

**Indukált görcstevékenység befolyásolhatóságának és  
szinaptikus folyamatokra gyakorolt krónikus hatásának  
elemzése 4-amino-piridin modellekben**

**Borbély Sándor**  
Doktorjelölt

Témavezető: **Dr Világi Ildikó**  
egyetemi docens, PhD

Doktori Iskola: **Biológia Doktori Iskola**  
Vezető: **Dr Erdei Anna**,  
egyetemi tanár, PhD, DSc

Doktori program: **Idegtudomány és Humánbiológia**  
Vezető: **Dr Détári László**,  
egyetemi tanár, PhD, DSc



**ELTE TTK Élettani és Neurobiológiai Tanszék**  
**Budapest**  
**2009**

## TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék .....	2
Rövidítésjegyzék.....	4
1. Bevezetés .....	6
2. Irodalmi áttekintés .....	8
2.1. Az agykéreg sejttypusainak jellemzése .....	8
2.2. Serkentő szinaptikus kapcsolatok .....	11
2.2.1. Ionotróp receptorok.....	12
2.2.2. A kálium csatornák .....	19
2.3. Az idegsejtek ingerületi folyamatai és a belső optikai jelek kapcsolata .....	21
2.4. Az agykéreg anatómiája.....	22
2.4.1. Általános sajátosságok .....	22
2.4.2. A szomatoszenzoros kéreg.....	23
2.4.3. Az entorhinális kéreg .....	25
2.4.4. A hippocampális formáció.....	28
2.5. Elemi működés.....	31
2.5.1. Neokortikális kiváltott válasz szeletpreparátumban .....	31
2.5.2. Hippokampális kiváltott válasz szeletpreparátumban.....	31
2.6. Az epilepszia szindrómák kialakulásában érintett mikrohálózatok .....	32
2.7. Az epilepszia állati modelljei .....	32
2.7.1. A 4-amino-piridin modell .....	35
3. Kérdésfeltevés, célkitűzések .....	37
4. Anyagok és módszerek .....	38
4.1. Kísérleti állatok .....	38
4.2. <i>In vitro</i> elektrofiziológia .....	38
4.2.1. Szeletkészítés .....	38
4.2.2. A kiváltott válaszok mérése üvegelektroddal .....	39
4.2.3. Farmakológiai kezelések.....	41
4.2.4. Extracelluláris mezőpotenciál mérése többcsatornás elektroddal.....	42
4.2.5. Az áram-forrás sűrűség meghatározás .....	43
4.3. <i>In vivo</i> elektrofiziológia .....	44
4.4. Kobalt-felvétel vizsgálata .....	45
4.5. A belső optikai jelek rögzítése .....	46
4.6. Krónikus 4-amino-piridin kezelés.....	48
4.7. A laterális entorhinális kéreg roncsolása .....	48
4.8. Statisztikai elemzés.....	48
4.9. Alkalmazott vegyületek .....	49
5. Kísérleti eredmények .....	50

5.1. A görcskészséget befolyásoló krónikus hatások elemzése .....	50
5.1.1. Laterális entorhinális kéreg irtás hatása a 4-AP görcsérzékenységre .....	50
5.1.2. Ismételt 4-AP indukálta konvulziók hatása az alap ingerelhetőségre.....	52
5.1.3. Az ismétlődő 4-AP rohamok kobalt felvételre gyakorolt hatása .....	53
5.1.4. A 4-AP konvulziók hosszútávú szinaptikus hatékonyságnövekedésre gyakorolt hatása .....	56
5.1.5. Az ismételt 4-AP indukált rohamok glutamáterg receptorokra gyakorolt hatása .....	59
5.2. A 4-AP akut hatásai a szomatoszenzoros kéregben.....	63
5.2.1. A 4-AP indukált spontán görcskisülések elemzése optikai analízissel.....	63
5.2.2. A 4-AP indukált spontán görcskisülések áram-forrás sűrűség elemzése.....	64
5.2.3. A 4-AP facilitált szinaptikus ingerületátvitel farmakológiai befolyásolhatósága.....	66
6. Megvitatás.....	70
6.1. A 4-AP kísérleti modell .....	70
6.2. A krónikus kérgi működésváltozások elemzése .....	71
6.2.1. A fontosabb eredmények összefoglalása .....	71
6.2.2. Az unilaterális entorhinális kéregirtás hatása .....	71
6.2.3. A krónikus 4-AP kezelés hatására bekövetkező változások elemzése .....	74
6.3. Az akut kísérleti eredmények megvitatása .....	80
6.3.1. Az áramforrassűrűség és a belső optikai jelek kapcsolata .....	80
6.3.2. A 4-AP akut hatásának farmakológiai befolyásolhatósága .....	83
6.4. Konklúzió.....	86
Összefoglaló.....	87
Abstract .....	88
Irodalomjegyzék .....	89
1. Függelék.....	100
A belső optikai jelek vizsgálata .....	100
2. Függelék.....	103
Hisztoblot metodika .....	103
Hisztoblot eredmények .....	105
Köszönetnyilvánítás .....	107

## RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

ABP	AMPA-receptor-kötő fehérje (AMPA receptor <b>B</b> inding <b>P</b> rotein)
ACh	Acetil-kolin ( <b>A</b> cetyl- <b>C</b> holin)
ACSF	Mesterséges agyfolyadék ( <b>A</b> rtificial <b>C</b> erebrospinal <b>F</b> luid)
ANOVA	Varianciaanalízis ( <b>A</b> nalysis of <b>V</b> ariance)
CCD	Töltéscsatolt eszköz ( <b>C</b> harge <b>C</b> oupled <b>D</b> evice)
CSD	Áramforrás-sűrűség ( <b>C</b> urrent <b>S</b> ource <b>D</b> ensity)
EPSP	Serkentő posztzinaptikus potenciál ( <b>E</b> xcitatory <b>P</b> ostsynaptic <b>P</b> otential)
FS	Gyorsan tüzelő ( <b>F</b> ast <b>S</b> piking)
GABA	$\gamma$ -amino-vajsav ( $\gamma$ - <b>A</b> minobutyric <b>A</b> cid)
GRIP	Glutámreceptor-kötő fehérje ( <b>G</b> lutamate <b>R</b> eceptor <b>I</b> nteracting <b>P</b> rotein)
IB	Burst-ös tüzelésű ( <b>I</b> ntrinsically <b>B</b> ursting)
IPSP	Gátló posztzinaptikus potenciál ( <b>I</b> nhibitory <b>P</b> ostsynaptic <b>P</b> otential)
LTP	Hosszútávú szinaptikus hatékonyságnövekedés ( <b>L</b> ong-term <b>P</b> otentialiation)
NSF	N-etilmaleimid érzékeny fúziós fehérje ( <b>N</b> - <b>E</b> thylmaleimide <b>S</b> ensitive <b>F</b> usion <b>P</b> rotein)
PICK1	C-kinázhoz kötődő fehérje ( <b>P</b> rotein <b>I</b> nteracting with <b>C</b> <b>K</b> inase <b>1</b> )
PKC	Protein kináz C ( <b>P</b> rotein <b>K</b> inase <b>C</b> )
PSD	Posztzinaptikus denzitás ( <b>P</b> ostsynaptic <b>D</b> ensity)
RS	Szabályos tüzelésű ( <b>R</b> egular <b>S</b> piking)
SLE	Roham-szerű események ( <b>S</b> eizure- <b>L</b> ike <b>E</b> vent)
SNAP	Oldható NSF kapcsoló fehérje ( <b>S</b> oluble <b>N</b> SF <b>A</b> ttachment <b>P</b> rotein)
SUMO	Kisméretű ubiquitin-szerű módosító fehérje ( <b>S</b> mall <b>U</b> biqutin-like <b>M</b> odifier <b>P</b> rotein)
TM	Transzmembrán régió ( <b>T</b> rans <b>m</b> embrane <b>r</b> egion)
VIP	Vazoaktív intestinális polipeptid ( <b>V</b> asoactive <b>I</b> ntestinal <b>P</b> olypeptide)

## Vegyületek

---

AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-izoxazol-4-propionsav
4-AP	4-amino-piridin
APV	D-2-amino-5-foszfono-valeriánsav
AP-7	D-2-amino-7-foszfono-heptánsav
ATP	Adenozin-trifoszfát
CNQX	6-ciano-7-nitrokvinoxalin-2,3-dion
Domoát	(2S, 3S, 4S) – 4 -[(2Z, 4E)-6-karboxihepta-2,4-dién-2-il]-3-karboxi-metil pirrolidin-2-karboxilsav
GYKI 52466	1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-metiléndioxi-5H-2,3-benzodiazepin
HEPES	N-2-hidroxi-etilpiperazin-N-2-etánszulfonsav
KA	Kainát
LTG	Lamotrigin
MEM	Memantin
NBQX	6,7-dinitro-kvinoxalin-2,3-dion
NMDA	N-metil-D-aszpartát
PILO	Pílokarpin
PTZ	Pentiléntetrazol

## 1. BEVEZETÉS

Az epilepszia változatos megjelenési formával bíró idegrendszeri működési rendellenesség, melyet az idegsejtek spontán, rohamokban jelentkező szinkronizált működése jellemez. Az agy serkentő és gátló átviteli folyamatainak egyensúlya felborul, ennek következtében túlserkentettség alakul ki, ami idővel provokáció nélküli görcstevékenység kialakulását eredményezi.

Az emberi populáció 1-2%-a szenved valamilyen típusú epilepsziás megbetegedésben, ezért kezelése, háttérmechanizmusainak vizsgálata indokolt. Habár az epilepszia a beteg életvitelére jelentős hatással van, a társadalomba való beilleszkedés sikeres lehet. Ezt bizonyítja az a tény is, hogy számos kimagasló történelmi személyiség szenvedett e kórtól. Köztük van Szókratész, Nagy Sándor, Julius Caesar, Jeanne d'Arc, Bonaparte Napóleon, Vincent van Gogh, Ludwig van Beethoven és Alfred Nobel.

Az epilepszia a háttérben álló folyamatok tisztázása előtt egy misztikus, titokzatos betegség volt, számos rejtély lengte körül. Azokban az időkben, amikor az agy működéséről még nem voltak ismereteink, úgy gondolták, természetfeletti erők, gonosz vagy jó szellemek irányítják az epilepsziás beteget a roham alatt. Így keletkezhetett a *morbus sacer*, azaz szent betegség elnevezés is.

Mivel az epilepsziás működészavar az agykéreg bármely területén kialakulhat, a betegség tünetei rendkívül változatosak lehetnek. Számos formája már az ókori ember számára is ismert volt, de kiváltó okainak magyarázatára, tüneti kezelésére a múlt század közepéig várni kellett. A hatékony antiepileptikumok kifejlesztése előtt a rohammentesség elérésére leginkább az epilepsziás góc műtéti kimetszését alkalmazták. Ezen műtétek járulékos hozadékként az agykéreg funkcionális feltérképezésére is lehetőség nyílt, amire egészséges emberek esetében a műtét invazív jellegéből adódóan etikai okok miatt nem volt lehetőség. Az epilepszia egyéb módon is hozzájárult az agy működésével kapcsolatos ismereteink bővüléséhez. A rohamok hatására az idegsejtek működése hosszútávon is megváltozik, tartós hatékonyságnövekedés következik be. A tanulás, emléknymok kialakításakor ugyanezen plaszticitási folyamatok mennek végbe, így a tanulási folyamatokra építkezve alakulhatnak ki rohamok. Ezt alátámasztja, hogy az új emléknymok kialakulásában a limbikus rendszer részét képező hippocampusznak van

döntő szerepe, és éppen ez az az agyterület, mely az epilepsziás megbetegedések nagy hányadát kitevő temporális lebeny epilepsziában kóros működést mutat. A lassú hullámú alvás fenntartásában fontos talamokortikális kör kóros túlműködése egy másik, szintén gyakori szindróma, az absence rohamok, kialakulásában és fennmaradásában fontos.

A változatos megjelenési formáknak és háttérmechanizmusoknak köszönhetően az epilepszia vizsgálata nem lehetséges egyetlen modell révén. A legfontosabb tünetegyüttesek kutatására napjainkban számos állatmodell áll rendelkezésre, ami a rohamok vagy a szindróma fontosabb elemeit többé-kevésbé utánozza. Vizsgálataimban a 4-amino-piridin nevű görcskeltővel váltottam ki epilepsziás rohamokat élő állatokban és túlélő agyszeletekben azzal a céllal, hogy a rohamok kialakulásában érintett struktúrák szerepéről nyerjünk újabb ismereteket, amik közelebb vihetnek az epilepsziás működészavar kialakulásának megismeréséhez.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Az agykéreg sejttypusainak jellemzése

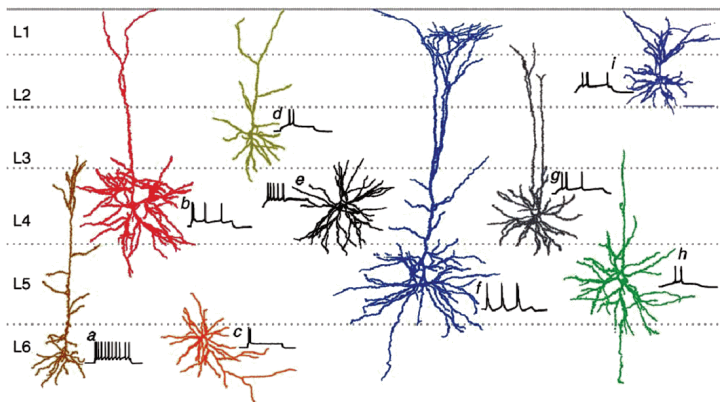
Az idegrendszer legkisebb működési egységének az idegsejteket tekinthetjük. Az agykéregben mind anatómiai, mind funkcionális szempontból lényeges eltéréseket mutató sejteket találunk, csoportosításuk történhet alakjuk, elhelyezkedésük, kapcsolataik vagy a dendritek megjelenése alapján. A tüskés dendritű sejtek közé tartoznak a piramis sejtek és a csillagsejtek. Ingerületátvivő anyaguk glutamát vagy aszpartát lehet, ami a posztszinaptikus sejten serkentő posztszinaptikus potenciált hoz létre (EPSP; excitatory postsynaptic potential). A sima dendritű neuronok csoportjába tartoznak a meglehetősen heterogén morfológiájú interneuronok. Ingerületátvivő anyaguk a  $\gamma$ -amino-vajsav (GABA), ami a posztszinaptikus sejten gátló posztszinaptikus potenciált (IPSP; inhibitory postsynaptic potential) hoz létre (Connors és Amitai, 1993; Connors, 1984). Becslések szerint a kérgi sejtek mintegy 75-85%-a glutamaterg, 12-25%-a GABAerg (Lübke és Feldmeyer, 2007; Mody és Pearce, 2004; Schubert és mtsai., 2007).

Az agykéreg sejtjeinek több mint kétharmada piramis sejt (2.1 ábra), jellegzetességük a dendritágakon nagy számban jelen lévő dendrittüske (Connors és Amitai, 1993). Ez a sejttypus az 1. kérgi réteget leszámítva minden rétegben előfordul. Nevét jellegzetes alakjáról kapta, a piramis alakú sejttestből indul ki a két bazális és az egyetlen apikális dendritág. A 2/3. rétegben lévő piramis sejtekre teljes hosszában elágazó, az 1. rétegig futó apikális dendrit és a 140-280  $\mu\text{m}$  távolságra eljutó intralaminárisan haladó bazális dendritek jellemzőek. Amennyiben a sejt a kérgi oszlop szélén helyezkedik el a bazális dendritágak átnyúlnak a szomszédos oszlopok sejtjeihez. Az axon erőteljes arborizációt hoz létre a 2/3. rétegben és az 5. rétegben, míg a 4. rétegben nincsenek elágazások. Az 5. rétegbeli piramis sejtek változatos morfológiát mutatnak. A sejtek egy részének apikális dendritje csak a 4. rétegig fut, míg más sejtek esetében az 1. vagy 2. rétegig haladnak. Az axon kollaterális a piramis sejtek kisebbik hányadában főleg vertikálisan orientált, legfeljebb a 2/3. rétegig futó rostok figyelhetők meg, melyek horizontálisan is 800-1600  $\mu\text{m}$  távolságig eljuthatnak. A sejtek nagyobb része 2000-2400  $\mu\text{m}$  távolságra eljutó intralaminárisan haladó axonokat növeszt. (Gottlieb és Keller, 1997) Az 5. réteg nagyméretű piramidális neuronjai robusztus



apikális dendrittel rendelkeznek, ami egészen az 1. rétegig fut. Axonjuk az 5. és 6. rétegben kiterjedt kollaterális rendszert hoz létre, horizontálisan 1-2 mm távolságra is eljuthat (Connors és Amitai, 1993). Az axonok a corpus callosumba futnak, és kapcsolatot tartanak távoli agyterületekkel.

A serkentő idegsejtek másik típusa a csillagsejt (2.1 ábra *e* sejt). Kizárólag az agykéreg 4. rétegében fordul elő. Egyenlő hosszúságú, szimmetrikus dendritágai miatt csillagszerű megjelenése van. Axonja általában a lokális áramkörök kialakításában vesz részt, a kergét szinte soha nem hagyja el. Legfőbb feladatuk a talamikus afferensek fogadása (Douglas és Martin, 1998).



**2.1 ábra:** Az előagy jellegzetes serkentő sejttypusainak axon- és dendritarborizációja. Szabályos tüzelésű piramisajt az *a*, *d*, *g*, *h*, és *i* jelű sejt, burst-ös tüzelésű piramisajt a *b* és *f* jelű, míg az *e* jelzésű sejt egy szabályosan tüzelő tüskés csillagsejt. (Bannister, 2005)

A sima dendritű sejtek változatos megjelenésű neuronok. Közös vonásuk, hogy nincs apikális dendritjük, hosszú nyúlványuk soha nem hagyja el az adott kérgi területet és az agykéreg bármely rétegében előfordulhatnak. A sima dendritű sejtek tipizálását eleinte a dendritikus morfológia alapján végezték. Elkülönítettek multipoláris, bipoláris, csillagsejteket és sok egyéb típust, de ez a felosztás végül nem bizonyult teljesen megbízhatónak. Újabbban 3 fő sejttypust különítünk el, a kandeláber sejteket, kosárisejteket és a kettős-csokor sejteket (Douglas és Martin, 1998). A kandeláber sejtek a piramisajtak axondombján, a kosárisejtek a piramisajtak szómáján és dendritágain, míg a

kettős-csokor sejtek más sima dendritú sejteken szinaptizálnak (Connors és Amitai, 1993; Kawaguchi és Kondo, 2002). A gátló idegsejtek osztályozásának másik módja az expresszáladó  $\text{Ca}^{2+}$  kötő fehérjék, illetve neuropeptidek kimutatásán alapul. Négy típus különítenek el, a parvalbumin, szomatosztatin, kolecisztokinin és a kalretinin vagy vazoaktív intestinális polipeptid tartalmú gátló idegsejteket (Kawaguchi és Kondo, 2002). Habár a kalcium ionok intracelluláris pufferelesének nagy jelentősége van a sejtek tüzelési mintázata szempontjából, rácsálók esetében mégsem lehet konkrét összefüggéseket meghatározni a GABAerg sejtek elektrofiziológiai és immuncitokémiai jellemzőit illetően (Zaitsev és mtsai., 2005). A gátló interneuronok közé tartozik még a Cajal-Retzius sejt és a Martinotti sejt is. Előbbi az 1. rétegben található, horizontális elrendeződésű dendritfája soha nem hagyja el a réteget (Douglas és Martin, 1998), míg az utóbbi a 2/3. és 5. rétegekben található, axonja elérve az 1. réteget a piramis sejtek dendritágain szinaptizál (Kawaguchi és Kondo, 2002; Le Bon-Jego és Yuste, 2007; Xu és Callaway, 2009).

Az idegsejtek nemcsak morfológiájukban, fő ingerületátvivő anyagaikban különböznek egymástól, hanem a tüzelési mintázataikban is. A tüskés dendritú sejtek általában szabályos tüzelési mintázatot mutatnak (RS; Regular Spiking). Két-három akciós potenciál erejéig gyors frekvenciás tüzelésre képesek, majd erős frekvencia adaptáció következik be. A sima dendritú sejtekre ezzel szemben általában a gyors tüzelési (FS; Fast Spiking) mintázat jellemző. Viszonylag rövid akciós potenciálok követik egymást magas frekvenciával, adaptáció nincs, vagy csak kismértékű. A 4.-5. réteg bizonyos piramis sejtjei a szabályos tüzelési mintázattól eltérően működnek, jellemző rájuk a csoportokban megjelenő akciós potenciál sorozatok (IB; Intrinsically bursting) nagy ismétlési idővel való kialakulása (Bannister, 2005; Douglas és Martin, 1998).

Annak ellenére, hogy a kérgi mikrohálózatok nagy variabilitást mutatnak az egyes neokortikális területek között, megállapíthatók alapvető hasonlóságok is, pl. a réteges szerveződés. Az egyes rétegeket hasonló morfológiájú és működésű idegsejtek alkotják, melyek kapcsolatrendszere is azonos. Egyes kérgi areák (látókéreg, szomatoszenzoros kéreg) esetében jellegzetes oszlopos szerveződés is megfigyelhető (Swindale, 1990; Szentágothai, 1975). Az érző kéregterületek bemeneteiket főleg a talamuszból kapják és

kimeneteik nagy része is ide tér vissza. A talamikus információt a 4. és részben a 6. réteg fogadja, a kimenet az 5. és 6. rétegből indul. A kortiko-kortikális pályák a 2/3-as rétegből indulva a corpus callosumban haladva érik el ipsi- vagy kontralaterális féltekében lévő célpontjukat, ahol a 2-6. rétegekben végződhetnek (forward projekció). A magasabbrendű (asszociatív) bemenetek az 1. rétegben horizontálisan haladó pályákon (back projekció) keresztül is eléri a célterületet, ahol a piramis sejtek apikális dendritjein végződnek (Bannister, 2005).

A kérgi mikrohálózatok szerveződésében nagy jelentősége van a gátló kapcsolatoknak is. A gátló idegsejtek – a korábban leírtak szerint – a serkentő idegsejtek meghatározott részein alakítanak ki szinaptikus kapcsolatokat, ezáltal azok be- vagy kimenetét képesek módosítani. Összehangolt működésüket elősegíti, hogy az azonos tüzelési mintázatú gátló idegsejtek nemcsak kémiai-, hanem elektromos szinapszisok révén is kapcsolnak (Hestrin és Galaretta, 2005).

## **2.2. Serkentő szinaptikus kapcsolatok**

Az idegsejtek közötti kommunikáció túlnyomórészt a kémiai szinapszisok révén valósul meg. Ezek megjelenésük szerint lehetnek szimmetrikusak és aszimmetrikusak; az előbbi típus inkább gátló, az utóbbi főleg serkentő jelátvitelben vesz részt. A szimmetrikus szinapszisokban elektrondenz réteg található mind a pre-, mind a posztzinaptikus membrán alatt, míg az aszimmetrikus szinapszisokban kicsi a preszinaptikus denzitás, de a posztzinaptikus nagyon kifejezett (Douglas és Martin, 1998). Kétségkívül a neuronok közötti információátvitel legfontosabb eleme a kémiai szinapszis, de nem ez az idegsejtek kommunikációjának egyetlen módja. A gátló idegsejtek között a kémiai szinapszisok mellett elektromos szinapszisok (rés kapcsolat; gap junction) is kapcsolatot létesítenek, ami szinkronizált működésük alapja (Hestrin és Galaretta, 2005).

Az agy legfőbb serkentő neurotranszmitterei aminosavak, melyek közül a legfontosabb a glutamát, de az aszpartát, a szerin és a glicin is betölthet ilyen funkciót (Johnson és Ascher, 1987). A szinapszisokban pre- és posztzinaptikus is előfordulnak receptoraik, előbbieket a szinaptikus ingerületátvitel modulációjában, utóbbiakat a tényleges ingerületátvitelben érintettek. A glutamátreceptorok között találunk kationok számára

átjárható ionsatorna-receptor komplexeket (ionotróp receptorok), és G-fehérjéhez kapcsolt receptorokat (metabotróp receptorok).

Az alábbiakban az ionotróp glutamát-receptorokkal kapcsolatos legújabb ismereteket foglalom össze, mivel kísérletes munkáim részben ezek működésének, kifejeződésének megváltozásaira irányultak.

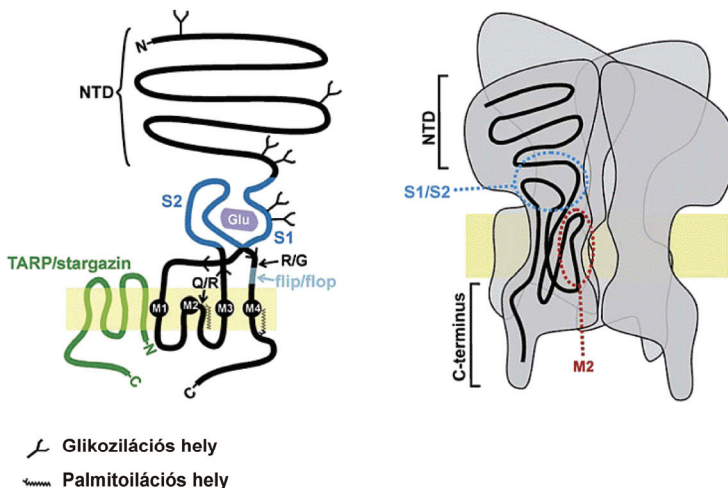
### 2.2.1. Ionotróp receptorok

Az ionotróp glutamát-receptorok farmakológiai módszerekkel elkülöníthető csoportokba sorolhatók. Mindegyik receptor aktiválható glutamáttal, de számos egyéb vegyület létezik, melyek az idegrendszerbe juttatva csak adott szerkezetű és felépítésű glutamát-receptorokhoz kötődnek. A receptorok csoportosításának alapja, hogy mely specifikus glutamát agonistát kötik a legnagyobb hatékonysággal. Ezek alapján 3 receptor alcsoportra különíthető el. A gyors ingerületáttevődést az AMPA-val ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-izoxazol-4-propionsav) és a KA-tal (Kainát) aktiválható receptorok közvetítik, míg az NMDA-ra (N-metil-D-aszpartát) érzékeny receptorok késleltetett feszültségfüggő válasz kialakításában vesznek részt.

A glutamát-receptorok közös jellemzője, hogy 4 alegységből felépülő heterotetramer szerkezetű fehérjék. Az egyes alegységek 4 membránba (M1-4) ágyazott régiót tartalmaznak (2.2A ábra), ezek közül az M1, M3 és M4 átéri a plazmamembránt, az M2 visszafordul a citoplazma felé (Bennett és Dingledine, 1995; Bigge, 1999). Az N-terminális vég extracelluláris, a C-terminális vég intracelluláris elhelyezkedésű. Az ionsatornát a 4 alegység M2 doménjei hozzák létre (2.2B ábra). A glutamát kötőhelyet az N-terminális vég és a M3-M4 domén közötti extracelluláris hurok (2.2A ábra) együttesen hozza létre (Pellegrini-Giampietro és mtsai., 1997).

Az AMPA-receptorok GluR1-4 típusú alegységekből (Bigge, 1999) állnak. Az aktivált receptor-ionsatorna komplex  $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$ , valamint bizonyos mértékig  $\text{Ca}^{2+}$  számára átjárható. Általánosan előfordulnak az agyban, főleg a GluR2/3 tartalmú receptorok. A GluR1 receptorok leginkább gátló interneuronokon fejeződnek ki (Conti és Weinberg, 1999). Az alegységek 2 illesztési variánszal rendelkeznek, a főleg embrionálisan megjelenő flip, és a posztnatálisan expresszálandó flop formával. Ez utóbbi nagyobb áram áteresztőképességgel rendelkezik és gyorsabban deszenzitizálódik (Conti

és Weinberg, 1999; Ozawa és mtsai., 1998; Stone és Addae, 2002). Az alegységek génjeiről átíródó mRNS átszerkesztődhet két helyen is, ami funkcionális következményekkel bír a működő receptorra nézve. A 743. pozícióban lévő R/G szerkesztési hely a deszenzitációt követő helyreállítási folyamatra van hatással, míg az 586. pozícióban lévő Q/R szerkesztési hely a receptor  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitását befolyásolja (2.2A ábra). Az R/G átszerkesztés érintheti a GluR2-4 alegységeket, míg a Q/R átszerkesztés specifikus a GluR2-re. A posztnatálisan kifejeződő GluR2 alegységek közel 100%-ban átszerkesztődnek, ami gátolt  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitást eredményez (Pellegrini-Giampietro és mtsai., 1997; Bigge, 1999). Az AMPA-receptorok specifikus agonistája az AMPA, de aktiválhatók kiszálsavval, iboténsavval és kaináttal is. A legismertebb kompetitív antagonisták a CNQX (6-ciano-7-nitrokvinoxalin-2,3-dion) és az NBQX (6,7-dinitro-kvinoxalin-2,3-dion), de ezek nem specifikusak erre a receptorcsaládra. AMPA-receptor specifikus antagonistája a 2,3-benzodiazepin családba tartozó GYKI 52466 (1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-metiléndioxi-5H-2,3-benzodiazepin) és származékai (Bleakman és mtsai., 1996; Kew és Kemp 2005; Tarnawa és mtsai., 1990a; Yamada és Turetsky, 1996), ezek allostérikus hatásúak.



**2.2 ábra: Az AMPA-receptor alegységszerkezete és konformációja.** A panel: Az AMPA-receptort felépítő alegységek általános felépítése a legfőbb módosulási aminosav pozíciókkal. B panel: a 4 alegységből felépülő receptor térszerkezete. Rövidítések: Glu: glutamát, M1-4: transzmembrán régiók, NTD: N-terminális vég, S1 és S2: glutamát kötőhely (Isaac és mtsai, 2007)

Az AMPA-receptorok a gyors szinaptikus ingerületátvitel kialakításában elsődleges jelentőségűek. Az idegsejtek glutamát közvetítette depolarizációja elsősorban ezen receptorok aktiválódása következtében valósul meg (Conti és Weinberg, 1999). A glutamát kötődése után gyors és rövid idejű (<1 ms) aktiválódás következik be, amit deaktiváció követ. Hosszabb idejű agonista jelenlét esetében deszenzitizáció is kialakul.

Főleg a posztzinaptikus membránfelszínen fordulnak elő a posztzinaptikus denzitást alkotó (PSD; postsynaptic density) PDZ domén tartalmú fehérjék által kihorgonyozva. A PDZ fehérjék nem pusztán a receptorok rögzítését végzik, hanem azok plazmamembránba való kihelyeződésében és visszavételében is részt vesznek, ezáltal a szinaptikus plaszticitás fontos elemei. A PDZ domén tartalmú fehérjék közül a GRIP (glutamate receptor interacting protein; glutamátreceptorhoz kötődő fehérje), az ABP (AMPA-receptor binding protein; AMPA-receptorkötő fehérje) és a PICK1 (protein interacting with C kinase I; C-kinázhoz kötődő fehérje) szerepe tisztázott. A GRIP szerepe az AMPA-receptorok összekapcsolása a posztzinapszison (Braithwaite és mtsai., 2000; Isaac és mtsai., 2007) míg a PICK 1 ezen túlmenően a protein kináz C (PKC) általi foszforilációban és a receptorok kihelyeződésében, visszavételében is fontos (Braithwaite és mtsai., 2000; Derkach és mtsai., 2007; Greger és Esteban, 2007). A receptor szinapszison belüli stabilizálásáért a GRIP és ABP felelős.

