eksperimentalno izazivanje epileptičnih napadaja na ljudima u svrhu istraživanja novih antiepileptika nije dopušteno. Stoga je izrazito bitno razviti što vjerodostojniji životinjski model epilepsije na kojem bi se specifično istraživanje moglo provesti. Eksperimentalno se epilepsija može izazvati kemijski, sustavnom ili intrahipokampalnom primjenom tvari poput kainatne kiseline ili pilokarpina. Druga mogućnost je elektrofiziološka stimulacija glavnog puta koji iz entorinalne moždane kore vodi do hipokampusa, tzv. perforantnog puta. Budući da ni jedna od tih metoda nije u potpunosti selektivna, pojavila se potreba za novim pristupom. Optogenetika je metoda kojom se izvanjskom primjenom svjetlosti mogu po volji aktivirati ili inhibirati specifične živčane stanice, nakon eksperimentalnog umetanja voltažnih kanalnih receptora, opsina. Izborom vrste receptora koji će se eksprimirati na staničnoj membrani moguće je potaknuti ili zaustaviti epileptične napadaje, što je specifičnost te metode. Vremenska i prostorna specifičnost postiže se usklađenom primjenom svjetlosti putem optičke niti koja je implantirana u žarišno područje. Ukoliko je izvor svjetlosti, laser ili dioda, povezan s EEG uređajem koji bilježi električna izbijanja u pravom trenutku možemo zaustaviti inicirani napadaj. Zbog navedenih prednosti optogenetika će doprinijeti boljem razumijevanju neurobiološke podloge nastanka epileptičnih napadaja, kao i razvitku mogućih novih terapijskih pristupa.

**Ključne riječi:** temporolimbička epilepsija, mahovinaste stanice, animalni modeli, opsini, optogenetika

## SUMMARY

### **Optogenetics in animal models of temporolimbic epilepsy**

**Sanja Delovski**

Epilepsy is a paroxysmal disturbance of consciousness associated with synchronized, abnormal and spontaneous seizures that may occur diffusely or focally. A major problem today is pharmacoresistant, inoperable epilepsy, which still affects a significant number of patients. The most common form of focal epilepsy is temporolimbic epilepsy. The epileptogenic focus of temporolimbic epilepsy is most often associated with hippocampal sclerosis. There are several theories of epileptic seizures which include the loss of GABA stimulation, the perforant pathway stimulation and the inadequate differentiation of granular cells from the subgranular zone, but also the role of mossy cells, especially their reduced number after traumatic brain injury. Therefore, several types of animal models have been developed to carry out studies for better understanding of the pathophysiological bases of epilepsy. Their importance lies in the fact that experimental induction of epileptic seizures on humans with the purpose of exploring new antiepileptics is not allowed because of ethical reasons. It is therefore essential to develop the most credible animal epileptic model on which specific research could be carried out. In experiments, epilepsy can be induced by chemicals, i.e. systemic or intrahippocampal application of substances such as kainic acid or pilocarpine. Another option is the electrophysiological stimulation of the main pathway leading from the entorhinal cerebral cortex to the hippocampus, i.e. the perforant pathway. Since none of these methods is completely selective, the need for a new approach appeared. Optogenetics is a method by which externally applied light can deliberately activate or inhibit specific neurons after experimental insertion of the receptor voltage channels, i.e. opsins. The specificity of this method lies in the fact that it is possible to induce or stop epileptic seizures by selecting a receptor type that will be expressed on the cell membrane. Time and space specificity are achieved by synchronized application of light by means of an optical fiber implanted into the focal area. If the light source, a laser or a diode, is connected to an EEG device that records electrical outbreaks we can stop an induced seizure at the right time. Because of the above mentioned advantages, optogenetics will contribute to better understanding of the neurobiological basis of epileptic seizures, as well as the development of potential new therapeutic approaches.

**Key words:** temporolimbic epilepsy, mossy cells, animal models, opsins, optogenetics



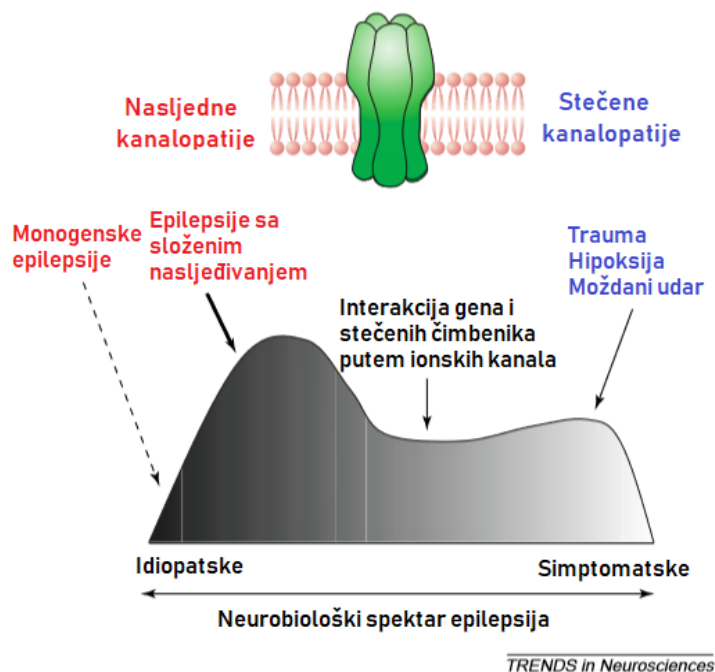
# 1. UVOD

Epilepsija je poremećaj koji se očituje ponavljajućim, spontanim električnim izbijanjima živčanih stanica, a objedinjuje niz kliničkih entiteta, kao i različitih mehanizama. Nažalost, naše znanje o tome što uzrokuje pojavu, širenje i zaustavljanje epileptičnih napadaja veoma je ograničeno. Taj manjak razumijevanja otežava razvoj novih terapijskih pristupa (1). Tradicionalna farmakoterapija ima mnogobrojne nuspojave, među kojima su mučnina, umor, poremećaji krvne slike i jetrene funkcije, tremor, osteoporoza, kognitivne poteškoće, promjene ponašanja te teratogenost i poremećaji erekcije (2). Čak trećina pacijenata ima farmakorezistentnu epilepsiju (3). Kirurgija, koja je danas druga terapijska mogućnost, invazivan je, neselektivan i ireverzibilan zahvat koji izaziva mnogobrojne posljedice (4). Osim toga, nisu svi pacijenti kandidati za kirurški zahvat jer on zahtijeva točno definirano, ograničeno žarište epileptogeneze koje se može ukloniti bez drastičnih nuspojava. Dok se kod generaliziranih epilepsija već u samom početku napadaja pojavljuju difuzna izbijanja, gubitak svijesti i promjene na EEG-u, parcijalne epilepsije počinju promjenama u ograničenoj moždanoj regiji, a tek se naknadno mogu, ali i ne moraju, proširiti po ostalim moždanim regijama. Stoga nam se otvara mogućnost uvođenja nove tehnologije kojom bismo mogli prostorno i vremenski specifično djelovati na ograničenu moždanu regiju, koja je ishodište električnih izbijanja, te tako spriječiti sekundarnu generalizaciju i gubitak svijesti bez uzrokovanja promijena u interiktalnom razdoblju (5). Upravo takva tehnologija jest optogenetika. Ona se koristi opsinima, koji su na svjetlo osjetljivi proteini, a vrše ulogu raznovrsnih ionskih kanala i pumpi. Nakon fotoizomerizacije retinala, koji je kovalentno vezan na opsin, događa se niz konformacijskih promjena u proteinu koje dovode do otvaranja kanala i/ili aktivnog pumpanja iona. Ekspresijom opsina u specifičnim staničnim skupinama karakteriziranih posebnim obrascem neurohistokemijskih obilježja i vremenski preciznom primjenom svjetlosti točno određene valne duljine na točno određenu regiju mozga možemo dobiti temporalno, prostorno i stanično visoko specifičnu eksperimentalnu i potencijalno terapijsku metodu za istraživanja i liječenje epilepsije (6). Također, u kombinaciji s metodama detekcije epileptogenih izbijanja, ona može prekinuti (5,7,8) abnormalnu električnu aktivnost te time spriječiti nastanak epileptičnog napadaja. Dodatno, za razliku od elektrostimulacije, možemo birati hoćemo li aktivirati ili inhibirati skupinu stanica pumpanjem iona različitih naboja unutar ili izvan stanice te time modulirati neuralnu aktivnost prema potrebi.

## 2. EPILEPSIJE

Epilepsije su paroksizmalni poremećaji svijesti. Uzrokovane su prekomjerenim, abnormalnim i sinkroniziranim izbijanjima živčanih stanica u središnjem živčanom sustavu (SŽS) (9). Izbijanja imaju tendenciju ponavljanja, a klinički se očituju epileptičnim napadajima. Trenutna prevalencija aktivne epilepsije 2017. godine iznosila je 6.38 na 1000 osoba, dok je životna prevalencija bila 7.60 na 1000 osoba. Godišnja kumulativna incidencija iznosila je 6.77 na 100,000 osoba dok je stopa incidencije bila 61.44 na 100,000 osoba-godina (10).

Epilepsije mogu biti uzrokovane genetskim ili okolišnim čimbenicima. Oko 30 % svih epilepsija nazivamo idiopatskim epilepsijama (11). Idiopatske epilepsije uzrokovane su raznovrsnim genetičkim mutacijama koje najvećim dijelom zahvaćaju gene što kodiraju ionske kanale (slika 1). Otprilike četvrtinu epilepsija za koje nam je poznat okolišni uzročnik nazivamo simptomatskim (11). One etiološki mogu biti postupalne, posttraumatske, epilepsije nakon moždanog udara te one vezane uz perinatalne ozljede. Napretkom u razvoju dijagnostike SŽS-a, posebice magnetske rezonance (MR), udio etiološki razjašnjenih epilepsija je u porastu. Međutim, oko polovice epilepsija još uvijek čine one nepoznatog podrijetla.



Slika 1. Spektar etiopatogeneze epilepsija prikazan je na horizontalnom pravcu, dok vertikalna dimenzija ukazuje frekvenciju. Intenzitet sive ukazuje na ulogu genetike. Debela strelica upozorava na najvišu incidenciju, tanja na manju, a isprekidana na najnižu incidenciju podtipa epilepsije. Za sve prikazane tipove kanalopatija ima središnju ulogu u etiologiji. Prilagođeno prema: Berkovic SF, Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S. Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors. Trends Neurosci. 2006;29(7):391–7.

Prema najnovijoj klasifikaciji ILAE (eng. *International League Against Epilepsy*) iz 2017. godine podjela epilepsija ima tri razine (12). Prvu razinu čine vrste epileptičnih napadaja koji mogu biti fokalni, generalizirani ili nepoznatog ishodišta. Drugu razinu čine tipovi epilepsija koje se dijele na fokalne, generalizirane, kombinirane ili neodređene, dok treća razina opisuje epileptične sindrome. Sindromi se prezentiraju kao karakterističan zbir vrste napadaja, rezultata EEG-a i radioloških nalaza, specifičnih komorbiditeta i epidemioloških te etioloških značajki (12,13).

Unutar generaliziranih epileptičnih napadaja razlikujemo skupinu nemotoričkih *apsans* napadaja i motoričkih generaliziranih napadaja. Apsansi se dodatno dijele na tipične i atipične apsanse, mioklone napadaje i miokloniju očnih vjeđa (13). Fokalne epilepsije mogu biti jednostavne ili složene. Jednostavni parcijalni napadaji nisu praćeni gubitkom svijesti (14), dok se kod složenih pojavljuje gubitak svijesti i pamćenja za vrijeme trajanja napadaja (15). Klinička slika žarišnih napadaja ovisi o lokalizaciji električnih izbijanja. Najčešća lokalizacija električnih izbijanja tijekom žarišnih složenih napadaja jest temporalni režanj. Svega 10-30% složenih parcijalnih napadaja ima ekstratemporalno ishodište (15).

