

## Mitokondriális károsodás *in vitro* epilepszia modellben – Szakmai beszámoló

A kutatás célja az epileptikus aktivitás alatt fellépő  $\text{Ca}^{2+}$  ion-függő mitokondriális változás és szabadgyök képződés energiaháztartásra gyakorolt rövid-távú és krónikus hatásainak valamint az ezt követő epileptikus sejtpusztulásban játszott szerepének a felderítése volt.

Elő-kísérleteink kimutatták, hogy *in vitro* epileptikus aktivitás alatt a sejten belüli  $\text{Ca}^{2+}$  ion koncentráció-változások bizonyos mértékig továbbjutnak a mitokondriumokba. Ezzel egy időben, a mitokondriális membránpotenciál és a sejtek redukált piridin nukleotid tartalma is megváltozott. A korábban alkalmazott vizsgálati módszer azonban nem tette lehetővé annak megállapítását, hogy mely sejtípusok milyen mértékig járulnak hozzá ehhez a változáshoz, sem pedig azt, hogy van-e ok-okozati összefüggés a jelenségek között. Kísérleteink rámutattak arra is, hogy az epileptikus aktivitás megnövekedett oxidatív stresszel jár együtt, amelyet sejtpusztulás követ. Ezek a vizsgálatok azonban sem arról nem adtak felvilágosítást, hogy mely körülmények vezetnek a mitokondriumok szabadgyök termelésének fokozásához, és arról sem, hogy a szabadgyökök milyen szerepet töltenek be az energiaháztartás és az epileptikus aktivitás kifejeződésének szabályozásában.

Előzetes eredményeink alapján azt a munkahipotézist állítottuk fel, hogy a rohamok alatti mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  ion-akkumuláció hosszú távon negatív hatással van a sejtek energiaháztartására és ezáltal csökkenti az idegsejtek túlélési esélyeit. Feltételezésünk szerint mind a légzési láncban keletkező szuperoxid gyökionoknak, mind pedig a szinaptikus végződéseken keletkező nitrogén monoxidnak (NO) szerepe van az epileptikus aktivitás hosszútávú következményeinek (metabolikus diszfunkció, farmako-rezisztencia és sejtpusztulás) kialakulásában, úgy külön, mint reagálva peroxinitrit formában.

Mivel az idegsejtek többféle funkcionális kompartmentumra bonthatók, amelyekben mind funkcionális mind pedig morfológiai szempontból heterogén mitokondrium populáció található, ezért a jelen vizsgálatok során nagy hangsúlyt fektettünk a regionális és szub-celluláris különbségek nem-destruktív (képalkotó) módszerekkel történő vizsgálatára.

\*

A kombinált elektrofiziológiai és mikrofluorimetriás vizsgálatokat patkány hippocampális agyszelet-tenyészetekben, kontroll és krónikusan epileptikus patkányból illetve egérből frissen izolált entorhinális kéreg és hippocampusz agyszeleten, illetve halántéklebény epilepsziában szenvedő betegek műtéti úton eltávolított hippocampuszán végeztük. Az elektrofiziológiai módszerek az epileptikus aktivitás követését és jellemzését szolgálták. Ion-szenzitív elektóddal történő mezőpotenciál és extracelluláris  $[\text{K}^+]$  mérés mellett egészsejtes '*patch-clamp*' elvezetést

alkalmaztunk feszültség-zár ('*voltage-clamp*') és áram-zár ('*current-clamp*') módban. A különböző mitokondriális és intracelluláris paraméterek, (mitokondriális membrán potenciál:  $\Delta\Psi_m$ , mitokondriális kalcium ion koncentráció:  $[Ca^{2+}]_m$ ), a sejt redukáló potenciálja ( $[NADH]/[FADH_2]/[Glutathion]$ ), a szuperoxid gyökion és a nitrogén monoxid (NO) termelődésének vizsgálata a megfelelő fluoreszcens indikátorok, illetve a sejtek autofluoreszcenciájának mikrofluorimetriás nyomkövetésével zajlott. A vizsgálat jellegének (soksejtes, egysejtes vagy mitokondriális szintű) megfelelően a fluoreszcencia változások nyomkövetésére spektrofluorimétert (HighTech Inc.), foton sokszorozót ('*photomultiplier-tube*', PMT, Seefelder Messtechnik GmbH), nagysebességű hűtött CCD-kamerát (Orca - Olympus Cell^R Olympus Europe GmbH) és konfokális pásztázó lézer mikroszkópot (Olympus Fluoview 300 – Olympus Europe GmbH; Noran Oz - Prairie Technologies Inc.) alkalmaztunk. A mitokondriális szuperoxid gyökion képződésének kinetikáját és  $[Ca^{2+}]_m$ -függését izolált mitokondriumokon, a leállított áramlás ('*stopped-flow*') elvén alapuló gyorskinetikai berendezésben vizsgáltuk.