A PDZ domén nélküli fehérjék közül az NSF (N-ethylmaleimide sensitive fusion protein; N-etilmaleimid érzékeny fúziós fehérje) és a SNAP (Soluble NSF attachment protein; oldható NSF kapcsoló fehérje) szerepe ismert, mindkettő a receptorok kihelyeződését segíti elő. Az AMPA-receptorok működését számos intra- vagy extracelluláris hatás befolyásolja. Az extracellulárisan ható működésszabályozás fontos eleme lehet az asztrociták által termelt kinurénsav, mely kötődik a receptorhoz. *In vivo* alkalmazhatósága vitatott, mivel a kinurénsav hatása erősen dóziszfüggő, alacsony koncentrációban pozitív modulátorként hat, nagy dózisban erőteljes gátlás érvényesül (Prescott és mtsai., 2006). Intracelluláris folyamatok is jelentősen módosíthatják a receptorok működését. Az AMPA-receptor C-terminálisának protein kináz A (PKA) általi foszforilációja az EPSP amplitúdóját fokozza (Conti és Weinberg, 1999) és növeli a receptor nyitási valószínűségét (Derkach és mtsai., 2007). A PKC foszforiláció a sejt felszíni AMPA-receptorok számát emeli, ezzel fokozza a szinaptikus ingerületátvitelt

(Braithwaite és mtsai., 2000), de bizonyított a szerepe a hosszútávú szinaptikus hatékonyság csökkenésben is kisagyi Purkinje-sejtek esetében (Isaac és mtsai., 2007). A  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmódulin kináz II (Ca/CaMKII) általi foszforiláció a receptor konduktanciáját fokozza (Derkach és mtsai., 2007). Az AMPA-receptorok kihelyeződését, szinapszison belüli stabilizálódását segíti a nemrégiben felfedezett stargazin fehérje is (Soto és mtsai., 2007).

A KA-receptorok kis affinitású GluR5-7, illetve nagy affinitású KA1-2 alegységekből épülhetnek fel (Bigge, 1999). Az újonnan bevezetett nomenklatúra szerint a GluR5-7 alegységeket GluK1-3-ként, míg a KA1-2 alegységeket GluK4-5-ként jelölik (Jane és mtsai., 2009). Ismertebb agonistáik a kainát és a domoát ((2S, 3S, 4S) - 4 - [(2Z, 4E)-6-karboxihepta-2,4-dién-2-il]-3-(karboximetil) pirrolidin-2-karboxilsav), bár ezen vegyületek magasabb koncentrációban aktiválhatják az AMPA-receptorokat is. A kis affinitású alegységek a domoátra specifikusabbak, míg a nagy affinitásúak a kainsavra. A KA1-2 alegységeket is tartalmazó KA-receptorok aktiválhatók nagy koncentrációjú AMPA-val is (Malva és mtsai., 1998), hatására nem-deszenzitizáló válasz alakul ki. Habár a KA-receptorok aminosav szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutat az AMPA családdal, számos eltérést leírtak biokémiai és sejtéletani jellemzőiket illetően. A receptorok  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  ionok számára átjárhatók. Glutámát hatására lassan és hosszú ideig aktivizálódnak, lassú a deaktivációjuk. Előfordulhatnak pre-, poszt-, és extraszinaptikusan is, emiatt leginkább moduláló hatásuk miatt fontosak.

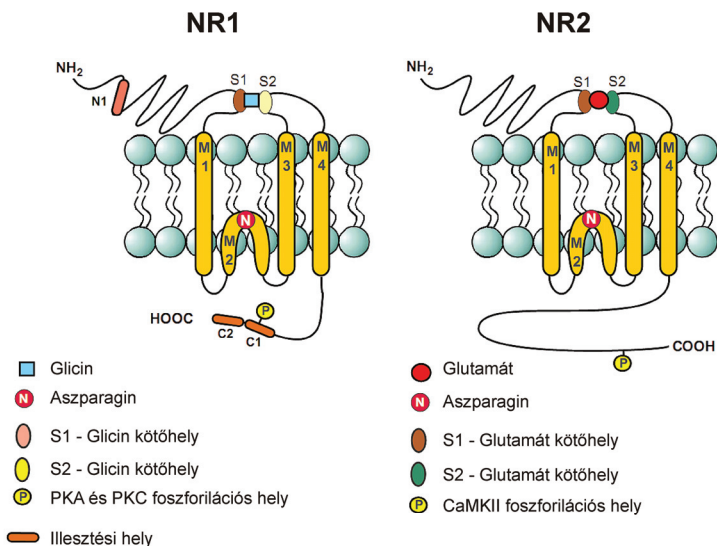
A KA-receptor alegységek esetében nem léteznek flip és flop variánsok, itt főleg a C-terminális és esetenként az N-terminális domén mutat módosulásokat. A GluR5 alegység két N-terminálisában módosult változattal rendelkezik: a GluR5-1 illetve GluR5-2-vel, ez utóbbinak 3 altípusa van (GluR5-2a, b és c), melyek C-terminálisa különbözik (Stricker és Haganir, 2002). Annak ellenére, hogy a GluR5-7 alegységekből szerveződő receptorok is működőképesek, *in vivo* a legtöbb esetben csak KA1-2 alegységekkel együtt hoznak létre receptort. A különböző alegység-összetétellel rendelkező KA-receptorok markánsan eltérő farmakológiai érzékenységgel rendelkezhetnek, a homotetramer GluR5 receptorok AMPA szenzitív, míg a homotetramer GluR6 és GluR7 receptorok AMPA inszenzitív receptort formálnak. Ha a GluR6 alegységhez KA-2 is kapcsolódik már AMPA-ra is érzékennyé válik (Sommer és

Seeburg, 1992; Stricker és Huganir, 2002). Az AMPA-receptoroknál megfigyelt Q/R átszerkesztés jellemző a KA-receptorokra is, de esetükben csak részleges az átszerkesztés, ebből következik, hogy a receptorok permeábilisak  $Ca^{2+}$ -ra nézve. A GluR5 alegységek 30-50%-ban, a GluR6 alegységek 75-95%-ban szerkesztődnek át (Sommer és Seeburg, 1992; Stricker és Huganir, 2002), míg a GluR7 alegységek kizárólagosan Q konfigurációban léteznek (Sommer és Seeburg, 1992). A KA-receptorok előfordulása általános a központi idegrendszerben, de néhány régió kiemelten magas expressziót mutat. Ilyen területek a hippokampusz CA3 régiója, a gyrus dentatus és a gerincvelő hátsó szarvában lévő neuronok (Darstein és mtsai., 2003; Pinheiro és mtsai., 2005; Sommer és Seeburg, 1992; Wisden és Seeburg, 1993; Bigge, 1999). A KA-receptorok agonistái a már említett kainsav, domoát és AMPA, ezek eltérő specificitással aktiválják a receptorokat (Kew és Kemp, 2005; Malva és mtsai., 1998). Legjelentősebb antagonistáik a CNQX és NBQX, de ezen vegyületek az AMPA-receptorok működését is gátolják. Specifikus KA-receptor antagonistá az NS-102 (5-nitro-6,7,8,9-tetrahidrobenzo (G) indol-2,3-dion-3-oxim) (Jane és mtsai., 2009). A kainát receptort tartalmazó szinapszisok ingerületi folyamatait jelentősen befolyásolhatja a SUMO (Small ubiquitin-like modifier protein; kisméretű ubiquitin-szerű módosító fehérje). Erőteljes glutamát vagy kainát által előidézett aktiváció során az agonistát kötő receptort képes reverzibilisen internalizálni a fehérje a GluR6 alegységhez kötődve, ami a káros aktiváció kivédésében hasznos lehet (Martin és mtsai., 2007).

Az NMDA-receptorok felépülése (2.3 ábra), az alegységek szerkezete sok hasonlóságot mutat az AMPA-receptorokkal, viszont működésük, farmakológiai jellemzőik jelentősen eltérnek. Az NMDA-receptorokat felépítő alegységeket 3 csoportba soroljuk, ezek az NR1, 2 és 3 (Cull-Candy és mtsai., 2001; Bigge, 1999). Az NR1 alegység egy izoformában létezik, minden NMDA-receptorban jelen van, mivel nélküle nem formálódik működő receptor. Az NR1 alegység alakítja ki a receptor aktiválódása szempontjából fontos sztrichnin-inszenzitív glicin kötőhelyet (2.3 ábra) amirez kapcsolódhat a ko-agonistaként funkcionáló glicin (Johnson és Ascher, 1987; Sauer, 1993). Az NR2 alegységnek 4 izoformája van (NR2A-D), ezek központi idegrendszeri lokalizációja mind helyileg, mind fejlődéstanilag szigorúan szabályozott. Embrióális korban minden agyterületen kifejeződik az NR2B, illetve NR2D található az agytörzsben



és a diencephalonban (Cull-Candy és mtsai., 2001; Lujan és mtsai., 2005). Patkányok esetében perinatálisan kezd expresszálni az NR2A alegység, ami a posztnatális 28. napra a legtöbb helyen kiszorítja az NR2B-t (Lujan és mtsai., 2005). Az NR2C később jelenik meg, főleg a kisagyban mutatható ki (Cull-Candy és mtsai., 2001). Az NR3 alegység 2 izoformával rendelkezik (A és B), mivel csak néhány éve fedezték fel, pontos szerepéről viszonylag kevés információ áll rendelkezésre. Mindkét izoformára jellemző, hogy csökkenti az NMDA-receptor konduktanciáját. Érdekesség, hogy az NR1/NR3 receptorok glutamatra érzéketlenek, míg glicin hatására teljes mértékben aktiválódnak. Ezen receptorok  $Ca^{2+}$  áteresztőképessége alacsony, és a  $Mg^{2+}$  blokádnak sem érvényesül rajtuk, ráadásul az ismert NMDA receptor antagonisták (MK-801, memantin) nem képesek gátolni a működését (Chatterton és mtsai., 2002). Az NR3A prenatálisan univerzálisan megjelenik, posztnatálisan csak talamikus magvakban és az amygdalában fordul elő (Ciabarra és mtsai., 1995). Az NR3B agytörzsi és gerincvelői motoneuronokon expresszálódik (Nishi és mtsai., 2001).



**2.3 ábra:** Az NMDA-receptor alegység szerkezete. **A** panel: Az NR1 alegység felépítése és főbb kötőhelyei. **B** panel: az NR2 alegység szerkezete és fontosabb kötőhelyei. Rövidítések: M1-4: transzmembrán régiók, (Parsons és mtsai, 2007)

Az NMDA-receptorok az előagyban mindenhol előfordulnak, legnagyobb mennyiségben a hippocampusban vannak jelen (Ozawa és mtsai., 1998). Szelektív agonistái az N-metil-D-aszpartát és kinolinsav, melyek az NR2 alegységeken lokalizálódó transzmitter kötőhelyen keresztül aktiválhatják a receptort (Sauer, 1993). Az NMDA-receptor azonnali aktiválódását megakadályozza, hogy az ioncsatornát nyugalmi potenciálon egy  $Mg^{2+}$  zárja el, ami hozzávetőleg  $-35$  mV hipopolarizáció esetén mozdul ki és teszi lehetővé az aktivációt (Sauer, 1993).

Az NMDA-receptorok ismertebb antagonistái a D-2-amino-5-foszfono-valeriánsav (APV), fenciklidin, és a nem-kompetitív antagonisták ketamin, dizocilpin (MK-801), illetve memantin (Kew és Kemp, 2005; Ozawa és mtsai., 1998). A ketamin, dizocilpin és a memantin is a nyitott csatornába kötve gátolja annak működését. Léteznek alegység-specifikus antagonisták is, az NR2B alegységre specifikus az ifenprodil (Herin és Aizenman, 2004), illetve a még szelektívebb második generációs ifenprodil analóg traxoprodil (CP 101606) (Gogas, 2006). A glutation és a kinurénsav endogén antagonistái az NMDA-receptoroknak (Scharfman és mtsai., 1999; Varga és mtsai., 1997; Wu és Schwarcz, 1996). Az NMDA-receptorok működésének tanulmányozását megnehezíti, hogy áram áteresztőképességük és farmakológiai befolyásolhatóságuk erősen függ az alegységösszetételtől, továbbá számos modulációs kötőhellyel rendelkeznek, amik szintén jelentősen befolyásolják a működésüket. A poliamin kötőhelyre endogén agonisták köthetnek be (spermin, spermidin), a redox kötőhely a receptor aktivitását képes befolyásolni, oxidált állapotában a receptor kevésbé aktív. Ehhez a helyhez kapcsolódik a ditriotreitól, növelve a konduktanciát. A receptor-ioncsatorna komplexen ezen kívül más kötőhelyek is vannak, mint  $Zn^{2+}$ -kötőhely vagy a proton érzékeny kötőhely (Stone és Addae, 2002).

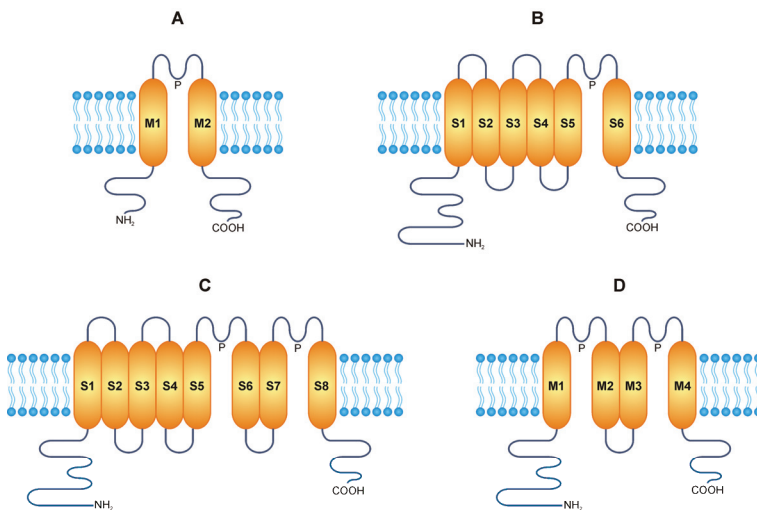
A feszültségfüggő  $Mg^{2+}$  blokádi miatt az NMDA-receptorok aktiválódásához a glutamát kötődésén kívül az AMPA-receptorok által előidézett hipopolarizációra is szükség van. Amennyiben minden feltétel adott, a receptor több mint 2 ms késleltetéssel tartósan aktiválódik. A nyitódást több lépéses konformációváltozás előzi meg (Erreger és mtsai., 2005), ami a  $Mg^{2+}$  csatornából történő távozásához szükséges idő mellett, magyarázatot adhat az AMPA-receptorokéhoz viszonyított hosszú késleltetésre. A nyitott csatornán keresztül  $Na^+$ ,  $K^+$  és  $Ca^{2+}$  áramlik be. Az NMDA-receptorok  $Ca^{2+}$

permeabilitása hozzávetőleg százszorosa a natív AMPA-receptorénak, így az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció növekedése elsősorban az NMDA aktiváció következménye (Conti és Weinberg, 1999). A tartósan magas intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció hatására olyan kaszkád folyamatok indulhatnak be, amelyek a szinaptikus ingerületátvitel hatékonyságának tartós növekedését (LTP; Long-term potentiation) eredményezhetik (Bennett, 2000, Collingridge és mtsai., 1983). A receptor konduktanciájának, kihelyeződésének szabályozása az AMPA-receptorokéhoz hasonlóan a C-terminálison lévő szerin oldalláncok foszforilációjával valósul meg, PKA, PKC és Ca/CaMKII révén (Conti és Weinberg, 1999). A PKC általi foszforiláció növeli a csatorna nyitási valószínűségét és csökkenti az extracelluláris magnézium ionokkal szembeni affinitást, ezáltal a receptor serkentődik (Dingledine és mtsai., 1999). A PKA és Ca/CaMKII működésszabályozásban betöltött szerepe eddig ismeretlen. Az NMDA-receptorok túlzott mértékű aktivációja bizonyítottan szerepet játszik a glutamát okozta excitotoxicitás kialakulásában. Az NMDA-receptorok tartós nyitódása miatt megemelkedő intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció hatására aktiválódik a kalpain fehérje, ami az AMPA-receptorok közvetítésével csökkenti a toxikus hatást. Az AMPA-receptor downreguláció némileg csökkenti az NMDA-receptorok aktivációját is (Del Rio és mtsai., 2008; Yuen és mtsai., 2007).

### 2.2.2. A kálium csatornák

A legváltozatosabb ioncsatorna család, genetikai kódolásukban legalább 50 gén vesz részt. Megkülönböztetünk nem feszültségérzékes, befelé egyenirányító és ATP érzékeny, illetve  $\text{Ca}^{2+}$  érzékeny és feszültségérzékes  $\text{K}^+$  csatorna alcsoportokat. A feszültségfüggő  $\text{K}^+$  csatornák meghatározzák a sejtek ingerlékenységét, válaszadó képességét. Aktiválásuk esetén a receptor-ioncsatorna komplex átjárhatóvá válik  $\text{K}^+$ -ok számára. Mindez azt eredményezi, hogy a membránpotenciál a kálium ekvilárium potenciál irányába mozdul el, ebből kifolyólag a serkentődés leállításában van fontos szerepük. Kálium csatornák minden állati sejten jelen vannak, az idegsejteken kívül megtalálhatók sima-, vér- és szívizom sejteken, illetve a hasnyálmirigy  $\alpha$ - és  $\beta$ -sejtjein is. Nagyon változatos ioncsatorna család, csoportosításukat általában a szerkezetük alapján végzik.

A 2 transzmembrán (TM) régiót tartalmazó  $K^+$  csatornák (2.4A ábra) négy alegységből épülnek fel, a TM régiók között nagy extracelluláris hurok található, ami visszahajlik a membránszintbe és a C-terminálissal együtt részt vesz a pórus formálásában. Jellemző képviselői ennek a típusnak a befelé egyenirányító kálium csatornák és az ATP érzékeny kálium csatornák  $\alpha$ -alegysége, illetve a bakteriális kálium ionszűrő (Choe, 2002, Wei és mtsai., 1996). A befelé egyenirányító  $K^+$  csatornák a bemenő árammal szemben mutatnak kisebb ellenállást és fontosak a membránpotenciál stabilizálásában. A hippocampusz sejtjeit moduláló transzmitter rendszereken keresztül érkező, szignáltranszdukciós útvonalakat aktiváló hatások következtében G-fehérje révén aktiválódnak (GIRK csatornák) és hiperpolarizációt eredményeznek (Yuan és Chen, 2006). Az ATP érzékeny csatorna a szulfonilurea-receptor (SUR) kapcsolódását követően képes érzékelni az ATP-t. ATP hatására a receptor gátlódik, MgADP hatására érzékenyítődik. A  $K_{ATP}$  csatornák aktiválódása idegsejtekben a neurotranszmitter leadás csökkenését eredményezi (Ashcroft és Gribble, 2000).



**2.4 ábra: A  $K^+$  csatorna család tagjainak alegység szerkezete. A panel: 2TM/P receptor. B panel: 6TM/P receptor. C panel: 8TM/2P receptor. D panel: 4TM/2P receptor. Rövidítések: COOH: C-terminális vég, M1-4: transzmembrán régiók,  $NH_2$ : N-terminális vég, P: pórusformáló domén, S1-8: transzmembrán régiók (Choe, 2002 alapján).**

A feszültségfüggő csatornák 4, egyenként 6 TM régiót tartalmazó alegységből épülnek fel (2.4B ábra). A csoporton belül több altípus különíthető el: úgymint tranzienst áramot kialakító A-típus, vagy a lassabban inaktíválódó D-áramot kialakító receptorok (Yuan és Chen, 2006). A feszültségfüggő  $K^+$  csatornák hatással vannak az akciós potenciál ingerküszöbére, tüzelési frekvenciájára és az utó-hiperpolarizáció refrakter stádiumára (Pongs, 1999). Depolarizált állapotban a csatorna nagyobb valószínűséggel van nyitva, míg hiperpolarizáció esetén nagyobb valószínűséggel van zárva. A nyitott állapotot gyakran követi inaktívált állapot, ilyenkor áram egyáltalán nem folyik át. Depolarizáció hatására a feszültségszenzorként funkcionáló S4 domén az extracelluláris felszín felé mozdul el, ami megváltoztatja a fehérjemolekula konformációját és az ionszatorna átjárhatóvá válik. A  $Ca^{2+}$  érzékeny kálium csatornák is 6TM receptorok, ezek az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint emelkedésére nyílnak ki (Wei és mtsai., 1996).

A 2TM és 6TM alegységek kombinálódásával jött létre a 8TM receptor (2.4C ábra), míg a 2TM régiók duplikálódásával alakultak ki a 4TM receptorok (2.4D ábra). Közös tulajdonsága ezen típusoknak, hogy két pórusformáló domén található bennük, így a működőképes ionszatorna komplex kialakulásához csak 2 alegységre van szükség (Choe, 2002).

A tetraetil-ammonium (TEA) az intracelluláris oldal felől kötődve gátolja a  $K^+$  kiáramlást, míg a 4-amino-piridin (4-AP) intracellulárisan és extracellulárisan alkalmazva gátolja a számos  $K^+$ -csatorna működését. Mindezek következtében az akciós potenciál repolarizációs szakasza hosszabb lesz, ami fokozott neurotranszmitter leadáshoz vezet a preszinapszison.

### **2.3. Az idegsejtek ingerületi folyamatai és a belső optikai jelek kapcsolata**

Az idegsejtek működése következtében jelentős ionmozgások mennek végbe (döntően nátrium és kálium ionok áramlása), melyek jelentős hatással vannak az idegsejtek és gliasejtek működésére és az extracelluláris tér kémiai, fizikai tulajdonságaira. Az akciós potenciált kísérő nátrium ion beáramlás és kálium ion kiáramlás az extracelluláris tér közvetítésével a gliasejtekre is jelentős hatással van, mivel pufferelek az ionösszetételt. Mindezen ionmozgások jelentős vízmozgásokat eredményeznek, amit a sejtek duzzadása vagy zsugorodása követ.

Amennyiben nincs szükség festési eljárásra, az élő szövetekből regisztrált optikai jelek belső optikai jeleknek tekintendők. A megvilágítás során ezen optikai jelek megváltozása CCD (Charge coupled device; töltéscsatolt eszköz) kamerával vagy fotodióda rendszerrel mérhető. A sejtek aktiváció-függő alakváltozása az *in vitro* agyszövet preparátumokban kiemelten fontos, mivel vérkeringés hiányában egyedüli tényezőként határozza meg a belső optikai jelek megváltozásait (Witte és mtsai., 2001). Az egyik lehetséges mechanizmus, hogy a sejtek duzzadása közvetlenül csökkenti a fényszóródás mértékét (Somjen, 2004), a vízterek térfogatának megváltozása az extra- és intracelluláris tér törésmutatóját módosítja, illetve a jelenlévő makromolekulák koncentrációváltozása is az optikai tulajdonságokat befolyásolja. A sejtmembrán lipid kettősrétegének ozmolaritás-függő törésmutató változása szintén jelentős tényező lehet az optikai jel kialakulásában, bár ez utóbbi jelenség okára még nincs magyarázat (Aitken és mtsai., 1999; Andrew és mtsai., 1999). A jelenség megértését bonyolítja, hogy nem kizárólag az idegsejtben mehetnek végbe az előbb leírt folyamatok, hanem a dendrittüskékben, mitokondriumokban és egyéb sejtorganelumokban, de akár gliasejtben is lejátszódhatnak (Andrew és mtsai., 1999; Sykova és Chvátal, 2000). A belső optikai jelekről részletesebb leírás az 1. függelékben található.

## **2.4. Az agykéreg anatómiája**

### **2.4.1. Általános sajátosságok**

Az agykéreg jellemzően réteges szerveződést mutat, a törzsfeljődéstanilag újabb – neokortikális – struktúrák általában 6 rétegre különíthetők el, míg az ősbibb területek – archikortex – 3 rétegre tagolhatók. A rétegek elkülönítése szövettani, sejtfestési eljárásokon alapul. Az agykéreg egyes területeinek citoarchitektúrája jelentős eltéréseket mutathat, ami sok esetben vita tárgyát képezheti az anatómiai egységek pontos elkülönítésében (Douglas és Martin, 1998).

A neokortikális területeken a horizontális tagolódás mellett – bizonyos agyterületeken – vertikális szerveződés is megfigyelhető, az összes rétegre kiterjedő kérgi oszlopok jönnek létre. A kérgi oszlop 10-20000 idegsejt által alkotott funkcionális egység szinaptikusan szorosan kapcsolt neuronokkal. Létezésüket elsőként a szomatoszenzoros kéregben írta le Mountcastle (Mountcastle, 1957), majd az ő modelljét átdolgozva

értelmezte Hubel és Wiesel (Hubel és Wiesel, 1962; Szentágothai, 1975) a látókéreg működését.

Az alábbiakban a szomatoszenzoros és entorhinális kéreg, illetve a hippokampusz felépülésének és működésének alapjait foglalom össze, mivel vizsgálataim ezen agyterületeken végeztem.

#### 2.4.2. A szomatoszenzoros kéreg

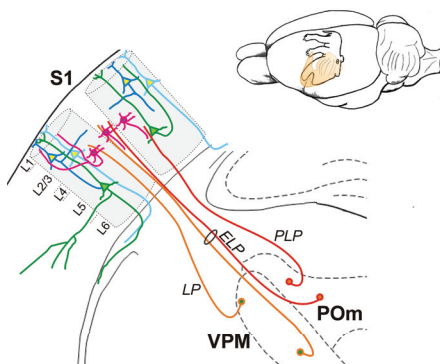
A szomatoszenzoros kéreg szövettani felépítése az agykéreg általános ismertetésében leírtakhoz hasonló. Hat rétegből épül fel, az 1. réteg (stratum moleculare) szinte sejtmentes réteg, benne a piramis sejtek apikális dendritvégződéseinek vannak jelen. A 2. és 4. réteg (stratum granulosum externa et interna) szemcsesejteket tartalmaz, míg piramis sejteket a 3. és 5. rétegben (stratum pyramidale externa et interna) találunk. A 6. réteg (stratum multiforme) változatos képet mutat az öt felépítő sejtek típusa szerint.

Emberben a Brodmann 1, 2 és 3 areáknak megfeleltethető kéregterület, melynek feladata a testfelszínen lévő receptorok ingerületének fogadása és továbbítása az asszociatív kéregterületek felé. A bejövő afferensek szomatotópiás vetületet mutatnak, tehát testünk leképeződik erre a kéregterületre. Rágcsálókban is kimutatták a perifériás afferensek szomatotópiás vetülését, de esetükben - az életmódjuk következtében - a legnagyobb jelentősége a bajuszszőrök által szolgáltatott információ feldolgozásának van, ami szintén eme területhez köthető. A bajuszok szőrtüszőiben lévő idegvégződések ingerülete többszöri átkapcsolás (Petersen, 2007) után az elsődleges érzőmező hordókérgi területére (barrel cortex) fut be. Mivel a hordókéreg idegi hálózata sok hasonlóságot mutat a szomatoszenzoros kéreg egyéb területeivel, ezen keresztül ismertetem a kéregterület legfőbb anatómiai jellegzetességeit.

A hordókéreg a fej és a mellső végtag disztális részének reprezentációs területén lokalizálható (2.5 ábra). Nevét a 4. réteg sajátos citoarchitektúrája miatt kapta, ezen a területen az idegsejtek 200-400 µm átmérőjű hordószerű képleteket formálnak, melyek kijelölik a kérgi oszlopok határait is. A hordók elhelyezkedése az agykéreg felszínén követi a bajuszok elhelyezkedésének módját, vagyis 5 sorba rendeződnek és soronként 4-7 hordót találunk (Woolsey és Van der Loos, 1970). A sejtek döntő többsége a hordók falában van, ezek nagyobb részt tüskés dendritű csillagsejtek, de lehetnek vasoaktív

intesztinális polipeptid (VIP, vasoactive intestinal polypeptide) tartalmú gátló csillagsejtek is. A hordók belsejében futnak a talamikus afferensek, sejteket csak kis számban találunk itt. A hordók közötti szeptomokban vertikálisan futó dendritek és intrakortikális rostok vannak jelen (Tracey, 2004; Waite, 2004). A hordók bemenetei is topográfiai vetületet mutatnak, mind a talamusz (barreloidok), mind a középgy (barrelettek) szintjén (Deschenes és mtsai., 1998).

A hordókéreg legfőbb bemenete a lemniszkális útvonal, mely a talamusz ventropostero-mediális magjának (VPM) központi részén („core”) keresztül éri el az



**2.5 ábra: A szomatoszenzoros kéreg agykérgi lokalizációja és főbb serkentő kapcsolatai.** Az elsődleges szomatoszenzoros kéreg és a talamikus magvak kapcsolatrendszerét mutatja be az ábra. A jobb felső sarokban lévő panel a hordókéreg elhelyezkedését szemlélteti (sárga terület). Rövidítések: ELP: extralemniszkális pálya, L1-6: kérgi rétegek, LP: lemniszkális pálya, PLP: paralemniszkális pálya, POM: poszterior mediális talamikus mag, S1: elsődleges szomatoszenzoros kéreg, VPM: ventrális poszteromediális talamikus mag

agykérget és a 4. rétegben végződik (Pierret és mtsai., 2000). Az afferensek kis hányada szinaptikus kapcsolatokat hoz létre a 3., 5. és 6. rétegben is (Tracey, 2004). A talamikus afferensek a hordók falában lévő tüskés csillagsejteken szinaptizálnak. Mivel a csillagsejtek nagy számú visszatérő kapcsolattal rendelkeznek, a talamikus eredetű ingerület jelentős erősítésen mehet keresztül, mielőtt az intrakolumnáris 2/3. rétegben lévő piramisettet eléri (Bannister, 2005). A csillagsejtből kiinduló és piramisetten végződő szinaptikus kapcsolat magas küszöbbel

rendelkezik, emiatt akár 50 csillagsejt szinkron aktiválódására is szükség lehet ahhoz, hogy a piramisetten akciós potenciál alakuljon ki. A 2/3. réteg piramisetteji szerzteágazó kapcsolatokat hozhatnak létre. Horizontális axonjaik révén az oszlopon belüli intralamináris piramisettekkel létesíthetnek reciprok kapcsolatokat (Bannister, 2005; Feldmeyer és mtsai., 2006), vagy a piramisettek kis hányada az 5/B réteg vastag pamacsos piramisettejének apikális dendritjein létesít szinapszist. Az 5. réteg idegsejtjei



a striatumba, colliculus superiorba és az anterior praetectalis magvakba küldenek efferenseket (Schubert és mtsai., 2007; Waite, 2004), de axonkollaterálisuk számos 5. rétegbeli piramisajt apikális dendritjét is innerválják a 3. rétegben (Thomson és Bannister, 1998). Az 5. rétegből eredő axonok alkotják a kortiko-kortikális kapcsolatrendszer visszavetülő pályáit, melyek bármely rétegben végződhetnek (Bannister, 2005).

A hordókéreg másik fontos bemenete a paralemniszkális pálya, ami a talamikus poszteromedialis (POm) mag közvetítésével éri el az 5/A réteg piramissejtjeit (Manns és mtsai., 2004). Az ingerület innen a 2/3. réteg piramissejtjeihez fut. A talamikus bemenetet fogadó piramisajtak működését befolyásolhatják a 4. réteg csillagsejtjeinek itt szinaptizáló axonjai (Lübke és Feldmeyer, 2007).

A közelmúltban leírtak egy harmadik bemenetet is, az extralemniszkális útvonalat (Petersen, 2007). Ez a pálya szintén a VPM közvetítésével éri el a szomatoszenzoros kérget, az axonok a szeptomokban lévő 4. rétegbeli csillagsejteken végződnek (Petersen, 2007). A pályák a VPM perifériás helyzetű farki részéből („tail”) erednek (Pierret és mtsai., 2000). A POM-ból is érkeznek olyan pályák, amik ezen szeptális idegsejteken végződnek.