## 2.1. Temporolimbička epilepsija

Temporalna epilepsija (eng. *temporal lobe epilepsy*, TLE) najčešća je i najbolje istražena epilepsija u ljudi (16). Kompleksni parcijalni napadaji s temporalnim ishodištem mogu se dodatno podijeliti na one s mezijalnim i one s lateralnim temporalnim ishodištem. Iako im se klinička slika većim dijelom preklapa, napadaji s lateralnim ishodištem imaju izraženiju motoričku komponentu, svijest je dulje očuvana, a sekundarna generalizacija je češća. Napadaji mezijalnog ishodišta nazivaju se još i limbičkim napadajima. S obzirom na postupni razvoj, u početku je svijest djelomično očuvana. TLE uključuje nekoliko stadija koji prelaze jedan u drugi (17). Najprije se pojavljuje aura pa pseudoapsans na koji se nadovezuju automatizmi (15), najprije jednostavni automatizmi kao unilateralna distonija ili pareza, a na kraju kompleksni automatizmi ili sekundarna generalizacija (17). Aura se može manifestirati gustatornim ili olfaktornim simptomima, fenomenima poput *deja vu* ili *jamais vu*, strahom zbog zahvaćanja amigdale te drugim afektivnim i kognitivnim simptomima. Automatizmi se očituju kao mljackanje, hvatanje, hodanje, gužvanje odjeće itd. Pacijenti su amnestični za radnje koje obavljaju tijekom napadaja. Postiktalne glavobolje nisu neuobičajene. Karakteristični je patohistološki nalaz hipokampalna skleroza (18).

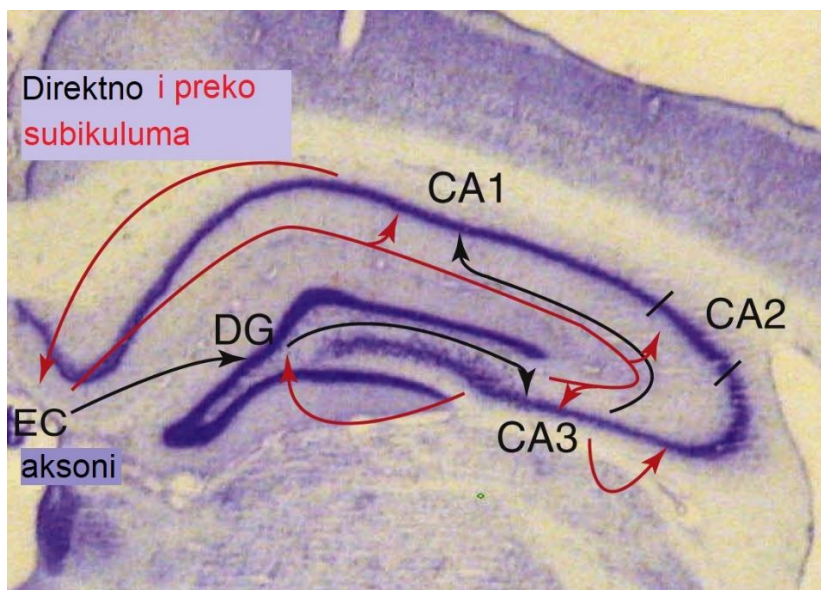
### 3. ANATOMIJA I FUNKCIJA TEMPOROLIMBIČKOG SUSTAVA

#### 3.1. Hipokampus

Retrokomisuralni je hipokampus smješten ispod površine medijalnog dijela temporalnog režnja i pripada troslojnom arhikorteksu. Na frontalnom presjeku uočava se zavijeni Amonov rog, cornu ammonis, unutar kojeg razlikujemo četiri odsječka, CA1-CA4 (19). Manji i vitkiji piramidni neuroni polja CA1 razlikuju se od velikih piramidnih stanica polja CA3. Polje CA1 još se naziva Sommerovim sektorom i smatra se najosjetljivijim područjem Amonovog roga. Tijekom opetovanih epileptičnih napadaja zbog osjetljivosti na hipoksiju velik dio piramidnih stanica toga polja propada. Polja CA2 i CA3 nazivaju se rezistentnim sektorom i propadanje stanica u tim je poljima slabije izraženo. Osnovna tri sloja koja oblikuju cornu ammonis su stratum moleculare, stratum pyramidale i stratum oriens. Stratum moleculare se dodatno može podijeliti u substratum eumoleculare i substratum lacunosum, unutar kojih se nalaze završetci dugačkih apikalnih dendrita piramidnih stanica, te substratum radiatum, kroz koji ti apikalni dendriti prolaze. Samo u polju CA3 postoji dodatni sloj, substratum lucidum, koji izgrađuju mahovinasta vlakna, odnosno aksoni zrnatih stanica fascia dentata. Stratum pyramidale čine tijela piramidnih neurona. Stratum oriens je građen od interneurona i bazalnih dendrita piramidnih stanica, a u njemu se nalaze i košaraste stanice koje djeluju kao inhibitorni interneuroni. Nakon aktivacije piramidne stanice ona putem aksonalnih kolaterala aktivira košaraste stanice koje putem aksosomatskih sinapsi uzrokuju inhibiciju okolnih piramidnih stanica. Najdublje je smješten alveus kojim prolaze aksoni piramidnih stanica koja na izlasku iz hipokampusa oblikuju fimbria hippocampi. Najveći dio aksona piramidnih stanica polja CA3 oblikuju Schafferove kolaterale koje aktiviraju piramidne stanice polja CA1. Polje CA4, koje čini završni dio Amonovog roga, većina autora smatra dubokim dijelom fascia dentata, te ga stoga nazivaju hilus fascia dentata. Fascia dentata, tj. gyrus dentatus ima nešto drukčiju troslojnu građu od Amonova roga. Umjesto stratum pyramidale u njemu se nalazi stratum granulare, koji čine zrnate stanice. Aksoni tih zrnatih stanica tvore sinapse s dendritima piramidnih stanica isključivo polja CA3 (20), a nazivaju se još i mahovinastim vlaknima. Sve piramidne stanice Amonovog roga, kao i zrnate stanice fascia dentata izrazito su ekscitabilne stanice te kao neurotransmiter izlučuju glutamat.

### 3.2. Trisinaptički put

Trisinaptički put je niz od tri neuronske veze unutar hipokampusa (slika 2) (21). Prvi neuron trisinaptičkog puta su piramidne stanice lamina principalis externa entorinalne moždane kore od kojih polaze aksoni koji oblikuju perforantni put (22). Probijajući subikulum on završava na dendritima zrnatih stanica fascia dentata, koje čine drugi neuron trisinaptičkog puta. Medijalnom komponentom perforantnog puta prenose se prostorne informacije putem N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora, a lateralnom komponentom neprostorne (npr. mirisi, objekti) preko opioidnih receptora (23). Od zrnatih stanica polaze mahovinasta vlakna (20) kroz hilus fascia dentata i završavaju na trećem neuronu trisinaptičkog puta, tj. piramidnim stanicama CA3. Kasnije te stanice Schafferovim kolateralama (24) komuniciraju s neuronima polja CA1 čiji aksoni dijelom odlaze u subikulum, a dijelom u alveus. Aksoni piramidnih stanica subikuluma projiciraju se povratno u entorinalno i peririnalno polje. Stoga trisinaptički put predstavlja glavni krug komunikacije između moždane kore i hipokampusa.



Current Biology

Slika 2. Koronarni rez kroz poprečnu os hipokampusa. Crne strelice prikazuju trisinaptički put. Crvene strelice prikazuju druge važne puteve u hipokampusu, uključujući izravne projekcije iz entorinalnog korteksa (EC) u sva tri polja CA, povratnu informaciju prema EC preko subikuluma i povratnu vezu od CA3 do fascia dentata (DG). Radi jednostavnosti, mnoge su druge pojedinačne veze hipokampusa izostavljene. Prilagođeno prema: Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol.* 2015 Dec;25(23):R1116-21.

### 3.3. Papezov krug

Godine 1937. James Papez opisao je niz neuronskih veza bitnih za procesiranje emocija i reakcija na emotivne podražaje (25). Iz subikuluma odlaze projekcije putem postkomisuralnog forniksa do nukleus mamillaris medialis, odakle se nastavlja mamilotalamički fascikul koji završava na jezgrama talamusa. Postoje i direktne projekcije prema talamusu (26) izravno iz forniksa u septalno-preoptičko područje i prednji (limbički) dio talamusa.

Iz talamusa potom talamokortikalne projekcije (26) cinguluma završavaju na paralimbičkoj (mezokortikalnoj) zoni. Nju sačinjavaju praesubiculum, parasubiculum i entorinalni korteks. Iz tog područja perforantnim putem se krug zatvara na neuronima fascia dentata. Dakle uz prethodno navedene kortikokortikalne intrahipokampalne projekcije trisinaptičkog puta, postoje i subkortikalne projekcije u talamus koje su nužne za povezivanje emocija i autonomnih reakcija. Stoga temporalna električna izbijanja živčanih stanica dovode do aktivacije limbičkih jezgara talamusa.

### 3.4. Središnji limbički kontinuum

Središnji limbički kontinuum sastoji se od hipotalamusa, limbičkog polja mezencefalona i septalno-preoptičkog područja. Tu prolaze sve silazne projekcije prema izvršnim strukturama moždanog debla i kralježnične moždine za somatske i visceralne funkcije. Također, uzlazne projekcije koje povezuju rombencefalom, njegove visceralne i autonomne strukture s hipotalamusom. Preko mamilarnog tijela taj sustav komunicira s Papezovim krugom, a preko komunikacija s hipofizom utječe na neuroendokrine funkcije.

Regio septalis telencefalona prima projekcije iz hipokampusu za lateralnu septalnu jezgru i dodatna aferentna vlakna iz preoptičkog područja, moždanog debla i hipotalamusa (27). Iz lateralne septalne jezgre eferentne projekcije odlaze povratno u entorinalni korteks i hipokampus (28), kroz medijalni telencefalički fascikul u preoptičko područje, moždano deblo i hipotalamus, te kao stria medullaris thalami u jezgre talamusa i epitalamusa. Stoga je jasno da septalno područje djeluje kao svojevrsno čvorište neuronskih veza i sudjeluje u upravljanju velikim brojem funkcija, od mikcije i defekacije, preko agresije i spolnog ponašanja do hranjenja i pijenja.

Regio preoptica se dijeli na medijalnu i lateralnu jezgru. Dok je nucleus preopticus medialis uključen u funkcije autonomne regulacije, regulacije gonadotropina i spolnih funkcija te termoregulaciju (29), nucleus preopticus lateralis bogato je povezan s limbičkim strukturama (30). U toj se regiji ljudskog mozga opisuje i spolno dimorfna jezgra te na granici s hipotalamusom suprahijazmatska jezgra zadužena za cirkadijarni ritam.

Hipotalamus (31) ima tri rostrokaudalne zone: supraoptičku, tuberoinfundibularnu i mamilarnu zonu. Može se podijeliti i na tri uzdužne zone: periventrikularnu, uz III. moždanu komoru, medijalnu, gdje je smještena većina neurosekrecijskih neurona putem kojih upravlja hipofizom, i lateralnu, koju čini medijalni telencefalički fascikul. On nadzire autonomni i neuroendokrini sustav te sadrži histaminske projekcije prema korteksu.

Središnji dio limbičkog sustava mezencefalona čini periakveduktalna siva tvar, nit poveznica između limbičkih struktura i nukleusa ambiguusa koji upravlja spolnim ponašanjem te lučenjem inzulina i hormona nadbubrežne jezgre. Preko projekcija u nukleus raphes magnus utječe na silazni sustav nadzora boli i *flight or flight response* (32). Ventralna tegmentalna regija daje dopaminske i serotoninske projekcije u MFB snop (eng. *medial forebrain bundle* = fasciculus telencephalicus medialis) koji seže od septalnog područja do lateralnog tegmentuma ponsa i produljene moždine, oblikuje lateralni dio hipotalamusa i dvosmjerno povezuje cijeli limbički kontinuum. Na rafe jezgrama završava direktni i indirektni, preko interpedunkularne jezgre, polisinaptički put kojim hipokampus preko septuma i habenula utječe na njihov rad.