A vizsgálatok elvégzéséhez szükséges kísérleti és festési protokollok részben újak, a csoportunk által az adott vizsgálat céljára lettek kifejlesztve. A fent említett berendezések egy részét a projekt időtartama alatt, a projekt céljainak megvalósításához szereztük be.

### **Az epileptikus aktivitás alatt fellépő $[Ca^{2+}]_m$ akkumuláció energiaháztartásra gyakorolt rövidtávú hatása**

Az epileptikus aktivitást kísérő  $[Ca^{2+}]_m$  változások energia metabolizmusra gyakorolt rövidtávú hatásainak vizsgálatához az organotipikus hippokampális szelettenyészetekben  $Mg^{2+}$  ion-mentes Ringer oldattal (hypomagnéziás ACSF) kiváltható *in vitro* epilepszia modellt választottuk. Az epileptikus aktivitás követésére és jellemzésére a szelet-tenyészetek CA3 régiójában a mezőpotenciál változásait extracelluláris üveg mikro-elektroddal mértük, vagy a régió piramissejtjeiből egészsejtes patch clamp elvezetést végeztünk. A kísérletek kivitelezéséhez azért választottuk ezt a régiót, mert kontroll körülmények között a spontán aktivitás előfordulási valószínűsége itt volt a legnagyobb, hypomagnéziás körülmények között pedig az izolált CA3 régió egymagában is képes volt visszatérő rohamok generálására. Az epileptikus aktivitást a megjelenési formája alapján három kategóriába soroltuk, ezek az interiktális aktivitás, a rohamszerű aktivitás és a késői rekurrens kisülés. A megjelenés rendszeressége miatt az első két forma energiaháztartásra gyakorolt hatását vizsgáltuk a továbbiakban részletesen. A konfokális

pásztázó lézer mikroszkóp alkalmazása lehetővé tette, hogy az *in situ*  $[Ca^{2+}]_m$  és a  $\Delta\Psi_m$  változásokat az egyes mitokondriumok szintjén 1-2 Hz-es időfelbontással követhessük. A CA3 régió egyes piramissejtjeit a patch pipettán keresztül egy a mitokondriumokban specifikusan felhalmozódó feszültségfüggő fluoreszcens festékkel, a rhodamine-123-mal (Rh-123) töltöttük fel. Így a membránpotenciál váltoásaival egyidőben regisztrálhattuk a protonokra ható elektrokémiai gradiens nagyobbik részét kitevő  $\Delta\Psi_m$  változásait is. A  $[Ca^{2+}]_m$  változások nyomon követésére a hippokampális szelettenyészeteket a mitokondriumok belsejét szelektíven jelölő,  $Ca^{2+}$  ion-szenzitív festékekkel (rhod-2-AM illetve rhod-FF-AM) festettük. A citoszólikus és mitokondriális  $Ca^{2+}$  ion-változások megkülönböztetésére egy mitokondrium szelektív festékkel (MitoTracker Green) végeztünk kolokalizációs vizsgálatokat, amelyek megmutatták, hogy a  $Ca^{2+}$  ion-érzékeny festékkel pontszerűen és intenzíven festődő organelumok valóban mitokondriumok, míg a citoszól festődése inkább homogén volt. Ezen eredmények ismeretében egy térbeli frekvencia-szűréssel el tudtuk különíteni a citoszólikus kalcium ion koncentráció ( $[Ca^{2+}]_i$ ) és a  $[Ca^{2+}]_m$  változásait.

A fenti festékekkel végzett kísérletek egyértelműen bebizonyították, hogy a hippokampális idegsejtek mitokondrium populációja mind a  $[Ca^{2+}]_m$  mind pedig a  $\Delta\Psi_m$  tekintetében heterogén, ami a mitokondriumok eltérő morfológiájában is megnyilvánult. Nagy  $[Ca^{2+}]_m$  tartalmú granuláris mitokondriumokat és kis  $[Ca^{2+}]_m$  tartalmú mitokondriális filamentumokat lehetett megkülönböztetni. Ez utóbbiak nagyfelbontású vizsgálata kimutatta, hogy esetenként több granuláris mitokondrium fúziójával alakultak ki. Érdeemes megjegyezni, hogy a mitokondriumokra jellemző irányított mozgásban főleg a kisebb méretű granuláris mitokondriumok - esetenként a rövidebb filamentumok, - vettek részt, míg a hosszú filamentumok és a nagy  $[Ca^{2+}]_m$  tartalmú granulumok csak véletlenszerű Brown-mozgást végeztek. A mitokondriális populáció heterogenitásának ellenére normal Ringer oldatban (ACSF) nem tapasztaltunk  $[Ca^{2+}]_m$  és  $\Delta\Psi_m$  változásokat, bár a mérési körülmények, mint például a pipetta oldatban található  $Ca^{2+}$  ion-puffer jelenléte hozzájárulhatott a változások elfedéséhez.