Feltételezhetően a 3 pályarendszer a 2/3. vagy a 4. rétegben konvergál egymással, lehetővé téve a bajuszokból érkező információ komplex feldolgozását (Lübke és Feldmeyer, 2007).

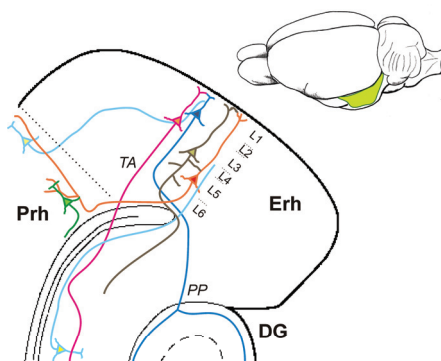
A hordókéreg talamikus kimenete a 6. réteg piramissejtjeiből indul ki és mind a specifikus, mind a nem specifikus magvakba eljut (Bannister, 2005). A hordók kimenete célzottan azon VPM-beli barreloidokba irányul, ahonnan a bemenete is származik. Ezen kívül futnak rostok az adott barreloidot beidegző retikuláris talamusz magban lévő gátló idegsejtekhez is. Ezen sejtek a 4. réteg csillagsejtjeivel állnak erős reciprok kapcsolatban (Bokor és mtsai., 2008; Schubert és mtsai., 2007).

### 2.4.3. Az entorhinális kéreg

A Brodmann 28 és 34 areáknak megfeleltethető kéregterület, melynek szerepe van az emlényomok kialakításában és a térbeli tájékozódásban, a hippocampuszal együttműködve. Anatómiai szerkezete alapvetően hasonló az agykéreg egyéb

területeihez. Két nagyobb egységre bontható, a laterális (LEA; lateral entorhinal area) és a mediális (MEA; medial entorhinal area) entorhinális kérgi területekre. Ezen területek könnyen elkülöníthetők szövettani különbségeik miatt: a LEA területén a 2. réteg, határozottabban elkülönül, mint a MEA esetében, az itt jelenlévő sejtek szigetekbe tömörülnek. A MEA esetében a 4. réteg élesen elhatárolódik, a sejtek radiálisan rendeződnek ezen területen (Witter és Amaral, 2004).

Az entorhinális kéreg, akárcsak egyéb neokortikális területek hatrétegű szerveződést mutat. Az 1. rétegben szinte sejtmentes, elvéve találunk GABAerg csillagsejteket, illetve horizontális gátló neuronokat, melyek a hippokampuszba induló



**2.6 ábra: Az entorhinális kéreg agykérgi lokalizációja és főbb serkentő kapcsolatai.** Az entorhinális kéreg belső kapcsolatrendszerét és asszociációs pályáit mutatja be az ábra. A jobb felső sarokban lévő panel a laterális entorhinális kéreg elhelyezkedését szemlélteti (zöld terület). Rövidítések: DG: gyurus dentatus, Erh: entorhinális kéreg L1-6: kérgi rétegek, PP: perforáns pálya, Prh: perirhinális kéreg, TA: temporoammonikus pálya

szubikulumba futnak. Az axonkollaterálisok belépnek az 1. rétegbe, vagy intralaminárisan hoznak létre szinapszisokat (Lingenhöhl és Finch, 1991; Witter és Amaral, 2004). Az entorhinális kéreg 4. rétegében kis számban találunk csak sejteket. Ezek többsége piramidális vagy orsó alakú sejt (Witter és Amaral, 2004). A piramis sejtek axonkollaterálisai a szubikulumot, illetve az infragranuláris rétegeket innerválják. Az orsó alakú sejtek, ahogy nevük is mutatja orsó alakú sejtesttel rendelkeznek, az apikális dendritág az 1. rétegegig halad, míg a bazális dendrit a szubikulumot idegzi be. Axonjuk a

kimeneteket szabályozzák. A 2. réteg túlnyomó részt piramis-sejtekből áll, melyek az entorhinális kéreg hippokampuszba irányuló kimenetének, a perforáns pályának a kiindulási pontjai. A csillagsejtek egy részénél a projekciós rostok elágazás nélkül hagyják el a kérget, míg más sejtek axonjai kollaterálisokat küldenek az 1. és 2. rétegekbe, melyek általában gátló interneuronokon végződnek. A 3. réteg legjellemzőbb sejtípusa a piramis sejt. Axonjaik a hippokampusz CA1 területére és a

kérget elhagyva kollaterálisokat hoz létre, amik a mély rétegekben végződnek (Lingenhöhl és Finch, 1991). Az 5. és 6. rétegekben piramis sejtek, orsó alakú sejtek és gömbölyded sejtek fordulnak elő. Feltételezhetően mindhárom típus projekciós sejt, de részt vesznek a lokális áramkörök kialakításában is. A nagyméretű piramis sejtek apikális dendritje az 1. és 2. réteg határáig fut, ahol kisebb ágakat hoz létre, míg a bazális dendritarborizáció az infragranuláris rétegeken belül alakul ki. Az axonkollateralizáció a sejttest közelében jön létre, a fő axonág horizontálisan nagy távolságra eljuthat, kollaterálisai akár a 2. réteget is elérhetik (Lingenhöhl és Finch, 1991).

Az entorhinális kéreg szerepe, hogy a szaglórendszer és a látási-térérzékelési rendszer afferentációit közvetítse a hippocampusz irányába (Biella és mtsai., 2002). Emellett kulcsfontosságú szerepe van az emléknymok rögzítésében is, amit a hippocampuszal szoros együttműködésben végez (Villers-Sidani és mtsai., 2004). Nem pusztán reléállomásként továbbítja az információkat, hanem asszociatív kéregterületként feldolgozást is végez, amit a perirhinális kéreggel és a hippocampuszal alkotott reciprok kapcsolata tesznek lehetővé (Villers-Sidani és mtsai., 2004). A neokortikális kéregterületek irányából érkező bemenetek elsőként a perirhinális kéreg 2. rétegének principális sejtjeit érik el, majd innen monoszinaptikus kapcsolat révén érik el az entorhinális kéreg 2. és 3. rétegének principális sejtjeit (4.6 ábra). Az entorhinális kéreg 2. rétegében elhelyezkedő piramis sejtekből indul ki a perforáns pálya, ami a gyurus dentatusba, illetve a hippocampusz CA3 régiójába fut (Johnston és Amaral, 1998; Villers-Sidani és mtsai., 2004). A gyurus dentatusból kiinduló moharostok, és a CA3 piramis sejtek axonjai által alkotott Schaffer-kollaterális közvetítésével jutnak az ingerületek a CA1 régióba, illetve a szubikulumba, majd onnan az entorhinális kéreg 5.-6. rétegébe fut (Johnston és Amaral, 1998; Villers-Sidani és mtsai., 2004). A 3. rétegben található piramis sejtekből indul ki a temporo-ammonikus pálya, ami a hippocampusz CA1 régió piramis sejtjeit innerválja (Buzsáki, 1996). Az entorhinális kéreg mély rétegeiből ered a perirhinális kéreg felé irányuló kimenet (2.6 ábra), ami annak 1. és 5. rétegében végződik el (Villers-Sidani és mtsai., 2004).

Az entorhinális kéreg tanulásban és térbeli tájékozódásban betöltött szerepe kevésbé ismert, és jelenleg intenzíven kutatott terület. A működés megismerésében fontos előrelépés volt az ún. „grid” sejtek felfedezése (Hafting és mtsai., 2005). A 2. réteg

principális sejtei az állat adott térbeli pozícióiban tüzelnek, létrehozva ezzel egy koordinátarendszert a tájékozódáshoz. A rendszer egységei nem négyzetek, hanem egyenlő oldalú háromszögek. A különböző orientációjú és térközű vonatkoztatási rendszert létrehozó grid sejtek képesek leképezni az állat környezetét, lehetővé téve a tájékozódást (Witter és Moser, 2006).

#### 2.4.4. A hippocampális formáció

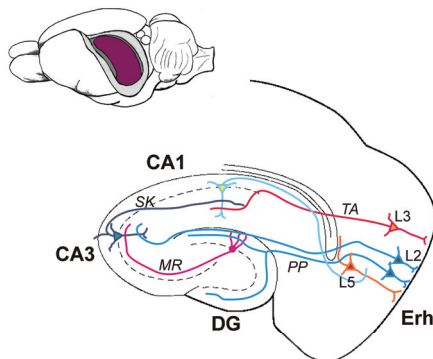
A hippocampális formáció az új emléknymok rögzítéséért és a térbeli tájékozódásért felelős agyterület, szoros kapcsolatban áll a szomszédos entorhinális kéreggel. Részét képezi az Ammon-szarv, gyrus dentatus, szubikulum és a preszubikulum is. Az Ammon szarv sejtani jellegzetességek alapján három alterületre osztható fel (CA1-3; Cornu Ammonis). Patkányban közvetlenül az agykéreg alatt található, a szeptális magvaktól a temporális kéregig húzódik. A hosszanti tengelyét ebből kifolyólag szeptotemporális tengelynek nevezzük, míg az erre merőleges tengelyt transzverzálisként emlegeti a szakirodalom (Johnston és Amaral, 1998).

A hippocampusz a neokortikális területekhez hasonlóan réteges szerveződést mutat, de a hippocampuszban csak 3 réteg különíthető el. A 2. rétegben helyezkednek el az adott területre jellemző principális sejtek, míg ez alatt és fölött a dendritikus rétegek találhatók.

A gyrus dentatus (DG; dentate gyrus) esetében elkülöníthető rétegek a szemcsesejt réteg, a fölötte elhelyezkedő molekuláris réteg és az alatta lévő hilus. A szemcsesejt rétegben található a DG principális sejtei, a szemcsesejtek. Ezek dendritfája kizárólag a molekuláris rétegben lokalizálhatók. Az axon a sejt ellentétes pólusából eredve hozza létre a DG kimenetét képező moharostokat. A moharostok kollaterálisai szinaptizálnak a hilusban lévő mohasejtekkel, amik visszatérő serkentő kapcsolatokat alakítanak ki (Johnston és Amaral, 1998; Lisman, 1999). A hilus kolecisztokinin és parvalbumin tartalmú kosársejtei szabályozzák a szemcsesejtek és a mohasejtek közötti ingerületi folyamatokat, a mohasejtek periszomatikus régióiban szinaptizálva (Acsády és mtsai., 2000). A molekuláris rétegben kandeláber sejtek találhatók, melyek axonja a szemcsesejtek axondombján végződik el, míg a hilusban lévő szomatosztatin pozitív sejtek a disztális dendriteken hoznak létre szinapsziszokat.

Az Ammon szarv horizontális szerveződését tekintve szintén 3 rétegre osztható, bár további rétegeket szokás elkülöníteni a sajátos mikrohálózatok miatt. A CA3 régióban többek között a sejttesteket tartalmazó piramidális réteg, a bazális dendritfát magába foglaló stratum oriens, és az apikális dendritágakat tartalmazó str. lucidum, str. radiatum és a str. lacunosum-moleculare található meg. A CA2 area celluláris felépítése, kapcsolatrendszere közel azonos a CA3 régióéval. Fontos különbség, hogy a piramis sejtek nem kapnak afferenciát a moharostoktól, ezért a str. lucidum hiányzik (Johnston és Amaral, 1998). A CA1 area több anatómiai eltérést is mutat a CA3 régióhoz képest. A piramis sejtek kisebb méretűek, mint a CA3 régióban és nem kapnak bemenetet a DG-ból. A str. radiatum és oriens rétegek fogadják a CA3 piramis sejtek axonjait. Ezt a pályarendszert, leírója alapján Schaffer-kollaterálisnak nevezzük. A str. lacunosum-moleculare-ban akárcsak a CA3 area esetében találjuk az entorhinális kéreg afferenseit (Johnston és Amaral, 1998).

A hippocampusz legfőbb kérgi bemenete az entorhinális kéregből származik (2.7 ábra). Ezen agykérgi terület 2. rétegében találhatóak azon piramis sejtek, melyek axonjai a kérget elhagyva alkotják a perforáns pályát. A perforáns pálya jellemzően



**2.7 ábra: A hippocampusz előagyi lokalizációja és főbb serkentő kapcsolatai.** A hippocampális régiók kapcsolatrendszerét és asszociációs pályáit mutatja be az ábra. A bal felső sarokban lévő panel a hippocampusz szubkortikális elhelyezkedését szemlélteti (lila terület). Rövidítések: DG: gyrus dentatus, Erh: entorhinális kéreg L2, 3 és 5: kérgi rétegek, MR: moharostok, PP: perforáns pálya, SK: Schaffer-kollaterális, TA: temporoammonikus pálya

glutamaterg afferenciát továbbít a DG szemcsesejtjeire és a CA3 area piramis sejteire (Buzsáki, 1996; Johnston és Amaral, 1998; Lisman, 1999; Witter és Amaral, 2004). A rostok egy része a DG kosáresejtjein végződik, és érzék az afferenciát az entorhinális kéreg mély rétegeiből is (Johnston és Amaral, 1998; Witter és Amaral, 2004). Az entorhinális kéreg afferensei radiális elkülönböztést mutatnak mind a DG, mind a CA3 régió esetében, annak függvényében, hogy az afferens pontosan honnan ered. A

DG molekuláris rétegének külső két harmada fogadja a kérgi afferenciációt, a külső harmadában a LEA-ból, míg a középső harmadában a MEA-ból érkező rostok végződnek el. Hasonló elkülönülés figyelhető meg a CA3 area str. lacunosum-moleculare esetében is, a LEA afferensek a stratum lacunosum-moleculare felszíni részeibe futnak be, míg a MEA rostjai mélyebben végződnek el ugyanezen rétegben (Witter és Amaral, 2004).

Az entorhinális kéregből érkező ingerületek feldolgozásának következő állomása a CA3 area, ahova - az előbb említett módon - közvetlenül jut el a perforans pálya révén, vagy a DG közbeiktatásával a moharostok afferensei által (Buzsáki, 1996; Johnston és Amaral, 1998; Lisman, 1999). Innen a Schaffer-kollaterális rendszeren keresztül jut a CA1 régióba (2.7 ábra). A CA3 régió tükrözve vetül a CA1 régióra (Brivanlou és mtsai., 2004). A CA3 DG-hoz közeli sejtjei a CA1 szubikulummal határos részeire vetítenek, míg a CA3 CA2 areához közeli sejtjei a CA1 proximális részébe küldenek rostokat. A Schaffer kollaterális részét képező axonok CA1 piramidális sejteket innerválhatják a stratum oriens és radiatum rétegekben is (Johnston és Amaral, 1998). A CA1 régió neuronjai kapnak közvetlen afferenciációt is az entorhinális kéreg 3. rétegében lévő piramissejtektől, topografikusan vetülve (temporo-ammonikus pálya). A pályák a stratum lacunosum-moleculare rétegben hoznak létre szinapszisokat. A LEA rostjai a CA1 disztális részébe vetítenek, a MEA pályarendszere a proximális helyzetű régiót innerválja (Johnston és Amaral, 1998; Witter és Amaral, 2004). A CA1 area piramidális sejtjei közvetlenül, vagy a szubikulum közbeiktatásával küldenek információt az entorhinális kéreg 4.-5. rétegébe.

A hippocampusz kap külső, szubkortikális bemeneteket is, melyek főleg a szeptális magvakból vetülnek ide. A szeptumból érkező kolinerg innerváció minden területet elér, de legtöbb rost a hilusba fut be. Ez a terület egyben a fő külső kimeneti célpontja is (Buzsáki, 1996; Johnston és Amaral, 1998).

A hippocampális formáció kapcsolatrendszere alaposan feltárt agyterület, de a pontos működése a mai napig nem ismert. A fent ismertetett triszinaptikus kör működésének megismerését bonyolítja, hogy a hippocampusz nem párhuzamosan rendeződő laminákból épül fel, hanem a szeptotemporális tengely mentén a projekciós pályák (perforans pálya, moharostok, Schaffer kollaterálisok) szétterülnek (Buzsáki, 1996; Brivanlou és mtsai., 2004). Feltételezhetően a terület funkciója, hogy az externális

világról származó kortikális információkat összevesse az internális világ szubkortikális eredetű információival (Buzsáki, 1996).

## **2.5. Elemi működés**

### **2.5.1. Neokortikális kiváltott válasz szeletpreparátumban**

A kérgi kiváltott válasz rögzítése valamely rétegben (jellemzően a 3. rétegben) elhelyezett üveg mikroelektród és a corpus callosum – 6. réteg határán lévő ingerlelektród segítségével történik. Annak ellenére, hogy a különféle kérgi területekről és azok eltérő rétegeiből elvezetett kiváltott válaszok nagyfokú heterogenitást mutatnak, többé-kevésbé azonos latenciával megjelenő komponensek különíthetők el. Az ingerlést követően kis latenciával és amplitúdóval megjelenő populációs spike detektálható, ami a fehérállomány irányába haladó axonok retrográd ingerlése miatt megjelenő nem-szinaptikus komponens (Langdon és Sur, 1990). Ezt követi a 3-6 ms késleltetéssel megjelenő, az AMPA/KA-receptorok aktivációját reprezentáló, feszültségfüggést mutató negatív hullám. Hozzávetőleg 40 ms latenciáidővel jelenik meg a sokszor minden-vagy-semmi módon aktiválódó NMDA-receptorok által közvetített negatív komponens (Sutor és Hablitz, 1989; Thompson és mtsai., 1995).

### **2.5.2. Hippokampális kiváltott válasz szeletpreparátumban**

A hippocampusban lejátszódó ingerületi folyamatok is követhetők az extracelluláris mezőpotenciál rögzítésével. A Schaffer-kollaterális elektromos ingerlése hatására egy komplex, több komponensű kiváltott válasz rögzíthető a CA1 areában. Az ingerlést követően először egy rövid latenciájú, kis intenzitású pozitív komponens regisztrálhatunk a str. radiatumban, amit a preszinaptikus rostokon végigfutó akciós potenciál eredményez. Ezt egy lassabb negatív hullám követi, ami a szinaptikus áramok következtében alakul ki. Ez utóbbit populációs serkentő posztzinaptikus potenciálnak (EPSP; Excitatory postsynaptic potential) nevezzük, mivel több, az elektród környezetében aktiválódó sejt együttesen alakítja ki. A dendriteken belépő áram a sejttesten kilép, ezért a piramidális rétegbe helyezett elektróda pozitív irányú kitéréseket regisztrál a szinaptikus ingerületátvitel során. Ha elég erős a szinaptikus áram akciós potenciál is kialakul, ami gyors negatív komponensként rátevéődik az EPSP pozitív

hullámára. Ezt az összetevőt populációs spike-nak (POP-spike) nevezzük, amit a sejttesten belépő áram idéz elő (Johnston és Amaral, 1998).

### **2.6. Az epilepszia szindrómák kialakulásában érintett mikrohálózatok**

Az epilepsziás megbetegedések oka sok esetben valamilyen specifikus kapcsolatrendszer megerősödése. A leggyakrabban megjelenő temporális lebeny epilepsziában (TLE) az entorhinális kéreg – hippocampusz hálózat kóros működése áll, míg a szintén gyakorta kialakuló absence epilepsziában a talamokortikális pályák túlműködése áll. A temporális lebeny epilepsziára jellemző, hogy a limbikus rendszer sérülését követő strukturális és funkcionális változások nyomán spontán szerveződő rohamok alakulnak ki hosszabb-rövidebb lappangási idő után. A rohamok kialakulásában a entorhinális kéreg – hippocampusz triszinaptikus kör módosulása áll (Curia és mtsai., 2008; Mathern és mtsai., 2002). Az absence epilepsziában a serkentő talamokortikális relé sejtek és a retikuláris és perigeniculáris talamikus magvak gátló interneuronjainak kapcsolatrendszere felelős a kéregben megjelenő 3-4 Hz frekvenciájú tüske-hullám aktivitás kialakulásáért (Huguenard és McCormick, 2007).

Az epilepsziás működészavar során jellemzően kétféle kérgi elektromos aktivitás alakulhat ki: a hosszú időtartamú rohamok, amit a szakirodalom gyakran iktusnak, vagy iktális tevékenységnek nevez, illetve a rohamok között megjelenő rövid görcskisülések, az interiktálisok. A kétféle aktivitás mintázat külön-külön és egymást felváltva is megjelenhet, attól függően, hogy mely epilepsziás góc működése kerül előtérbe.

### **2.7. Az epilepszia állati modelljei**

Az epilepszia nem egységes betegség jól definiálható kiváltó okokkal és tünetekkel, hanem változatos patomechanizmust mutató szindrómák összessége. Mivel az embereken végzett kísérletek meglehetősen szigorúan szabályozottak és erkölcsileg is sok kérdést vetnek fel, ami az invazív kísérletek esetében fokozottan érvényes, ezért szükséges állati – elsősorban emlős – modellek kialakítása. Az utóbbi 3-4 évtizedben számos modell került kidolgozásra, melyek egy része csak a rohamokat modellezi, míg mások az epilepsziás betegség modelljeiként kezelhetők. A kettő közötti alapvető különbség, hogy a rohammodellek esetében adott inzultusra valóban kialakul görcsaktivitás, amit viszont



nem követnek újabb, provokáció nélküli görcsjelenségek. Az epilepsziamodellek esetében adott beavatkozás hatására állandósuló epilepsziás állapot jön létre, spontán indukálódó rohamokkal (Fisher, 1989; Engel és Schwartzkroin, 2006). Az ideális modelltől elvárható, hogy nagyfokú hasonlóságot mutasson az elektrofiziológiai, etiológiai, életkori, patológiai, terápiás és viselkedési vonatkozásokban a modellezett szindrómával, bár minden kritérium ritkán teljesül (Sarkisian, 2001)

A modellek teljes körű áttekintése meghaladná ezen dolgozat terjedelmi korlátait, így csak a leggyakrabban használt, és a kísérletes munkámhoz valamilyen módon közel álló modelleket ismertetem. Manapság egyaránt használatosak *in vivo* és *in vitro* modellek. Előbbiek előnye, hogy az emberben lejátszódó folyamatokkal nagyobb hasonlatosságot mutatnak, viszont vizsgálatuk is nehezebb a nagyobb komplexitás miatt. Az *in vitro* modellek előnye, hogy számos, a periférián kialakuló tünet nem érinti, nincsenek viselkedési megnyilvánulások és a vér-agyát sem befolyásolja a vizsgálatokat. Hátrányuk viszont, hogy a nagyfokú egyszerűsítés miatt az eredmények csak korlátozottan alkalmazhatók a humán szindrómákra. Az emberi megbetegedésekkel való korreláltatást tovább nehezíti, hogy az esetek döntő többségében egészséges állatokban idézünk elő epilepsziás aktivitást, ami nem kellőképpen tükrözi a modellezni kívánt szindróma patomechanizmusát.

Az epilepszia kiváltó oka sok esetben valamilyen genetikai defektus következtében kialakuló receptorális- vagy anyagcserezavar. Ezek vizsgálatára számos genetikailag módosított rágcsláló modell létezik. A mutáns egértörzsek közül említésre érdemesek a letargiás egerek, a  $Ca^{2+}$  csatorna alegység deficitet mutató támolygó (totterer) egértörzs, vagy a stargazin gén mutációja miatt létrejövő stargazer fenotípus (Puranam és McNamara, 1999). Patkányok esetében a GAERS (genetic absence epilepsy rats from Strasbourg;) illetve a WAG/Rij törzs ismertebb; ezek mindegyike az absence epilepszia modellje (Marescaux és mtsai., 1992; van Luijtelaar és Coenen, 1986). A GAERS patkányok esetében az alacsony küszöbű  $Ca^{2+}$  csatornák (T-típus) különféle alegységeinek talamikus túlexpresszáldását írták le (Danover és mtsai., 1998; Talley és mtsai., 2000), illetve a serkentő ingerületátvitel relatív túlsúlyát a kéregben, ami feltételezhetően a glutamát visszavétel részleges működészavarára vezethető vissza (Touret és mtsai., 2007). Újabbban leírták a stargazin fehérje túlexpresszáldását is, ami az

AMPA-receptorok fokozott kihelyeződését idézi elő poszt-szinaptikusan (Powell és mtsai., 2008). A WAG/Rij törzs esetében bizonyított a  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák érintettsége, de a pontos mechanizmus nem ismert. Farmakológiai vizsgálatok az L- és T-típusú áramok szerepét mutatták ki, míg immuncitokémiai vizsgálatok a P/Q-típusú kalcium csatornák számának növekedését jelezték a rostrális retikuláris talamikus magban (Coenen és van Luijtelea, 2003). Ezek általában az ún. absence epilepszia genetikai modelljei, melyben elsősorban a talamokortikális rendszer érintett. Az absence szindrómára jellemző tüske-hullám aktivitás kiváltható szisztémásan beadott görcskeltőkkel is. A  $\text{GABA}_A$  receptor antagonistá pentiléntetrazol (PTZ) és a GABA metabolit  $\gamma$ -hidroxi-vajsav egyaránt kialakíthat rohamtevékenységet (Snead, 1988; Wong és mtsai., 2003). Kis dóziszú, szisztémásan alkalmazott PTZ ismételt beadásával is elérhető a szinaptikus ingerületátvitel fokozódása és néhány nap elteltével rohamok alakulnak ki (Sarkisian, 2001).

Gyakran használt kísérleti modellek még a temporális lebeny epilepszia háttérmechanizmusainak vizsgálatára alkalmazott kainsav (KA), illetve pilokarpin (PILO) modellek. A kainsav a nem-NMDA glutamát-receptorok túlaktiválódását eredményezi, míg a PILO kolinerg agonistaként idéz elő túlserkentettséget. Mindkét görcskeltő közös tulajdonsága, hogy mind szisztémásan, mind intracerebrálisan nagy dózisban alkalmazva, akut rohamok indukálódnak, amit egy rövidebb-hosszabb idejű rohammentes időszak után megjelenő status epilepticus követ (Nadler és mtsai., 1978; Turski és mtsai., 1983). Több hétig tartó látens állapot után jelennek meg a spontán rohamok az akut roham által előidézett neurodegeneratív folyamatok miatt (Berg és mtsai., 1993; Cavalheiro, 1995).

Epilepsziás állapot előidézhető ismételt, gyenge inzultusok segítségével is. Ezt a modellt nevezi a szakirodalom kindling-nek. Az amygdala szubkonvulzív ismétlődő elektromos ingerlésével egyre erőteljesebb válaszreakciók, majd parciális illetve generalizált rohamok válthatók ki. Néhány fajban spontán rohamok kialakulása is előidézhető a megfelelő protokoll alkalmazásával (Sarkisian, 2001).

Az epilepszia kialakulásában, fennmaradásában érintett struktúrákat, folyamatokat gyakran vizsgálják akut túlélő agyszeletekben. Ezek előnye, hogy a kísérleti körülmények pontosan ellenőrizhetők, az elvezethető elektrofiziológias jelek nagy hasonlóságot

mutatnak az élő állatban megfigyelttel. Mivel az *in vitro* roham modellek szükségszerűen nélkülözik a viselkedési és motoros komponenseket, túlélő agyszerkezetek esetében rohamszerű eseményekről (SLE; seizure-like event) szoktunk beszélni. Az iktális jelenségek mellett sok esetben interiktális tevékenység is megfigyelhető, akárcsak *in vivo*. Az összes kémiai indukált rohamszerű tevékenység közös jellemzője, hogy a serkentő és gátló ingerületátvitel egyensúlyát valamely ioncsatorna-receptor komplex működésének megváltoztatásával eltolják a túlserkentettség irányába, ami végül epileptikus aktivitás kialakulásához vezet. A gátló ingerületátvitel gyengítése interiktális kislüések megjelenéséhez vezet. Erre a célra szolgál számos GABA receptor antagonistá, úgymint a bikukullin, penicillin, pentiléntetrazol és a pikrotoxin alkalmazása (Gulyás-Kovács és mtsai., 2002; Heinemann és mtsai., 2006; Lindquist és mtsai., 2004; Wong és mtsai., 2003). A kálium ioncsatornák gátlása a serkentő folyamatok felerősödése révén okoz túlaktivációt, ami 4-amino-piridin, cézium és bárium alkalmazásával érhető el (Heinemann és mtsai., 2006; Medina-Ceja és mtsai., 2000; Weiczner és mtsai., 2008).

Az epilepszia kialakulásában szerepet játszhatnak egyéb ioncsatornák is. A  $\text{Na}^+$  csatornák mutációja miatt újszülöttkori vagy gyermekkori epilepszia alakulhat ki, aminek hátterében a lecsökkent  $\text{Na}^+$  áramok és GABAerg interneuronokra irányuló serkentő bemenetek gyengülése miatti túlserkentettség jellemző (Catterall és mtsai., 2008). A  $\text{Na}^+$  csatornák epileptikus folyamatokban betöltött kiemelt szerepét bizonyítja az a tény is, hogy számos klinikai forgalomban lévő antiepileptikum ezen ioncsatornákon hat (Phenytoin, Lamotrigin, Topiramate). Az extracelluláris tér  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjának csökkenése SLE kialakulásához vezet, a kalcium-függő kálium áramok csökkenése miatt (Park és Durand, 2006). A  $\text{Mg}^{2+}$  extracelluláris mennyiségének csökkenése az NMDA-receptorok túlaktiválódását eredményezi a  $\text{Mg}^{2+}$ -blokádjának megszűnésével (Gulyás-Kovács és mtsai., 2002).

### 2.7.1. A 4-amino-piridin modell

Vizsgálataimban 4-amino-piridint (4-AP) használtam eszközként az epileptikus aktivitás kialakítására, így ezen görcskeltő hatásmechanizmusát részleteiben ismertetem. Széles körben alkalmazzák rohamok kiváltására, mivel a beadás módjától és a beadott dózistól függően eltérő görcstevékenységek válhatnak ki vele. Szisztémásan alkalmazva

generalizált tónusos-klónusos rohamok alakíthatók ki (Fragoso-Veloz és mtsai., 1990), agyfelszínre juttatva, vagy agykamrába beadva fokális rohamok idézhetőek elő (Barna és mtsai., 2000; Medina-Ceja és mtsai., 2000). A generalizált rohamok megjelenése előtt prokonvulzív tünetek tapasztalhatók, mint a fej bólogató mozgása, mellső végtag tremor, nyáladás, szaglászás, ágaskodás, rágási és önápolási automatizmusok, illetve mioklónus. A nagyrohamok 2-3 percig tartanak, minden esetben jól elkülöníthető tónusos és klónusos szakaszokkal. A görcskeltő beadását követően 2-3 órával a túlserkentettség tünetei teljesen megszűnnek, az állat folytatja szokásos napi tevékenységét (Fragoso-Veloz és mtsai., 1990). Agyszeletben alkalmazva SLE és interiktális tevékenység figyelhető meg (Gulyás-Kovács és mtsai., 2002). A legalacsonyabb effektív dózissal az  $I_D$ -áramokat gátolja, milimoláris koncentrációban a tranzienst  $I_A$ -áramokat, míg 5mM koncentráció felett a késleltetett egyenirányító áramokat és a lassú kalcium aktiválta kálium csatornákat is blokkolja (Andreasen, 2002). Mindezek eredménye az elhúzódnó akciós potenciál, ami fokozódó neurotranszmitter leadást eredményez (Fragoso-Veloz, és mtsai., 1990; Hoffman és Prince, 1995), amit felerősít a preszinaptikus feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatornán kifejtett aktiváló effektus is (Gu és mtsai. 2004, Jones és Heinemann, 1987). Következésképpen a serkentő folyamatok felerősödnek a fokozott szinaptikus felszabadulás miatt (Morales-Villagran és Tapia, 1996; Pena és mtsai., 2002), ami túlaktivációhoz és spontán görcskisülések megjelenéséhez vezet.