### 3.5. Amigdala

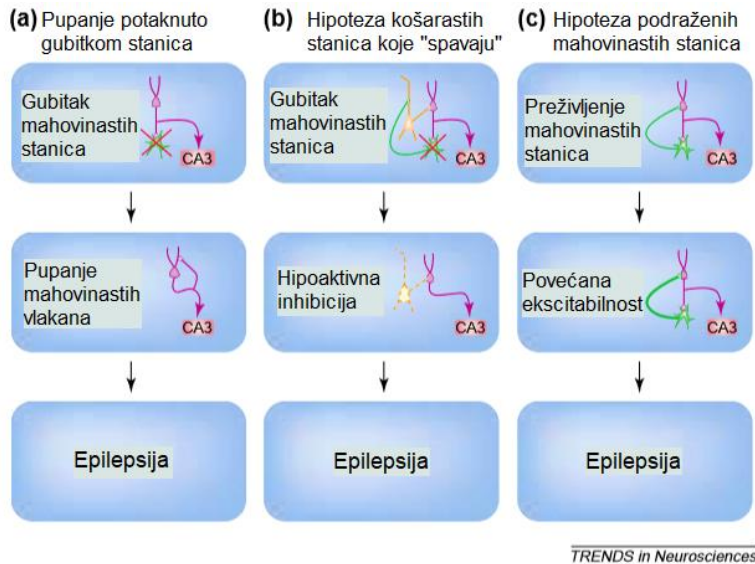
Amigdala je skupina jezgara u dorzomedijalnom vrhu temporalnog režnja koja ima sličnu embrionalnu osnovu kao neostriatum, odnosno bazalni gangliji. Ventralni amigdalofugalni put (33) je dvosmjerni put koji dijelom završava na septo-preoptičkom području, dijelom u medijalnom frontalnom korteksu, a dijelom inervira magnocelularni dio mediodorzalne jezgre talamusa. Postoji i amigdalotegmentalna projekcija iz centralne jezgre amigdale u MFB snop (34). Stria terminalis polazi od kaudalno-medijalnog dijela amigdale te, dijeleći se iznad komisure, suprakomisurnim dijelom završava na septalnom, preoptičkom i prednjem hipotalamičkom području; komisurnim dijelom povezuje dvije amigdale, a postkomisurnim dijelom inervira nucleus interstitialis striae terminalis (NIST). Amigdala ima eferentne projekcije (35) u subikulum i parasubikulum, entorinalno i peririnalno polje, cingulum, orbitofrontalnu koru i inzulu.

Većina projekcija iz amigdale je dvosmjerna, uz izuzetak projekcija u neostriatum (kaudatus i putamen). Također, za razliku od limbičkih jezgara talamusa koje su dvosmjerno povezane s hipokampusom, iz amigdala postoji samo jednosmjerna eferentna projekcija u magnocelularni dio mediodorzalne jezgre talamusa (36), dok povratne projekcije prima kao jednosmjerne aferentne projekcije iz intralaminarnih jezgara talamusa.



## 4. PATOFIZIOLOGIJA TEMPOROLIMBIČKE EPILEPSIJE

Epilepsija i njezin nastanak još su uvijek predmet mnogobrojnih rasprava. Postoji niz teorija kojima se nastoji objasniti zašto i kako nastaju epileptični napadaji te što uzrokuje nastanak konvulzija (slika 2). Još uvijek ne postoji jedinstven mehanizam kojim bismo objasnili sve.



Slika 3. Prikaz tri moguće hipoteze nastanka TLE. Prilagođeno prema: Ratzliff AH, Santhakumar V, Howard A, Soltesz I. Mossy cells in epilepsy: Rigor mortis or vigor mortis? Trends Neurosci. 2002;25(3):140–4.

### 4.1. Uloga GABA-ergičkih neurona

Epilepsija se može objasniti disbalansom stimulacijskih i inhibitornih podražaja. GABA, kao glavni inhibitorni neurotransmiter u SŽS-u, igra ulogu u nastanku epileptičnih napadaja. Mnogobrojni epileptični sindromi osnovu imaju u mutacijama gena vezanih uz GABA-u. Tako je u juvenilnoj mioklonoj epilepsiji mutirana podjedinica receptora GABRA1, dok je u idiopatskoj generaliziranoj epilepsiji s febrilnim konvulzijama mutacija zahvatila podjedinicu GABRG2 (11). Također, karakterističan vremenski početak idiopatskih epilepsija povezuje se s promjenom GABA<sub>A</sub> receptora iz ekscitatornog u nezrelom mozgu u inhibitorni u odrasлом mozgu (11). U puno je radova opisana povezanost disfunkcije GABA-ergičnih neurona i konvulzija (37). Tako, na primjer, manjak piridoksina koji djeluje kao kofaktor enzima glutamatne dekarboksilaze (eng. *glutamic acid decarboxylase*, GAD) za sintezu GABA-e može dovesti do atipičnih epileptičnih napadaja u novorođenčadi (38). Stanje se liječi peroralnom nadomjesnom terapijom piridoksinom. Također se pokazalo da tvari koje djeluju ekscitacijski na SŽS (npr. pilokarpin) uzrokuju slične obrasce neuralnih izbijanja i danas se rabe u animalnim modelima za provociranje epileptičnih napadaja.

#### 4.2. Fascia dentata kao ulazna vrata, ali i izvor ekscitacijskih impulsa

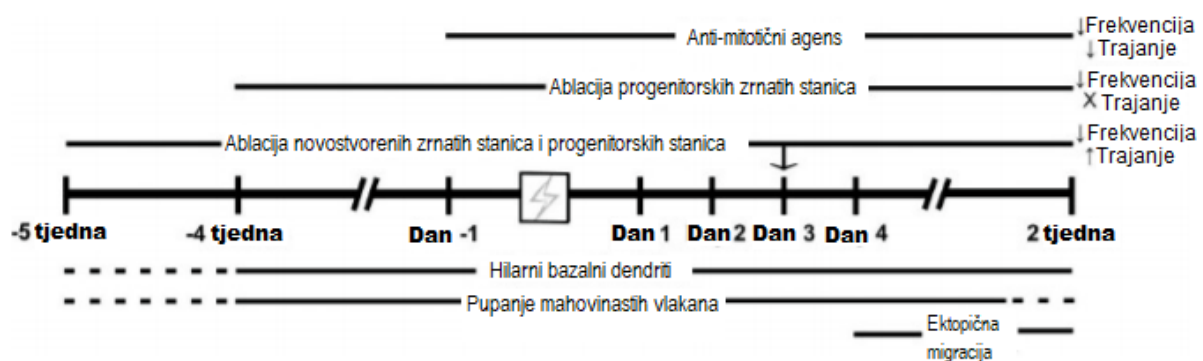
Perforantni put predstavlja glavni ekscitacijski ulazni put u fascia dentata. Produžena stimulacija perforantnog puta (eng. *perforant pathway stimulation*, PPS) u štakora dovodi do električnih izbijanja živčanih stanica i epileptogeneze. Nakon 30-minutne stimulacije tijekom 2 dana pripreme i produžene 8-satne subkonvulzivne stimulacije trećeg dana uočena su spontana izbijanja koja su nakon 2 do 3 tjedna napredovala do klinički očitih epileptičnih napadaja u štakora (39). Međutim, ako se nakon PPS-a fizički presiječe perforantni put neće se posljedično smanjiti frekvencija, trajanje, latencija niti težina epiletiformnih izbijanja. To se može objasniti jednom od dviju hipoteza. Ili se izbijanja mogu pripisati postojanju nekog drugog, podjednako važnog ekscitacijskog imputa koji presijecanjem perforantnog puta nismo oštetili ili je uloga entorinalnog korteksa gotova nakon primarnog podražaja stvaranjem proiktogenog hipokampusa koji postaje dostatan za održavanje i daljnji epileptogeni razvoj (40).

#### 4.3. Novonastale zrnate stanice nakon epileptogenih ozljeda mozga

Postoji veći rizik razvitka temporalne epilepsije nakon ishemijskih i traumatskih moždanih lezija te regije. One uzrokuju strukturne promjene u građi i neuronalnom sastavu fascia dentata. Posttraumatski dolazi do regeneracije zrnatih stanica koje diferenciraju iz subgranularne zone (41). Isti se proces obnove događa i nakon svakog epileptičnog napadaja. Iako u zdravome mozgu novostvorene stanice služe usvajanju novih informacija i lakšoj separaciji usvojenih znanja (42), one mogu pridonijeti epileptogenezi u odraslih (43).

Trauma može uzrokovati razvoj aberantnih aksonalnih i dendritičkih projekcija tek diferenciranih zrnatih stanica te ektopičnu intergraciju i migraciju stanica nastalih neposredno nakon traume (41). Promjene dendritičkih projekcija uočene su među stanicama nastalih 4 tjedna prije do 3 tjedna nakon epileptogenog podražaja, promjene u mahovinastim vlaknima među stanicama nastalim 4 tjedna prije do 4 dana poslije podražaja, dok je atipična migracija opisana isključivo među populacijom stanica nastalih posttraumatski (4 dana do 3 tjedna nakon podražaja) i nije uočena u zrnatim stanicama diferenciranim prije epileptogenog podražaja (41). Istraživanja su pokazala kako ablacija novostvorenih zrnatih stanica može ublažiti neuronalna izbijanja, smanjiti frekvenciju epileptičnih napadaja, ali i smanjiti ili produžiti trajanje pojedinačnog napadaja ovisno o periodu djelovanja na progenitorske stanice (41). Primjena

kontinuirane infuzije antimitotičnog faktora citozin-b-D-arabinofuranozida u razdoblju 1 dan prije epileptogenog podražaja do 2 tjedna poslije, smanjuje i trajanje i učestalost pilokarpinom induciranih napadaja u štakora (44). Ablacija neurogeneze 4 tjedna prije podražaja rezultirat će promjenom u vidu smanjenja frekvencije napadaja bez promjene u njihovom trajanju, ali i dugoročnim poboljšanjem kognitivnih deficita uzrokovanih epileptičnim napadajima (45). Nasuprot tome, ako se selektivno eksprimira receptor za difterija toksin na progenitornim stanicama 5 tjedana prije epileptogenog podražaja, ali difterija toksinom djeluje na stanice tek 3 dana nakon podražaja, postoji porast trajanja pojedinog epileptičnog napadaja uz smanjenje njihove ukupne frekvencije (slika 3) (41). Takav porast u trajanju možda bi se mogao pripisati neselektivnoj ablaciji stanica. Naime osim progenitornih stanica koje bi razvile aberantne veze i lokalizaciju, potencijalno smo reducirali i broj stanica koje bi stvorile normalne neuronske veze i lateralnu inhibiciju nužnu za ograničavanje izbijanja u hipokampusu.



Slika 4. Prikaz kako ablacija progenitornih stanica i zrnatih stanica različitim metodama u različitom trenutku utječe na frekvenciju i trajanje epileptičnih napadaja te migraciju stanica i promjenu sinapsi. Prilagođeno prema: Yu W, Krook-Magnuson E. Targeting newly generated granule cells: A double-edged sword. *Epilepsy Curr.* 2017;17(2):121–3.