Alapvetően más volt a helyzet hypomagnéziás ACSF jelenlétében. Az interiktális aktivitás megjelenésével egyidejűleg, a  $[Ca^{2+}]_m$  fluktuálni kezdett az egyes dendritekben, majd ez a fluktuáció kiterjedt a mitokondriális populáció nagy részére, ahogy az interiktális aktivitás átváltott rohamszerű aktivitásba. Míg az intracelluláris  $Ca^{2+}$  ion koncentráció ( $[Ca^{2+}]_i$ ) változásokra a rohamszerű események alatt folyamatos növekedés és a klónusos fázis alatti relatíve lassú fluktuációk voltak jellemzőek, addig a  $[Ca^{2+}]_m$  fluktuációja csak kevésbé volt szinkronizált, mind az egyes mitokondriumok mind pedig az idegsejtek egyes részeinek szintjén.

A  $[Ca^{2+}]_m$  fluktuációja egy mitokondriális kalciumion-felvétel gátló vegyület (Ru360) segítségével blokkolható volt, ami alátámasztja a jel specificitását. Különböző affinitású fluoreszcens  $Ca^{2+}$  ion festékek alkalmazásával bizonyítottuk, hogy a festék telítődése nem befolyásolja a mért  $[Ca^{2+}]_m$  változások kinetikáját. Mindebből azt a következtetést lehet levonni, hogy epileptikus aktivitás alatt folyamatos  $Ca^{2+}$  ion akkumuláció helyett fluktuáló dinamika jellemzi a  $[Ca^{2+}]_m$ -t, aminek szerepe lehet az idegi és a metabolikus aktivitás pontos összehangolásában.

Hypomagnéziás körülmények között a  $\Delta\Psi_m$  is jelentős változásokon esett át. Interiktális aktivitás alatt a dendritikus és szomatikus mitokondriumok viselkedése különbözött. Míg a dendritekben a  $\Delta\Psi_m$ -t a  $[Ca^{2+}]_m$ -hoz hasonló fluktuációk jellemezték, addig a sejtestben található mitokondriumok membránpotenciálja változatlan maradt. Ezzel ellentétben rohamszerű eseményekhez a mitokondriális populáció nagyrészeének egyidejű, az egész idegsejtre kiterjedő, hosszan tartó depolarizációja társult. Ez a depolarizáció nem jelentette a membránpotenciál teljes elvesztését, amint az egy protonofórral indukált mitokondriális depolarizációval történő összehasonlításból kiderült. A mitokondriális permabilitási tranzíciós pórus blokkálása cyclosporin-A-val nem befolyásolta a  $\Delta\Psi_m$  változásait, ugyanakkor mind a mitokondriális kalcium ion felvétel (Ru360), mind pedig az elektrogén mitokondriális kalcium ion leadás (CGP 57137) gátlása megszüntette a rohamszerű eseményekhez társuló mitokondriális depolarizációt. Ezen eredmények alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a  $\Delta\Psi_m$ -ben tárolt energia egy része a mitokondriális kalcium ion ciklus fenntartására fordítódik, és ez szélsőséges körülmények között – mint például epileptikus rohamok alatt – oly mértékű mitokondriális depolarizációz vezethet, amely károsan hathat az ATP-szintézisre és súlyosbíthatja a patológiás állapotot. Az apoptózis indukációjához vezető mitokondriális permeabilitási tranzíció létrejöttére utaló jeleket csak elvétele figyeltünk meg, ám ez lehet, hogy pusztán a mérés – és így az epileptikus státusz - időtartamának technikai okok miatti relatív rövidsége (~ 1 óra) miatt volt így.