### 3. KÉRDÉSFELTEVÉS, CÉLKITŰZÉSEK

Számos epilepszia szindróma köthető a limbikus kéreg vagy a szomatoszenzoros kéreg kóros működéséhez, ezért ezen kéregterületek görccstevékenységben betöltött szerepének vizsgálata kiemelten fontos. Habár az idegi hálózatok kóros működésével kapcsolatban sok ismeret áll már rendelkezésre, sem a hálózat, sem annak elemei - sejtek, szinapszisok, receptorok - szintjén nem ismerjük az epilepszia kialakulásában, fenntartásában fontos összes tényezőt. Kísérleteinkkel az epilepsziás szinkronizált tevékenység fenntartásában szerepet játszó folyamatok jobb megismerését kívántuk elősegíteni az alábbi, konkrét kérdések megválaszolásával:

- A gyakorta epilepsziás göcként működő entorhinális kéreg irtása milyen hatással van az akut görccstevékenység kialakulására?
- Hogyan befolyásolja az ismétlődő konvulzió a limbikus rendszer, köztük az entorhinális kéreg és más agyi területek, például a szomatoszenzoros kéreg rohamérzékenységét?
- Milyen receptorális szintű és ingerületátviteli változások állnak a vizsgált területek esetleges megváltozott működése mögött?
- A görccstevékenység szempontjából kevésbé feltárt szomatoszenzoros kéregben mely hálózati elemek érintettek az epilepsziás működés kialakulásában és fenntartásában?
- A szomatoszenzoros kéregben kialakuló akut görccsaktivitás milyen farmakológiai befolyásolhatósággal rendelkezik?

A kérdések megválaszolására *in vivo* és *in vitro* elektrofiziológiai módszereket alkalmaztunk képfeldolgozó eljárásokkal, immunhisztoblot és kalcium permeabilitás vizsgálatokkal kiegészítve.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Kísérleti állatok

A kísérletekhez Wistar törzsbe tartozó, felnőtt, hím patkányokat használtunk fel. Az állatok kezelése mindenben az érvényes magyar állatvédelmi törvényekben foglaltaknak megfelelően történt. Minden beavatkozást érzéstelenítés és altatás alatt végeztünk. Az állatokat standard megvilágítási körülmények (12 h nappal/éjszaka) között tartottuk,  $22\pm 2$  °C hőmérsékleten, víz és élelem szükségleteiknek megfelelően rendelkezésre állt.

### 4.2. In vitro elektrofiziológia

#### 4.2.1. Szeletkészítés

A kísérleti állatokat (100-250 g hím Wistar patkányok, Toxicop, Budapest) 350 mg / testsúly kg dózisu klorál-hidráttal altattuk, majd dekapitálás után egy percen belül kiemeltük az agyat és 0-4 °C hőmérsékletű HEPES-puffer (N-2-hidroxi-etilpiperazin-N-2-etánszulfonsav és nátrium sója) tartalmú módosított összetételű mesterséges agyfoladékba (ACSF; artificial cerebrospinal fluid) helyeztük 1-2 percre. Ezt követően kiemeltük az oldatból és kivágtuk a vizsgálni kívánt agyterületet tartalmazó blokkot. Mindezek után 400 µm vastag koronális, vagy horizontális szeleteket vágtunk OTS-4000 (Electronic Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) típusú vibratómmal, majd legalább 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk azokat karbogénnel (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) telített HEPES-puffer tartalmú ACSF-ben (összetétele mM-ban: 120 NaCl, 20 NaHCO<sub>3</sub>, 2 KCl, 1,25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 glükóz, 6,7 HEPES, 2,6 NaHEPES; pH: 7,1-7,2). A szeleteket ezután Haas-féle interface kamrába helyeztük. Életben tartásuk végett Heidolph PD-5101 típusú (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Németország) perisztaltikus pumpa segítségével 1,5-2 ml/perc sebességű folyamatos ACSF perfúziót tartottunk fel, amit a mérés teljes időtartama alatt karbogénnel buborékoltattunk át. (az ACSF összetétele mM-ban: 126 NaCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1,8 KCl, 1,25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 MgSO<sub>4</sub>, 2,4 CaCl<sub>2</sub>, 10 glükóz). A méréseket 32-33 °C-on

végeztük, a szeleteket páras környezetben tartva. A tényleges vizsgálatok elkezdését a kamrában legalább 15 perces inkubáció előzte meg.

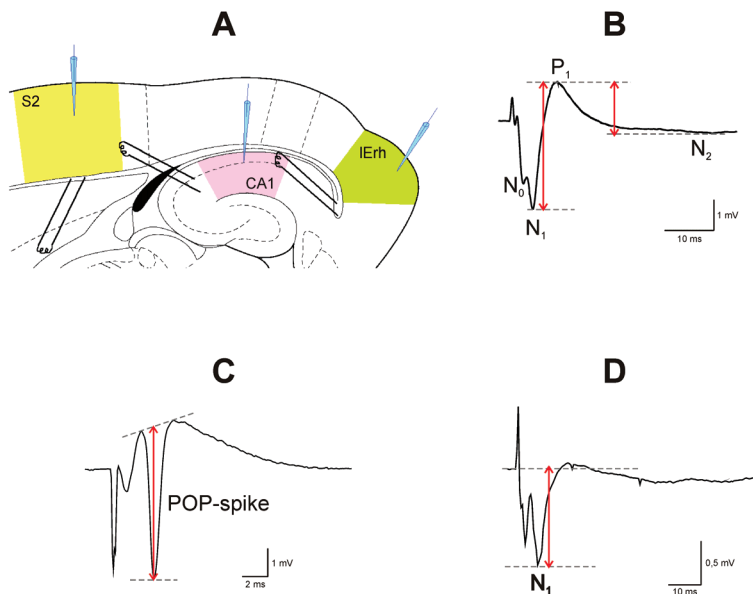
#### 4.2.2. A kiváltott válaszok mérése üvegelektóddal

A kiváltott válasz kialakításához bipoláris wolfram elektródot helyeztünk a vizsgálni kívánt szinaptikus kapcsolat afferens rostjai mellé (4.1A ábra). Az ingerlő elektródot a neokortikális vizsgálatok esetében a szürkeállomány-fehéralállomány határán, a corpus callosumba helyeztük, míg hippocampális mérések esetében a Schaffer kollaterálisok mentén pozicionáltuk. Az ingerlést Supertech BioStim (Supertech Kft., Pécs, Magyarország) ingerlővel végeztük, 100  $\mu$ s szélességű négyszögjellel. A jelek elvezetéséhez Ag/AgCl másodfajú üvegelektódot (3-10 M $\Omega$ ) helyeztünk a rögzítés helyére, amit előzetesen 1M NaCl-oldattal töltöttünk meg. A mezőpotenciál rögzítését a 3. rétegből végeztük a szomatoszenzoros kéreg esetében, a 2. rétegből az entorhinális kéreg esetében és a piramissejtes rétegből a hippocampusz CA1 régió esetében. Az erősítéshez Axoclamp 2B (Axon Instruments Inc., Union City, CA, USA) erősítőt alkalmaztunk, majd Supertech Signal Conditioner (Supertech Kft., Pécs, Magyarország) szűrővel végeztük a további jelkondicionálást (Szűrés: 0,1 Hz-1 kHz, erősítés: 1000x). A jelek digitalizálását NI-6023E típusú A/D kártyával (National Instruments, Austin, Texas) végeztük 200 kHz mintavételezési frekvenciával. Az adatok számítógépes rögzítéséhez és az off-line elemzéshez a SPEL Advanced IntrasyS (Experimetria Kft., Budapest, Magyarország) szoftvert használtuk.

A kísérlet első lépéseként teszteltük a szelet életképességét. Ha a válasz megfelelőnek mutatkozott, meghatároztuk a kiváltott válasz küszöbinger-intenzitását, amit  $T$ -vel ( $T$ ; threshold) jelöltünk. Ezután lemértük egy maximális választ kiváltó ingerre (neokortikális ingerlésnél 4T, hippocampusz esetében 3T) adott válasz amplitúdóját. Ha ennek nagysága nem érte el az alsó korlát értékét (neokortex: 1,5 mV; hippocampusz: 3 mV), a szeletet kizártuk a további vizsgálatokból. Ha a kiváltott válasz minden szempontból megfelelt az elvárásainknak, elkezdtük a méréseket. Legelőször felvettünk egy ingerintenzitás – kiváltott válasz amplitúdó görbét (I-O; Input-output). Neokortikális vizsgálatok esetében 1T és 4T között 0,5T léptékkel növelve 7 ingerintenzitás értéknél mértünk, míg hippocampusz esetében 1T és 3T között 0,25T

léptékekkel haladva rögzítettük a kiváltott válaszokat 9 pontban. Minden intenzitás értéknél 3 párhuzamos ingerlést végeztünk. Ezután 2T intenzitásnál 10 ingerlést (Tesztingerlés) végeztünk, azonos körülmények között.

Egyes anyagok hatáselemzésekor az alapszakasz adatainak rögzítése után az ACSF-ben feloldott és vizsgálni kívánt anyagot tartalmazó oldatot kezdtük perfundálni. Az előre meghatározott kezelési idő letelte után a fent leírt mérési protokollt megismételtük. Bizonyos kísérletsorozatok esetén a kezelés időtartama alatt 0,05 Hz frekvenciával, 2T ingerintenzitás mellett folyamatos ingerlést is végeztünk (Az eredmények ismertetésekor erre külön felhívom a figyelmet).



**4.1 ábra:** Az *in vitro* kiváltott válasz kísérletek során alkalmazott elektródpozicionálás és a különféle területekről elvezett kiváltott válaszok jellegzetes megjelenési formája. **A** panel: horizontális túléző szeletben alkalmazott elektródpozicionálás a három vizsgált agyterület esetében. **B** panel: Jellegzetes szomatoszenzoros kérgi kiváltott válasz. A mért EPSP komponenseket piros nyilak jelzik. **C** panel: Tipikus hippocampális kiváltott válasz. A POP-Spike amplitúdó meghatározási módját jelzi a piros nyíl. **D** panel: Jellegzetes entorhinális kérgi kiváltott válasz. A korai N1 komponenst piros nyíl jelzi. Rövidítések: S2: másodlagos szomatoszenzoros kéreg; IERh: laterális entorhinális kéreg; CA1: hippocampus CA1 area



Az eredmények off-line kiértékelése során a párhuzamos mérések görbéit átlagoltuk és meghatároztuk a kiváltott válasz egyes komponenseinek amplitúdó értékét. A szomatoszenzoros kérgi kiváltott válasz (továbbiakban kérgi EPSP) esetében 3 pontot jelöltünk ki; az átlagosan 6,1 ms késleltetéssel megjelenő első negatív komponens minimumértékét neveztük el N1-nek, az ezt követő pozitív csúcs maximumértéke lett a P1 és a következő késői negatív komponens kapta az N2 jelölést (4.1B ábra). Ezen adatokból számoltunk N1-P1 és P1-N2 csúcstól-csúcsig amplitúdó értékeket a kérgi EPSP korai, illetve késői komponensére. A nem-szinaptikus, 3,7 ms latenciáidejű N0 komponenset a kiértékeléskor figyelmen kívül hagytuk. A hippocampusz esetében az EPSP-re szuperonálódó populáció spike (továbbiakban POP-spike) 3 pontos csúcscsúcspérték amplitúdóját mértük meg (4.1C ábra). Az entorhinális kéregben mért kiváltott válaszok esetében a permanensen jelen lévő első negatív komponens (N1) minimum értékét határoztuk meg (4.1D ábra).

#### 4.2.3. Farmakológiai kezelések

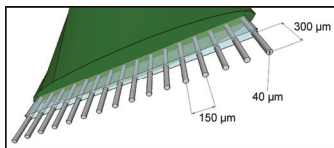
A lamotigin (LTG) és memantin (MEM) epileptikus működésre gyakorolt hatásának vizsgálatokor kontroll és 4-AP kezelt szeletek szomatoszenzoros kérgi területén vizsgáltuk antiepileptikus hatékonyságukat. A mérés kezdetén (0. perc) meghatároztuk az alap aktiválhatóságot az I-O görbe és tesztingerlés rögzítésével, majd 1 órán át kezeltük a szeleteket 20  $\mu\text{M}$  4-AP tartalmú ACSF oldatban. A túlserkentett állapotról újabb mérést végeztünk a kísérlet 60. percében. Ezt követően a 4-AP tartalmú ACSF oldatba beoldottuk a farmakonok egyikét és 30 percen át kezeltük vele a szeletet. A kísérlet 90. percében újabb kiváltott válasz regisztrálást végeztünk az előbbiekkal azonos körülmények között. Az antiepileptikumok alkalmazott koncentrációja 50  $\mu\text{M}$  volt a LTG esetében és 1,5  $\mu\text{M}$  a MEM esetében. Kétféle kontroll csoportot hoztunk létre a hatékonyságvizsgálatok elemzéséhez, minden esetben azonos időtartamú kezeléseket alkalmazva (adatregisztráció a 0., 60. és 90. percben). Az egyik kontrollcsoportnál görcskeltőt nem alkalmazva mértük az antiepileptikumok hatását, míg a másik csoport szeletei a kísérlet teljes időtartama alatt csak a szükséges ACSF-et kapták meg.

A krónikus 4-AP kezelés (A kezelés leírása a 4.6. fejezetben) glutamáterg ingerületátvitelre gyakorolt hatásának elemzésekor a szomatoszenzoros és entorhinális

kéreg, illetve a hippocampusz területén azonos eljárás szerint végeztük a kezelést, mind a kontroll, mind a 4-AP kezelt állatok esetében. Az AMPA-receptorok működésbeli változásának vizsgálata céljából 30 percen át 40  $\mu\text{M}$  GYKI 52466 tartalmú ACSF oldattal perfundáltuk a szeleteket, a kezelés előtt és után a szokásos adatrögzítést (IO-görbe, tesztingerlés) elvégezve. Az NMDA-receptorok vizsgálatára 10 perces 25  $\mu\text{M}$  APV tartalmú ACSF oldattal végzett kezelést alkalmaztunk. A hosszútávú szinaptikus hatékonyságnövekedés (LTP; Long Term Potentiation) vizsgálatok a szeleteket a kísérlet teljes időtartama alatt ACSF oldattal perfundáltuk. A kísérlet kezdetén rögzítettük az alapaktivitást, majd sorozatingerlést alkalmaztunk az LTP kiváltására. Aingersorozat intenzitása minden esetben 2T volt. A szomatoszenzoros és az entorhinális kéregben 2 percen át 10 Hz frekvenciával alkalmaztuk, míg a hippocampusz esetében kétszer 6s időtartamban, 10s ingerlési szünettel (Malenka, 1995), 100 Hz frekvenciával végeztük. 30 perc elteltével a mérési protokollt megismételtük. A kontroll szeletekben a szokásos eljárást folyamatos ACSF perfúzió mellett, a 0. 10. és 30. percben végeztük el.

#### 4.2.4. Extracelluláris mezőpotenciál mérése többcsatornás elektróddal

A vizsgálatok elvégzéséhez 16 csatornás multielektrodot (Neuronelektrod Kft., Budapest, Magyarország) alkalmaztunk. Az elektród elvezetései 10%-os platina-irídium ötvözetből készültek, egymástól 150  $\mu\text{m}$  távolságra pozicionálva. Az egyes elvezetések



4.2 ábra: A 16 csatornás multielektrod. Az elektród legfőbb méretezési paramétereit az ábra szemlélteti.

átmérője 40  $\mu\text{m}$ , aktív vezetőképes szakaszaik 300  $\mu\text{m}$  hosszúságúak (4.2 ábra). Az extracelluláris mezőpotenciál jelek kondicionálását 16 csatornás Supertech BioAmp erősítővel (Supertech Kft., Pécs, Magyarország) végeztük, 0,16 Hz – 100 Hz szűrési tartománnyal 5000x erősítés mellett. A

jelek digitalizálására NI-6023E típusú A/D kártyát (National Instruments, Austin, Texas) alkalmaztunk 512 Hz csatornánkénti mintavételezési frekvencián. Az adatok rögzítésére a SPEL Neurosys.EEG (Experimetria Kft., Budapest, Magyarország) szoftvert használtuk.

A szeletpreparátum elkészítését és életképességének vizsgálatát a 4.2.1. és 4.2.2. fejezetekben leírtakhoz hasonlóan végeztük el minden kísérlet kezdetén. Mivel a spontán

epileptikus aktivitás rögzítéséhez ingerlőelektródra nincs szükség, ezt kiemeltük a szeletből. Az életképesség vizsgálatához használt üvegelektrodát a szomatoszenzoros kéreg 3. rétegében hagytuk, hogy a kísérlet során a görcskeltő adása után kialakuló spontán aktivitást nyomon tudjuk követni. Jelfeldolgozásra a kiváltott válasz kísérleteknél alkalmazott mérőrendszert használtuk, egyetlen különbség csak az adatok szoftveres rögzítésében volt. Ezt követően a perfúziós folyadékot lecseréltük 4-amino-piridin (4-AP; 20  $\mu\text{M}$  koncentráció) tartalmú ACSF-re, a görcsaktivitás kialakítása végett. Miután állandósult az epileptikus aktivitás mintázata (hozzávetőleg 1 órával a kísérlet kezdete után), kiemeltük az üvegelektrodát és behelyeztük a 16 csatornás multielektrodót (4.2 ábra). Az elektrodát a piális felszínre merőlegesen, a szomatoszenzoros kéregben helyeztük el, majd 3-5 perces regisztrátumokat készítettünk több mintavételi területről.

#### 4.2.5. Az áram-forrás sűrűség meghatározás

Az áramforrassűrűség meghatározása (CSD; current source density) során a 16 csatornás multielektróddal mért spontán mezőpotenciál görbék matematikai elemzésével meghatározzuk a szeletpreparátumon belüli áramfolyások irányát és nagyságát. Az elemzés alapjául szolgáló modellt és a kivitilezéshez szükséges makró Az MTA KFKI Rézszecke és Magfizikai Kutatóintézet Biofizikai Osztályának munkatársai Dr. Somogyvári Zoltán és Körössy Csaba dolgozta ki.

A módszer kiindulási alapja a forrásnak egy biológiailag realiztikus modellje, a matematikai számítás során pedig ezen modell szabad paramétereit illesztjük a mérési adatok alapján. A forrásmodell mindig megválasztható úgy, hogy az a mérési szituációnak leginkább megfeleljen. Esetünkben ez azt jelentette, hogy a forrást a kérgi rétegek síkjával párhuzamosan elhelyezkedő, adott oldalhosszúságú téglalapokba sűrítve homogénnek feltételezzük. A téglalapok száma elvileg tetszőleges lehet, de esetünkben két szomszédos elektróda közé 20 forrás-téglalapot (ekvidisztráns módon) felvéve már maximális volt a pontosság, vagyis ez már jól közelítette a forrás térbeli folytonosságát. A téglalap egyik oldalának hosszát a szelet vastagsága adta, a másikat az optikai felvételen látottak alapján állítottuk be. A szabad paraméterek illesztése a forrástéglalapok 'CSD amplitúdójának' meghatározását jelenti, és két kritérium alapján

történik. Egyrészt a forrás által keltett elektromos tér az elektródák helyén egyezzen meg a mért értékekkel,

$$\Phi = FI$$

másrészt a forrás legyen a lehető legsimább, tehát matematikailag a forrás második deriváltjának a normája legyen minimális:

$$\min_I \|DI\|$$

ahol,

$I$ :	CSD vektor (a téglalapok amplitúdói)
$D$ :	második derivált mátrix
$\ \cdot\ $ :	Euklideszi norma
$\Phi$ :	potenciál vektor
$F$ :	transzfer mátrix ( $F_{ij}$ : a $j$ . egységnyi 'amplitúdójú' forrástéglalap tere az $i$ . mérési pontban)

A második kritériumra azért van szükség, mert önmagában a mérési adatok a mérés véges térbeli felbontása miatt nem határozzák meg egyértelműen a forrást. (A simasági feltétel ésszerű feltételezés lokális mezőpotenciál esetében, illetve kellően kis elektródaköz esetén pontos eredményhez vezet.)

A fenti két egyenlet, mint feltételes szélsőértékprobléma megoldása a következő:

$$I = T\Phi$$

Az egyenletben 'T' jelentése:

$$T = W^{-1}F^T[FW^{-1}F^T]^+,$$

illetve

$$W = D^T D + \epsilon$$

ahol,

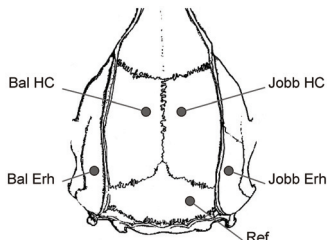
$[\dots]^+$ :	a Moore-Penrose pszeudoinverz
$\epsilon$ :	egy nulla várható értékű, kis szórású, normális eloszlású zaj, ami a numerikus stabilitás miatt szükséges.

A módszer ötletadója az EEG/MEG képpalkotás során használt Loreta módszer (Pascual-Marqui, 1999).

#### **4.3. In vivo elektrofiziológia**

A vizsgálatokat 250-350 g tömegű, hím Wistar patkányokon végeztük el Nembutal® (50 mg / testsúly kg; i.p.) narkózist alkalmazva. Az altatott állatok fejét

sztereotaxikus készülékben rögzítettük, majd rozsdamentes acélból készült csavarelektrodokat ültettünk be a laterális entorhinális kéreg fölé (A: 5,5 mm, L: 6,0 mm) és mélyelektrodokat a hippocampusba (P: 3,3 mm, L: 2,0 mm, V: 3,0 mm), bilaterálisan



**4.3 ábra: A kortikális csavarelektrodok pozícionálása.** Az ábra a kérgi elektrodok beültetési pontjait szemlélteti. A pontos koordináták a metodikai leírásban találhatóak. Rövidítések: HC: hippocampus; Erh: entorhinális kéreg; Ref: referencia elektrod

(4.3 ábra). A kisagy felett beépített csavarelektrod szolgált referenciaként. Az elektrodok elvezetéseit egy kisméretű csatlakozóhoz kötöttük, majd fogászati cementtel rögzítettük az állat fején. 14 napos regenerálódási időt követően az állatokat az adatrögzítés céljára alkalmazott lakóketrecekbe helyeztük és csatlakoztattuk a mérőrendszer érintkezőit. Mivel a lakóketrecek és az EEG rögzítésére szolgáló mérőberendezés külön helységben került elhelyezésre, az állatok

viselkedését videokamerák segítségével követtük nyomon. Egy óra időtartamú kontroll EEG szakasz rögzítése után 5 mg / testsúly kg dózisu 4-AP-vel kezeltük a patkányokat. A görcskeltő beadását követően 8 órán át folyamatosan regisztráltunk. Az EEG jeleket egy 32 csatornás erősítővel (Elsoft Kft, Budapest, Magyarország) 1000x erősítésnek vetettük alá, majd 0,3 - 100 Hz frekvencia tartományban szűrtük. Ezt követően Axon Digidata 1200 B (Axon Instruments Inc., Union City, CA, USA) segítségével digitalizáltuk és számítógépen rögzítettük a jeleket a későbbi off-line elemzés céljából. A generalizált nagyrohamok részletes frekvencia analízisét a Microcal Origin 7.5 (OriginLab, Northampton, MA, USA) szoftverrel végeztük el.

#### **4.4. Kobalt-felvétel vizsgálat**

A vizsgálatot 250  $\mu\text{m}$  vastagságú horizontális szeleteken végeztük el Pruss módszere szerint (Pruss és mtsai., 1991). A szeleteket  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes inkubáló oldatban tartottuk 5 percig, mielőtt a puffer oldatba helyeztük. Ezt követte az 5 mM  $\text{CoCl}_2$  és 100  $\mu\text{M}$  kainát tartalmú puffer oldattal (összetétele mM-ban: 13 szukróz, 57,5 NaCl, 5 KCl, 2  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\text{CaCl}_2$ , 12 glükóz, 10 HEPES) végzett kezelés 20 percen át. A kainátot a 10. percben adtuk az oldathoz a  $\text{Co}^{2+}$  felvétel facilitálása végett. A szövet

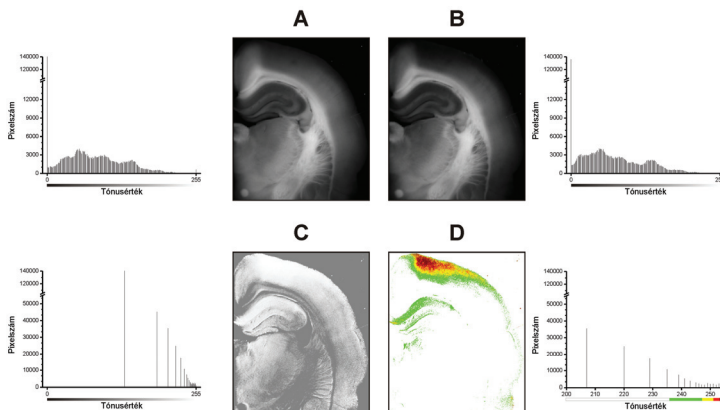
háttérfestődésének megállapításához kainát hozzáadása nélküli metszeteket is készítettünk. Ezután 10 percen át mostuk a szeleteket 2 mM EDTA tartalmú puffer oldatban a nem specifikusan kötött  $\text{Co}^{2+}$ -ok eltávolítása miatt. Kétszer 5 perces puffer oldatban történő mosást követően a szeleteket 5 percre 0,12 V/V%  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  tartalmú oldatba helyeztük. A kezelés hatására sötét színű CoS csapadék válik ki azon sejtekben, melyek felvették a  $\text{Co}^{2+}$ -okat. Háromszor 5 perces mosást követően 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk, mostuk, majd tárgylemezre szárítottuk a metszeteket. A kiértékelésig glicerinnel lefedve, fénytől elzárva tároltuk őket 4 °C-on.

A feldolgozás első lépéseként digitális fényképeket készítettünk a szeletekről egy Olympus Camedia C4040-Zoom típusú fényképezőgép segítségével, amit egy háromutas Olympus CH-2 fénymikroszkóphoz csatlakoztattunk. Az elkészült képek kiértékeléséhez az AnalySIS 3.2 DOCU (Soft Imaging System GmbH, Münster, Németország) szoftvert alkalmaztuk. Ezt követően a képeket 8 bites szűrkeárnyalatos képpé konvertáltuk. A hippokampusz esetében 5000 vagy 10000 pixelt tartalmazó mintavételi téglalapokban határoztuk meg az átlagos denzitás értéket, minden egyes hippokampális rétegben. A neokortikális területek vizsgálatakor 50 pixel szélességű és a szürkeállományt pontosan lefedő hosszúságú (300-600 pixel), a piális felszíntől a corpus callosumig terjedő mintavételi téglalapban vettünk fel átlagolt hisztogramot. A kaináttal kezelt szeletek denzitásértékeit minden esetben korrigáltuk a kaináttal nem kezelt metszetek adataival, hogy relatív változásokat tudjunk kimutatni. A szomatoszenzoros és entorhinális kéreg esetében a 300-600 értéket tartalmazó adatsort 20 egységre bontottuk fel, majd ezeket korreláltattuk a kérgi rétegekkel.

#### **4.5. A belső optikai jelek rögzítése**

Az epileptikus aktivitást kísérő belső optikai jelek (IOS; Intrinsic optical signals) vizsgálatát 400  $\mu\text{m}$  vastagságú szeletpreparátumokon végeztük el. Az interface kamrába helyezett szeletet a 4.2.1. fejezetben leírtak szerint tartottuk életben, és a spontán rohamok indukálása is az ott leírtak szerint történt. A szeletet a vizsgálat teljes időtartama alatt megvilágítottuk egy Dolan-Jenner Fiber-Lite MI-150 típusú száloptikás lámpa (Dolan-Jenner Industries, Boxborough, MA, USA) segítségével, amit stabilizált áramforrásról működtettünk. A visszavert fény detektálására egy Olympus SZX9 típusú

(Olympus Corporation, Japan) háromutas sztereomikroszkóphoz csatlakoztatott, FOculus FO-432B típusú firewire rendszerű CCD kamerát alkalmaztunk. Másodpercenként 1 képkockát rögzítettünk 800x600 pixel felbontásban 8 bites szürkeárnyalatos képként. A képek rögzítését a görcskeltővel való kezelés megkezdése előtt indítottuk el, és 60 percen keresztül folyamatosan rögzítettük azokat.



**4.4 ábra:** A belső optikai jelek kiértékelési módja. **A** panel: a kontroll (Kont) kép és histogramja. **B** panel: az epileptikus görcestevékenység (Epil) közben rögzített felvétel és histogramja. **C** panel: normalizált különbségi felvétel ([Epil-Kont]/Kont) kontraszt kiegyenlítést követően és histogramja. **D** panel: a normalizált képből küszöbölési transzformációval kapott álszínes kép és histogramja. A histogram alatt láthatók a küszöbölési határok.

A feldolgozáshoz az AnalySIS 3.2 DOCU (Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Németország) szoftvert használtuk. A képsorozat első képkockáját kontrollként használva (4.4 ábra) kivontuk a sorozat többi képkockájából, majd a kapott különbséget osztottuk a kontroll kép szürkeség értékeivel. A kontroll képpel való leosztás normalizálásként működve korrigálja a szövet egyes részeinek eltérő átlátszóságából adódó különbségeket. A kapott képet kontrasztosítottuk, majd a histogramját felhasználva a legvilágosabb értékeket szinkódolás segítségével álszínes képpé alakítottuk át (4.4 ábra). Az ilyen módon kinyert aktivitás mintázatot felső réteggént ráhelyeztük az eredeti képre, hogy az aktív terület térbeli lokalizációja behatárolható legyen. A rétegek összefésülésére a Corel Draw X3 (Corel Corporation, Ottawa, Canada) szoftvert alkalmaztuk. Mivel egyetlen

mérésből 3600-4000 fénykép készült, a képek feldolgozását az említett szoftverekben megírt makrók segítségével, automatizálva végeztük el.

#### **4.6. Krónikus 4-amino-piridin kezelés**

Az ismételt 4-amino-piridin indukálta generalizált nagyrohamokat követő (maradandó) idegrendszeri elváltozásokat szeletpreparátumban vizsgáltuk. Az állatok előkezeléséhez prof. Mihály András és munkatársai által kidolgozott módszert használtuk. Hím Wistar patkányokat 12 egymást követő napon át kezeltünk i.p. beadott 4-amino-piridinnel. Az első három napban 4,5 mg / testsúly kg kezdő dózist alkalmaztunk. A negyedik naptól kezdődően, ha egy adott állat nem mutatott Racine skála (Racine, 1972) szerinti ötös szintű rohamot, a következő napon 5%-kal megemelt dózist kapott. Az alkalmazható dózis felső határa 6,65 mg / testsúly kg volt. A kontroll állatok 12 napon át fiziológiás sóoldattal lettek kezelve.

#### **4.7. A laterális entorhinális kéreg roncsolása**

A kísérleti állatokat (150-180 g hím Wistar patkányok) 100 mg / testsúly kg Calypsol<sup>®</sup> és 0,01 mg / testsúly kg dózisú atropin keverékével altattuk. A sebészi narkózis állapotában lévő patkányok fejét sztereotaxikus készülékben rögzítettük, majd vertikális bőrmetszéssel és az izmok tompa bontásával feltártuk a baloldali halántékcsontot. A csontot fogászati fűróval megbontottuk és azonosítottuk a rhinális barázda területét. Ezt követően a laterális entorhinális kérgi területet elektrokoagulációval elroncsoltuk, a szövetmaradványokat eltávolítottuk. Az ablációnál minden kérgi réteget és az alatta fekvő fehérállományt is lézionáltunk. A műtétek befejeztével a sebet lezártuk. A kontrollként szolgáló, álműtött állatokat hasonló kezeléseknak vetettük alá, csak a koagulációt nem végeztük el. A műtétet minden kísérleti állatnál a Dr. Kopniczky Zsolt végezte el.