#### 4.4. Uloga mahovinastih stanica

Mahovinaste stanice su najbrojnija podskupina neurona smještenih u hilusu fascia dentata (46). To su glutamatergične ekscitacijske stanice, a uz njih se u hilusu nalazi i nešto inhibicijskih GABA-ergičkih interneurona (47). Mahovinaste stanice spadaju u skupinu najosjetljivijih neurona. Njihovo značajno stradavanje opisano je u traumatskim ozljedama, moždanim udarima, kao i epileptičnim napadajima izazvanima električnim podraživanjem ili upotrebom ekscitacijskih toksina (46). Ove stanice inerviraju aksoni zrnatih stanica fascia dentata oblikujući mahovinasta vlakna. Osim toga, one primaju u manjem opsegu ekscitacijske

i inhibicijske podražaje iz polja CA3 (48). Aksoni mahovinastih stanica projiciraju se u unutarnji molekularni sloj fascia dentata, stvarajući tzv. asocijacijska i komisuralna vlakna. Ova vlakna ekscitiraju inhibicijske interneurone fascia dentata te preko njih blokiraju aktivnost okolnih zrnatih stanica. Ovaj mehanizam, inače poznat kao proces lateralne inhibicije, odgovoran je za tzv. lamelarnu organizaciju hipokampalne formacije, a njen poremećaj uzrok je nastanka temporolimbicke epilepsije. Mahovinaste stanice pokazuju karakterističnu, deset puta veću frekvenciju spontanih ekscitatornih postsinaptičkih potencijala (sEPSP) nego inhibitornih podražaja (46). Postoje tri hipoteze kojima se opisuje uloga mahovinastih stanica u epileptogenezi. Prvo, propadanje mahovinastih stanica ima za posljedicu stvaranje dodatnih veza mahovinastih vlakana zrnatih stanica s okolnim zrnatim stanicama jer su izgubile svog postsinaptičkog partnera, što posljedično uzrokuje preveliku ekscitabilnost fascia dentata (49,50). Protiv te teorije govore eksperimenti koji su pokazali kako mahovinasta vlakna stvaraju više sinapsi s interneuronima nego samim mahovinastim stanicama u hilusu. Prema drugoj teoriji, smrt mahovinastih stanica dovodi do izostanka ekscitacije košarastih stanica, koje u normalnim okolnostima inhibiraju okolne zrnate stanice. Međutim zbog propadanja mahovinastih stanica njihovu aktivnost nema tko potaknuti te one miruju (eng. *dormant basket cell hypothesis*). Kako su one glavni inhibicijski interneuroni, posljedično dolazi do hiperekscitabilnosti i električnih izbijanja zrnatih stanica fascia dentata (51). Treća hipoteza tvrdi upravo suprotno, odnosno da su za nastanak epileptičnih izbijanja najvažnije mahovinaste stanice koje su „preživjele“. Naime, da bi kompenzirale propadanje velikog broja mahovinastih stanica, preostale mahovinaste stanice u hilusu povećavaju svoju električnu aktivnost te se počinju ponašati epileptogeno. Dakle, preostale mahovinaste stanice bi putem sEPSP mogle dodatno potencirati već postojeći sinaptički krug između mahovinastih vlakana, mahovinastih stanica i zrnatih stanica, stvarajući *circulus vitiosus* konstantne održive depolarizacije i epileptogeneze (46,52). Postoje mnogobrojna istraživanja koja idu u prilog, ali i ona koja pobijaju svaku od navedenih teorija. Iako se znanstvena zajednica još uvijek nije uspjela dogovoriti koji je najvažniji mehanizam kojim mahovinaste stanice utječu na epileptogenezu, njihova je uloga u promjeni praga epileptičnog napadaja te time i nastanku temporolimbicke epilepsije neosporiva.

## 5. ANIMALNI MODELI

Životinjski su modeli nužni za istraživanje epilepsije, jer su podatci vezani za epilepsiju u ljudi većinom deskriptivne prirode. Istraživanja epilepsije na ljudima ograničena su dijelom etičkim normama, a dijelom rezolucijskim sposobnostima današnjih radioloških metoda.

Na primjer, epileptogeneza u temporalnom režnju dugo je bila izjednačavana s prisutnošću hipokampalne skleroze (53). Međutim, postoje pacijenti bez hipokampalne skleroze koji imaju epilepsiju (54), kao i kirurški pacijenti s hipokampalnom sklerozom bez povijesti febrilnih konvulzija ili moždanih udara koji bi prouzročili takvo stanje. Istraživanja su pokazala da izbijanja u hipokampusu često ne dovode do klinički vidljivog epileptičnog napadaja, dok se i manje promjene aktivnosti u amigdali i parahipokampalnoj vijuzi mogu proširiti i uzrokovati manifestnu epilepsiju (55).

Važnost animalnih modela upravo leži na razjašnjavanju kontroverznih znanstvenih stavova uz pomoć eksperimentalne potvrde. TLE se očituje u nekoliko karakteristika. Postoji žarište u limbičkom sustavu, početna predisponirajuća lezija, latentni period te hipokampalna skleroza i kasnija reorganizacija mreže živčanih stanica (56). Veliki dio toga možemo preslikati na modelu TLE u glodavca, kojim se koristimo za naknadne analize i istraživanja.

Danas se sve više postavlja pitanje jesu li animalni modeli reprezentativni za humanu epilepsiju i u kojoj mjeri. Naime, hipokampalna skleroza koja čini temelj epileptogeneze u animalnim modelima nije nužno prisutna i isključivo povezana s TLE u ljudi. Pacijenti s TLE većinom imaju normalan neurološki status (barem pri početnim pregledima), fokalne neurološke ispade s asimetričnim oštećenjima mozga te razvoju epilepsije ne prethodi produljeni epileptični status. Nasuprot tome, animalni se modeli, u kojih je epileptogeneza i inducirana uvođenjem životinje u produljeni epi-status, manifestiraju generaliziranim epileptičnim napadajima s često difuznim oštećenjima moždane tvari te izraženim promjenama u ponašanju (16).

### 5.1. Izbor animalnog modela

Životinjski su modeli jedina mogućnost za detaljnija istraživanja i proučavanje epilepsije te obrazaca električnih izbijanja. Oni su i jedina mogućnost u istraživanju novih antiepileptika. U animalnim je modelima moguće reproducirati hipokampalnu sklerozu, pupanje i formiranje novih sinapsi mahovinastih vlakana, različite moždane lezije te spontana električna izbijanja, međutim nije moguće sve reproducirati u istome modelu. Kako ne postoji jedinstven životinjski

model koji bi oponašao sve karakteristike TLE, nužno je utvrditi koji dio patofiziološkog procesa nastojimo istražiti i koji je animalni model najpogodniji za takvo istraživanje (57).

## 5.2. Koje animalne modele poznajemo

Epileptična se izbijanja mogu izazvati nizom različitih mehanizama. Može se direktno aktivirati NMDA receptore (kvinolinski model) ili indirektno preko porasta razine glutamata (kainatni model, pilokarpinski model, organofosfatni model). Suprotno tome, inhibicija GABA-e također dovodi do provokacije konvulzija (flurotilski model). Postoje i modeli koji kombiniraju više mehanizama djelovanja. Kobalt-homocisteinski model istovremeno inhibira GABA-u i aktivira NMDA receptor, a tetanus-toksin model uz inhibiciju GABA-e aktivira i glicin. Za provokaciju epileptičnog napadaja i hipokampalnih promjena može se primijeniti i stimulacija perforantnog puta, hipoksijsko-ishemijski model ili hipertermija koja dovodi do porasta IL- $\beta$  i oštećenja krvno-moždane barijere. U nastavku ću detaljnije opisati nekoliko modela.

### 5.2.1. Kainatni model

Kainatna kiselina (KA) je agonist glutamata koji djelovanjem na AMPA i KA receptore dovodi do postupne depolarizacije i ekscitotoksičnosti. Stoga, ona može biti korisna za indukciju epileptogeneze (58). KA se može primijeniti u modelu sistemno i intrahipokampalno. Obje varijante primjene dovode do sličnih neuropatoloških promjena i encefalografskih (EEG) nalaza koje nalazimo kod ljudi koji boluju od epilepsije te imaju slično razdoblje latencije od prvog epileptogenog podražaja (*status epilepticus*, SE) do razvoja kasnijih epileptičnih napadaja kao i u ljudi (59).

Intrahipokampalna primjena uključuje žarišnu injekcijsku primjenu 0.4-2.0  $\mu$ g KA tijekom 5-60 minuta i uzrokuje izbijanja koja se iz limbičkih struktura mozga šire na druga područja. Razina električnih izbijanja može se povezati s hipokampalnom gliozom i gubitkom stanica, ali ne korelira s intenzitetom početnog epileptičkog statusa (60). Takav je put primjene povezan s manjim stupnjem smrtnih ishoda. Sistemno doziranje 6-15 mg/kg tijekom 30-60 minuta povezano je sa znatno višom stopom smrtnosti (57). Takav se ishod može ublažiti višestrukim doziranjem manjih doza od 5 mg/kg/h, što još uvijek dovodi do pupanja mahovinastih vlakana, spontanih rekurentnih električnih izbijanja i pojave epileptičnih napadaja (61). Prednost intrahipokampalne i intra-amigdaloidne primjene KA leži u preciznijoj imitaciji fokalne TLE u ljudi (59). Istraživanja su pokazala kako fenotipske razlike i razlike između vrsta ne utječu na vrijeme latencije kod KA intrahipokampalno inducirane TLE (57).

KA ponajviše djeluje na amigdalnu, septum, medijalni talamus i korteks, to jest na limbički sustav. Degenerativne su promjene najizraženije u CA1 polju (62), dok su zrnate stanice i regija CA2 pošteđene. Već 24 sata nakon indukcije SE bilježi se gubitak stanica u talamusu, korteksu i entorinalnom korteksu, koji u kasnijim razdobljima tek umjereno progredira. Najteži gubitak stanica očituje se u proksimalnom subikulumu i sloju III medijalnog entorinalnog korteksa (63). Gliozna je najistaknutija potkraj prvog mjeseca, a premda se nakon 3 mjeseca znatno smanjuje, u manjem opsegu ostaje trajno prisutna u većine šakora (63).

### 5.2.2. Pilokarpinski model

Pilokarpin pripada skupini kolinomimetika koji mogu poslužiti za indukciju epileptogeneze (64). Dovodi do inicijacije epileptičnih napadaja aktivacijom M1 muskarinskih receptora (65), te održava izbivanja putem NMDA receptora. Propagacija je omogućena porastom razine interleukina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i oštećenjem krvno-moždane barijere (eng. *blood-brain barrier*, BBB) (66).

Primjena može biti sistemna (intraperitonealna) ili intrahipokampalna i, kao i u KA modela, žarišna injekcija ima niži rizik smrtnog ishoda (56). Klinička slika varira ovisno o primijenjenoj dozi. Kod primjene 100 mg/kg oštećenja zahvaćaju samo piriformni korteks i prednju olfaktornu jezgru. Limbički se sustav aktivira tek pri primjeni 200 mg/kg, dok 400 mg/kg uzrokuje difuzne neurodegenerativne promjene u svim podložnim područjima (67). Nakon indukcije SE i pojave toničko-kloničkih konvulzija slijedi latentni period prije razvoja kliničke epilepsije i spontanijih električnih izbivanja (56).

Pilokarpin se može kombinirati s litijem jer se međusobno potenciraju (68). Najprije se izvodi premedikacija s 3 mEq/kg litija, koji snižava prag podražljivosti. U tom je slučaju dostatno 30 mg/kg pilokarpina za indukciju SE, a dijeleći ga na manje doze uz višestruko doziranje dodatno se smanjuje smrtnost (56). U tim količinama ni litij ni pilokarpin samostalno neće uzrokovati spontana električna izbivanja (68). Štakori koji su dobili litij-pilokarpin nisu se razlikovali od štakora koji su primili više doze isključivo pilokarpina ni u ponašanju ni u elektografskom, metaboličkom i neurohistopatološkom nalazu. Jedina razlika je bila u manjoj smrtnosti i preciznijoj indukciji SE s litij-pilokarpin kombinacijom (69).

### 5.2.3. Stimulacija perforantnog puta

Stimulacija perforantnog puta (eng. *perforant pathway stimulation*, PPS) može biti unilateralna, bilateralna i samo-održavajuća stimulacija. Za razliku od prethodnih metoda, to je elektrofiziološki, a ne kemijski postupak kojim se djeluje isključivo lokalno na hipokampus bez sistemnih i difuznih moždanih promjena.