### **Az energia metabolizmus módosulása krónikusan epileptikus szövetben**

A fent említett kísérletek megállapításai egészséges szövetben kiváltott epileptikus aktivitás akut metabolikus következményeire vonatkoztak. Munkahipotézisünk szerint a rendszeresen visszatérő rohamok és az ezeket követő oxidatív stressz a mitokondriumok maradandó károsodásához vezethet. Ezért következő lépésként két, az ATP szintézis szempontjából kulcsfontosságú mitokondriális paraméternek, a redukált/oxidált piridin

nukleotidok arányának és a  $\Delta\Psi_m$ -nak változásait vizsgáltuk krónikusan epileptikus szövetben. Mivel az alkalmazott noninvazív módszer nem tette lehetővé az abszolút kvantifikációt, ezért ezen paraméterek ingerléssel kiváltott változásait hasonlítottuk össze epileptikus és egészséges szövetben. Az idegsejtek aktiválása elektromos ingerléssel illetve glutamát adagolással történt. Az extracelluláris káliumion-koncentráció változás egyidejű mérése lehetővé tette az ingerlés erősségének standardizálását.

A krónikusan epileptikus szövet halántéklebény epilepsziában szenvedő betegek idegsebészeti úton eltávolított hippokampuszából származott. Kontroll humán szövetminta hiányában a kísérleteket megismételtük egy patkány krónikus epilepsziamodellemben. A patkány modell esetében már természetesen lehetséges volt a kontroll mérések kivitelezése is. Egyszeri pilokarpin alkalmazással kiváltott epileptikus státusz után 3-5 héttel a patkányokban spontán visszatérő rohamok jelentkeznek, és ezen állatok hippokampuszában az emberi halántéklebény epilepsziára jellemző patológiás elváltozásokat (hippokampális szklerózis: szelektív sejtpusztulás, gliózis, idegrostok sarjadása ú.n. 'axonal sprouting', multidrug transzporterek expressziója stb.) találtunk. Az állatokat több hónapnyi epileptikus szakasz után dekapitáltuk, és a méréseket a humán mintával egyenértékű anatómiai struktúrákban végeztük el.

Kontroll patkány hippokampuszában ingerléssel kétfázisú NADH változást (kezdeti oxidáció, másodlagos redukció) és jelentős mértékű mitokondriális depolarizációt lehetett kiváltani. Krónikusan epileptikus patkány CA1 régiójában az idegi stimulációval vagy glutamát adagolással kiváltott NADH redukció jelentős mértékben lecsökkent, míg szomszédos, a szklerózis által kevésbé érintett szubikulumban a kontrollhoz hasonló mértékű változásokat lehetett regisztrálni. Hasonlóképp, epileptikus betegekből származó hippokampuszban a NADH oxidáció változatlan volt, míg az  $\text{NAD}^+$  redukció drasztikusan lecsökkent. Ez a csökkenés metabolikus károsodásra utalt, és nem pedig a szövetmintában található sejtpusztulás következménye volt, mivel a stimulációval kiváltott extracelluláris káliumion-koncentráció változás, amely az aktivált idegsejtek számát tükrözi, megfelelt a kontroll szövetben található értékeknek. Érdeemes megjegyezni, hogy ez a jelenség nem függött a hippokampális szklerózis mértékétől, azaz inkább az eltelt rohamok számával és nem pedig a szövettani változásokkal állt kapcsolatban.

Mivel a  $\text{NAD}^+$  redukció fokozódása kalcium ion függő folyamat, a kalcium ion felvétele pedig függ a  $\Delta\Psi_m$  értékétől, következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy hogyan változik a  $\Delta\Psi_m$  értéke krónikusan epileptikus szövetben. A fent említett mitokondrium specifikus feszültségfüggő fluoreszcens festék alkalmazásával elsőként mutattuk ki, hogy az epileptikus humán szövet idegsejtjei intakt mitokondriális kompartmentummal és  $\Delta\Psi_m$ -al rendelkeznek.

Glutamát adagolás hatására a kontroll –patkány- szövetben mérhető  $\Delta\Psi_m$  változásokkal összevethető mértékű mitokondriális depolarizációt mértünk. Mivel tehát a mitokondriális kalcium ion felvétel feltételei adottak, valószínűsíthető, hogy a NADH-szintézis elégtelensége a Krebs-Szentgyörgyi-ciklus egy vagy több kalciumion-függő enzimének rendellenes működésének tudható be. Ez a következtetés összhangban van más kutatók eredményeivel, akik oxidatív stressz által okozott enzimatis hipofunkciót találtak epileptikus humán szövetben.