#### **4.8. Statisztikai elemzés**

A kísérleti eredmények statisztikai értékelése a kezelési csoportok számának és a korrelátások jellegének függvényében vagy Student-féle t-tesztel, vagy egyváltozós varianciaanalízissel történt (ANOVA; Analysis of variance). A statisztikai elemzés előtt minden esetben megvizsgáltuk a csoportok varianciáját, az ANOVA esetében az adatok



normál eloszlását is teszteltük. Ha a statisztikai próbák minden előfeltétele teljesült, elvégeztük a tényleges kiértékelést. A variancianalízis esetében post hoc Newman-Keuls teszt segítségével elemeztük a változásokat. A grafikonokon szignifikáns eltérés esetén jelöltük, hogy milyen szignifikanciaszint mellett teljesül a csoportok különbözősége. A szignifikanciaszintek az ábraalírásokban definiálva vannak. Minden diagramon  $\bar{x} \pm SE$  adatok vannak feltüntetve.

#### **4.9. Alkalmazott vegyületek**

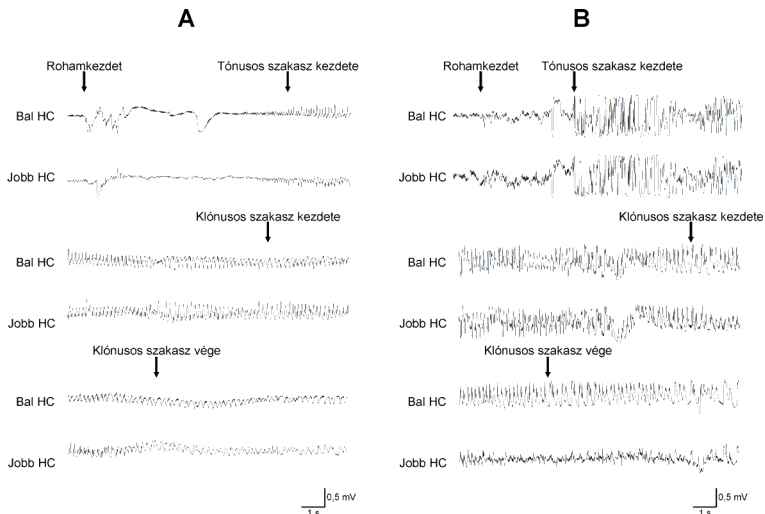
A kísérletek során alkalmazott vegyületek, reagensek – amennyiben külön nem lett megjelölve - Sigma-Aldrich Kft-től kerültek beszerzésre. A kobalt felvétel vizsgálatok során alkalmazott kainátot Dr. Tarnawa István bocsátotta rendelkezésünkre.

## 5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

### 5.1. A görcskészséget befolyásoló krónikus hatások elemzése

#### 5.1.1. Laterális entorhinális kéreg irtás hatása a 4-AP görcsérzékenységre

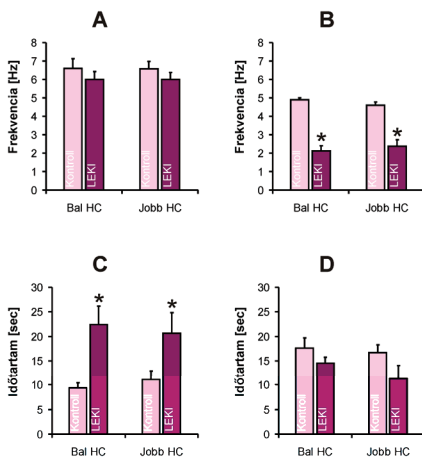
Az intraperitoneálisan beadott 5 mg / testsúly kg dózisu 4-AP hatására tónusos-klónusos nagyrohamok jelentek meg a kísérleti állatok többségénél (5.1 ábra). Az esetleges görcstevékenység a beadást követő 30 percen belül jelent meg, és legfeljebb 2-3 óra időtartamon belül alakult ki újabb roham. Az álműtött állatok (Kontroll; n=6) esetében a kezelést követő 3 órán belül legkevesebb 2 roham alakult ki, míg a bal oldali entorhinális kéreg irtásán átesett patkányoknál (LEKI, laterális entorhinális kéreg irtás; n=7) 4 állat esetében egy nagyroham alakult ki a vizsgált időszakban, 3 állatban egyáltalán nem jelent meg generalizált görcstevékenység.



**5.1 ábra: 4-AP hatására kialakuló hippokampális generalizált rohamok jellegzetes EEG regisztrátumai.** Az A panelen kontroll állatból elvezetett roham látható, míg a B panelen LEKI patkány tipikus rohammintázata figyelhető meg. A roham kezdetét és a tónusos illetve klónusos szakaszok végpontjait nyilak jelzik. A rohammintázatban mindkét kezelési csoportnál féltekei asszimmetria volt megfigyelhető.

A kontroll állatokban átlagosan  $20,8 \pm 6,4$  perc latenciaidővel jelent meg az első roham (5.1A ábra), ami  $55,5 \pm 4,2$  s időtartamú volt. A LEKI csoport esetében az első roham (5.1B ábra) latenciája  $31,8 \pm 4,3$  percre növekedett, míg a rohamok hossza  $100,3 \pm 21,1$  s időtartamra változott.

A kezelési csoportok jelentős különbséget mutattak az indukált görcstevékenység mintázatában. A hippocampális rohamok (5.1 ábra) viselkedési megnyilvánulása szerint elkülönített tónusos és klónusos szakaszainak részletes frekvenciaanalízisét végeztük el



**5.2 ábra: 4-AP indukált generalizált rohamok frekvencia és időtartam változásai a bal és jobb oldali hippocampusban.** A panel: a tónusos szakasz frekvenciája nem változott. B panel: a klónusos szakasz frekvenciája a LEKI patkányokban jelentős csökkenést mutatott a kontrollhoz képest. C panel: a tónusos szakasz időtartama jelentősen megnövekedett. D panel: a klónusos szakasz hossza nem változott. \* szimbólum:  $p < 0,05$  ANOVA Neumann-Keuls post hoc teszt.

emelkedett, míg a kontralaterális oldalon 187%-ra nőtt (Bal-HIP/Kontroll:  $9,3 \pm 2,4$  s; Bal-HIP/LEKI:  $22,4 \pm 7,5$  s; Jobb-HIP/Kontroll:  $11,0 \pm 4,2$  s; Jobb-HIP/LEKI:  $20,6 \pm 8,5$  s;  $n=6$  Kontroll,  $n=7$  LEKI;  $p < 0,05$  ANOVA).

A klónusos szakasz esetében a frekvencia (5.2B ábra) jelentős változást mutatott. Az ipsilaterális hippocampus esetében 57%-os, míg a kontralaterális oldalon 50%-os

gyors Fourier transzformáció segítségével, és elemeztük ezen szakaszok időtartamának megváltozásait is a hippocampusból elvezetett EEG regisztrátumokon (5.2 ábra). A tónusos aktivitás frekvenciája (5.2A ábra) sem a bal, sem a jobb oldali hippocampus esetében nem változott meg (Bal-HIP/Kontroll:  $6,6 \pm 1,2$  Hz; Bal-HIP/LEKI:  $6,0 \pm 0,8$  Hz; Jobb-HIP/Kontroll:  $6,6 \pm 0,9$  Hz; Jobb-HIP/LEKI:  $6,0 \pm 0,8$  Hz;  $n=6$  Kontroll,  $n=7$  LEKI;  $p > 0,05$  ANOVA). A tónusos szakasz hossza (5.2C ábra) viszont számottevően változott a LEKI csoportban. A baloldali hippocampusban hozzávetőleg 240%-ra

csökkenést tapasztaltunk (Bal-HIP/Kontroll:  $4,9 \pm 0,2$  Hz; Bal-HIP/LEKI:  $2,1 \pm 0,6$  Hz; Jobb-HIP/Kontroll:  $4,6 \pm 0,4$  Hz; Jobb-HIP/LEKI:  $2,3 \pm 0,7$  Hz;  $n=6$  Kontroll,  $n=7$  LEKI;  $p < 0,05$  ANOVA). A szakasz hossza (5.2D ábra) viszont nem változott meg szignifikánsan egyik féltekei hippokampuszban sem (Bal-HIP/Kontroll:  $17,7 \pm 4,4$  s; Bal-HIP/LEKI:  $14,5 \pm 2,5$  s; Jobb-HIP/Kontroll:  $16,7 \pm 3,5$  s; Jobb-HIP/LEKI:  $11,2 \pm 5,6$  s;  $n=6$  Kontroll,  $n=7$  LEKI;  $p > 0,05$  ANOVA).

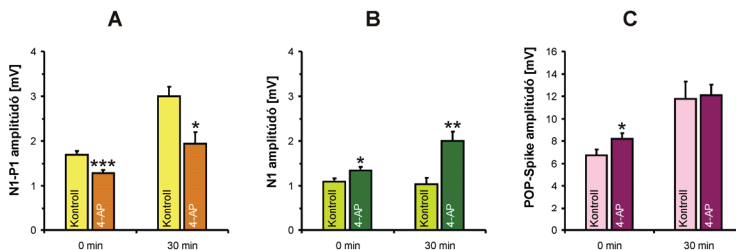
### 5.1.2. Ismételt 4-AP indukálta konvulziók hatása az alap ingerelhetőségre

A 12 napon át tartó ismétlődő generalizált rohamok szinaptikus ingerületátvitelre gyakorolt utóhatását *in vitro* szeletpreparátumokon teszteltük. Az állatokat az utolsó kezelés másnapján áldoztuk fel, majd extracellulárisan elvezetett kiváltott válasz komponenseinek megváltozását elemeztük. Kísérleteinkben három agyterület, a szomatoszenzoros kéreg, entorhinális kéreg és a hippokampusz ingerületi folyamatait vizsgáltuk 2T ingerintenzitásnál, majd 30 perc ACSF-ben történő inkubálást követően azonos körülmények között megismételtük a mérést. A kezelés során a preparátumot 0,05 Hz frekvenciával ingereltük 2T ingerintenzitás mellett. A szomatoszenzoros kéreg esetében mind a kontroll, mind a 4-AP kezelt állatok szeletei érzékenyítődést mutattak 30 perc elteltével a kezdeti értékekhez képest, amit feltételezhetően a 0,05 Hz-es folyamatos ingerlés eredményezett. A kezelési csoportok átlagos kiváltott mezőpotenciál válaszok N1-P1 komponensének amplitúdó értékei jelentős eltéréseket mutattak mindkét időpontban.

A kísérletek kezdetekor meghatároztuk a kiváltott válasz adott komponensének amplitúdóját (5.3A ábra). A 0. percben rögzített mezőpotenciál görbék N1-P1 komponensének átlagos amplitúdója a kontrollhoz képest 24%-kal kisebbnek bizonyult a 4-AP kezelt csoportban (Kontroll/0. perc:  $1,7 \pm 0,1$  mV; 4-AP/0. perc:  $1,3 \pm 0,1$  mV;  $n=32$ ;  $p < 0,001$  Student t-teszt). Ez a különbség a 30. percben végzett mérésig tovább fokozódott, a 4-AP kezelt csoportban 35%-kal volt kisebb az N1-P1 amplitúdó (Kontroll/30. perc:  $3,0 \pm 0,2$  mV; 4-AP/30. perc:  $1,9 \pm 0,3$  mV;  $n=8$ ;  $p < 0,05$  Student t-teszt)

Az entorhinális kéregben (5.3B ábra) megfigyelhető volt szinaptikus hatékonyságnövekedés a 30 perces, folyamatos, alacsony frekvenciás ingerlést követően, de kizárólag a 4-AP kezelt csoportban. A 0. percben mért EPSP N1 komponense 22%-kal

nagyobb volt a 4-AP kezelt állatokban, mint a kontroll csoportban (Kontroll/0. perc:  $1,1 \pm 0,1$  mV; 4-AP/0. perc:  $1,3 \pm 0,1$  mV;  $n=32$ ;  $p < 0,05$  Student t-teszt). A kezelési csoportok közti különbség tovább fokozódott a 30. perc végéig, a 4-AP kezelt csoportban 93%-kal volt nagyobb az N1 amplitúdó (Kontroll/30. perc:  $1,0 \pm 0,1$  mV; 4-AP/30. perc:  $2,0 \pm 0,2$  mV;  $n=8$ ;  $p < 0,01$  Student t-teszt)



**5.3 ábra:** Krónikus 4-AP kezelés hatása a szinaptikus ingerületátvitel hatékonyságára 2T ingerintenzitásnál a vizsgált agyterületeken. A panel: az N1-P1 amplitúdó növekedése a szomatoszenzoros kéregben. A kontroll állapot esetében nagyobb mértékű növekedés figyelhető meg a 30 perces vizsgálat során. B panel: az N1 amplitúdó változása az entorhinális kéregben. A kontroll állapotban nem változott az amplitúdó, a 4-AP kezelésen átesett állatokban jelentősen nőtt. C panel: a POP-Spike amplitúdó növekedése a hippocampális CA1 régióban. Mindkét csoport közel azonos mértékű növekedést mutatott. \* szimbólum:  $p < 0,05$ ; \*\* szimbólum:  $p < 0,01$ ; \*\*\* szimbólum:  $p < 0,001$  Student t-teszt.

A hippocampális kiváltott válasznál is megfigyelhető volt a hatékonyságnövekedés a 30. perc végére, ami ebben az esetben mindkét kezelési csoportban kialakult. A 0. percben mért POP-spike amplitúdó 22%-kal volt magasabb a 4-AP kezelésen átesett állatokban (Kontroll/0. perc:  $6,7 \pm 0,5$  mV; 4-AP/0. perc:  $8,2 \pm 0,5$  mV;  $n=32$ ;  $p < 0,05$  Student t-teszt). A szinaptikus hatékonyságnövekedésben a kezelési csoportok közötti különbség 3%-ra csökkent a 30. perc végére, mivel a kontroll állapotban nagyobb mértékű hatékonyságfokozódás következett be (Kontroll/30. perc:  $11,8 \pm 1,6$  mV; 4-AP/30. perc:  $12,1 \pm 0,9$  mV;  $n=8$ ;  $p > 0,05$  Student t-teszt).

### 5.1.3. Az ismétlődő 4-AP rohamok kobalt felvételre gyakorolt hatása

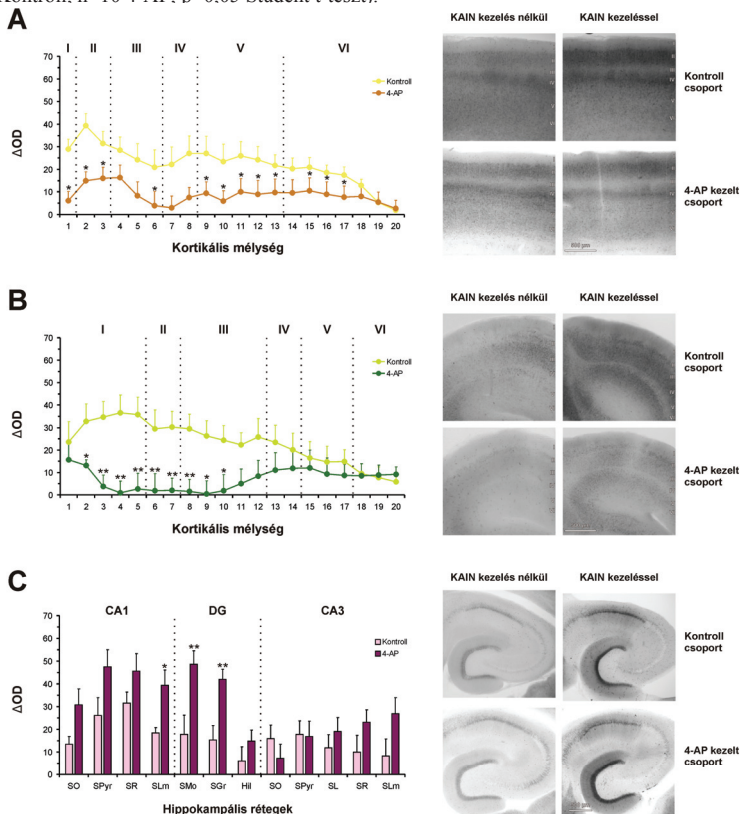
A 12 napos 4-AP kezelésen átesett állatokban kobalt felvétel vizsgálattal detektáltuk a nem-NMDA-receptorok kalcium permeabilitásának megváltozását mindhárom agyterületen a szövettani felvételek denzitometriai elemzésével.

A szomatoszenzoros kéreg esetében a kortikális rétegek markánsan elkülönülő kobalt denzitást mutattak (5.4A ábra). A 2. és 4. réteg erőteljesebb festődést mutat, míg az 3., 5. és 6. rétegekben alacsonyabb fokú a kobalt felvétel. A leggyengébb festődés az 1. rétegben tapasztalható. A 4-AP kezelt állatokban csökkent mértékű kobalt felvétel figyelhető meg, amely szignifikánsnak bizonyult az 1., 2. és 5. rétegek egészében, illetve a 3. réteg alsó és a 6. réteg felső részeiben. A kontroll állatok metszeteiben megfigyelt festődési mintázat a 4-AP kezelt állatokban is fennmaradt, a denzitás értéke minden rétegben közel azonos mértékben csökkent. Ezek a különbségek a reprezentatív szövettani felvételeken is jól megfigyelhetők. Az elektrofiziológiai mérések során a 3. réteg alsó részéből vezettünk el kiváltott válaszokat. Ezen a területen (5.4A ábra, 6. cella) 82%-os denzitás csökkenést tapasztaltunk a 4-AP kezelt állatokban (Kontroll:  $21,0 \pm 7,7$  OD; 4-AP:  $3,9,1 \pm 6,3$  OD;  $n=9$  Kontroll,  $n=10$  4-AP;  $p < 0,05$  Student t-teszt)

Az entorhinális kéreg vizsgálatakor is jellegzetes festődési mintázatot mutattunk ki (5.4B ábra). A kontroll állatokból származó szeletekben a 2., 3. és 6. rétegek mutattak magasabb denzitást, míg a legalacsonyabb mértékű kobalt felvételt a 1., 4. és 6. rétegben tapasztaltunk, ahogy az a szövettani felvételeken is megfigyelhető. A 4-AP kezelés hatására a kobalt felvétel jelentős mértékben csökkent a szupragranuláris rétegekben, míg a granuláris és infragranuláris rétegekben nem mutattak eltérést. Mindezen változások miatt a kontroll állatokban tapasztalt festődési mintázat átalakult, a 4. réteg alacsonyabb denzitása megmaradt, míg a többi réteg között fennálló intenzitás különbség eltűnt. A szinaptikus ingerületátvitel vizsgálatakor a 2. rétegből rögzítettünk kiváltott válaszokat. Ebben a rétegben (5.4B ábra, 7. cella) 93%-os optikai denzitás csökkenést eredményezett a 4-AP kezelés (Kontroll:  $30,2 \pm 7,0$  OD; 4-AP:  $2,0 \pm 5,3$  OD;  $n=9$  Kontroll,  $n=10$  4-AP;  $p < 0,01$  Student t-teszt)

A hippokampusz felvételek denzitometriai elemzése az egyes areák eltérő előjeli megváltozását mutatta ki (5.4C ábra). A CA1 area és a DG minden egyes rétege megemelkedett kobalt felvételt mutatott a 4-AP kezelt állatok esetében a kontroll csoport adataival összevetve. Ezzel szemben a CA3 area vizsgált területei esetében változatlan vagy csökkenő tendenciát mutató denzitást sikerült kimutatni, bár egyik csökkenés sem bizonyult szignifikánsnak. Az elektrofiziológiai mérések során a Schaffer-kollaterális ingerlésével a CA1 piramidális régióból vezettünk el kiváltott válaszokat. Ezen area

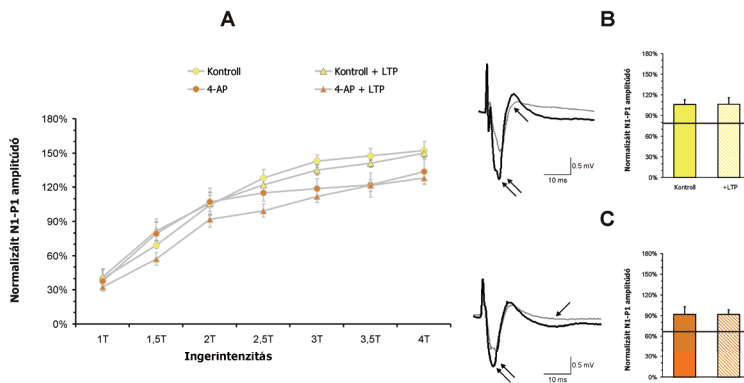
minden rétegében denzitás növekedési tendencia figyelhető meg, de csak a stratum lacunosum-moleculare esetében bizonyult szignifikánsnak az ismétlődő 4-AP kezelés hatására kialakuló 114%-os emelkedés (Kontroll: 18,4±2,4 OD; 4-AP: 39,4±6,6 OD; n=9 Kontroll. n=10 4-AP: p<0.05 Student t-teszt).



**5.4 ábra: Krónikus 4-AP kezelés következtében kialakuló kobalt felvétel változások.** A bal oldalon az optikai denzitás értékek megváltozásai (ΔOD) láthatók, míg a jobb oldalon a vizsgált területek jellegzetes szövettani felvételei. **A panel:** A kobalt felvétel vizsgálatok eredményei a szomatoszenzoros kéregben. Minden rétegben csökkent festődést tapasztaltunk. **B panel:** a szövettani vizsgálatok eredményei az entorhinális kéregben. A 4-AP kezelésen átesett állatok metszeteiben jelentősen lecsökkent festődést figyeltünk meg a szupragranuláris rétegekben. **C panel:** a kobalt felvétel vizsgálatok eredményei a hippokampuszban. Szignifikáns kobalt permeabilitás növekedés mutatható ki a CA1 area stratum lacunosum-moleculare illetve a DG stratum moleculare és stratum granulosum esetében. Rövidítések: SO: str. oriens; SPyr: str. pyramidale; SR: str. radiatum; SLm: str. lacunosum-moleculare; SL: str. lucidum; SMO: str. moleculare; SGR: str. granulosum; Hil: hilum. \* szimbólum: p<0,05; \*\* szimbólum: p<0,01 Student t-teszt.

### 5.1.4. A 4-AP konvulziók hosszútávú szinaptikus hatékonyságnövekedésre gyakorolt hatása

Az ismételt 4-AP kezeléssel átesett állatok szomatoszenzoros kérgi, entorhinális kérgi és hippokampális területein szeletpreparátumban teszteltük a hosszútávú szinaptikus hatékonyságnövekedés (LTP) kiválthatóságát, kiváltott válasz mérésén alapuló kísérletekben. A mérés menete az alapingerlékenység vizsgálatánál alkalmazott protokoll szerint történt, tehát az alapingerelhetőséget meghatároztuk, majd 30 perc elteltével megismételtük az adatrögzítést. Az alapaktivitás lemérése után alkalmaztunk sorozatingerlést az LTP kialakítására. Az alapingerelhetőség meghatározása során a 4T ingererősségre adott válasz amplitúdóját vettük referencia értéknek, és minden, a kísérletsorozat során kapott adatot ezen értékre normáltunk.



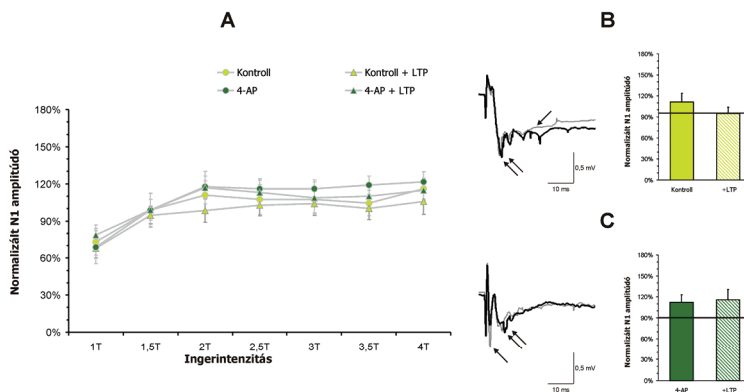
**5.5 ábra: Krónikus 4-AP kezelés hatása az LTP kialakulására a szomatoszenzoros kéregben.** A grafikonok minden esetben az alapingerelhetőség meghatározásakor (0. perc) 4T ingerintenzitásnál kapott, N1-P1 amplitúdóra normált relatív adatokat tartalmaznak. **A** panel: A kontroll és 4-AP kezelt állatok átlagolt I-O görbéi. A kezelési csoportok nem mutattak eltérést az LTP indukálhatóságában. **B** panel: a kontroll állatokban mért relatív N1-P1 amplitúdó változások 2T ingerintenzitásnál és egy jellegzetes kiváltott válasz. A tetanizálás hatására azonos mértékű változás következett be. **C** panel: a 4-AP kezelt állatokban mért relatív N1-P1 amplitúdó változások 2T ingerintenzitásnál és egy jellegzetes kiváltott válasz. Nincs különbség a szinaptikus hatékonyságnövekedés tekintetében az LTP indukáción átesett állatok esetében.

Az oszlopdiagramokon lévő vonalak az alapingerlékenység szintjét jelzik. A regisztrátumon  $\uparrow$  jelzi a 0. percben rögzített kiváltott választ, míg a  $\uparrow\uparrow$  jelzi a 30. percben mért állapotot.

A szomatoszenzoros kéregben mindkét kezelési csoport esetében megfigyelhető kismértékű hatékonyságnövekedés (5.5 ábra), de a kontroll és 4-AP kezelt állatok adatai



között nem találtunk szignifikáns eltérést egyik ingerintenzitás esetén sem (5.5A ábra). A kontroll állatokban tetanizáló ingerlés nélkül 27%-os növekedést tapasztaltunk, míg tetanizáló ingerlés hatására 28%-os amplitúdó fokozódást detektáltunk (5.5B ábra) 2T ingerintenzitásnál (Kontroll-Alap (n=32):  $79\pm 1\%$ ; Kontroll (n=8):  $106\pm 7\%$ ; Kontroll+LTP (n=8):  $107\pm 10\%$ ;  $p>0,05$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). A 4-AP kezelési csoportban (5.5C ábra) 24, illetve 25%-os növekedést tapasztaltunk a sorozatingerlés nélkül, illetve annak hatására (4-AP-Alap (n=32):  $67\pm 2\%$ ; 4-AP (n=8):  $91\pm 11\%$ ; 4-AP+LTP (n=8):  $92\pm 7\%$ ;  $p>0,05$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). Ezen változások között egyetlen korrelációban sem találtunk szignifikáns eltérést.

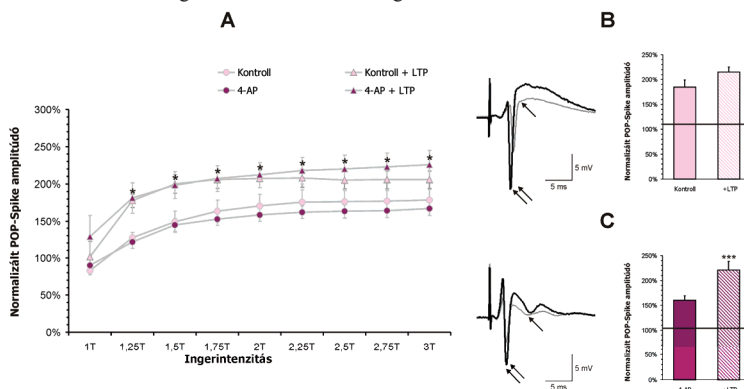


### 5.6 ábra: Krónikus 4-AP kezelés hatása az LTP kialakulására az entorhinális kéregben.

A grafikonok minden esetben az alapingerelhetőség meghatározásakor (0. perc) 4T ingerintenzitásnál kapott, N1 amplitúdóra normált relatív adatokat tartalmazzák. **A** panel: a kontroll és 4-AP kezelt állatok átlagolt I-O görbéi. A kezelési csoportok nem mutattak eltérést az LTP indukálhatóságában. **B** panel: a kontroll állatokban mért relatív N1 amplitúdó változások 2T ingerintenzitásnál és egy jellegzetes kiváltott válasz. Tetanizálás nélkül kisköfű hatékonyságnövekedés következett be, míg az LTP kialakítása sikertelen maradt. **C** panel: a 4-AP kezelt állatokban mért relatív N1 amplitúdó változások 2T ingerintenzitásnál és egy jellegzetes kiváltott válasz. Nincs számottevő különbség a szinaptikus hatékonyságnövekedés tekintetében az LTP indukció átesett állatok esetében. Az oszlopdiagramokon lévő vonalak az alapingerelékenység szintjét jelzik. A regisztrátumon ↑ jelzi a 0. percben rögzített kiváltott választ, míg a ↑↑ jelzi a 30. percben mért tetanizálás utáni állapotot.

Az entorhinális kéreg esetében a kiváltott válasz N1 komponensének megváltozásait elemeztük LTP hatására a két kezelési csoportban (5.6 ábra). Egyik kezelési csoportban sem sikerült jelentős különbséget kimutatni a tetanizálás hatásában (5.6A ábra). A kontroll állatok esetében (5.6B ábra) sorozatingerlés nélkül 16%-os

hatékonyaságnövekedést tapasztaltunk, míg tetanizálás hatására az átlagos N1 amplitúdó 1%-kal csökkent 2T ingerintenzitásnál (Kontroll-Alap (n=32):  $96\pm 3\%$ ; Kontroll (n=8):  $112\pm 12\%$ ; Kontroll+LTP (n=8):  $95\pm 9\%$ ; n=32;  $p>0,05$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). A 4-AP kezelésnek alávetett állatokban (5.6C ábra) 21, illetve 25%-os amplitúdó növekedést mértünk az LTP indukció nélkül, illetve az LTP indukció hatására (4-AP-Alap (n=32):  $91\pm 2\%$ ; 4-AP (n=8):  $112\pm 11\%$ ; 4-AP+LTP (n=8):  $116\pm 15\%$ ;  $p>0,05$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). A kontroll és 4-AP csoport nem mutatott számottevő különbséget az LTP indukálhatóságában.



**5.7 ábra: Krónikus 4-AP kezelés hatása az LTP kialakulására a hippocampusz CA1 régióban.** A grafikonok minden esetben az alapingerelhetőség meghatározásakor (0. perc) 3T ingerintenzitásnál kapott, POP-Spike amplitúdóra normált relatív adatokat tartalmaznak. A panel: A kontroll és 4-AP kezelt állatok átlagolt I-O görbéi. A 4-AP kezelt állatok esetében szignifikáns hatékonyságnövekedés következett be szinte minden ingerintenzitásnál a tetanizálás következtében. **B** panel: a kontroll állatokban mért relatív POP-Spike amplitúdó változások 2T ingerintenzitásnál és egy jellegzetes kiváltott válasz. Nagymértékű hatékonyságnövekedés következett be mind a tetanizáló inger alkalmazása, mind annak hiánya esetén. A mért növekedési arányok nem különböznek szignifikánsan egymástól. **C** panel: a 4-AP kezelt állatokban mért relatív POP-Spike amplitúdó változások 2T ingerintenzitásnál és egy jellegzetes kiváltott válasz. A hatékonyságnövekedés mértéke számottevően magasabb volt a tetanizált állatokban.