#### 5.2.3.1. Unilateralna stimulacija

7 dana nakon kirurške implantacije elektroda u hipokampus primjenjuje se unilateralna stimulacija perforantnog puta. Struja se primjenjuje u ciklusima od 10 s stimulacije s pulsirajućim podražajima od 20 Hz po 0.2-0.4 ms. Ti se ciklusi ponavljaju svakih 30 s. Oni čine veću skupinu od 10 krugova takvih ponavljanja između kojih postoji 15 minuta pauze. Reproducira se sve dok se ne pojave kontinuirana spontana električna izbijanja živčanih stanica koja se potom mjere EEG-om (57,70).

#### 5.2.3.2. Bilateralna PPS

Kirurški se pod anestezijom uvode dvije stimulirajuće elektrode i dvije elektrode koje snimaju. Životinje se sedmog dana postoperativno izlaže trosatnoj bilateralnoj stimulaciji čiji je cilj aktivacija piramidnih stanica i indukcija električnih izbijanja zrnatih stanica (57).

Kod unilateralnih izbijanja neurodegeneracija je ograničena na zone CA1 i CA3, bez zahvaćanja fascia dentata. Kod bilateralnog podraživanja do 8 sati neurodegeneracija zahvaća samo zrnate stanice, dok kod produljene stimulacije od 24 sata dolazi do gubitka i hilarnih i piramidnih hipokampalnih živčanih stanica (71).

Istraživanja su pokazala da postoje razlike između štakora koji su nakon primarnog SE razvili progresivan tijek bolesti sa sve učestalijim i težim izbijanjima, za razliku od onih čija bolest nije progredirala. Bilateralni gubitak hilarnih stanica, bilateralni pad broja parvalbumin i somatostatin-imunoreaktivnih neurona te pojačano pupanje mahovinastih vlakana povezani su s progresivnim tijekom i porastom frekvencije epileptičnih napadaja. Kod neprogresivnih slučajeva promjene su bile pretežito unilateralne, a formiranje *de novo* sinapsi znatno manje izraženo (72). Bilateralna stimulacija omogućuje postizanje učinka nalik kemokonvulzivnim lijekovima bez sistemnih nuspojava. Unatoč mnogim prednostima, očiti nedostatak te metode jest potreba za kirurškim zahvatom (57).

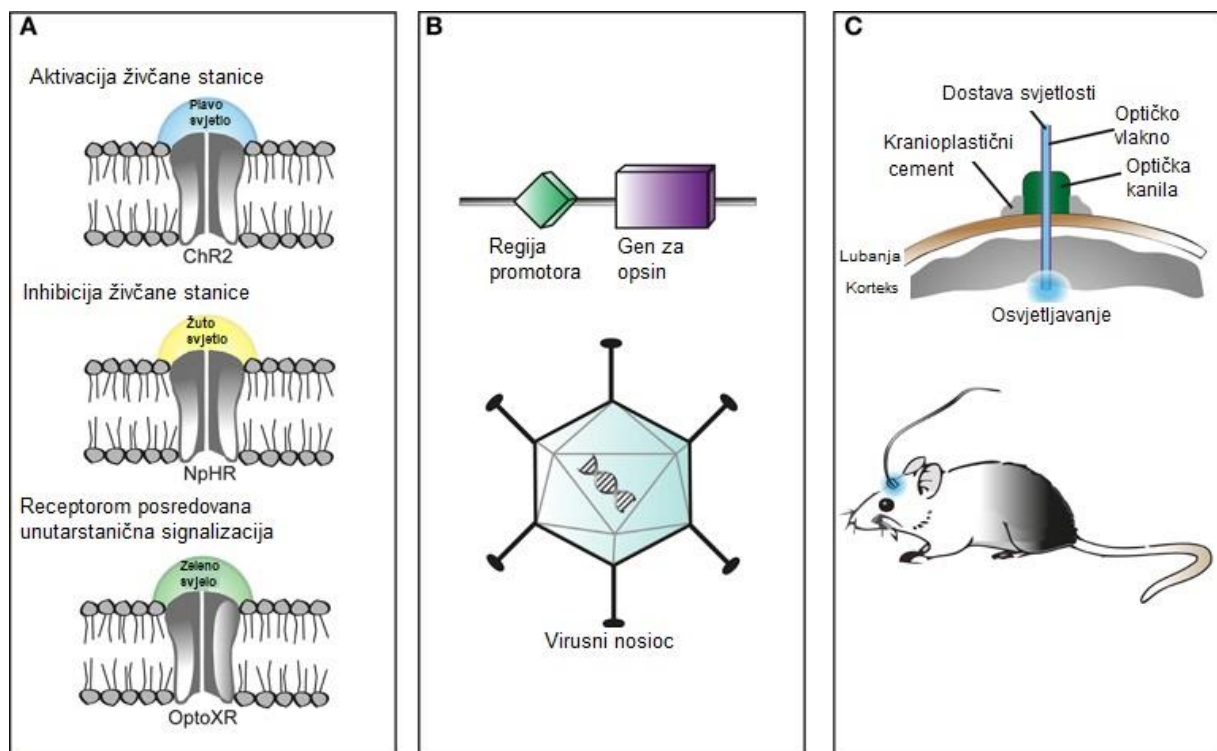


### 5.2.3.3. *Samoodrživa stimulacija*

Iako nalikuje klasičnom PPS-u, izvodi se u dva koraka (57). Prvo se elektrode implantiraju u hipokampus i stimulira se po 10 s s 50 Hz kako bi se razvila epileptična izbijanja, a životinje u kojih električna izbijanja ne dosežu više od 250  $\mu$ A stimuliramo kontinuirano u pulsevima od 1 ms s 400  $\mu$ A i 50 Hz. Stimulacija traje 90s. Razvija se SE koji traje oko 6 do 12 sati (57). Dok diazepamom i fenobarbitalom možemo smanjiti promjene ponašanja modela, fenitoin nije učinkovit. Neurodegeneracija zahvaća fascia dentata i CA1 regiju (73).

## 6. OPTOGENETIKA

Optogenetika je područje koje se izrazito brzo razvija i omogućuje napredak neuroznanosti, uključujući i istraživanja vezana uz epilepsiju. Uz pomoć na svjetlo osjetljivih opsina postiže se trenutna, vremenski i prostorno specifična aktivacija ili inhibicija točno određene skupine stanica i zato je idealna za kontrolu izbijanja na zahtjev (6,74–76). Opsini mogu biti na svjetlo osjetljivi kanali, pumpe, G-proteinski receptori pa čak i transkripcijski faktori (77). Prvi korak jest odabrati odgovarajući opsin, potom osigurati njegovu ekspresiju u stanici i na kraju dostaviti svjetlost kako bismo aktivacijom opsina regulirali staničnu aktivnost (78). *In vivo* i *in vitro* istraživanja dokazala su korist optogenetike u regulaciji epileptičnih izbijanja (8,79,80). Cilj je reagirati u trenutku pojave prvih prediktalnih i iktalnih električnih izbijanja, sprječavajući difuzno širenje epileptičnih potencijala i pojavu kliničkih znakova epilepsije s posljedičnom neurodegeneracijom. Tu TLE, za razliku od talamokortikalne epilepsije, predstavlja dodatne izazove zbog velikih interindividualnih razlika u nalazu EEG-a i prisutnosti interiktalnih izbijanja koja otežavaju prepoznavanje početka epileptičnih napadaja (5).



Slika 5. Optogenetika se sastoji od nekoliko koraka. (A) Odabir odgovarajućeg opsina. (B) Osiguravanje zadovoljavajuće ekspresije opsina u željenoj staničnoj populaciji. (C) Aktivacija ili inhibicija živčane aktivnosti s pomoću iluminacije. Prilagođeno prema: Pama EAC, Colzato L, Hommel B. Optogenetics as a neuromodulation tool in cognitive neuroscience [Internet]. Vol. 4, Frontiers in Psychology . 2013. p. 610.

## 6.1. Opsini

Opsini su na svjetlo osjetljivi transmembranski proteini. Dije se na bakterijske opsine (tip I), koje nalazimo u prokariotima, gljivama i algama (81), te životinjske opsine (tip II), koji služe za vid u eukariota (82). Homolognost sekvenci između animalnih i bakterijskih opsina vrlo je niska, međutim unutar obitelji iznosi između 20% i 80% (83). Kovalentnim vezanjem retinala (retinaldehida), jednog od oblika vitamina A, na lizinski ostatak proteinske opsinske jedinice, oblikuje se rodopsin.

Tip II opsini su zapravo G-proteini sa sedam transmembranskih podjedinica (eng. *G protein-coupled receptors*, GPCR). U mirovanju vežu 11-cis retinal, koji nakon apsorpcije fotona prelazi u all-trans konfiguraciju i omogućuje fototransdukciju svjetlosnog u električni signal. Nakon fototransdukcije veza između retinala i opsina se hidrolizira. All-trans retinal se otpušta i veže se novi 11-cis retinal (84).

Tip I opsini u neaktivnom obliku vežu all-trans retinal. Pri apsorpciji fotona dolazi do fotoizomerizacije iz all-trans u 13-cis retinal, međutim nikada ne dolazi do pucanja kovalentne veze. Nakon aktivacije retinal se vraća u prvotni all-trans oblik, cijelo vrijeme održavajući kovalentnu vezu s opsinom (85).

Za optogenetiku najvažnije je razumjeti kako veličina, kinetika, odnosno aktivacijske/deaktivacijske/inaktivacijske konstante, osjetljivost na određenu valnu duljinu i ionska selektivnost direktno definiraju mogućnost upotrebe i ulogu određenog opsina u istraživanjima te da je vrlo bitno i zahtjevno izabrati odgovarajuću opsinsku inačicu (83).

## 6.2. Vremenska specifičnost

Za vremensku preciznost potrebna nam je dostava svjetlosti određene valne duljine u točno određenom trenutku. Kako bismo mogli pravovremeno reagirati u optogenetici nužno je postojanje preciznih metoda registriranja električnih izbijanja i prepoznavanja promjene obrazaca izbijanja iz svakodnevnog normalne moždane aktivnosti u epileptogenu aktivnost. Te se dvije tehnologije moraju istovremeno razvijati i usavršavati kako bismo došli do željene kontrole živčanih stanica. Danas se na EEG nadovezuju posebni programski sustavi koji omogućuju prepoznavanje posebnog obrasca epileptogenih izbijanja, karakterističnog i jedinstvenog za svaku pojedinu životinju, na temelju detaljne analize jačine signala, učestalosti promjena na EEG-u, amplitude, širine, frekvencije i pravilnosti EEG šiljaka te promjena frekvencije električnih izbijanja živčanih stanica (5).

### 6.3. Stanična specifičnost

Aktivacija ili inhibicija točno željene skupine stanica znatno je zahtjevnija. Postoje različite metode kojima se ona nastoji postići. Mogu se rabiti virusni vektori kao AAV (eng. *adeno-associated virus*) ili lentivirus, elektroporacija ili transgenične životinje. Selektivnu ekspresiju opsina u specifičnoj staničnoj liniji možemo postići ciljanjem na neurokemijski profil stanica (npr. ekspresija parvalbumina), stanično podrijetlo, lokaciju (injekcija virusa u točno ograničeno područje), vrijeme stvaranja stanice s pomoću retrovirusa koji djeluju samo na stanice koje se dijele, razinu aktivnosti stanica u određenom trenutku ili njihove projekcije (preko retrogradnog transinaptičkog prijenosa) (86).

Najizravniji način jest pozicioniranje opsina pod specifični promotor. Postoje tri vodeća problema takvog pristupa. Može se pojaviti ekspresija i u drugim staničnim populacijama, dugi promotori ne stanu u male vektore (npr. AAV) i ako je promotor preslab, ekspresija opsina biti će nedostatna (86).