### **A rohamok alatti $[Ca^{2+}]_m$ akkumuláció szabad gyökképzésére gyakorolt hatása**

A mitokondriális szabad gyök képződés és ennek kalcium ion függése izolált mitokondriumokban tanulmányozható a legjobban kontrollált körülmények között. Ehhez először egy fluoreszcencia-detekciós módszeren alapuló gyorskinetikai vizsgálati protokoll beállítására volt szükség, a kontroll kísérletek elvégzésével egyetemben, ugyanis csoportunk előként vezette be ezt módszert ilyen jellegű kérdések vizsgálatára. A leállított áramlás (stopped flow) elvén működő UV/fluoreszcenciás spektrofluoriméterben az agykérgi izolált mitokondriumok pillanatszerűen tehető ki eltérő összetételű extramitokondriális oldatoknak, majd az ezt követő  $[Ca^{2+}]_m$  változások illetve a szabad gyök képződés kinetikája követhető nyomon megfelelő fluoreszcens festékek alkalmazásával a milliszekundumtól a néhány másodpercig terjedő időskálán. Az agykérgi izolált mitokondrium preparátum összetételét elektronmikroszkópos vizsgálattal igazoltuk, a preparátum respirációs képességének a mérésére pedig egy új, az oxigén foszforeszcencia-kioltáson alapuló detekciós módszert dolgoztunk ki. Egy gliális metabolizmusgátló segítségével meghatároztuk a glia *versus* idegsejt arányt a preparátumban. A fogyasztott oxigén 50 – 50 %-ban oszlott meg a két sejttípusból származó mitokondriumok között. Első lépésként a  $[Ca^{2+}]_m$  változását kinetikáját vizsgáltuk növekvő extramitokondriális kalciumion-koncentráció függvényében. A gyorskinetikai berendezés alkalmazását indokolja egyrészt a mitokondriális gyors kalciumion-felvételi mechanizmus (RAM) léte, továbbá az, hogy a mitokondriális kalciumion-uniporterről rendelkezésre álló kinetikai adatok egyensúlyi rendszerekben lettek megmérve, ahol a RAM-inaktivációja, a  $\Delta\Psi_m$  csökkenése befolyásolhatja a tényleges sebességi állandókat. Az epileptikus aktivitás alatti fluktuáló kalciumion dinamika mitokondriális szintű leírása szintén szükségessé tette a gyors detektálást. Növekvő extramitokondriális  $[Ca^{2+}]$  jelenlétében (0.1, 2.5, 10, 20  $\mu M$ ) a  $[Ca^{2+}]_m$  szintén jelentősen megnövekedett és telítési értékeket ért el az első másodpercben. A legnagyobb ugrást a 0.1 – 2.5  $\mu M$  lépésnél lehetett látni.

A mitokondriális szabad gyökképződést egy fluoreszcens festékkel, dihidroethidiummal követtük nyomon. Az eredetileg szintelen festéket a szuperoxid gyökanionok fluoreszcenssé oxidálják. A reakció specificitását egy sejtmentes szuperoxid gyökanion termelő rendszerben (hypoxanthin/xanthin oxidáz) igazoltuk. Ezek után a patológiás állapotra jellemző külső körülmények (emelt  $[Ca^{2+}]$ ,  $[Na^+]$ , ADP) mitokondriális szabad gyökképződésre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A rövid életidejű primer szabad gyökök típusának meghatározására elengedhetetlen a gyorskinetikai vizsgálati módszer. Izolált agykérgi mitokondriumok a fent leírt patológiás körülményekre fokozott szabad gyökképződéssel válaszoltak. Ez egy szuperoxid gyökanion specifikus gyökfogó molekulával (para-benzoquinon) kivédhető volt, ami igazolja, hogy a primer szabad gyök a respirációs láncban keletkező szuperoxid gyökanion. A légzési lánc komplexeinek részleges gátlásával illetve főlegben adott szubsztráttal a komplex I-nek a gyökkepződésben játszott szerepét lehetett igazolni az adott körülmények között. A  $[Ca^{2+}]_m$  és a szabad gyökképződés kinetikájának összehasonlítása két paraméter ok-okozati viszonyát támasztja alá.