Az oszlopdiagramokon lévő vonalak az alapingerelékenység szintjét jelzik. A regisztrátumon ↑ jelzi a 0. percben rögzített kiváltott választ, míg a ↑↑ jelzi a 30. percben mért, tetanizálás utáni állapotot. \* szimbólum:  $p<0,05$ ; \*\*\* szimbólum:  $p<0,001$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt.

A hippocampusz elektrofiziológiai vizsgálatakor a CA1 régióban kiváltott POP-spike sorozatingerlés hatására bekövetkező módosulását elemeztük (5.7 ábra). A tetanizáló ingerlés mindkét állatcsoportban fokozta a szinaptikus ingerületátvitel

hatékonyságát. A 4-AP kezelt állatokban a hatás 1,25T és 3T között minden ingerintenzitásnál szignifikánsnak bizonyult (5.7A ábra). A kontroll állatokban tetanizáló ingerlés nélkül 2T ingerintenzitásnál (5.7B ábra) 75%-kal nőtt a POP-spike amplitúdó, míg a nagyfrekvenciás ingerlés következtében 105%-os fokozódást tapasztaltunk (Kontroll-Alap (n=32): 110±3%; Kontroll (n=8): 185±14%; Kontroll+LTP (n=8): 215±10%; p>0,05 ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). A 4-AP kezelési csoportban (5.7C ábra) a tetanizáló ingerlés nélkül 56%-os átlagos amplitúdó növekedést detektáltunk, míg ingerlés hatására 117%-os hatékonyságfokozódást figyeltünk meg (4-AP-Alap (n=32): 104±2%; 4-AP (n=8): 160±9%; 4-AP+LTP (n=8): 221±17%; p<0,001 ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). Az LTP indukálhatóság tekintetében számottevő különbséget nem tapasztaltunk a kezelési csoportok között.

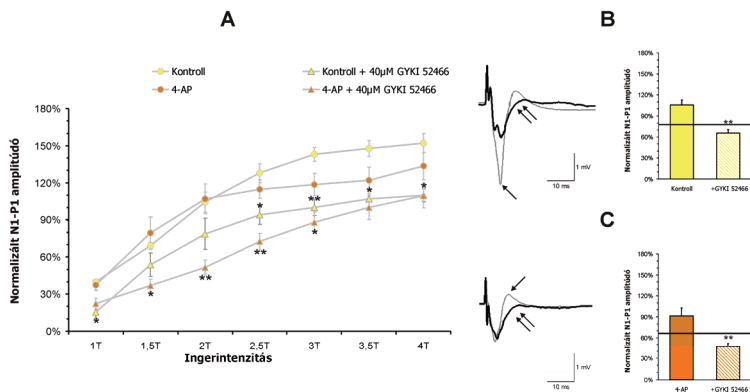
Az LTP kiválthatóság (hosszútávú szinaptikus hatékonyság fokozódás) kezelési csoportok közötti statisztikai összevetése egyik területen sem mutatott szignifikáns különbséget, tehát a krónikus 4-AP kezelés nincs jelentős hatással a hosszútávú szinaptikus hatékonyság változására.

#### 5.1.5. Az ismételt 4-AP indukált rohamok glutamáterg receptorokra gyakorolt hatása

A gyors glutamáterg neurotranszmisszió közvetítésében szerepet játszó AMPA- és NMDA-receptorok ingerületi folyamatokban játszott szerepét, annak módosulását vizsgáltuk szelektív antagonistáik alkalmazásával. Az AMPA-receptorok gátlására GYKI 52466-ot alkalmaztunk 40 µM koncentrációban, míg az NMDA-receptorok gátlását 25 µM APV-vel végeztük. A mérés menete az alapingerlékenység vizsgálatnál alkalmazott protokoll szerint történt, tehát az alapingerelhetőséget meghatároztuk, majd 30 perc elteltével megismételtük az adatrögzítést. Az alapaktivitás lemerése után a perfúziós folyadékot a megfelelő antagonistát is tartalmazó ACSF-re cseréltük le. Az alapingerelhetőség meghatározása során 4T ingererősségre adott válasz amplitúdóját vettük referencia értéknek, és minden, a kísérletsorozat során kapott adatot ezen értékre normáltunk.

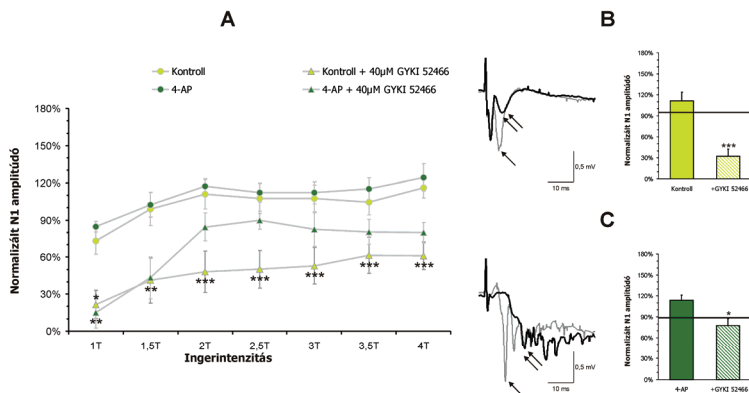
A szomatoszenzoros kéregben az EPSP N1-P1 komponensét hatékonyan gátolta a GYKI 52466 (5.8 ábra). A kontroll csoportban 2,5T ingerintenzitásnál, illetve e fölött mutatott szignifikáns hatást, míg a 4-AP csoportban 1,5T és 3T között csökkent le az

N1-P1 amplitúdó számottevően (5.8A ábra). A kontroll csoportban antagonistá alkalmazása nélkül a kísérlet 30. percére 27%-os facilitáció alakult ki 2T ingerintenzitásnál (5.8B ábra), amit GYKI 52466 alkalmazásával teljesen ki lehetett védeni, sőt 14%-kal a kiindulási érték alá csökkent az N1-P1 amplitúdó (Kontroll-Alap (n=32):  $79 \pm 1\%$ ; Kontroll (n=8):  $106 \pm 7\%$ ; Kontroll+GYKI (n=8):  $65 \pm 5\%$ ;  $p < 0,01$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). A 4-AP csoport esetében 2T ingerintenzitásnál (5.8C ábra) 25%-os amplitúdó növekedést tapasztaltunk 30 perc elteltével, amit a GYKI 52466 hatásosan gátolt, 20%-os csökkenést indukálva (4-AP-Alap (n=32):  $67 \pm 2\%$ ; 4-AP (n=8):  $92 \pm 11\%$ ; 4-AP+GYKI (n=8):  $47 \pm 5\%$ ;  $p < 0,01$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). A 30. percen rögzített adatok statisztikai összehasonlítása szignifikáns hatást mutatott ki mindkét csoporton belül, de a GYKI 52466 hatékonyság (-14% Kontroll, -20% 4-AP) csoportok közötti összevetése már nem mutatott eltérést. Az APV nem volt hatással az N1-P1 komponensre, viszont kis mértékben gátolta a P1-N2 komponens mindkét csoportban. Hatékonyságkülönbséget nem sikerült kimutatni.



**5.8 ábra:** A GYKI 52466 gátló hatékonysága a kontroll és 4-AP csoportban a szomatoszenzoros kéregben. A grafikonok minden esetben az alapingerelhetőség meghatározásakor (0. perc) 4T ingerintenzitásnál kapott, N1-P1 amplitúdóra normált relatív adatokat tartalmaznak. **A** panel: A kontroll és 4-AP kezelt állatok átlagolt I-O görbéi. A kontroll csoport esetében nagyobb ingerintenzitásoknál, a 4-AP csoport esetében kisebb ingerintenzitásoknál tapasztaltunk szignifikáns amplitúdó csökkenést a GYKI 52466 hatására. **B** panel: a kontroll állatokban mért relatív N1-P1 amplitúdó változások 2T ingerintenzitásnál és egy jellegzetes kiváltott válasz. Jelentős gátlás alakult ki az antagonistá hatására. **C** panel: a 4-AP kezelt állatokban mért relatív N1-P1 amplitúdó változások 2T ingerintenzitásnál és egy jellegzetes kiváltott válasz. A kontroll csoportnál megfigyelthez hasonló mértékű amplitúdó csökkenés alakult ki a GYKI 52466 hatására.

Az oszlopdiagramokon lévő vonalak az alapingerelékenység szintjét jelzik. A regisztrátumon  $\uparrow$  jelzi a 0. percen rögzített kiváltott választ, míg a  $\uparrow\uparrow$  jelzi a 30. percen mért, kezelés utáni állapotot. \* szimbólum:  $p < 0,05$ ; \*\* szimbólum:  $p < 0,01$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc

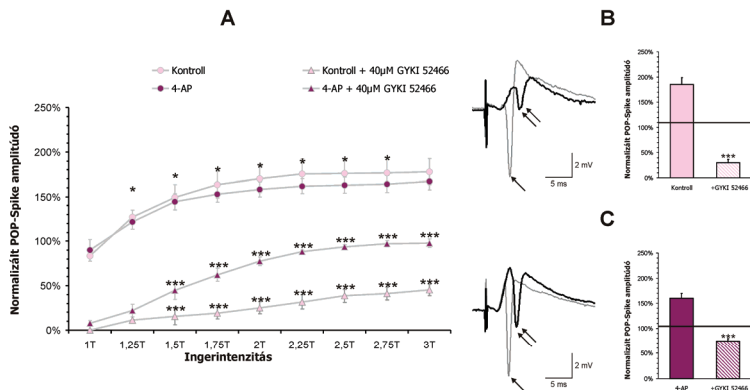


**5.9 ábra: A GYKI 52466 gátló hatékonysága a kontroll és 4-AP csoportban az entorhinális kéregben.** A grafikonok minden esetben az alaperelelhetőség meghatározásakor (0. perc) 4T ingerintenzitásnál kapott, N1 amplitúdóra normált relatív adatokat tartalmaznak. **A panel:** A kontroll és 4-AP kezelt állatok átlagolt I-O görbéi. A kontroll csoport esetében minden ingerintenzitásnál, a 4-AP csoport esetében 1T ingerintenzitásnál tapasztaltunk szignifikáns amplitúdó csökkenést a GYKI 52466 hatására. **B panel:** a kontroll állatokban mért relatív N1 amplitúdó változások 2T ingerintenzitásnál és egy jellegzetes kiváltott válasz. Nagyfokú gátlás alakult ki az antagonistá hatására. **C panel:** a 4-AP kezelt állatokban mért relatív N1 amplitúdó változások 2T ingerintenzitásnál és egy jellegzetes kiváltott válasz. A amplitúdó csökkenése kisebb mértékű volt a GYKI 52466 hatására, mint a kontroll csoportnál.

Az oszlopdiagramokon lévő vonalak az alaperlelékenység szintjét jelzik. A regisztrátumon ↑ jelzi a 0. percben rögzített kiváltott választ, míg a ↑↑ jelzi a 30. percben mért, kezelés utáni állapotot. \* szimbólum:  $p < 0,05$ ; \*\* szimbólum:  $p < 0,01$ ; \*\*\* szimbólum:  $p < 0,001$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt.

Az entorhinális kéreg esetében a GYKI 52466 eltérő hatékonyságot mutatott a kontroll és 4-AP csoportban (5.9 ábra). A kontroll állatokban jelentős gátlás alakult ki, ami minden ingerintenzitásnál erősen szignifikánsnak bizonyult (5.9A ábra), míg a 4-AP csoportnál nem tapasztaltunk jelentős csökkenést. A kontroll állatok szeleiteiben antagonistá hiányában a 30. percre 16%-os facilitáció alakult ki (5.9B ábra), míg GYKI 52466 jelenlétében 64%-os amplitúdó csökkenést tapasztaltunk 2T ingerintenzitásnál (Kontroll-Alap ( $n=32$ ):  $96 \pm 3\%$ ; Kontroll ( $n=8$ ):  $112 \pm 12\%$ ; Kontroll+GYKI ( $n=8$ ):  $32 \pm 10\%$ ;  $p < 0,001$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). A 4-AP csoport esetében 2T ingerintenzitásnál a 30. percig 24%-os serkentődés alakult ki az antagonistá hiányában (5.9C ábra), míg GYKI 52466 hatására 12%-os gátlást mértünk (4-AP-Alap ( $n=32$ ):  $90 \pm 2\%$ ; 4-AP ( $n=8$ ):  $114 \pm 8\%$ ; 4-AP+GYKI ( $n=8$ ):  $78 \pm 10\%$ ;  $p < 0,05$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). A kontroll állatokban megfigyelt 64%-os

gátlás, illetve a 4-AP csoport 12%-os depresszálódása 99%-os szignifikancia szint mellett bizonyult különbözőnek ( $p=0,0041^{**}$ , ANOVA), tehát a 4-AP kezelt állatokban kevésbé volt hatékony a GYKI 52466. Az APV mindkét csoportban kis mértékben gátolta az N1 komponenst, de a hatékonyságban nem mutatkozott különbség az egyes csoportokban.



**5.10 ábra:** A GYKI 52466 gátló hatékonysága a kontroll és 4-AP csoportban a hippokampusz CA1 régióban. A grafikonok minden esetben az alaperelérthetőség meghatározásakor (0. perc) 3T ingerintenzitásnál kapott, N1 amplitúdóra normált relatív adatokat tartalmaznak. A panel: A kontroll és 4-AP kezelt állatok átlagolt I-O görbéi. Mind a kontroll, mind a 4-AP csoport esetében 1,5T ingerintenzitásnál, illetve e fölött tapasztaltunk szignifikáns amplitúdó csökkenést a GYKI 52466 hatására. **B** panel: a kontroll állatokban mért relatív POP-Spike amplitúdó változások 2T ingerintenzitásnál és egy jellegzetes kiváltott válasz. Nagyfokú gátlás alakult ki az antagonist hatására. **C** panel: a 4-AP kezelt állatokban mért relatív POP-Spike amplitúdó változások 2T ingerintenzitásnál és egy jellegzetes kiváltott válasz. A amplitúdó csökkenése kisebb mértékű volt a GYKI 52466 hatására, mint a kontroll csoportnál.

Az oszlopdiagramokon lévő vonalak az alaperelérthetőség szintjét jelzik. A regisztrátumon ↑ jelzi a 0. percben rögzített kiváltott választ, míg a ↑↑ jelzi a 30. percben mért, kezelés utáni állapotot. \*\*\* szimbólum:  $p<0,001$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt.

A hippokampusz farmakológiai érzékenysége az entorhinális kéregnél tapasztaltakhoz hasonlóan változott (5.10 ábra). A GYKI 52466 1,5T ingerintenzitás felett mind a kontroll, mind a 4-AP csoportban szignifikáns gátlást eredményezett, bár a kontroll csoportban az amplitúdó csökkenése nagyobb mértékű volt (5.10A ábra). A kontroll csoport esetében 75%-os serkentődés alakult ki 2T ingerintenzitásnál (5.10B ábra), míg a GYKI 52466 hatására 80%-os POP-spike amplitúdó csökkenés volt megfigyelhető (Kontroll-Alap ( $n=32$ ):  $110\pm 3\%$ ; Kontroll ( $n=8$ ):  $185\pm 14\%$ ; Kontroll+GYKI ( $n=8$ ):  $30\pm 7\%$ ;  $p<0,001$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). A

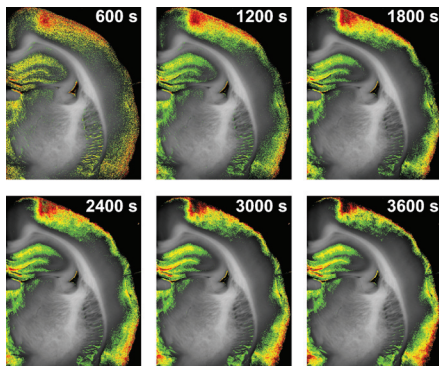
4-AP csoportban 56%-os facilitáció alakult ki, ami az antagonist hatásra 30%-os gátlódást mutatott a kiindulási értékhez képest (4-AP-Alap (n=32):  $104 \pm 2\%$ ; 4-AP (n=8):  $160 \pm 9\%$ ; 4-AP+GYKI (n=8):  $74 \pm 5\%$ ;  $p < 0,001$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). A POP-spike amplitúdó kontroll csoportbeli 80%-os és a 4-AP csoportbeli 30%-os csökkenése 95%-os szignifikancia szint mellett bizonyult különbözőnek ( $p = 0,021^*$ , ANOVA). Az APV semmilyen hatással nem volt a POP-Spike amplitúdójára sem a kontroll, sem a 4-AP csoportban.

A szomatoszenzoros kéregben nem tapasztaltunk különbséget a GYKI hatékonyságát illetően a kontroll csoport, illetve a 4-AP csoport összehasonlításában, viszont az entorhinális kéreg és a hippokampusz esetében a 4-AP csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt az antagonist gátló hatása.

## 5.2. A 4-AP akut hatásai a szomatoszenzoros kéregben

### 5.2.1. A 4-AP indukált spontán göreskislülések elemzése optikai analízissel

A 4-AP agyszelet preparátumban alkalmazva is képes epileptikus aktivitás kialakítására. A túlserkentettség a szinaptikus ingerületátvitel általános fokozódása miatt



**5.11 ábra:** 4-AP indukálta epileptikus göres-tevékenység hatására kialakuló optikai aktivitás mintázat. A göresindukció kezdetétől mért idő függvényében (jobb felső sarok) egyre nagyobb intenzitású optikai jelek alakultak ki az elsődleges és a másodlagos szomatoszenzoros kéregben, illetve a hippokampuszban.

jelentős transzmembrán ionáramlásokat hoz létre, ami passzív vízmozgást eredményez. Mindezek miatt a sejtek jelentős alakváltozáson mennek keresztül, amit a belső optikai jelek rögzítésével vizsgálni lehet.

Vizsgálatainkat 8 agyszeleten végeztük el, 6 esetben hasonló aktivitás mintázatot tapasztaltunk a neokortikális területeken. A 4-AP kezelés első 60 percében folyamatosan rögzített képkockák elemzése kimutatta, hogy

mely területek aktiválódnak erőteljesebben az izolált koronális túlélő agyszeletben (5.11 ábra). Az adatrögzítés elején készült képkockákon még diffúz zaj jelenléte volt megfigyelhető a teljes területen, majd a 4-AP görcskeltő hatásának egyre erőteljesebb érvényesülésével ez a zaj eltűnik, és nagyobb mértékű aktiválódás alakult ki a motoros kéregben, az elsődleges szomatoszenzoros kéreg motoros kéreggel határos részén, a másodlagos szomatoszenzoros kéregben és a perirhinális kérgi területen (5.11 ábra). A szomatoszenzoros kéreg egyéb, inaktívnak tűnő területei is megnövekedett optikai jel intenzitást mutattak, de a változás mértéke jóval kisebb volt, mint a fent említett területeken, ezért a küszöbölési eljárás miatt eltűnt ez az aktiváció. A legnagyobb változás minden kérgi areában a szupragranuláris rétegekben történt, míg a 6. réteg az esetek döntő részében inaktívnak mutatkozott. A legerősebb aktiváció a másodlagos szomatoszenzoros kéregben figyelhető meg. Az optikai eljárás során terjedő epileptikus aktivitást nem tapasztaltunk, minden esetben az aktív területekről érkező jelek erősödését, majd állandósulását mértük. Ez a folyamat jól nyomon követhető az 5.11 ábra különböző időpontokban rögzített felvételein. A két eltérő mintázatot mutató szeletpreparátum kizárólag a másodlagos szomatoszenzoros kéreg és perirhinális kéreg területén mutatott különbözőséget, ezen területek inaktívak voltak. A kísérletek jelentős hányadában a hippokampusz CA1 régiója és a DG is aktiválódott, illetve a talamikus magvak is sok esetben megnövekedett jelintenzitást mutattak.

Az optikai jelek rögzítésével párhuzamosan a szomatoszenzoros kéregbe helyezett üvegelektroddal is nyomon követtük a spontán aktivitás kialakulását. Az esetek döntő többségében interiktális aktivitás alakult ki, aminek látható jele nem volt a képeken.

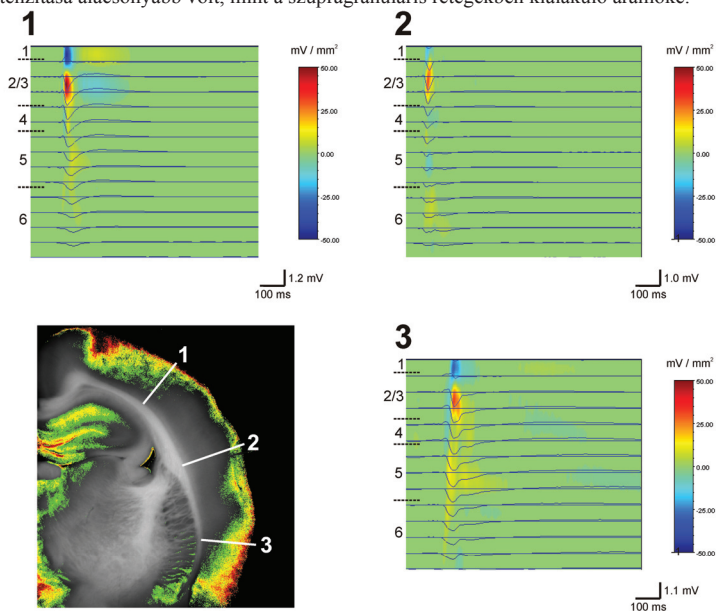
#### 5.2.2. A 4-AP indukált spontán görcskisülések áram-forrás sűrűség elemzése

A 4-AP indukálta spontán rohamszerű eseményeket rögzítettük 16 csatornás multielektroddal, majd a mezőpotenciál regisztrátumokat CSD módszerrel elemeztük. A mezőpotenciál görbéket a szeletpreparátum azon pontjaiból rögzítettük, ahol az optikai mérések során eltérő aktivitási mintázatot tapasztaltunk.

A CSD meghatározás során - összhangban az optikai regisztrálás eredményeivel - a szupragranuláris rétegek erősebb aktivációját sikerült kimutatni (5.12 ábra). A mezőpotenciál görbéken megfigyelhető, hogy a 4-AP hatására kétkomponensű spontán



interiktális aktivitás jelent meg, ami egy kis amplitúdójú pozitív hullámból és az utána következő nagy negatív komponensből állt. Ez utóbbi a maximális amplitúdót a 2/3. rétegben érte el. A spontán aktivitás minden kérgi rétegben detektálható volt, bár a hullám alakja jelentős tendenciózus változást mutatott. A CSD mintázat két jelentősebb áramelnyelődést mutatott ki a szomatoszenzoros kérgi területeken, a 2/3. rétegben egy nagyobb, az 5. rétegben egy kisebb volt lokalizálható, ez utóbbi nem jelent meg minden területen. Az 5. rétegben megjelenő áramelnyelés latenciája alacsonyabb volt, mint a 2/3. rétegben megjelenő eseményé és részlegesen megjelent a 4. rétegben is. A 2/3. rétegben kialakuló áramelnyeléssel egy időben megjelent egy áramforrás is az 1. rétegben, közel azonos mértékű amplitúdóval. A CSD profil alapján az infragranuláris rétegek nem aktiválódtak számottevően, az 5. és 6. rétegekben kialakuló áramok intenzitása alacsonyabb volt, mint a szupragranuláris rétegekben kialakuló áramoké.



**5.12 ábra:** 4-AP indukált spontán epileptikus aktivitás optikai aktivitás mintázata és a jellegzetes CSD regisztrátumai. A bal alsó sarokban lévő felvétellel az állandósult optikai mintázatot és a mezőpotenciál regisztrátumok rögzítési helyeit szemlélteti. A három regisztrálási pontból felvett eredeti mezőpotenciál görbéket és áramforrassűrűség eloszlásukat mutatják be a számozott panelek. **Panel 1:** elsődleges szomatoszenzoros kéreg motoros kéreggel határos része. **Panel 2:** elsődleges szomatoszenzoros kéreg. **Panel 3:** másodlagos szomatoszenzoros kéreg. A színskódos paneleken piros szín jelzi az áramelnyelési és kék szín jelzi az áramforrás helyeket.

A belső optikai jelek és az áramsűrűség meghatározás módszerek egybehangzóan a szupragranuláris rétegek erőteljesebb aktivációját mutatták ki.

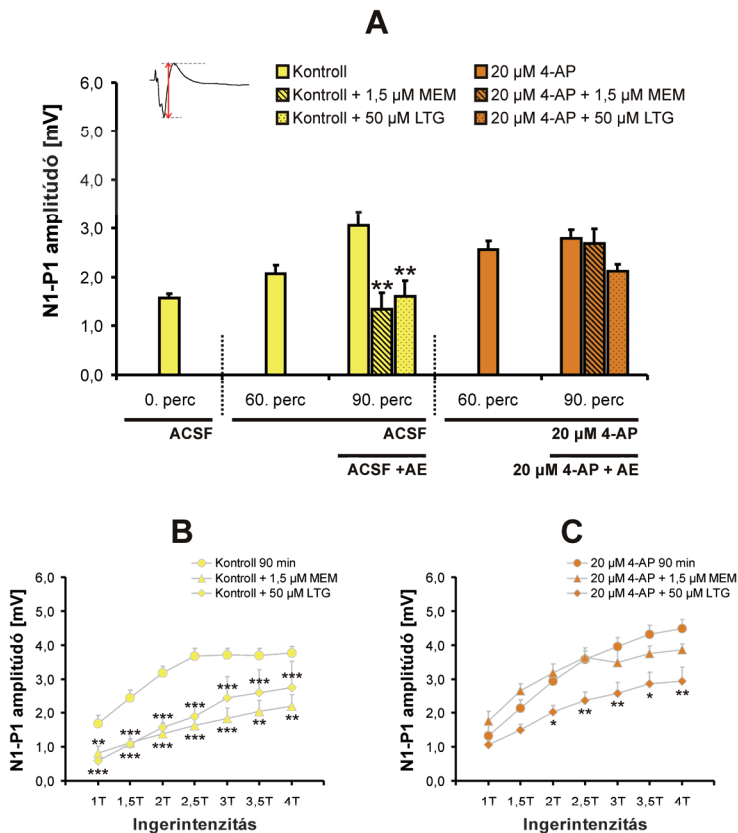
### 5.2.3. A 4-AP facilitált szinaptikus ingerületátvitel farmakológiai befolyásolhatósága

A kísérletek kezdetén meghatároztuk az alapingerelhetőséget, majd a görcskeltő hatására bekövetkező megnövekedett szinaptikus ingerületátvitel vizsgálata céljából az 1 órás 4-AP perfúzióval érzékenyített szeleteket 30 percen át kezeltük memantin (MEM) vagy lamotrigin (LTG) hozzáadásával. Kontrollként ACSF-ben inkubált szeleteket használtunk, melyekben azonos protokoll alkalmazásával mértük az EPSP mindkét komponensének megváltozásait.

A kiváltott mezőpotenciál N1-P1 komponense a kísérletek időtartama alatt jelentősen növekedett a kontroll állapotokban (5.13A ábra), a 60. percig 30%-os facilitációt mutatott, ami a 90. percre 93%-os serkentődésre fokozódott 2T ingerintenzitásnál (Kontroll-Alap (n=24):  $1,6 \pm 0,1$  mV; Kontroll-60perc (n=8):  $2,1 \pm 0,2$  mV; Kontroll-90perc (n=8):  $3,0 \pm 0,3$  mV;  $p > 0,05$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). A kontroll szeletek esetében  $1,5 \mu\text{M}$  memantin hatására az alapaktiváshoz képest 15%-os csökkenést tapasztaltunk, ami a 90. percben mért 93%-os facilitációhoz mérten erőteljes gátlásnak bizonyult. Az  $50 \mu\text{M}$  LTG hatására az alapaktiváshoz képest 1%-os növekedést tapasztaltunk, ami az antiepileptikum nélküli 93%-os serkentődéshez képest nagyfokú gátlást jelent ebben az esetben is (MEM (n=8):  $1,3 \pm 0,3$  mV; LTG (n=8):  $1,6 \pm 0,3$  mV;  $p < 0,01$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). Az antagonisták minden vizsgált ingerintenzitás esetén szignifikáns szuppresszió kiváltására voltak képesek (5.13B ábra).

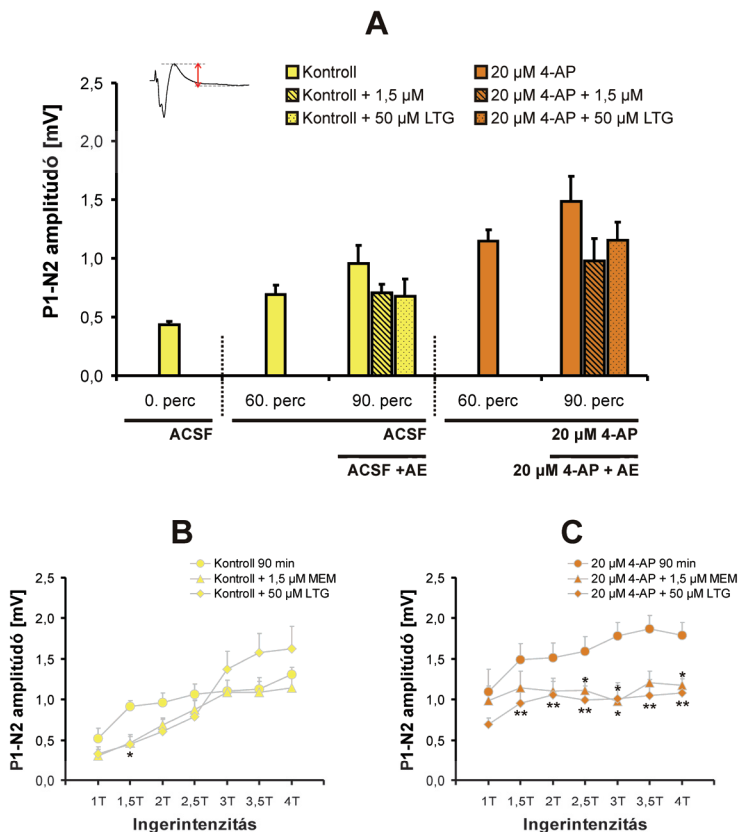
A 60 perces  $20 \mu\text{M}$  4-AP perfúzió hatására 62%-os amplitúdó fokozódás alakult ki (5.13A ábra), míg a 90. percre 76%-os facilitációt tapasztaltunk 2T ingerintenzitásnál (Kontroll-Alap (n=24):  $1,6 \pm 0,1$  mV; 4-AP-60perc (n=8):  $2,6 \pm 0,2$  mV; 4-AP-90perc (n=8):  $2,8 \pm 0,2$  mV;  $p > 0,05$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). A  $1,5 \mu\text{M}$  MEM 6%-os csökkenést váltott ki a 4-AP kezelt szeletekben, míg az  $50 \mu\text{M}$  LTG 41%-os csökkenést idézett elő, de egyik változás sem bizonyult szignifikánsnak a tesztíngelés adatok alapján (MEM (n=8):  $2,7 \pm 0,3$  mV; LTG (n=8):  $2,1 \pm 0,1$  mV;  $p > 0,05$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). A MEM az I-O görbe egyik ingerintenzitásánál sem

mutatott számottevő gátlást, míg a LTG hatására 2T és 4T intenzitás között szignifikáns gátlás alakult ki (5.13C ábra).