Kako bi se ti problemi izbjegli, opsini se stavljaju pod snažne promotore, a selektivnost stanica postiže se putem Cre/loxP sustava. Cre rekombinaza ili ciklička rekombinaza jedan je od najkorištenijih oblika tirozin rekombinaza. Ona omogućuje prepoznavanje i djelovanje između specifičnih loxP sekvenci unutar deoksiribonukleinske kiseline (eng. *deoxyribonucleic acid*, DNA) (87). Može uzrokovati eksciziju i/ili inverziju slijeda, ovisno o orijentaciji loxP lokusa između kojih se nalazi (86). Kako bi se izbjegla neselektivna ekspresija ili preslaba ekspresija zbog nedovoljne kontrole nad Cre koja bi nastavila uzrokovati inverzije sekvence, „paleći i gaseći“ ekspresiju razvio se *flip-excision* (FLEX) sustav (88,89). U njemu se rabe dva para loxP sekvenci od kojih je jedan mutirani lox2272. Iako Cre prepoznaje mutirani lox2272, rekombinacija je moguća samo između dviju jednako mutiranih sekvenci (90). U prvom krugu Cre dovodi do inverzije sekvence, a u drugom ekscizije po jednog od oba para loxP mjesta, kako bi se spriječile daljnje rekombinacije i zaključao virus u aktiviranom stanju (86). Ta se metoda pokazala uspješnom za postizanje dostatnih razina ekspresije opsina (89).

Postoji obilje linija transgeničnih miševa, među kojima i Cre linije (91), koje su komercijalno dostupne. Potrebno je osvijestiti da je ekscizija sekvence uzrokovana Cre (npr. STOP kodona) trajna, čak i kada je ekspresija rekombinaze prolazna. Stoga se opsini mogu eksprimirati u svim stanicama koje su potomstvo stanice u kojoj se rekombinacija dogodila, što može imati posljedice na rezultate istraživanja. Također, potrebno je postići staničnu selektivnost na temelju većeg broja karakteristika, jer postoji više staničnih tipova s istim neurokemijskim

markerom (86). Taj se problem nastoji nadvladati intersekcionalnim transgeničnim modelima (91) u kojima se rabi kombinacija dvaju rekombinacijskih sustava, Cre/loxP i Flp/Frt sustava. Na taj se način postiže veća stanična selektivnost, jer je nužna prisutnost dvaju, a ne samo jednog staničnog markera da bi se u toj stanici opsin eksprimirao. Iako danas imamo velik izvor Cre linija, Flp linije nisu toliko raširene, te će biti nužno povećati izvore Flp linija, kao i kombiniranih Cre-Flp linija (86).

Za istraživanja na ljudima moraju se koristiti virusni vektori, budući da transgenični pristup, iz etičkih razloga, nije odobren. Neovisno o optogenetici, manipulacija genima i njihovom transkripcijom otvara i druge prednosti, prije svega u terapijskom pristupu (77,80,92). No za istraživanja na životinjama transgenični pristup ima mnogobrojne prednosti nad viralnim metodama. Injekcije virusa su invazivne, razina opsina ovisi o broju viralnih kopija, a ako optičko vlakno nije u optimalnom položaju spram lokacije dane injekcije, može doći do neadekvatnog osvjetljavanja ključnih stanica (86).

#### 6.4. Specifičnost smjera modulacije aktivnosti živčanih stanica

Ovisno o tipu kanala ili pumpe možemo djelovati ekscitacijski ili inhibicijski.

##### 6.4.1. Aktivacija

Za aktivaciju se najčešće rabi *Channelrhodopsin-2* (ChR2), neselektivni kationski kanal prisutan u alge *Chlamydomonas reinhardtii*. Svjetlosna stimulacija plavim svjetlom (86) dovodi do pasivnog kretanja monovalentnih i divalentnih kationa niz njihov elektrokemijski gradijent ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  i  $\text{K}^+$ ) i depolarizacije stanične membrane (93). Naravno, kasnije je razvijeno još mnogo varijanti nalik prvotnom ChR2 u nastojanjima da se postigne što preciznija ekspresija i bolja kinetika otvaranja/zatvaranja.

Međutim, sve te varijante imaju maksimum ekscitacije na 470 nm, a kako je prodor u dubinu srazmjernan veličini valne duljine, plava svjetlost niske valne duljine ne dopire duboko u tkivo, već se raspršuje u površnim slojevima. Mnogo praktičnija bila bi upotreba crvenog svjetla većih valnih duljina, te su stoga napravljene varijante VChR s pomaknutim apsorpcijskim maksimumom derivirane od alge *Volvox carteri* (94). Danas je u pokusima u kojima je potrebno obuhvatiti veće područje mozga preferirana upotreba opsina koji se aktiviraju crvenim svjetlom (86).

Zbog svoje kinetike varijante ChR pogodne su za vrlo brzu aktivaciju i omogućuju visoku vremensku specifičnost (93,95), ali nisu optimalne kad je potrebna produljena aktivacija živčanih stanica. U tom bi slučaju trebali imati stalan izvor svjetlosti visokog intenziteta tijekom nekoliko minuta, što bi dovelo do nuspojava u vidu zagrijavanja i posljedičnog oštećenja tkiva (86). Zato su napravljeni opsini kod kojih je kratkotrajni impuls svjetlom dostatan za dulje održavanje u aktiviranom stanju. Nakon niza različitih modifikacija proteinskih ostataka u molekuli, na kraju su modifikacijom na poziciji C128 postignute ključne promjene u fotociklusu, koje su omogućile stabilizaciju u aktiviranom stanju. Takvi su rodopsinski kanali nazvali *Step-Function Opsins* (SFO) i nakon 10 ms stimulacije plavim svjetlom kanal ostaje otvoren 30-60s (96). Kasnije su razvijeni stabilizirani SFO (SSFO) (97) s još većom osjetljivošću na slabe svjetlosne podražaje i deaktivacijskom konstantom od pola sata. Njihovom stimulacijom izaziva se depolarizacija ispod praga podraživanja. Kako pojačavaju osjetljivost stanica, a da ih direktno ne aktiviraju, mogu se rabiti za modulaciju mreža živčanih stanica (86).

#### 6.4.2. Inhibicija

Budući da s ekscitacijskim modelima možemo proučavati samo različite ekscitacijske obrasce i kliničke manifestacije takvih električnih promjena, a ne možemo djelovati na direktnu inhibiciju izbijanja niti samostalno regulirati ekscitacijsko-inhibicijske mreže živčanih stanica, razvila se potreba za inhibicijskim opsinima koji bi imali jednaku vremensku preciznost i povoljne karakteristike kao ChR2.

Neki od prvih korištenih inhibicijskih opsina bili su halrodopsini, točnije NpHR deriviran iz bakterije *Natronomonas pharaonis* (98). Iako je inicijalno istraživanje uključivalo uz NpHR i HsHR, halrodopsin deriviran iz *Halobacterium salinarum*, zbog veće stabilnosti i boljih elektrokemijskih karakteristika *in vitro* za istraživanja na životinjskim modelima izabran je NpHR. Oba halrodopsina imaju maksimum ekscitacije blizu 580nm (žuto svjetlo) pri čemu dolazi do aktivnog pumpanja kloridnih (Cl<sup>-</sup>) iona u stanicu i hiperpolarizacije stanične membrane (99). Pokazalo se da aktivacijom NpHR s velikom vremenskom preciznošću možemo blokirati i izolirane akcijske potencijale i dugotrajnija izbijanja te da se u kombinaciji s ChR2 (koji ima drukčiji maksimum) može rabiti za dvosmjernu optičku modulaciju, ovisno o primijenjenoj valnoj duljini svjetlosti (98).

Formiranje agregata u endoplazmatskom retikulumu pri ekspresiji NpHR može dovesti do stanične toksičnosti (75) te se stoga razvila potreba za stvaranjem modela s boljim elektrokemijskim karakteristikama i smanjenim stvaranjem agregata. Naposljetku je razvijen

eNpHR3.0 s dvostruko izraženijom staničnom hiperpolarizacijom, trostrukim porastom ionskih struja i znatnim pomakom ekspresijskog maksimuma prema crvenom svjetlosnom spektru, kao idealni model za buduća istraživanja (76).

Djelovanje NpHR na kloridne kanale može potencijalno imati posljedice i na druge receptore u SŽS-u. Unutarstanični pomak kloridnih iona pri svjetlosnoj aktivaciji halrodopsina uzrokuje promjene u homeostazi klorida nužnoj za adekvatno funkcioniranje GABA<sub>A</sub> receptora. Značajan porast unutarstanične koncentracije kloridnih iona mogao bi uzrokovati egzacerbaciju ionako poremećene GABA-ergičke aktivnosti u epilepsiji do razine obrata gdje bi aktivacija GABA<sub>A</sub> receptora uzrokovala depolarizaciju (100).

Razvijena je i druga skupina inhibicijskih opsina, derivirana iz bakterije *Halorubrum sodomense*. Aktivirani žutom/narančastom svjetlosti aktivno pumpaju protone u izvanstanični prostor (86). Glavni predstavnik je *Archaeorhodopsin-3* (Arch (72) i Arch-T (102)). Za razliku od halrodopsina, ne interferiraju s GABA<sub>A</sub> receptorima jer ne djeluju na kloridne ione, međutim mogu uzrokovati promjene pH (86). Dokazana je uspješna inhibicija električne aktivnosti, čak i u *in vivo* pokusima na primatima (102). Kao i NpHR, i *Archeorhodopsin-3* se može rabiti u istraživanjima dvosmjerne aktivacije-inhibicije u kombinaciji s ChR2, birajući hoćemo li primijeniti svjetlost plavog ili žutog spektra (76,102). Ako te inhibicijske opsine kombiniramo s ekscitacijskim opsinima crvenog spektra, možemo postići istovremenu ekscitaciju jedne i inhibiciju druge skupine stanica, npr. ekscitaciju GABA aktivnosti uz inhibiciju piramidnih neurona (86).

## 6.5. Dostava svjetlosti

Izvori koji se mogu rabiti uključuju laser (eng. *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) i LED svjetlost (eng. *Light Emitting Diode*). Laser ima kolimirani, koherentni, monokromatski snop koji ne zahtijeva filtre i omogućuje prijenos velike energije kroz vlakno malog promjera. Može se kombinirati s mehaničkim zatvaračem koji omogućuje prekidanje laserskog snopa kako bi se izbjegla kašnjenja u dosezanju maksimalne jačine. Glavni nedostatak i zatvarača i lasera je visoka cijena. S druge strane, LED svjetla su jeftinija i dosežu maksimum za manje od 200  $\mu$ s, pa izvanjski zatvarači nisu potrebni. Međutim, takva svjetlost nije monokromatska i zahtijeva kromatske filtre (86).

U *in vitro* pokusima najčešće se svjetlost dovodi kroz mikroskopsku leću (79,86,98), iako postoje i istraživanja u kojima se optička vlakna postavljaju blizu proučavanih područja (103).

*In vivo* se najčešće rabe optička vlakna koja se implantiraju u moždano tkivo. Mogu se direktno implantirati ili se mogu uvesti u mozak kroz prethodno fiksiranu kanilu (104). Danas postoje vodiči koji mogu dostavljati svjetlost različitih valnih duljina na različite lokacije duž cijelog vodiča (105), kao i varijante koje ne zahtjevaju optička vlakna. Bežičnu optogenetiku možemo postići injektibilnim optoelektroničkim  $\mu$ LED-ovima dimenzija u rangu veličine jedne živčane stanice (106) kao i LED uređajima koji se postavljaju na glavu (107).

## 6.6. Rezultati istraživanja

Od početka razvoja optogenetike do danas provedena su mnoga istraživanja kojima se nastoji poboljšati same istraživačke metode i pojasniti dosad nerazjašnjena pitanja vezana uz moždanu aktivnost i epilepsiju. Proučavalo se kako ekscitacija i inhibicija pojedinih stanica djeluju na epileptogenu aktivnost te kakvu je regulaciju moguće postići dvosmjernim pristupom.