### **Gyökfogó molekulák hatása az epileptikus aktivitásra és a farmako-rezisztencia kialakulására**

A szuperoxid gyökanion mellett egy másik nagyon fontos szabad gyöknek, a nitrogén monoxidnak (NO) a képződését vizsgáltuk a következő munkaszakaszban. Az NO-ról ismeretes, hogy NMDA receptor függő módon szintetizálódhat hippokampális idegsejtekben, és retrográd hírvivőként részt vesz a transzmitter ürülés és a szinaptikus plaszticitás szabályozásában. Ugyanakkor toxikus hatással is rendelkezik – szuperoxid gyökanionnal reagálva a különösen reaktív peroxinitrit gyök formájában. A neuronális, az endotéliális és az indukálható NO-szintetáz (nNOS, eNOS, iNOS) izoformák után a közelmúltban egy mitokondriális NO-szintetáz (mtNOS) is leírtak. Ez azért is különösen érdekes, mert az NO a légzési lánc komplexeire hatva reverzibilisen, illetve patológiás mennyiségben irreverzibilisen képes gátolni a metabolizmust, és így hozzájárulhat a  $Ca^{2+}$  ion-akkumuláció energiaháztartásra gyakorolt negatív hatásához. Az NO az idegsejtek receptorfunkcióit sokrétűen befolyásolja, így pro- és antiepileptikus hatása egyaránt ismeretes a különböző *in vivo* epilepsziamodellekben. Előkísérleteink alapján úgy tűnt, hogy az NO-nak fontos szerepe van az entorhinális kéregben hypomagnéziás ASCF-fel kiváltható epileptikus aktivitás szabályozásában. Jelen vizsgálatok keretein belül ezeket az eredményeket

terjesztettük ki különböző állatfajokra, epilepsziamodellekre és központi idegrendszeri régiókra, továbbá az NO-hatás hátterében rejlő általános mechanizmust próbáltuk meg kideríteni.

A NO szintézis detektálására két független módszert dolgoztunk ki. Egyrészt felállítottunk egy NO-szelektív nano-elektrodán alapuló amperometriás eljárást, amelynek beállítása jelenleg még folyamatban van. Részletes eredményekre a projekt munkaterv szerinti lezárásakor, 2006 május 31-én számítunk. Ennél a módszernél egy 150 nm-re kihegyezett grafit szálon oxidáljuk az NO-t és a keletkezett áramot rögzítjük. A szelektivitásért a grafit szálat borító membránok felelősek. Előkísérleteinkben 30 nM körüli érzékenységet értünk el sejtmentes közegben, és hippokampális szelettenyészetben glutamát kiváltotta NO szintézis növekedést is sikerült már detektálnunk.

A másik módszer NO-val szelektíven reagáló fluoreszcens festék alkalmazásán alapult. Ez a módszer az NO-szenzitív elektródával összehasonlítva az NO-szintézis változásának térbeli eloszlásáról szolgáltat információkat, ugyanakkor kevésbé alkalmas dinamikus változások követésére. A hippokampális szelettenyészeteket és a frissen izolált entorhinális kéreg szeleteket a még szintelen festék membránpermeábilis diacetát észterével töltöttük fel. Az észterkötés hasítása után felszabaduló szintelen festék felhalmozódik a citoszólban, majd NO-val reagálva fluoreszcenssé válik. A reakciótermék szintén nem jut át a sejtmembránon, így az NO szintézisére a fluoreszcencia folyamatos növekedése utal. Az idegsejtekben mérhető fluoreszcencia a NO képződésnek, a festék sejtből történő kipumpálásának és a fluoreszcencia „fakulásának” (photobleaching) dinamikus egyensúlyából jön létre. Bár a fluoreszcencia abszolút mértéke önmagában kevésbé informatív, a fluoreszcencia növekedésének meredeksége a NO-szintézis változására utal. Három különböző festék (DAQ, H<sub>2</sub>DCFDA, DAF-fmDA) tesztelése után a további kísérleteket DAF-fm diacetáttal folytattuk, mert ez a festék mutatta a legjobb áthatoló képességet és a legintenzívebb fluoreszcenciát, mely utóbbi különösen fontos a szövet autofluoreszcenciájától való elkülönítésekor.

Patch pipettán keresztül festve a sejteket a fluoreszcens reakciótermék lassú, homogén citoszólikus akkumulációját tapasztaltuk. Mivel ez a módszer nem ad felvilágosítást a NO szintézis regionális eltéréseiről, a továbbiakban az egész agyszeletet illetve szelettenyészetet festettük. A perfúzióhoz folyamatosan adott festék ellenére a fluoreszcencia egy adott szinten stabilizálódott, mely azonban nem a reagálatlan festék elfogyásának, hanem a festék és NO közötti reakció valamint a festék fakulásának stacionárius egyensúlyba kerülésének volt köszönhető, mert egy externális NO-donor, SNAP hatására további fluoreszcencia növekedést tapasztalhattunk. A NOS szubsztrátumának, L-Argininnak adásával szintén fluoreszcencia növekedést lehetett elérni, amit egy szélesspektrumú NOS-inhibitor (L-NAME) egyidejű



adásával gátolni lehetett. Ez arra enged következtetni, hogy mind a szelettenyészetekben, mind pedig a frissen izolált szeletekben jelen voltak aktív NO-szintázok és a sejten belüli reagálatlan festék mennyisége elegendő az NO szintézis változásának követésére.