5.13 ábra: A lamotrigin és a memantin gátló hatékonyságának vizsgálata az EPSP N1-P1 komponensének esetében. A panel: A kontroll és 4-AP kezelt állatok 2T ingerintenzitásánál mért N1-P1 amplitúdó megváltozásai lamotrigin és memantin hatására. Mindkét antagonistát hatékonyan csökkentette az N1-P1 amplitúdót a kontroll szövetekben, míg a 4-AP kezelt szövetekben hatástalannak bizonyultak. B panel: Az I-O görbe az antagonisták hatását mutatja a kontroll szövetekben. Mindkét antagonistát minden ingerintenzitásnál erőteljesen csökkentette az N1-P1 amplitúdót. C panel: Az I-O görbe az antagonisták hatását mutatja a 4-AP kezelt szövetekben. Csak a lamotrigin mutatótt gátló hatást, 2T és 4T ingerintenzitás között. \* szimbólum:  $p < 0,05$ ; \*\* szimbólum:  $p < 0,01$ \*\*\* szimbólum:  $p < 0,001$ \*\*\* ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt.

Az EPSP P1-N2 amplitúdó megváltozásait is vizsgáltuk kísérleteink során (5.14 ábra), mivel a 4-AP kezelés hatására erőteljes növekedést produkál ez a komponens. A kontroll szeletekben 60 perc elteltével 60%-os serkentődést figyeltünk meg 2T ingerintenzitásnál (5.14A ábra), ami a 90. percig 96%-os facilitációvá fokozódott (Kontroll-Alap (n=24):  $0,43 \pm 0,03$  mV; Kontroll-60perc (n=8):  $0,69 \pm 0,08$  mV; Kontroll-90perc (n=8):  $0,96 \pm 0,15$  mV;  $p > 0,05$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). Sem  $1,5 \mu\text{M}$  MEM, sem  $50 \mu\text{M}$  LTG nem volt képes szignifikáns mértékű gátlást kialakítani (MEM (n=8):  $0,71 \pm 0,08$  mV; LTG (n=8):  $0,67 \pm 0,15$  mV;  $p > 0,05$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). A perfúzióban alkalmazott  $20 \mu\text{M}$  4-AP hatására erőteljes facilitáció alakult ki 2T ingerintenzitásnál, 60 perc elteltével 114%-os, 90 perc elteltével 149%-os növekedést figyeltünk meg (Kontroll-Alap (n=24):  $0,43 \pm 0,03$  mV; 4-AP-60perc (n=8):  $1,14 \pm 0,10$  mV; 4-AP-90perc (n=8):  $1,49 \pm 0,21$  mV;  $p > 0,05$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt). Mindkét antagonista hatástalannak bizonyult a P1-N2 gátlásában (MEM (n=8):  $0,98 \pm 0,19$  mV; LTG (n=8):  $1,15 \pm 0,15$  mV;  $p > 0,05$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt) 2T ingerintenzitásnál (5.14B ábra). A LTG  $1,5\text{T}$  ingerintenzitás felett minden esetben hatásosnak bizonyult, míg a MEM  $2,5\text{T}$  felett mutatott gátló hatást (5.14C ábra) az I-O-görbe adatok alapján.



**5.14 ábra: A lamotrigin és a memantin gátló hatékonyságának vizsgálata az EPSP P1-N2 komponensének esetében.** **A** panel: A kontroll és 4-AP kezelt állapotok 2T ingerintenzitásánál mért P1-N2 amplitúdó megváltozásai lamotrigin és memantin hatására. Egyik antagonistát sem volt szignifikáns hatással P1-N2 amplitúdóra. **B** panel: Az I-O görbe az antagonisták hatását mutatja a kontroll szeletekben. Nincs jelentős változás egyik antagonistát hatására. **C** panel: Az I-O görbe az antagonisták hatását mutatja a 4-AP kezelt szeletekben. A lamotrigin 1,5T ingerintenzitás felett, a memantin 2,5T felett mutatott gátló hatást. \* szimbólum:  $p < 0,05$ ; \*\* szimbólum:  $p < 0,01$ ; \*\*\* szimbólum:  $p < 0,001$ ; ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt.

## 6. MEGVITATÁS

### 6.1. A 4-AP kísérleti modell

Krónikus epilepsziás állapot kialakítására gyakran használják a kolinerg agonista pilokarpint (Cavalheiro, 1995; Nadler és mtsai., 1978), vagy a glutamát agonista kaininsavat (Turski és mtsai., 1983). Ezen görcskeltők közös jellemzője, hogy hatásukra fokozódik glutamáterg ingerületátvitel, megemelkedik az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció, ami a beadást követő 2 órán belül status epilepticus kialakulásához vezet. Az erőteljes túlaktiváció következtében neurodegeneratív folyamatok indulnak be, amik egyéb hatások mellett jelentős moharost-burjánzást eredményeznek a hippocampusban, és egy több hétig tartó látens időszak múltán spontán, másodlagosan generalizált rohamok kialakulásához vezetnek (Mello és mtsai., 1993). A 4-AP közvetlenül, nagy koncentrációban, agykamrába beadva kialakíthat szövetkárosodást (Ayala és Tapia, 2005), de az általunk alkalmazott kezelési módok esetén, bár kialakult túlaktiváció, nem tapasztaltunk sejtpusztulást, amit nem publikált, galloicianidos festéssel végzett vizsgálataink igazolnak.

A feszültségfüggő  $\text{K}^{+}$  csatorna blokkoló 4-AP, amit széles körben alkalmaznak akut görcstevékenység kialakítására mind *in vivo*, mind *in vitro* modellekben (Barna és mtsai., 2000; Fragoso-Veloz és mtsai., 1990; Gu és mtsai., 2004; Gulyás-Kovács és mtsai., 2002;), a serkentő és gátló szinaptikus folyamatokra rövid távon egyaránt hatással van; jelentősen fokozza a szinaptikus transzmitterek felszabadulását (Fragoso-Veloz és mtsai., 1990; Versteeg és mtsai., 1995; Medina-Ceja és mtsai., 2000; Morales-Villagran és Tapia, 1996; Pena és mtsai., 2002). Azonban, amint a 4-AP kiürül a szervezetből – vagy *in vitro* kísérletek esetén kimosódik a preparátumból – a túlserkentettségi állapot megszűnik.

Ennek alapján, mivel a 4-AP által indukált, mérsékelt görcstevékenység hosszútávon nem vált ki epileptikus állapotot, kiválóan alkalmas a rohamtevékenység közvetlen idegsejthálózatokra gyakorolt hatásának vizsgálatára anélkül, hogy neurodegeneratív folyamatokkal kellene számolnunk. Kísérleteinkben emiatt esett a választás ezen görcskeltőre az aktivációs vizsgálatokban.

## 6.2. A krónikus kérgi működésváltozások elemzése

### 6.2.1. A fontosabb eredmények összefoglalása

Krónikus kísérletsorozataim legfőbb eredményei: 1) A laterális entorhinális kéreg irtásával jelentős mértékben csökkent a 4-AP kezelt állatok görcsérzékenysége. Maga a megjelenő roham EEG-s mintázata is jelentős változásokat mutatott. 2) Az ismételt 4-AP kezelés által kiváltott konvulziók számos változást eredményeztek a kérgi hálózatok görcsérzékenységében. Ezen változások leginkább az AMPA-receptorok által közvetített gyors szinaptikus átvétődést érintették. A túlélő agyszeletekben mért kiváltott válaszok korai komponensének vizsgálatai szerint a szomatoszenzoros kéregben, az alapingerlékenységet illetően kisfokú csökkenés állt be, míg ezzel ellentétes irányú változás zajlott le a két vizsgált limbikus területen, az entorhinális kéregben és a hippokampuszban. 3) Receptor-farmakológiai érzékenységekben is jelentős csökkenést tapasztaltunk. Az AMPA-receptor antagonistá GYKI 52466 hatékonysága lecsökkent a 4-AP előkezelésen átesett állatok esetében a limbikus rendszerben, míg a szomatoszenzoros kéregben nem történt relatív érzékenységbeli változás. Az NMDA-receptoron ható APV gátlás és az LTP kiválthatósága esetében az előkezelésnek nem volt kimutatható hatása egyik vizsgált területen sem. 4) Az idegsejtmembrán kalcium-permeabilitására utaló kobaltfelvételi vizsgálatok alapján a szomatoszenzoros kéreg esetében a 2/3. és 5. rétegekben, míg az entorhinális kéregben az 1-3. rétegek esetében kimutatható kalcium-áteresztőképesség csökkenést tapasztaltunk. A hippokampusz esetében a CA1 és DG régiók fokozott kalcium áteresztőképességet mutattak.

### 6.2.2. Az unilaterális entorhinális kéregirtás hatása

Az entorhinális kéreg és a hippokampusz kölcsönös és szoros kapcsolatban áll egymással a triszinaptikus hurok és a temporo-ammonikus pálya révén (Brun és mtsai., 2008; Johnston és Amaral, 1998; Villers-Sidani és mtsai., 2004), ezért bármelyik régiót is éri károsodás, az hatással lesz a teljes hippokampális formáció működésére. Az agykéreg egyéb területeinek direkt kísérletes léziója, vagy patológiás folyamatok következtében kialakuló sérülésének általában túlaktiváció, vagy fokozott érzékenység a

következménye. Az inzulturn által érintett agyterületeken a sejtek sérült anyagcseréje miatt nem képződik elegendő ATP, ami a transzmembrán iongradiensek csökkenéséhez, majd a sejt tartós depolarizációjához vezet. Ennek hatására emelkedik az extracelluláris glutaminsav szint, ami elsősorban az NMDA-receptorok patológiás mértékű aktiválódása miatt az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció tartós megemelkedéséhez, majd sejtpusztuláshoz vezet (Di Filippo és mtsai., 2008; Doyle és mtsai., 2008). Az elpusztult sejtek posztszinaptikus célpontjain megszűnő kapcsolatok helyén újabb szinapszisek alakíthatnak ki a túlélő neuronok. Azon sejtek, melyeknek az elpusztult sejtek célpontjai voltak, újabb szinaptikus partnert keresnek. Ezen folyamatok közben gyakran visszatérő kapcsolatokat tartalmazó, önmaga működését felerősítő és ezáltal érzékenyítő neuronális hálózat alakul ki, ami idővel epileptikus göcként kezd funkcionálni (Deller és Frotscher, 1997).

A hippocampális formációt érintő, sejtkárosító hatások során megfigyelt morfológiai változások funkcionális következményei meglehetősen vitatottak. Az erőteljes epileptikus aktivitás, vagy ischemiás állapot következtében kialakuló moharost-burjánzást számos alkalommal leírták már (Buckmaster és mtsai., 2002; Kotti és mtsai., 1997; Sloviter, 1992), de emellett a perforans pálya rostrendszere is átmeht hasonló változásokon (Kadish és van Groen, 2003; Deller és Frotscher, 1997). Mindkét pálya a DG régióval áll kapcsolatban (Johnston és Amaral, 1998), ezért az axonburjánzás következtében újonnan létrejövő kollaterálisok alapvetően a DG molekuláris rétegében végződve megváltoztatják a lokális áramkörök aktivációs folyamatait. A moharost-burjánzás következményeivel kapcsolatban egymásnak ellentmondó irodalmi adatok léteznek. Pilokarpinnal kezelt patkányokban bekövetkező moharost-burjánzás leginkább a szemcsejtek innerválja (Buckmaster és mtsai. 2002), míg kainsavval kezelt állatokban a GABAerg kosársejtek erőteljesebb beidegzését írták le (Kotti és mtsai., 1997; Sloviter, 1992). Mivel a moharostok filopodiális szinapsziseikkal és „en passant” boutonjaikkal célzottan GABAerg interneuronokat innerválnak (Acsády és mtsai., 1998; McBain, 2008), a rostok burjánzása a feed-forward gátlás erősödéséhez is vezethet, csökkentve ezáltal a görcsérzékenységet.

Az entorhinális kéreg lézió epileptogenitása is vitatott kérdés. Patkányokban neonatális korban végzett entorhinális kéreg abláció jelentősen csökkenti a parvalbumin



tartalmú gátló interneuronok számát (Harich és mtsai., 2008), felnőtt állatokban iboténsavval előidézett lézió a perforans pályában eredményez axonburjánzást (Kadish és van Groen, 2003). Mindezen változások azt sugallják, hogy a serkentődés irányába tolódik a szinaptikus ingerületátvitel. A kísérletes eredmények (Kotti és mtsai., 1997; Sloviter, 1992) mindazonáltal azt mutatják, hogy a kapcsolatrendszerek újrászerveződése után kisebb görcsérzékenység jellemző a kéregirtott állatokra, akárcsak a mi kísérletes modellünkben. Az entorhinális kéreg irtása következtében a DG molekuláris réteg afferens szinapszisaik nagy része megszűnik. A szemcsejtek üressé vált szinapszisaikért versengés indul, ezen helyeket az entorhinális kéregből érkező épen maradt afferensek töltik fel, illetve a hilumból érkező gátló asszociációs/kommissurális pályák is jelentős erősödést mutatnak (Deller és Frotscher, 1997). Patkányban az ellenoldali, egérben az azonos oldali entorhinális kérgi rostburjánzásnak van nagyobb jelentősége (Kadish és van Groen, 2003). A burjánzást mutató serkentő rostok nagy része kosárcsajteken végződik, ami szintén felerősíti a gátlás hatékonyságnövekedését (Deller és Frotscher, 1997). Léteznek azonban adatok arra vonatkozóan is, hogy az entorhinális kéreg léziója nincs hatással a görcstevékenységre. Az ACh-észteráz gátló soman indukálta rohamok esetében a perirhinális és a hátsó piriformis kéreg irtása antikonvulzív, míg az entorhinális kéreg és a hippokampusz ablációja nincs hatással a rohamokra (Myhrer és mtsai., 2008).

Az entorhinális kéregirtás rohamrezisztencia-fokozó hatására magyarázat lehet a kéregterület görcsiniciációban játszott szerepe. Patkány kombinált agyselemben végzett vizsgálatok szerint 4-AP hatására ún. interiktális aktivitás jelenik meg, melynek forrása a hippokampusz, jellemzője a viszonylag nagy frekvenciával megjelenő, rövid görcskisülés. Ez az aktivitás gátolja a perirhinális és entorhinális kérgi spontán tevékenység megjelenését. A parahippokampális területek leválasztása után az entorhinális és perirhinális kéregterületeken ún. iktális tevékenység alakul ki, melyet a generalizált nagyrohamokhoz hasonló komplex kisüléssorozat jellemez (Barbarosie és Avoli, 1997; de Guzman és mtsai., 2004). Az entorhinális kéreg diszinhibíciója szintén iktális rohamok kialakulásához vezet (de Curtis és Pare, 2004; Federico és MacVicar, 1996). Az entorhinális kérgi túlaktiváció könnyen lép be a triszinaptikus hurokba, majd a

hippokampuszból felerősítve érkezik vissza a kéregbe. Eltávolítása jelentős mértékben csökkentheti a görcsérzékenységet, ami összhangban van vizsgálati eredményeinkkel.

### 6.2.3. A krónikus 4-AP kezelés hatására bekövetkező változások elemzése

A laterális entorhinális kéreg irtás hatására lecsökkent rohamérzékenység miatt feltételezhető, hogy jelentős változások következtek be a hippokampális formáció kapcsolatrendszerében és működésében. Ezen eredmények alapján vetődött fel a kérdés, hogy egyéb, kíméletesebb beavatkozással is el lehet-e érni hasonló hatást. Kézenfekvőnek tűnt a 4-AP alkalmazása enyhe ismételt konvulziók indukálására. Együttműködő partnereink előzetes, a hippokampuszra vonatkozó immunhisztoblot eredményeikből láttuk, hogy van receptorális szintű változás ezen a területen, és felvetődött, hogy ez manifesztálódik-e valóban működési szinten is. Mivel a mi laborunk a hisztoblot vizsgálatokkal kapcsolatban kizárólag a kiértékelésben vett részt, ezen kísérletek közvetlenül nem képezik részét dolgozatomnak, de saját eredményeim megvitatása céljából felhasználom az együttműködésből származó adatokat is (Az immunhisztoblot eredmények a 2. függelékben illetve Világi és mtsai., 2009 és Borbély és mtsai., 2009 publikációkban érhetők el).

Az idegrendszernek is sajátosága, hogy az aktuális körülményekhez megfelelően alkalmazkodni tud a működési optimum elérése érdekében. Az idegtudomány talán legáltalánosabban elfogadott hipotézise, hogy azon szinapszisok, melyek ismétlődően szinkronizált pre- és posztzinaptikus aktivitást mutatnak, megerősödnek (Hebb, 1949), míg a kevésbé aktívak ingerületátvitelle lecsökken (Bastrikova és mtsai., 2008). Sokszor ismétlődő szinaptikus aktivitás hatására megszűnik az NMDA-receptorok  $Mg^{2+}$  blokádja, ami tartós aktiválódásuk következtében az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció jelentős növekedéséhez vezet. Ennek hatására - többek között - az AMPA-receptorok foszforilálódnak, vagy újabb AMPA-receptorok helyeződnek ki a posztzinaptikus membránfelszínre. A magas  $Ca^{2+}$  koncentráció következtében a nitrogén-monoxid szintáz is aktiválódik, NO keletkezik, ami retrográd transzmitterként visszadiffundál a preszinaptikus végződésbe, és fokozza a transzmitter felszabadulást (Bliss and Collingridge, 1993; Lynch, 2004; Pare, 2004; Son és mtsai., 1996). Fejlődési folyamatokban is hasonló okok miatt stabilizálódnak szinaptikus kapcsolatok. Ezen

folyamatok egyik *in vitro* modelljének, az LTP-nek alapvető molekuláris folyamatai napjainkra tisztázódtak. A tanulási folyamatban alapvető szerepe van az NMDA típusú glutamátreceptoroknak. Szeletpreparátumban alkalmaztunk LTP indukciót a mikrohálózat szintű változások vizsgálatára. Nagyfrekvenciás sorozatingerléssel 30 percen belül kiváltható a hatékonyságnövekedés. A vizsgálataink szerint a kontroll és 4-AP kezelt állatokból származó szeletek sem a szomatoszenzoros, sem a limbikus kérgi területeken nem mutattak jelentős különbséget az LTP indukálhatóságában, viszont immunhisztoblot eredményeink szerint az NR2A alegység expressziója szignifikáns mértékben fokozódott mindhárom területen, míg az NR1 alegység mennyisége nem változott az ismétlődő rohamok hatására (Borbély és mtsai., 2009; Világi és mtsai., 2009).

Az NR2 alegységek expresszióváltozása az idegsejtek ingerlékenységét jelentős mértékben megváltoztathatja, mivel az egyes alegységek farmakológiai és funkcionális tulajdonságai markánsan különböznek. Az NMDA-receptor agonista és antagonistáknak eltérő erősséggel kötődhetnek a különféle NR2 alegységekhez. Az APV és AP-7 (D-2-amino-7-foszfono-heptánsav) nagyobb affinitással köt az NR1/NR2A receptorokhoz, mint az NR1/NR2B heterodimérhez, viszont az dizocilpin, ketamin, memantin nem mutat szelektivitást (Paoletti és Neyton, 2007). Az NR2A, illetve 2B alegységek egyaránt nagy konduktanciával bírnak, de az NR2A esetében alacsonyabb a deaktivációs idő és magasabb a nyitási valószínűség (Cull-Candy és mtsai., 2001; Erreger és mtsai., 2005; Gielen és mtsai., 2009). Mindezek ellenére az NR2B alegység nagyobb ionáram létrehozására képes, mivel inaktivációs időállandója hozzávetőleg hatszor nagyobb, mint az NR2A alegységé (Cull-Candy és mtsai., 2001; Möddel és mtsai., 2005), emiatt az NR1/NR2B receptorok  $Ca^{2+}$  permeabilitása sokkal magasabb, mint az NR1/NR2A receptoroké.

Az egyedfejlődés során az NMDA-receptorok ezen alegységekhez kötődően jelentős funkcionális változáson esnek át. Az NR2A és 2B receptoralegységek expressziója szigorú fejlődéstani szabályozás alatt áll, sőt az egyes agyterületek között is jelentős különbségek lehetnek. Patkányban pre- és perinatálisan az NR2B alegység kifejeződése dominál, majd a posztnatális 3. hét után az NR2A alegység fokozatosan kiszorítja (Loftis és Janowsky, 2003; Luján és mtsai., 2005).

Az NMDA-receptor-rendszer módosulását számos túlaktivációval járó inzultus kiválthatja. Az újszülött korban ismételtlen kiváltott KA-indukált rohamok fokozzák az NR1 és NR2A, illetve B alegységek expresszióját, ami a rohamérzékenységet fokozó hatást eredményezte (Gashi és mtsai., 2007). Pentiléntetrazol indukálta kémiai kindling modellben az agykéregben szignifikánsan lecsökkent az NR2A alegységek száma, míg az NR1 és NR2B denzitás nem változott (Zhu és mtsai., 2004). A perinatális pilokarpin indukálta status epilepticus mind az NR2A, mind az NR2B downregulációját kiváltja (Silva és mtsai., 2005). A túlaktiválódással járó folyamatok hosszútávon a receptor alegység összetételének módosulásával járhatnak, ami a serkenthetőség, áramáteresztőképesség megváltozását eredményezheti.

Az NR2A expresszió perinatális fokozódása az irodalmi adatok alapján a görcsérzékenység növekedését eredményezi (Gashi és mtsai., 2007), míg érett idegrendszerben epileptikus inzultusokra az alegység downregulációja figyelhető meg (Silva és mtsai., 2005; Zhu és mtsai., 2004), ami némileg ellentmond a mi eredményeinknek. A 12 napos kezelés alatt folyamatosan emelni kellett a 4-AP dózist, hogy újabb rohamokat tudjunk indukálni, ami azt sugallja, hogy az állatok rohamrezisztenciája fokozódott. Az eltérések oka lehet, hogy a mi kísérleteink során csak kis mértékben változott az NR2A expresszió, ami valószínűleg nem volt elegendő a citotoxikus hatás kialakulásához, vagy egyéb receptorális változások kompenzálták az NMDA-receptorok alegységösszetételének megváltozását. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy sem az LTP indukálhatóságában, sem az APV gátló hatékonyságában nem tapasztaltunk különbséget a kezelési csoportok között egyik vizsgált agyterületen sem. Az APV bizonyítottan mutat kismértékű alegység-specifitást (Cull-Candy és mtsai., 2001), de az upreguláció mértéke valószínűleg nem érte el azt a szintet, hogy ennek funkcionális következményei is legyenek.

Az NMDA-receptorok aktiválódása igényli az AMPA-receptorok által kialakított előzetes hipopolarizációt. Amennyiben az AMPA-receptorok működésében bekövetkezik változás, az emiatt hatással lehet az NMDA-receptorok működésére is. Erre a lehetőségre utal, hogy az AMPA-receptor antagonistá GYKI 52466 alkalmazása során a vizsgálatok eredménye szerint a hippocampusz és az entorhinális kéreg esetében jelentős érzékenység csökkenés alakult ki a 4-AP kezelt állatokban, míg a szomatoszenzoros kéregben nem

volt funkcionális változás. Az antagonistá megváltozott hatásának hátterében feltételezhetően az AMPA- és részben a KA-receptorok alegység összetételének módosulása állhat. Az AMPA-receptorok négy alegységből (GluR1-4) felépülő receptorioncsatorna komplexek, melyek az agykérgi gyors szinaptikus ingerületátvitelben érintettek (Bigge, 1999).

A glutamáterg receptorrendszer megváltozását leírták már különféle patológiás folyamatok esetében (Grooms és mtsai., 2000; Pellegrini-Giampietro és mtsai., 1997). Mivel ezen receptorális változások nagymértékben befolyásolják a sejt egészének ingerlékenységét, ezért az agykérgi mikrohálózatok működése szempontjából nagy jelentősége van az expresszázó alegységek mennyiségi módosulásának. Hisztoblot vizsgálatainkkal kimutattuk a GluR2 alegység nagyfokú downregulációját a hippokampusz CA1 és DG területein, illetve az entorhinális kéregben. A receptor működése szempontjából a GluR2 alegység kiemelten fontos szerepet tölt be. Felnőtt idegrendszerben az alegység szinte teljes mértékben az átszerkesztett formát tartalmazza (Bigge, 1999; Hollmann és mtsai., 1991; Pellegrini-Giampietro és mtsai., 1997; Stone és Addae, 2002), emiatt a GluR2 tartalmú AMPA-receptorok  $\text{Ca}^{2+}$  impermeábilisak, lineáris I-V karakterisztikával és alacsony konduktanciával rendelkeznek (Isaac és mtsai., 2007). A GluR1/2 dimér receptorok döntő többségében principális sejteken expresszázódnak, míg a  $\text{Ca}^{2+}$ -ra áteresztő GluR1, GluR1/4 receptorok főleg interneuronokra jellemzőek, aminek következtében a principális sejteken lévő receptorok lassabban deszenzitizálódnak (Geiger és mtsai., 1995). A principális sejtek  $\text{Ca}^{2+}$  impermeábilis AMPA-receptorokat fejeznek ki a sejtfelszínen és szigorúan szabályozzák a  $\text{Ca}^{2+}$  intracelluláris koncentrációját. Viszonylag kis számú  $\text{Ca}^{2+}$  bejutása is erős jelzés a sejt számára, így ha az intracelluláris kalcium koncentráció erőteljesen megemelkedik és tartósan magas marad, apoptotikus folyamatok indulnak be. Az interneuronok hatékony kalciumkötő fehérjei védettebbé teszik őket ezen károsító hatásoktól (Geiger és mtsai., 1995), viszont előfordulhat, hogy ilyen esetekben válaszóó képességük csökken az inzultus következtében beinduló, génexpresszióváltozást és sejtfelszíni receptor kifejeződést módosító védekezési mechanizmusok miatt. A 4-AP kezelés hatására 30 percen belül megindul a *c-fos* gén átírása, majd a keletkező fehérje számos szabályzó fehérjét foszforilálva elősegíti a károsító inzultus kivédését (Borbély és mtsai., 2006;

Mihály és mtsai., 2005). Mindazon folyamatok, melyek a GluR2 receptor downregulációjához vezetnek, a principális sejteken neurodegenerációt váltanak ki (Pellegrini-Giampietro és mtsai., 1997).

A GluR2 receptor downreguláció bekövetkezik KAIN indukálta status epilepticus hatására a patkány hippocampusz CA3 régiójában (Friedman és mtsai., 1994; Friedman és Velisková, 1998; Lason és mtsai., 1997), ischémia következtében a CA1 areában (Pellegrini-Giampietro és mtsai., 1997) és pilokarpin kezelés eredményeképpen a CA3 régióban (Lason és mtsai., 1997). A GluR2 alegység expresszió csökkenése bekövetkezik kérgi idegsejt kultúrákban KA kezelés hatására (Jia és mtsai., 2006), illetve *in vivo* kérgi lézionálás miatt az 5. réteg piramissejtjein (Kharazia és Prince, 2001). A GluR2 antiszensz oligonukleotidjának bevitelével végzett vizsgálatok hatékonyan csökkentik az alegység sejtfelszíni mennyiségét, amely hatásra AMPA-receptor mediálta neurodegeneráció alakul ki (Oguro és mtsai., 1999). A kísérletes eredmények bizonyítják a GluR2 szelektív sejtpusztulásban betöltött szerepét. Az általunk alkalmazott modellben nem sikerült sejtpusztulást kimutatni egyik vizsgált agyterületen sem, ami feltételezhetően annak köszönhető, hogy szemben az előbbieken leírt modelleknél megfigyelt 50-60%-os expresszió csökkenéssel, a krónikus 4-AP kezelés hatására csak 10%-os downreguláció alakult ki.

A farmakológiai kísérleteink során alkalmazott GYKI 52466 nem-kompetitív módon gátolja az AMPA-receptorok működését (Tarnawa és mtsai., 1990b). A 2,3-benzodiazepin vegyületek antikonvulzív és neuroprotektív hatását már számos modellben leírták. Hatékonyan gátolja a kérgi utó kisülések kialakulását (Kubova és mtsai., 1997), megakadályozza a 4-AP indukálta rohamok kialakulását (Yamaguchi és mtsai., 1993; Dóczy és mtsai., 1999), megemeli a maximális elektrosokk és pentiléntetrazol indukálta rohamok küszöbét (Yamaguchi és mtsai., 1993; Löscher és Honack, 1994), és kivédi a jelentős sejtpusztulást is (Világi és mtsai., 2002). Habár a GYKI 52466 AMPA- és KA-receptorokon is hat, gátló hatékonysága az egyes altípusokon jelentős dóziszfüggést mutat. Az általunk is használt 40  $\mu\text{M}$  koncentráció kizárólag az AMPA-receptorokon hat, 100-200  $\mu\text{M}$  esetén már enyhe gátlást fejt ki a KA-receptorokra is (Wilding és Huettner, 1995; Bleakman és mtsai., 1996). Mivel a GYKI 52466 nem-kompetitív módon fejt ki hatását, a transzmitter-koncentráció

ingadozásai nem eredményeznek változást a hatékonyságában, ezért kifejezetten alkalmas az AMPA-receptorok szinaptikus ingerület átvitelben betöltött szerepének vizsgálatára (Wilding és Huettner, 1995).

A GYKI 52466-nak a 4-AP kezelt állatokban megmutatózó csökkent hatékonysága azt jelzi, hogy a receptorösszetétel kismérsékű módosulása ellenére, a változásnak voltak funkcionális következményei. Ezt támasztja alá, hogy a nem-NMDA-receptorok  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitása is jelentősen megváltozott. A megváltozott hatékonyság fő oka minden bizonnyal a GluR2 downreguláció, de a jelenségben szerepe lehet a GYKI 52466 kismérsékű alegység-specifikitásának is. A GluR1 és GluR4 homomér receptorok esetében enyhébb gátlást alakít ki, mint a GluR2 alegységet is tartalmazó komplex esetében (Bleakman és mtsai., 1996; Johansen és mtsai., 1995). Az AMPA-receptorok flip és flop izoformáit egyforma hatékonysággal képes gátolni (Johansen és mtsai., 1995). A GYKI 52466 hatással van a GluR6 homomér és GluR6/KA-2 kainát receptorokra is, bár ezen típusoknál jóval magasabb az effektív koncentráció (Bleakman és mtsai., 1996; Yamada és Turetsky, 1996). A GluR2 receptor csökkenő mennyisége a rendelkezésre álló irodalmi adatok ismeretében valóban okozhat csökkenő gátló potenciált a GYKI 52466 esetében, ahogy a mi kísérletsorozatunkban tapasztaltuk. Ezzel összhangban valóban csak azon területeken – a hippocampusz CA1 régióban és az entorhinális kéregben – mutatott csökkenő hatékonyságot az antagonistá, ahol jelentősebb változás következett be a GluR2 kifejeződésében. A  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitás megváltozásának tanulmányozása érdekében végzett kobaltfelvételi vizsgálatok eredménye is jól korrelál az elektrofiziológiai és hisztoblot adatokkal. A hippocampális CA1 area és a DG esetében megnövekedett a nem-NMDA-receptorok permeabilitása, amivel párhuzamosan csökkent GluR2 alegység expressziót találtunk. Az entorhinális kéregben csökkent a receptorok kalcium ionokkal szembeni átjárhatósága a szupragranuláris rétegekben annak ellenére, hogy a GluR2 alegység downregulációt mutatott. A látszólagos ellentmondás magyarázata lehet, hogy a KA-2 alegység expressziója is lecsökkent, sőt az sem zárható ki, hogy egyéb, általunk nem vizsgált KA-receptor alegységek sejtfelszíni száma is megváltozott. A szomatoszenzoros kéregben sem a GluR2, sem a KA-2 alegység expressziója nem változott meg jelentősen, ennek ellenére a  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitás lecsökkent a 2., 5. és 6. rétegben. Feltételezhető,

hogyan az AMPA-receptorok számának lecsökkenése áll a háttérben, amit GluR1-4 antitesttel végzett eredmények is alátámasztanak.