Aktivacijom inhibicijskog eNpHR opsina u piramidnim stanicama hipokampusa mogu se prekinuti abnormalna električna izbijanja. NpHR transgen se putem lentivirusa uvodi pod kontrolu CaMKII alfa promotora koji je prisutan u ekscitatornim piramidnim stanicama, ali ne i u inhibitornim interneuronima. Na preparatu hipokampalne kriške nakon primjene narančastog svjetla tijekom serije stimulacija kojima se izazivalo električna izbijanja (eng. *stimulation brain induced bursting*, STIB) u CA1 i CA3 regiji dolazi do supresije aktivnosti (79).

Optogenetika se uspješno rabila za inhibiciju u *in vivo* modelima, od induciranih akutnih izbijanja (108), fokalnih neokortikalnih epilepsija (80), temporalnih izbijanja (7), do talamokortikalne epilepsije u modelu moždanog udara (8).

Pokazalo se da na pilokarpinom inducirane akutne epileptične napadaje možemo djelovati aktivacijom inhibicijskog eNpHR3.0 eksprimiranog u piramidnim stanicama hipokampusa. Primjenom odgovarajuće svjetlosti uspješno se odgodio početak pilokarpinom induciranog napadaja (108).

Korist optogenetike pokazala se također u mišjem modelu kronične TLE. Nakon izazivanja unilateralne hipokampalne skleroze primjenom KA počinju se pojavljivati i spontana električna izbijanja živčanih stanica i pravi klinički manifestni epileptični napadaji. Tom je prilikom primijenjen i *online software* kako bi se pravodobno prepoznali epileptični napadaji. Budući da



je model imao selektivnu ekspresiju eNpHR3.0 u ekscitacijskim stanicama, primjena svjetlosti pri prepoznavanju početka epileptičke aktivnosti znatno je smanjila napadaje. Također se pokazalo da se supresija izbijanja može postići i selektivnom aktivacijom inhibicijskih, parvalbumin pozitivnih stanica koje eksprimiraju ChR2. Napadaji se nisu samo reducirali kod ipsilateralne primjene svjetla nego čak i pri osvjetljavanju kontralateralnog hipokampusa (86).

## 6.7. Budućnost optogenetike

Unatoč velikom napretku optogenetike i dalje postoje ograničenja koja onemogućuju njezinu primjenu u kliničke svrhe. Da bi se jednoga dana mogla rabiti u terapijske svrhe, moramo najprije postići stabilnu i sigurnu ekspresiju opsina u ljudskim živčanim stanicama, izraditi sigurne uređaje koji bi se implantirali u žarište epileptogeneze te potom *online* otkrivati preiktalne i početne iktalne promjene. Nakon detekcije takvih promjena ti bi uređaji trebali moći isporučiti svjetlo određene valne duljine i zaustaviti daljnju progresiju epileptičnog napadaja (86). Ako se to uspije postići, optogenetika će postati nova terapijska mogućnost za pacijente s epilepsijom, posebno one s farmakorezistentnom žarišnom epilepsijom koji nisu kandidati za kiruršku operaciju, kao npr. bilateralna TLE.

Optogenetika, s druge strane, već je važno sredstvo u istraživanju epilepsije. Ona omogućuje procjenu uloge svake pojedinačne stanične skupine u svim stadijima epileptičnog napadaja. Njome možemo otkriti koliki utjecaj živčana stanica ima u nastanku, razvitku ili prekidu epileptičnih napadaja, kao i koji se rezultat u promjeni frekvencije ili trajanja napadaja postiže njezinim onesposobljavanjem. Takve spoznaje mogle bi pridonijeti razvitku novih farmakoterapijskih i elektrostimulacijskih pristupa, a ne samo optogenetičkom terapijskom potencijalu.

Iako se optogenetikom već do sada puno postiglo, tek smo zagrebli površinu njezinih mogućnosti. Razvojem preciznijih EEG uređaja za detekciju električnih izbijanja i preciznijih implantabilnih uređaja kao izvora svjetlosti otvaraju se nove mogućnosti u optogenetici. Takav simultani razvoj optogenetike i srodnih područja mogao bi u budućnosti napokon dovesti do rasvjetljavanja mehanizama epileptogeneze i omogućiti nove, bolje terapijske pristupe za pacijente koji boluju od epilepsije.

## **7. ZAHVALE**

Zahvaljujem se svome mentoru, prof. dr. sc. Mariu Vukšiću na pomoći i savjetima prilikom pisanja ovog diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na potpori i razumijevanju tijekom svih šest godina studija.

## 8. REFERENCE

1. Magnuson K-, Wick C. Illuminating seizures : optogenetic approaches to studying networks in epilepsy. 2017;(August):2323–4.
2. Perucca E, Meador KJ. Adverse effects of antiepileptic drugs. *Acta Neurol Scand Suppl.* 2005;181:30–5.
3. Laxer KD, Trinkka E, Hirsch LJ, Cendes F, Langfitt J, Delanty N, et al. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy Behav.* 2014 Aug;37:59–70.
4. Duchowny M, Bhatia S. Epilepsy: preserving memory in temporal lobectomy—are networks the key? *Nat Rev Neurol.* 2014 May;10(5):245–6.
5. Krook-Magnuson E, Armstrong C, Oijala M, Soltesz I. On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nat Commun.* 2013;4:1376.
6. Krook-Magnuson E, Soltesz I. Beyond the hammer and the scalpel: selective circuit control for the epilepsies. *Nat Neurosci.* 2015 Mar;18(3):331–8.
7. Armstrong C, Krook-magnuson E, Oijala M, Soltesz I. Closed-loop optogenetic intervention in mice. 2013;8(8):1475–93.
8. Paz JT, Davidson TJ, Frechette ES, Delord B, Parada I, Peng K, et al. Closed-loop optogenetic control of thalamus as a tool for interrupting seizures after cortical injury. *Nat Neurosci.* 2013 Jan;16(1):64–70.
9. Falco-Walter JJ, Scheffer IE, Fisher RS. The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res.* 2018;139(November 2017):73–9.
10. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon C-S, Dykeman J, et al. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology.* 2017 Jan;88(3):296–303.
11. Berkovic SF, Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S. Human epilepsies: interaction of

- genetic and acquired factors. *Trends Neurosci.* 2006;29(7):391–7.
12. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2017 Apr;58(4):512–21.
  13. Fisher RS. The New Classification of Seizures by the International League Against Epilepsy 2017. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2017;17(6):1–6.
  14. Kumar A, Sharma S. Seizure, Simple Partial. In *Treasure Island (FL)*; 2019.
  15. Kumar A, Sharma S. Seizure, Complex Partial. In *Treasure Island (FL)*; 2019.
  16. Sloviter RS. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: Too much information, not enough knowledge. *Comptes Rendus - Biol.* 2005;328(2):143–53.
  17. Dantas FG, Yacubian EM, Jorge CL, Pedreira CC, Bueno JF, Valerio RM. Clinical and EEG analysis of mesial and lateral temporal lobe seizures. *Arq Neuropsiquiatr.* 1998 Sep;56(3A):341–9.
  18. Behr C, Levesque M, Stroh T, Avoli M. Time-dependent evolution of seizures in a model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2017 Oct;106:205–13.
  19. Braak H. On the structure of the human archicortex. I. The cornu ammonis. A Golgi and pigmentarchitectonic study. *Cell Tissue Res.* 1974;152(3):349–83.
  20. Sloviter RS, Lømo T. Updating the Lamellar Hypothesis of Hippocampal Organization. *Front Neural Circuits.* 2012;6(December):1–16.
  21. Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol.* 2015 Dec;25(23):R1116-21.
  22. Witter MP, Amaral DG. Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J Comp Neurol.* 1991 May;307(3):437–59.
  23. Kesner RP. An analysis of dentate gyrus function (an update). *Behav Brain Res*

- [Internet]. 2018;354(February 2017):84–91. Available from:  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.033>
24. Szirmai I, Buzsaki G, Kamondi A. 120 years of hippocampal Schaffer collaterals. *Hippocampus*. 2012 Jul;22(7):1508–16.
  25. Bhattacharyya KB. James Wenceslaus Papez, His Circuit, and Emotion. *Ann Indian Acad Neurol*. 2017;20(3):207–10.
  26. Wolff M, Alcaraz F, Marchand AR, Coutureau E. Functional heterogeneity of the limbic thalamus: From hippocampal to cortical functions. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015 Jul;54:120–30.
  27. Risold PY, Swanson LW. Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997 Sep;24(2–3):115–95.
  28. Muller C, Remy S. Septo-hippocampal interaction. *Cell Tissue Res*. 2018 Sep;373(3):565–75.
  29. McKinley MJ, Yao ST, Uschakov A, McAllen RM, Rundgren M, Martelli D. The median preoptic nucleus: front and centre for the regulation of body fluid, sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015 May;214(1):8–32.
  30. Larsen PJ, Hay-Schmidt A, Mikkelsen JD. Efferent connections from the lateral hypothalamic region and the lateral preoptic area to the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *J Comp Neurol*. 1994 Apr;342(2):299–319.
  31. Toni R, Malaguti A, Benfenati F, Martini L. The human hypothalamus: a morpho-functional perspective. *J Endocrinol Invest*. 2004;27(6 Suppl):73–94.
  32. Bondarenko E, Guimaraes DD, Braga VA, Nalivaiko E. Integrity of the dorsolateral periaqueductal grey is essential for the fight-or-flight response, but not the respiratory component of a defense reaction. *Respir Physiol Neurobiol*. 2016 Jun;226:94–101.

33. Kamali A, Sair HI, Blitz AM, Riascos RF, Mirbagheri S, Keser Z, et al. Revealing the ventral amygdalofugal pathway of the human limbic system using high spatial resolution diffusion tensor tractography. *Brain Struct Funct*. 2016 Sep;221(7):3561–9.
34. Veening JG, Swanson LW, Cowan WM, Nieuwenhuys R, Geeraedts LM. The medial forebrain bundle of the rat. II. An autoradiographic study of the topography of the major descending and ascending components. *J Comp Neurol*. 1982 Mar;206(1):82–108.
35. Usunoff KG, Schmitt O, Itzev DE, Haas SJ-P, Lazarov NE, Rolfs A, et al. Efferent projections of the anterior and posterodorsal regions of the medial nucleus of the amygdala in the mouse. *Cells Tissues Organs*. 2009;190(5):256–85.
36. Aggleton JP, Mishkin M. Projections of the amygdala to the thalamus in the cynomolgus monkey. *J Comp Neurol*. 1984 Jan;222(1):56–68.
37. Sloviter RS. Experimental status epilepticus in animals: What are we modeling? *Epilepsia*. 2009;50:11–3.
38. Bankier A, Turner M, Hopkins IJ. Pyridoxine dependent seizures--a wider clinical spectrum. *Arch Dis Child*. 1983 Jun;58(6):415–8.
39. Norwood BA, Bumanglag A V, Osculati F, Sbarbati A, Marzola P, Nicolato E, et al. Classic hippocampal sclerosis and hippocampal-onset epilepsy produced by a single “cryptic” episode of focal hippocampal excitation in awake rats. *J Comp Neurol*. 2010 Aug;518(16):3381–407.
40. Krook-Magnuson E. The Gate and the Source? the Dentate Gyrus Takes Central Stage in Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Curr*. 2017;17(1):48–9.
41. Yu W, Krook-Magnuson E. Targeting newly generated granule cells: A double-edged sword. *Epilepsy Curr*. 2017;17(2):121–3.
42. Aimone JB, Li Y, Lee SW, Clemenson GD, Deng W, Gage FH. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev*. 2014

Oct;94(4):991–1026.