A festék rövid idejű (20–30 min) inkubációja után egyenletes gliális – neuronális festődés jelentkezett. A sejttesteken kívül fényesen fluoreszkáló szemcséket – feltehetően szinaptikus végződéseket is lehetett még látni. Ezek az adatok egyenletes alap NOS-aktivitásra utalnak a hippocampális szelettenyészetekben. A festési mintázat eltért a NOS-immunfestések mintázatától, és inkább az NO jelátviteli kaszkád következő elemének, a cGMP-nek immunreaktivitására emlékeztetett, ami arra utal, hogy a NO tovább diffundálhatott keletkezési helyéről, mielőtt reagált volna a DAF-fm-mel. A festék hosszú idejű (12 órás) inkubációja után ettől eltérő fluoreszcencia mintázat jelentkezett, melynél egyes sejt típusok és sejt csoportok másoknál sokkal intenzívebben festődtek. Így az endotél sejtek, nagyszámú neuron a hilus, CA3c, CA2 régiókban és a szubikulumban illetve elvétve egy pár neuron a gyrus dentatus-ban és a CA1 régióban is. Kiterjedt, ám a fent említett idegsejteknél kisebb intenzitású gliális és mikrogliális fluoreszcenciát is látni lehetett. A sejt típusok és a fluoreszcencia elemzése alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a festék azon sejtekben, illetve azon sejtek közelében halmozódik fel, amelyek rendelkeznek NO-szintázal. Ennek igazolására jelenleg nNOS és iNOS immunfestéseket végzünk, melyek eredménye a közeljövőben várható.

A festék rövid idejű inkubációját használtuk az NO szintézis epileptikus aktivitás alatti változásának nyomon követésére. A perfúzió ACSF-ről hypomagnéziás ACSF-re történő cseréjével egyidőben jelentkezett az interiktális aktivitás a szelettenyészetek CA3 régiójában, mely egyben egy réteg-specifikus fluoreszcencia változással járt együtt. Az alapvonal meredekségének növekedése a stratum lucidumban és a stratum radiatumban a NO-képződés fokozódására utalt, míg a piramissejtek rétegében, a stratum pyramidale-ban ezt nem, vagy csak kevésbé lehetett tapasztalni. Érdeemes megemlíteni, hogy az egyes rohamszerű eseményekhez egy kétfázisú fluoreszcencia változás társult, amelyről azonban alaposabb elemzéssel kiderült, hogy a flavin eredetű autofluoreszcenciaváltozás következménye.

A következőkben az NO epileptikus aktivitás szabályozásában betöltött szerepét, és az ebben közreműködő NOS-ok típusát vizsgáltuk. Előkísérleteinkben a szélesspektrumú NOS inhibitor L-NAME gátolta frissen izolált patkány entorhinális kéreg szeletekben a rohamszerű események kialakulását hypomagnéziás ACSF hatására. Ugyanezeket a kísérleteket megismételtük egér entorhinális kéreg szeleteken és hippocampális szelettenyészetekben is. A korábbi eredményeinkkel ellentétben, az L-NAME illetve az L-NMMA egyik modellrendszerben sem volt képes meggátolni a rohamszerű események kialakulását. A projekt célkitűzésének