43. Murphy BL, Pun RYK, Yin H, Faulkner CR, Loepke AW, Danzer SC. Heterogeneous integration of adult-generated granule cells into the epileptic brain. *J Neurosci*. 2011 Jan;31(1):105–17.
44. Jung K-H, Chu K, Kim M, Jeong S-W, Song Y-M, Lee S-T, et al. Continuous cytosine-b-D-arabinofuranoside infusion reduces ectopic granule cells in adult rat hippocampus with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Eur J Neurosci*. 2004 Jun;19(12):3219–26.
45. Cho K-O, Lybrand ZR, Ito N, Brulet R, Tafacory F, Zhang L, et al. Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. *Nat Commun*. 2015 Mar;6:6606.
46. Ratzliff AH, Santhakumar V, Howard A, Soltesz I. Mossy cells in epilepsy: Rigor mortis or vigor mortis? *Trends Neurosci*. 2002;25(3):140–4.
47. Buckmaster PS, Jongen-Relo AL. Highly specific neuron loss preserves lateral inhibitory circuits in the dentate gyrus of kainate-induced epileptic rats. *J Neurosci*. 1999 Nov;19(21):9519–29.
48. Sun Y, Grieco SF, Holmes TC, Xu X. Local and Long-Range Circuit Connections to Hilar Mossy Cells in the Dentate Gyrus. *eNeuro*. 2017;4(2).
49. Houser CR. Neuronal loss and synaptic reorganization in temporal lobe epilepsy. *Adv Neurol*. 1999;79:743–61.
50. Masukawa LM, Burdette LJ, McGonigle P, Wang H, O'Connor W, Sperling MR, et al. Physiological and anatomical correlates of the human dentate gyrus: consequences or causes of epilepsy. *Adv Neurol*. 1999;79:781–94.
51. Sloviter RS. Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the “dormant basket cell” hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*. 1991 Jan;1(1):41–

- 66.
52. Santhakumar V, Bender R, Frotscher M, Ross ST, Hollrigel GS, Toth Z, et al. Granule cell hyperexcitability in the early post-traumatic rat dentate gyrus: the “irritable mossy cell” hypothesis. *J Physiol*. 2000 Apr;524 Pt 1:117–34.
  53. Engel JJ. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist*. 2001 Aug;7(4):340–52.
  54. Margerison JH, Corsellis JA. Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain*. 1966 Sep;89(3):499–530.
  55. Wennberg R, Arruda F, Quesney LF, Olivier A. Preeminence of extrahippocampal structures in the generation of mesial temporal seizures: evidence from human depth electrode recordings. *Epilepsia*. 2002 Jul;43(7):716–26.
  56. Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RSG, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods*. 2008 Jul;172(2):143–57.
  57. Nirwan N, Vyas P, Vohora D. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy : a narrative review. 2018;
  58. Vincent P, Mulle C. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience*. 2009 Jan;158(1):309–23.
  59. Levesque M, Avoli M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013 Dec;37(10 Pt 2):2887–99.
  60. Carriero G, Arcieri S, Cattalini A, Corsi L, Gnatkovsky V, de Curtis M. A guinea pig model of mesial temporal lobe epilepsy following nonconvulsive status epilepticus induced by unilateral intrahippocampal injection of kainic acid. *Epilepsia*. 2012 Nov;53(11):1917–27.
  61. Sharma AK, Reams RY, Jordan WH, Miller MA, Thacker HL, Snyder PW. Mesial



- temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol Pathol.* 2007 Dec;35(7):984–99.
62. Ben-Ari Y, Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci.* 2000 Nov;23(11):580–7.
  63. Drexel M, Preidt AP, Sperk G. Sequel of spontaneous seizures after kainic acid-induced status epilepticus and associated neuropathological changes in the subiculum and entorhinal cortex. *Neuropharmacology.* 2012 Oct;63(5):806–17.
  64. Turski WA, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia.* 1983 Dec;39(12):1408–11.
  65. Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Nov;94(24):13311–6.
  66. Uva L, Librizzi L, Marchi N, Noe F, Bongiovanni R, Vezzani A, et al. Acute induction of epileptiform discharges by pilocarpine in the in vitro isolated guinea-pig brain requires enhancement of blood-brain barrier permeability. *Neuroscience.* 2008 Jan;151(1):303–12.
  67. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 1983 Sep;9(3):315–35.
  68. Jope RS, Morrisett RA, Snead OC. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Exp Neurol.* 1986 Mar;91(3):471–80.
  69. Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience.* 1987 Dec;23(3):953–68.
  70. Sloviter RS. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science.* 1987 Jan;235(4784):73–6.

71. Sloviter RS, Dean E, Sollas AL, Goodman JH. Apoptosis and necrosis induced in different hippocampal neuron populations by repetitive perforant path stimulation in the rat. *J Comp Neurol*. 1996 Mar;366(3):516–33.
72. Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E, Lopes da Silva FH. Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. *Eur J Neurosci*. 2001 Feb;13(4):657–69.
73. Lothman EW, Bertram EH, Kapur J, Stringer JL. Recurrent spontaneous hippocampal seizures in the rat as a chronic sequela to limbic status epilepticus. *Epilepsy Res*. 1990 Jul;6(2):110–8.
74. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*. 2005 Sep;8(9):1263–8.
75. Gradinaru V, Thompson KR, Zhang F, Mogri M, Kay K, Schneider MB, et al. Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo. *J Neurosci*. 2007 Dec;27(52):14231–8.
76. Gradinaru V, Zhang F, Ramakrishnan C, Mattis J, Prakash R, Diester I, et al. Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell*. 2010 Apr;141(1):154–65.
77. Konermann S, Brigham MD, Trevino A, Hsu PD, Heidenreich M, Cong L, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*. 2013 Aug;500(7463):472–6.
78. Pama EAC, Colzato L, Hommel B. Optogenetics as a neuromodulation tool in cognitive neuroscience [Internet]. Vol. 4, *Frontiers in Psychology* . 2013. p. 610. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsyg.2013.00610>
79. Tonnesen J, Sorensen AT, Deisseroth K, Lundberg C, Kokaia M. Optogenetic control of epileptiform activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul;106(29):12162–7.

80. Wykes RC, Heeroma JH, Mantoan L, Zheng K, MacDonald DC, Deisseroth K, et al. Optogenetic and potassium channel gene therapy in a rodent model of focal neocortical epilepsy. *Sci Transl Med.* 2012 Nov;4(161):161ra152.
81. Spudich JL. The multitalented microbial sensory rhodopsins. 2006;14(11).
82. Sakmar TP. Structure of rhodopsin and the superfamily of seven-helical receptors: the same and not the same. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Apr;14(2):189–95.
83. Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K. *The Development and Application of Optogenetics.* 2011;
84. Hofmann CM, Quin KEO, Marshall NJ, Cronin TW, Carleton KL. The Eyes Have It : Regulatory and Structural Changes Both Underlie Cichlid Visual Pigment Diversity. 2009;7(12).
85. Haupts U, Tittor J, Bamberg E, Oesterhelt D. General Concept for Ion Translocation by Halobacterial Retinal Proteins: The Isomerization/Switch/Transfer (IST) Model. Vol. 36, *Biochemistry.* 1997. 2-7 p.
86. Krook-Magnuson E, Ledri M, Soltesz I, Kokaia M. How might novel technologies such as optogenetics lead to better treatments in epilepsy? *Adv Exp Med Biol.* 2014;813:319–36.
87. Pinkney J, Zawadzki P, Sherratt DJ, Kapanidis AN. Real-Time Single Molecule Tethered Particle Motion Experiments Reveal the Kinetics and Mechanisms of Cre-Mediated Site Specific Recombination. *Biophysj [Internet].* 2012;102(3):283a. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.1565>
88. De-zolt S, Sloun P Van, Hollatz M, Floss T, Hansen J, Altschmied J, et al. Genomewide production of multipurpose alleles for the functional analysis of the mouse genome. 2005;102(20):7221–6.
89. Atasoy D, Aponte Y, Su HH, Sternson SM. A FLEX Switch Targets Channelrhodopsin-2 to Multiple Cell Types for Imaging and Long-Range Circuit

- Mapping. 2008;28(28):7025–30.
90. Lee G, Saito I. Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene*. 1998 Aug;216(1):55–65.
  91. Taniguchi H, He M, Wu P, Kim S, Paik R, Sugino K, et al. A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron*. 2011 Sep;71(6):995–1013.
  92. Richichi C, Lin E-JD, Stefanin D, Colella D, Ravizza T, Grignaschi G, et al. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects mediated by adeno-associated virus vector neuropeptide Y expression in the rat hippocampus. *J Neurosci*. 2004 Mar;24(12):3051–9.
  93. Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov;100(24):13940–5.
  94. Zhang F, Prigge M, Beyriere F, Tsunoda SP, Mattis J, Yizhar O, et al. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nat Neurosci*. 2008 Jun;11(6):631–3.
  95. Hegemann P, Ehlenbeck S, Gradmann D. Multiple photocycles of channelrhodopsin. *Biophys J*. 2005 Dec;89(6):3911–8.
  96. Berndt A, Yizhar O, Gunaydin LA, Hegemann P, Deisseroth K. Bi-stable neural state switches. 2009;12(2):229–34.
  97. Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, Shea DJO, et al. Neocortical excitation / inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* [Internet]. 2011;477(7363):171–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10360>
  98. Zhang F, Wang L, Brauner M, Liewald JF, Kay K, Watzke N, et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. 2007;446(April).

99. Bamberg E, Tirtort J, Oesterheltt D. Light-driven proton or chloride pumping by halorhodopsin. 1993;90(January):639–43.
100. Raimondo J V, Kay L, Ellender TJ, Akerman CJ. Optogenetic silencing strategies differ in their effects on inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci*. 2012 Jun;15(8):1102–4.
101. Chow BY, Han X, Dobry AS, Qian X, Chuong AS, Li M, et al. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature*. 2010 Jan;463(7277):98–102.
102. Han X, Chow BY, Zhou H, Klapoetke NC, Chuong A, Rajimehr R, et al. A high-light sensitivity optical neural silencer: development and application to optogenetic control of non-human primate cortex. *Front Syst Neurosci*. 2011;5:18.
103. Kokaia M, Andersson M, Ledri M. An optogenetic approach in epilepsy. *Neuropharmacology*. 2013 Jun;69:89–95.
104. Zhang F, Gradinaru V, Adamantidis AR, Durand R, Airan RD, Lecea L De, et al. Optogenetic interrogation of neural circuits : technology for probing mammalian brain structures. 2010;5(3):439–56.
105. Zorzos AN, Boyden ES, Fonstad CG. Multiwaveguide implantable probe for light delivery to sets of distributed brain targets. 2010;35(24):4133–5.
106. Kim T. *Optoelectronics with Applications*. 2014;211(2013).
107. Wentz CT, Bernstein JG, Monahan P, Guerra A, Rodriguez A, Boyden ES. A wirelessly powered and controlled device for optical neural control of freely-behaving animals. *J Neural Eng*. 2011 Aug;8(4):46021.
108. Sukhotinsky I, Chan AM, Ahmed OJ, Rao VR, Gradinaru V, Ramakrishnan C, et al. Optogenetic Delay of Status Epilepticus Onset in an In Vivo Rodent Epilepsy Model. *PLoS One* [Internet]. 2013 Apr 24;8(4):e62013. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062013>

## 9. ŽIVOTOPIS

### OSOBNNE INFORMACIJE

Ime i prezime: Sanja Delovski

Datum rođenja: 26.11.1994.

Mjesto rođenja: Zagreb, RH

E-mail: [sanja.delovski@hotmail.com](mailto:sanja.delovski@hotmail.com)

### OBRAZOVANJE

2013.-2019. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet

2009.-2013. IV. gimnazija, Zagreb

2001.-2009. OŠ Zapruđe, Zagreb

### PRIZNANJA I NAGRADE

Dekanova nagrada za postignuti uspjeh na studiju za akademsku godinu 2016./2017.

### AKTIVNOSTI

Demonstrator na Katedri za anatomiju 2014./2015.

Pasivno sudjelovanje u sekciji za neuroznanost Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Sudjelovanje u humanitarnom projektu „Bolnica za medvjediće“.

### OSOBNNE VJEŠTINE

Strani jezici: engleski C1,

španjolski B2,

njemački A2,

talijanski A1.

Poznavanje rada na računalu.

Vozačka dozvola B kategorije.