megfelelően a következőkben NO specifikus gyökfogókat, PTIO-t és karboxiPTIO-t alkalmaztunk az NO szint csökkentésére. A NO gyökfogók csak a legnagyobb vizsgált koncentrációban, és ott is csak az esetek egy negyedében gátolták a rohamszerű események kialakulását. Feltételezve a vegyületek rossz penetrációját, következő lépésként a szeleteket előinkubáltuk egy szélesspektrumú NOS-inhibitorral és egy NO gyökfogóval. Ez a protokoll a frissen izolált szeletekben kivétel nélkül, a hippokampális szelettenyészeteknek pedig túlnyomó többségében meggátolta a rohamszerű események megjelenését. A rohamszerű események szabályzásában szerepet játszó NOS típusánk vizsgálatára a NO-gyökfogó mellé nNOS (7-nitroindazol), illetve iNOS (aminoguanidin) specifikus NOS-inhibitorokat alkalmaztunk. A frissen izolált egér entorinális kéreg szeletekben a neuronális NOS gátlása elég volt a az antiepileptikus hatás eléréséhez, viszont az iNOS gátlása hatástalannak bizonyult. Ezzel ellentétben csak a szélesspektrumú NOS gátlók bizonyultak hatékonynak hippokampális szelettenyészetekben, valószínűleg a mikroglia aktiválódása és a tenyésztés során az iNOS expressziójában bekövetkező változások miatt. A rohamszerű események megjelenése mellett vizsgáltuk még a NO-elvonás spontán idegi aktivitásra és az interiktális aktivitásra gyakorolt hatását is, hippokampális szelettenyészetek CA3 piramissejtjeinek egészséjtes *patch-clamp* elvezetésével. Az NO elvonás jelentősen csökkentette mind a serkentő mind a gátló szinaptikus áramok frekvenciáját és amplitúdóját normál ACSF-ben. Hypomagnéziás ACSF-ben a NO elvonás ellenére megnőtt a serkentő és gátló szinaptikus áramok gyakorisága, és interiktális aktivitás is jelentkezett, azonban ezek az értékek alatta maradtak a hypomagnéziás ACSF-ben NO jelenlétében mérhető értékeknek. Ezekből az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy az NO-nak a transzmitter ürülésben betöltött serkentő szerepe az, ami meghatározó az interiktális aktivitás – rohamszerű esemény átmenet szabályozásában. Továbbá azt, hogy az interiktális aktivitás kialakulása a rohamoktól függetlenül szabályozódik.

\*

A munkatervnek ehhez a részéhez tartozik még egy kísérletcsoport, mely jelenleg túljutott az előkísérletek szintjén, teljes befejezésére a projekt munkatervben foglalt lezárásáig (2006 május 31.) kerül sor. Az idegsejtek enzimatis és kismolekulás antioxidatív védekező rendszerének kulcsfontosságú eleme a glutathion. Ez a tripeptid vagy önmagában vagy a glutathion peroxidáz enzim révén reagálva vesz részt a peroxidok és egyéb szabad gyökök detoxifikációjában. A glutathion szintje és a szintézishez használt prekursorok tekintetében jelentős különbségek találhatók az idegsejtek és a gliasejtek között. Ennek következtében lehetőség nyílik a glutathion szintézis szelektív manipulációjára. Ebben a kísérletcsoportban a hippokampális szelettenyészetek glutathion szintjét és az elpusztult sejtek mennyiségét

hasonlítjuk össze kontroll körülmények között és három órás hypomagnéziás epileptikus státuszt követően. Következő lépésként a sejtek glutathion szintjét manipuláljuk egy glutathion szintézis gátló vegyület (buthionine sulfoximine) illetve glutathion prekursorok (N-acetyl cystein, cystin) 12 órás előinkubálásával, majd a hypomagnéziás ACSF-ben kialakuló epileptikus aktivitás típusát és az ezt követő idegsejtpusztulást hasonlítjuk össze kezelt és kezeletlen szelettenyészetekben. Az eddig lezajlott előkísérletekben beállítottuk a glutathion és sejtpusztulás fluoreszcens mérésének protokollját. A glutathion monochlorobimane-nal alkotott fluoreszcens reakciótermékének képződési kinetikája - a monochlorobimane kalibráció után, - már alacsony monochlorobimane koncentráció mellett is lehetőséget nyújt a glutathion szint mérésére. Ez azért volt fontos, mert a monochlorobimane a glutathion elvonásán keresztül maga is toxikus hatásúnak bizonyult. A sejthalál mérésére két protokollt vezettünk be, egyrészt a károsodott membránú sejtek magját festő propidium jodid fluoreszcenciájának vizsgálatával, másrészt pedig pusztuló sejteket szelektíven festő FluorJadeB nevű fluoreszcens próbának a segítségével kívánjuk kvantifikálni az epileptikus aktivitást követő sejtpusztulást.

\*

A projekt epileptikus aktivitás mitokondriumokra gyakorolt rövid-távú és krónikus hatásáról szóló részét és az ezt kiegészítő kutatások eredményeit az OTKA-támogatás emítése mellett rangos nemzetközi lapokban publikáltuk. Az izolált mitokondriumok  $\text{Ca}^{2+}$  ion-függő szuperoxid gyök anion képződéséről szóló cikk jelenleg átszerkesztés alatt áll, míg az NO és a glutathion szerepéről szóló cikkek előreláthatólag a projekt befejezésekor lesznek benyújtva. Ezért a publikációs listában ez utóbbi témák kongresszusi kiadványban megjelenő absztrakt formájában kerültek említésre.