### **6.3. Az akut kísérleti eredmények megvitatása**

#### **6.3.1. Az áramforrassűrűség és a belső optikai jelek kapcsolata**

Akut kísérletekben a 4-AP-nek a szomatoszenzoros kérgi mikrohálózatokra gyakorolt hatását elemeztük. A krónikus kísérleti eredmények szerint a 4-AP nem indukál hosszútávú változásokat a terület serkentetőségében, ami feltételezhetően a szomatoszenzoros kéreg élettani szerepével is kapcsolatba hozható. Ezen kérgi areának a testfelszíni receptorokból érkező ingereket kell fogadnia és feldolgoznia, így funkciójából adódóan nem elsődleges fontosságú a plaszticitás képessége, az állandó stabil ingerületátvitel nagyobb prioritást élvez, ezáltal védettebb az epileptikus folyamatokkal szemben is. Az élettani szerepének betöltésében viszont kiemelt jelentősége van a lokális és asszociációs kapcsolatrendszernek. Emiatt indokoltnak láttuk ezen hálózat működését részletesebben megvizsgálni. Korábbi elektrofiziológiai eredmények a laborból (Borbély és mtsai., 2006; Gulyás-Kovács és mtsai., 2002) és irodalomból ismertek, de ezek az üvegelektroddal mért adatok pusztán egy-egy pont aktivitását mutatják, a szinkronizált hálózati működésre áttételesen lehet csak következtetni. Amennyiben multielektrodd alkalmazásával több pontból történik az elektromos aktivitás regisztrálása, lehetőség adódik lamináris profil vizsgálatára, illetve a szomszédos csatornák jeleinek matematikai elemzésével a szinaptikus áramok iránya is meghatározható. A szinaptikus áramok vizsgálatára szolgál az áramforrás-sűrűség analízis (CSD; Current source density), amit egy újszerű, ezen folyamatokat közvetetten tanulmányozó vizsgálattal, a belső optikai jelek (IOS; Intrinsic optical signals) detektálásán alapuló módszerrel egészítettünk ki. A két módszer összevetése kiemelt jelentőségű, mert a CSD mintázat meghatározásakor kiemelten fontos, hogy az adatrögzítés a görcestevékenység fókuszából vagy egyéb kisebb aktivitást mutató területről történik-e.

A belső optikai jelek megváltozása számos élettani és patológiai folyamat során tapasztalható, ilyenek az ischemia, spreading depression, *in vivo* és *in vitro* szinaptikus ingerületátvitel (Fayuk és mtsai., 2002; Sheth és mtsai., 2003; Tao és mtsai., 2002).



Kialakulásának pontos mechanizmusa még nem ismert, számos elképzelés létezik a sejtek és sejtorganelumok lehetséges szerepéről (Részletesebben ld: 1. függelék), de az ionok és a víz membránon keresztüli vándorlása biztosan fontos szerepet játszik benne. Az eljárás előnye, hogy a preparátum egészének aktiválódását nyomon lehet követni, emiatt különféle folyamatok iniciációs helyének és terjedésének vizsgálatára alkalmas. Bár a módszer viszonylag egyszerű, *in vitro* belső optikai jelek mérésén alapuló kísérleti eredmények csak kis számban állnak rendelkezésre. A kombinált entorhinális kéreg – hippocampusz szeletekben kialakuló terjedő görcstevékenység és spreading depression aránylag jól dokumentált mind fejlődő, mind felnőtt idegrendszerben (Buchheim és mtsai., 2000; Holtkamp és mtsai., 2003; Meierkord és mtsai., 1997; Weissinger és mtsai., 2000 és 2005; Tao és mtsai., 2002.). A szomatosenzoros kérgi területet érintő optikai változásokra azonban kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Wag/Rij és kontroll állatok agyából készült szeletben jelentős különbség tapasztalható az elektromos ingerlésre adott IOS jelek intenzitásában. A kontroll állatok esetében az életkor előrehaladtával csökkent az intenzitás, míg a Wag/Rij állatok esetében ellentétes irányú változás volt megfigyelhető (D'Arcangelo és mtsai., 2006). A szomatomotoros kéreg eltérő rétegeiben végzett elektromos ingerlések is kiváltak optikai változásokat (Kohn és mtsai., 2000; Világi és mtsai., 2001), melyek jól korrelálnak az adott réteg ismert anatómiai kapcsolatrendszerével, ezért feltételezhető, hogy az optikai jelek kialakulásában a szinaptikus kapcsolatoknak is nagy szerepe van. A mi kísérletsorozatunkban a görcskeltő hatására a szelet adott pontjaiban kialakult egy gyenge belső optikai jel, ami a kísérlet előrehaladtával egyre nagyobb intenzitásúvá vált és a környező szövetekre is áttért. Hozzávetőleg 1h múltával a mintázat állandósult, az aktív terület kiterjedése nem változott. Az üvegelektroddal detektált spontán aktivitások megjelenése alatt sem változást, sem terjedést nem tapasztaltunk az aktivitás mintázatban. Az elektrofiziológiailag mérhető görcstevékenység és az optikai jelek között nem sikerült kimutatni közvetlen időbeli kapcsolatot, valószínűleg az optikai úton mért aktiválódás egyfajta háttér ad az elektrofiziológiailag mérhető szinaptikus folyamatoknak.

Két, merőben eltérő vizsgálati módszer - az IOS és CSD meghatározás - nagyon hasonló aktivációs mintázatokat mutatott ki. Az IOS mérésével a szupragranuláris rétegek gyengébb aktiválódását tapasztaltuk az elsődleges szomatosenzoros kéregben,

míg a másodlagos szomatoszenzoros kéregben erőteljesebb változások következtek be. Ezzel összhangban CSD elemzések két jelentősebb áramelnyelődést mutattak a szomatoszenzoros kérgi területeken, az egyik a 2/3. rétegben, ami minden vizsgált régióban jelentkezett, a másik a 4. és 5. rétegben volt lokalizálható, de kizárólag a másodlagos szomatoszenzoros kéregben. A 4. rétegben megjelenő áramelnyelés feltételezhetően az itt lévő tüskés csillagsejtek (Tracey, 2004; Waite, 2004) szinaptikus aktiválódását mutatja, ami felerősítve kis késleltetéssel átvődik a 2/3. rétegben lévő piramissejtekre. Az elsődleges szomatoszenzoros kéregben nem tapasztalható áramelnyelődés a 4. rétegben, viszont a 2/3 rétegben kialakul egy rövid áramelnyelődés. Ez a jelenség valószínűleg az ezen rétegben jelenlévő horizontális kapcsolatok (Bannister, 2005; Feldmeyer és mtsai., 2006) aktivitását tükrözi. Ezzel egy időben megjelenik egy áramforrás is az 1. rétegben, de ez minden bizonnyal csak a CSD kalkuláció egyik kiküszöbölhetetlen hibájából adódó műtermék. Amennyiben a szélső elvezetéseken nagyobb mértékű aktiváció alakul ki, a preparátum határain, ahol drámaian megváltozik az elektromos vezetőképesség, erőteljes áramfolyásokat mutat a CSD grafikon anélkül, hogy fiziológiás folyamat állna háttérben. A CSD profil alapján az infragranuláris rétegek nem aktiválódnak, az 5. és 6. rétegekben alakul egy-egy nagyon gyenge áramforrás.

A 4-AP modellt gyakorta alkalmazzák áramforrás meghatározási kísérletekben. A spontán, visszatérő epileptikus aktivitás iniciációját végző neuronok, mikrohálózati elemek azonosításával kapcsolatban több egymásnak ellentmondó kísérleti eredmény áll rendelkezésre. A legtöbb, rácsálókból származó kísérleti eredmény az 5. rétegben bekövetkező görcsindukciót dokumentál, amiért az itt lévő IB sejteket teszik felelőssé (Chagnac-Amitai és Connors, 1989). Ennek némileg ellentmond, hogy éretlen patkány idegrendszerben is kialakulnak epileptikus folyamatok 5. rétegbeli iniciációval (Hoffman és Prince, 1995) az egyedfejlődés azon szakaszában, amikor még bizonyíthatóan nincsenek jelen IB sejtek (Franceschetti és mtsai., 1993). Bizonyított azonban, hogy a szupragranuláris rétegekben erőteljesebb GABAerg gátlás érvényesül, ami magyarázata lehet annak, hogy miért nem ezen rétegekben indukálódik a rohamtevékenység (Yang és Benardo, 1997). Az 5. réteg kiemelt szerepének cáfolására is vannak irodalmi adatok. Patkány horizontális agysejtben végzett vizsgálatok szerint az egymástól szeparált

szupragranuláris, granuláris és infragranuláris rétegek képesek önállóan kialakítani spontán aktivitást 4-AP hatására (Yang és Benardo, 2002). Ezen kísérleteknél számolni kell a kérgi rétegek szeparálásából eredő roncsolódás epileptogén hatásával is, illetve egyes feltételezések szerint a túlélő agyszelet eltérően aktiválódhat, mivel a preparálás során az érzékenyebbnek vélt gátló interneuronok nagyobb mértékben degenerálódnak, mint a serkentő idegsejtek. A kísérleteinkben tapasztalt aktiváció mintázata nagyon hasonlít a patkány látókéregben, *in vivo* kísérletekben vizsgált elektromos vagy fényingerlésre adott válaszok (Bode-Greuel és mtsai., 1987; Kenan-Vaknin és Teyler, 1994), illetve humán epileptikus szövet *in vitro* spontán aktivitásának mintázataihoz (Köhling és mtsai., 1999). Az *in vivo* kiváltott válasz vizsgálatok esetében nyilvánvalóan a talamikus afferenseken befutó depolarizáció okozta a mintázatot, ami az eltérő kísérleti körülmények miatt természetesen nem állítható közvetlenül párhuzamba a mi eredményeinkkel, lévén izolált koronális szeleteken mértük a spontán aktivitást. A humán epileptikus szövet viszont ingerlés nélkül is hasonló aktivációt mutatott *in vitro* mérésekben, emiatt feltételezhető, hogy hasonló módon aktiválódott a kérgi mikrohálózat.

Az agyszövet saját optikai tulajdonságainak megváltozása és a CSD elemzés egybehangzóan a szupragranuláris rétegek erőteljesebb szinkronizációs készségét mutatta ki a 4-AP indukálta akut epilepsziamodellemben, ami összhangban van azzal a ténnyel, hogy mindkét módszer a dendritrendszeren ionáramok következtében végbemenő változásokat detektálja.

### 6.3.2. A 4-AP akut hatásának farmakológiai befolyásolhatósága

A 4-AP görcstevékenységet indukáló hatásának legfőbb összetevője a feszültségfüggő  $K^+$  csatornák gátlása miatt kialakuló fokozott szinaptikus működés. A krónikus kísérletek során is bizonyítottuk, hogy nagy a jelentősége ennek a folyamatnak, ezért tartottuk fontosnak akut, jól kontrollálható körülmények között megvizsgálni, milyen hatással van a fokozott szinaptikus ingerületátvitel a mikrohálózatok működésére. Mivel a szomatoszenzoros kérgi kiváltott válasz háttérben álló receptorális folyamatok megfelelően tisztázottak, és laborunk is nagy gyakorlattal rendelkezik ilyen kísérletekben, kézenfekvőnek tűnt ezen területen végezni farmakológiai vizsgálatainkat.

A tesztelésre két már bevált farmakont használtunk. A feszültségfüggő  $\text{Na}^+$  csatorna blokkoló lamotrigint a klinikai gyakorlatban is alkalmazzák antiepileptikumként (Landmark, 2007), míg a memantin alloszterikus NMDA-receptor antagonistaként hatékonyan gátolja a patológiás mértékű aktivációt magas extracelluláris glutamát-koncentráció esetén (Chen és Lipton, 1997).

A specifikus receptor antagonistákkal végzett vizsgálataink eredménye szerint az  $50 \mu\text{M}$  koncentrációban alkalmazott lamotrigin (LTG) hatékonyan gátolta a kiváltott válaszok korai komponensét (a fEPSP N1-P1 csúcsa), mind a kontroll, mind a 4-AP kezelt szeletekben, míg a késői komponens (P1-N2 csúcs) csak a 4-AP kezelt szeletekben csökkentette le. A  $1,5 \mu\text{M}$  memantin (MEM) hatékonyan gátolta a fEPSP korai komponensét a kontroll szeletekben, míg a késői komponensre inkább a 4-AP érzékenyített szeletekben volt hatással.

A LTG antiepileptikus, antikonvulzív hatását számos állatmodellben tesztelték már. Patkányban elektromos ingerléssel kiváltott status epilepticus során csökkentette a konvulzív szakaszban bekövetkező rohamok számát, de az epileptikus folyamatot és az utána bekövetkező neurodegenerációt nem tudta kivédeni (Nissinen és mtsai., 2004), míg maximális elektrosokk modellben vizsgálva kis antiepileptikus hatékonyságot mutat (Tomczyk és mtsai., 2007). Tengerimalac hippokampális szeletben az NMDA-receptorok  $\text{Mg}^{2+}$  blokádjának megszüntetése után dózisfüggő módon csökkenti a spontán interiktálisok megjelenését (von Wegerer és mtsai., 1997). Amennyiben az NMDA-receptorok diszinhibíciója mellett 4-AP és bikukullin hatásának is kiteszik a preparátumot, az antiepileptikus hatékonyság változatlanul megmarad, feltételezhetően a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák gátlása miatt (Pisani és mtsai., 2004). Patkány amigdalában a terápiás dózistartományban csökkenti a GABAerg ingerületátvitelt is, a hatás itt is feltételezhetően a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák közvetítésével alakul ki (Braga és mtsai., 2002). Mivel a lamotrigin nem fejt ki közvetlen hatást a glutamaterg receptorrendszerre, a kísérleteink során megfigyelt terápiás dózis következtében kialakuló erőteljes gátló hatás feltételezhetően a  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák gátlása révén lecsökkenő preszinaptikus transzmitter felszabadulás miatt jelenik meg. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy a 4-AP kezelt szeletekben a fEPSP AMPA- és NMDA-receptorok közvetítette komponensét közel azonos mértékben csökkentette le.

A memantin-t allosztérikus NMDA-receptor antagonistaként elterjedten használják Alzheimer-kór kezelésére (Axura<sup>®</sup> vagy Namenda<sup>™</sup>). A receptor ioncsatornájába nyitott állapotban köt be az MK-801 kötőhelyre, így feszültségtől függő módon akadályozza az áramvezetést (Parsons és mtsai., 1999). A receptor patológiás mértékű aktivációját hatékonyan akadályozza meg anélkül, hogy a nagy affinitású NMDA-receptor antagonistáknál leírt mellékhatásokkal (pl.: memóriaromlás, pszichotomimetikus szindróma) számolni kellene és mindeközben az LTP kiválthatóságára sincs hatással (Frankiewicz és Parsons, 1999; Johnson és Kotermanski, 2006; Parsons és mtsai., 1999). Terápiás dózisban (1-10  $\mu\text{M}$ ) alkalmazva az NMDA-receptorok tónusos aktivitását gátolja, ezáltal csökkentve a szinaptikus ingerületátviteli zajt, ami pozitív hatással van az LTP funkcionális megőrzésére (Frankiewicz és Parsons, 1999; Parsons és mtsai., 1999). Neuroprotektív hatását igazolták embólia okozta stroke modellben (Lapchak, 2006) és ischiemiás traumát követően (Chen és mtsai., 1998). Amennyiben nagyobb dózisban (100-200  $\mu\text{M}$ ) alkalmazzák, hatást gyakorol a dopaminerg, szerotonerg, noradrenerg ingerületátvitelre, gátolja a nikotinos ACh receptorokat és az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákat (Aracava és mtsai., 2005; Johnson és Kotermanski, 2006). Mivel a fEPSP késői komponensének kialakulása jellemzően az NMDA-receptorok aktiválódását jelzi, egy antagonistá alkalmazásakor leginkább ezen összetevő amplitúdójának csökkenésére számíthatunk. A memantin azonban kizárólag a 4-AP kezelt szeletek esetében csökkentette le ezt a komponenst, a kontroll szeletekben nem mutatott gátló hatást. Az eltérések egyik oka lehet, hogy a kontroll szeletekben általában kisebb a késői komponens amplitúdója, amit kevésbé tud lecsökkenteni az antagonistá. Másik lehetséges magyarázat, hogy a memantin akkor képes hatékonyan lecsökkenteni az NMDA-receptorok aktivitását, amikor a glutamát extracelluláris koncentrációja tartósan magas (Chen és Lipton, 1997). A feltételezést alátámasztja, hogy a gátló hatás az ingerlési feszültségtől függetlenül közel állandó szintű volt, tehát a preszinaptikus transzmitter felszabadulás nem befolyásolja az antagonistá működését. A memantin a kontroll szeletekben is képes volt kialakítani gátló hatást a fEPSP korai komponensét illetően. Ezen összetevő főleg AMPA-receptorok által közvetített, de kis részben NMDA-receptorok is részt vesznek a kialakításában. A hatás mértéke alapján valószínűsíthető, hogy nem az NMDA-receptorok működése gátlódott, feltételezhetően egyéb transzmitter rendszeren érvényesül az antagonistá hatás. Mivel az

általunk alkalmazott koncentrációban sem az AMPA-receptorokon, sem a szerotoninerg, dopaminerg, noradrenerg moduláló rendszereken (Parsons és mtsai., 1999) nem hat a memantin, a gátlás egyéb módon jut érvényre. Alacsony koncentrációban egyes források szerint a nikotinos ACh receptorokon hat a vegyület, ha ezeket gátoljuk, csökken a felszabaduló transzmitter mennyisége, mert ezek preszinaptikus elhelyezkedésű, serkentő hatású receptorok.

A receptorantagonistákkal végzett vizsgálatok eredménye szerint a 4-AP agykérgi működésre gyakorolt hatásában kiemelt szerepe van a megnövekedett szinaptikus ingerületátvitelnek, ami specifikus és aspecifikus módon is gátolható. Feltételezhetően a kis affinitású specifikus vegyületek *in vivo* kevesebb mellékhatással rendelkeznek, így terápiás alkalmazásuk több előnnyel jár.

#### **6.4. Konklúzió**

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az epileptikus aktivitás kialakulásának, lefolyásának menete befolyásolható, kéregterületenként eltérő háttérmechanizmusok révén. A laterális entorhinális kéreg egyoldali szelektív irtásával növekedett a kísérleti állatok rohamrezisztenciája. Tolerancia kialakítható volt ismételt enyhe konvulziók indukálásával is, amit a nem-NMDA-receptorok alegységösszetételének és funkcionális tulajdonságainak megváltozása eredményezett. A limbikus területeken és a szomatoszenzoros kéregben ellentétes változások mentek végbe, de összességében a rohamok ingerküszöbe megemelkedett. A szomatoszenzoros kéreg részletesebb elemzésével a szupragranuláris rétegek görcsaktivitásban betöltött fokozott szerepét sikerült kimutatni. A kialakult görcsaktivitás klasszikus antiepileptikummal gátolható, amihez hasonló hatás kialakítható nem-kompetitív receptor antagonistával is, jóval alacsonyabb effektív dózis mellett.

## ÖSSZEFOGLALÓ

Számos epilepszia szindróma köthető a limbikus- vagy a szenzoros kéreg kóros működéséhez, ezért ezen kéregterületek görcstevékenységben betöltött szerepének vizsgálata kiemelten fontos. Kísérleteinkkel a kóros mértékben szinkronizált – epilepszás – agykérgi tevékenység indukálhatóságában, illetve fenntartásában szerepet játszó háttér folyamatok jobb megismerését kívántuk elősegíteni.

Vizsgálataink során elektrofiziológiai módszereket kombináltunk szövettani eljárásokkal. Krónikus *in vivo* kísérletekben vizsgáltuk az entorhinális kéreg 4-amino-piridin (4-AP) által generált akut rohamtevékenységben betöltött szerepét. Túlélő agyszeleteken tanulmányoztuk az ismételt enyhe konvulziók görcsérzékenységre és glutamáterg receptorrendszerre gyakorolt hatását a limbikus rendszerben és a szomatoszenzoros kéregben. A 4-AP indukált epileptikus aktivitás kialakításában, fenntartásában érintett mikrohálózatok vizsgálatát klasszikus *in vitro* elektrofiziológiai és a belső optikai jelek detektálásán alapuló módszerekkel végeztük el. Külön kísérletsorozatban elemeztük a rohamtevékenység farmakológiai befolyásolhatóságát.

Eredményeinket összefoglalva megállapítottuk, hogy az epileptikus aktivitás kialakulásának, lefolyásának menete kéregterületenként eltérő háttérmechanizmusok révén valósulhat meg. A laterális entorhinális kéreg egyoldali szelektív irtásával növekedett a kísérleti állatok rohamrezisztenciája, bizonyítva a terület fontos szerepét a görcsök iniciálásában. Csökkent rohamkészséget figyeltünk meg ismételt enyhe konvulziók indukálásával is, amiben a nem-NMDA receptorok alegységösszetételének és funkcionális tulajdonságainak megváltozása alapvető szerepet játszik. A limbikus területeken és a szomatoszenzoros kéregben végbemenő változások ugyan nem feltétlenül mutatnak egyirányba, de összességében a rohamok ingerküszöbe megemelkedett, görcsök iránti tolerancia alakult ki. A szomatoszenzoros kéreg részletesebb elektrofiziológiai elemzésével, CSD analízissel és belső optikai jelváltozás vizsgálatával a szupragranuláris rétegek görcsaktivitásában betöltött fokozott szerepét sikerült kimutatni. A kialakult görcsaktivitás klasszikus antiepileptikummal gátolható, a nem-kompetitív receptor antagonistá esetében, jóval alacsonyabb effektív dózis mellett.

## ABSTRACT

Since the neural network of limbic system and thalamocortical circuit is involved in many types of epilepsy syndromes, the investigation of their role in epileptic processes may help us to improve the efficacy of antiepileptic treatment. The main goal of our study was to better understand the underlying mechanisms of epileptic activity generation and maintenance.

In our present study we combined classical electrophysiological methods with the analysis of intrinsic optical signals. Additional results were obtained from histological experiments. The role of entorhinal cortex lesioning in acute generalized convulsions was investigated in chronic *in vivo* electrophysiological experiments. Modification of glutamatergic synaptic processes elicited by mild, repeated 4-aminopyridine induced convulsions was analyzed in limbic structures and in somatosensory cortex. Alteration in the calcium permeability of non-NMDA receptors was also studied in this chronic 4-aminopyridine model. The underlying mechanisms of acute 4-aminopyridine induced epileptic activity were investigated by the analysis of intrinsic optical signals and current source densities in somatosensory cortex, as well as the pharmacological manipulation of epileptic processes.

Summarising our results we can assume that the induction and the maintenance of epileptiform activity possess different underlying mechanisms, depending on the cortical region. Selective unihemispheric lesioning of lateral entorhinal cortex resulted in an increase in seizure tolerance and a decrease in convulsion severity. Rise of seizure tolerance was able to be induced by repetitive mild convulsions. Due to the fact that the limbic system represented higher excitability, the somatosensory cortex and maybe other brain regions showed elevated threshold of seizures. According to our results the subunit composition and calcium permeability changes of non-NMDA receptors are responsible for the above mentioned effects. High importance of supragranular layers in seizure generation was demonstrated in *in vitro* experiments. This kind of epileptic activity can be suppressed by classical antiepileptic drugs as well as with a new generation anticonvulsant, however the effective dose is much lower in the latter case.



## IRODALOMJEGYZÉK

1. Acsady, L., Kamondi, A., Sik, A., Freund, T., Buzsaki, G., (1998) GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus, *J. Neurosci.*, 18, 3386-3403.
2. Acsady, L., Katona, I., Martinez-Guijarro, F.J., Buzsaki, G., Freund, T.F., (2000) Unusual target selectivity of perisomatic inhibitory cells in the hilar region of the rat hippocampus, *J. Neurosci.*, 20, 6907-6919.
3. Aitken, P.G., Fayuk, D., Somjen, G.G., Turner, D.A., (1999) Use of intrinsic optical signals to monitor physiological changes in brain tissue slices, *Methods*, 18, 91-103.
4. Andreasen, M., (2002) Inhibition of slow Ca(2+)-activated K(+) current by 4-aminopyridine in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones, *Br. J. Pharmacol.*, 135, 1013-1025.
5. Andrew, R.D., Jarvis, C.R., Obeidat, A.S., (1999) Potential sources of intrinsic optical signals imaged in live brain slices, *Methods*, 18, 185-96, 179.
6. Aracava, Y., Pereira, E.F., Maelicke, A., Albuquerque, E.X., (2005) Memantine blocks alpha7\* nicotinic acetylcholine receptors more potently than n-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 312, 1195-1205.
7. Ashcroft, F.M. and Gribble, F.M., (2000) New windows on the mechanism of action of K(ATP) channel openers, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21, 439-445.
8. Ayala, G.X. and Tapia, R., (2005) Late N-methyl-D-aspartate receptor blockade rescues hippocampal neurons from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy, *Eur. J. Neurosci.*, 22, 3067-3076.
9. Bannister, A.P., (2005) Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex, *Neurosci. Res.*, 53, 95-103.
10. Barbarosie, M. and Avoli, M., (1997) CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures, *J. Neurosci.*, 17, 9308-9314.
11. Barna, B., Szasz, A., Vilagi, I., Szenté, M., (2000) Anticonvulsive effect of AMPA receptor antagonist GYKI 52466 on 4-aminopyridine-induced cortical ictal activity in rat, *Brain Res. Bull.*, 51, 241-248.
12. Bastrikova, N., Gardner, G.A., Reece, J.M., Jeromin, A., Dudek, S.M., (2008) Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105, 3123-3127.
13. Bennett, J.A. and Dingledine, R., (1995) Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop, *Neuron*, 14, 373-384.
14. Bennett, M.R., (2000) The concept of long term potentiation of transmission at synapses, *Prog. Neurobiol.*, 60, 109-137.
15. Berg, M., Bruhn, T., Johansen, F.F., Diemer, N.H., (1993) Kainic acid-induced seizures and brain damage in the rat: different effects of NMDA- and AMPA receptor agonists, *Pharmacol. Toxicol.*, 73, 262-268.
16. Biella, G., Uva, L., de Curtis, M., (2002) Propagation of neuronal activity along the neocortical-perirhinal-entorhinal pathway in the guinea pig, *J. Neurosci.*, 22, 9972-9979.
17. Bigge, C.F., (1999) Ionotropic glutamate receptors, *Curr. Opin. Biol.*, 3, 441-447.
18. Bleakman, D., Ballyk, B.A., Schoepp, D.D., Palmer, A.J., Bath, C.P., Sharpe, E.F., Woolley, M.L., Bufton, H.R., Kamboj, R.K., Tarnawa, I., Lodge, D., (1996) Activity of 2,3-benzodiazepines at native rat and recombinant human glutamate receptors in vitro: stereospecificity and selectivity profiles, *Neuropharmacology*, 35, 1689-1702.
19. Bliss, T.V. and Collingridge, G.L., (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus, *Nature*, 361, 31-39.

20. Bode-Greuel, K.M., Singer, W., Aldenhoff, J.B., (1987) A current source density analysis of field potentials evoked in slices of visual cortex, *Exp. Brain Res.*, 69, 213-219.
21. Bokor, H., Acsaday, L., Deschenes, M., (2008) Vibrissal responses of thalamic cells that project to the septal columns of the barrel cortex and to the second somatosensory area, *J. Neurosci.*, 28, 5169-5177.
22. Borbely, S., Halasy, K., Somogyvari, Z., Detari, L., Vilagi, I., (2006) Laminar analysis of initiation and spread of epileptiform discharges in three in vitro models, *Brain Res. Bull.*, 69, 161-167.
23. Borbely, S., Dobo, E., Czege, D., Molnar, E., Bakos, M., Szucs, B., Vincze, A., Vilagi, I., Mihaly, A., (2009) Modification of ionotropic glutamate receptor-mediated processes in the rat hippocampus following repeated, brief seizures, *Neuroscience*, 159, 358-368.
24. Braga, M.F., Aroniadou-Anderjaska, V., Post, R.M., Li, H., (2002) Lamotrigine reduces spontaneous and evoked GABAA receptor-mediated synaptic transmission in the basolateral amygdala: implications for its effects in seizure and affective disorders, *Neuropharmacology*, 42, 522-529.
25. Braithwaite, S.P., Meyer, G., Henley, J.M., (2000) Interactions between AMPA receptors and intracellular proteins, *Neuropharmacology*, 39, 919-930.
26. Brivanlou, I.H., Dantzer, J.L., Stevens, C.F., Callaway, E.M., (2004) Topographic specificity of functional connections from hippocampal CA3 to CA1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 2560-2565.
27. Brun, V.H., Leutgeb, S., Wu, H.Q., Schwarcz, R., Witter, M.P., Moser, E.I., Moser, M.B., (2008) Impaired spatial representation in CA1 after lesion of direct input from entorhinal cortex, *Neuron*, 57, 290-302.
28. Buchheim, K., Schuchmann, S., Siegmund, H., Weissinger, F., Heinemann, U., Meierkord, H., (2000) Comparison of intrinsic optical signals associated with low Mg<sup>2+</sup>- and 4-aminopyridine-induced seizure-like events reveals characteristic features in adult rat limbic system, *Epilepsia*, 41, 635-641.
29. Buckmaster, P.S., Zhang, G.F., Yamawaki, R., (2002) Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit, *J. Neurosci.*, 22, 6650-6658.
30. Buzsaki, G., (1996) The hippocampo-neocortical dialogue, *Cereb. Cortex*, 6, 81-92.
31. Catterall, W.A., Dib-Hajj, S., Meisler, M.H., Pietrobon, D., (2008) Inherited neuronal ion channelopathies: new windows on complex neurological diseases, *J. Neurosci.*, 28, 11768-11777.
32. Cavalheiro, E.A., (1995) The pilocarpine model of epilepsy, *Ital. J. Neurol. Sci.*, 16, 33-37.
33. Chagnac-Amitai, Y. and Connors, B.W., (1989) Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition, *J. Neurophysiol.*, 61, 747-758.
34. Chatterton, J.E., Awobuluyi, M., Premkumar, L.S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K.A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S.A., Zhang, D., (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits, *Nature*, 415, 793-798.
35. Chen, H.S. and Lipton, S.A., (1997) Mechanism of memantine block of NMDA-activated channels in rat retinal ganglion cells: uncompetitive antagonism, *J. Physiol.*, 499 ( Pt 1), 27-46.
36. Chen, H.S., Wang, Y.F., Rayudu, P.V., Edgecomb, P., Neill, J.C., Segal, M.M., Lipton, S.A., Jensen, F.E., (1998) Neuroprotective concentrations of the N-methyl-D-aspartate open-channel blocker memantine are effective without cytoplasmic vacuolation following post-ischemic administration and do not block maze learning or long-term potentiation, *Neuroscience*, 86, 1121-1132.
37. Choe, S., (2002) Potassium channel structures, *Nat. Rev. Neurosci.*, 3, 115-121.
38. Ciabarra, A.M., Sullivan, J.M., Gahn, L.G., Pecht, G., Heinemann, S., Sevarino, K.A., (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family, *J. Neurosci.*, 15, 6498-6508.

39. Coenen, A.M. and van Luijtelaar, E.L., (2003) Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats, *Behav. Genet.*, 33, 635-655.
40. Collingridge, G.L., Kehl, S.J., McLennan, H., (1983) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus, *J. Physiol.*, 334, 33-46.
41. Connors, B.W., (1984) Initiation of synchronized neuronal bursting in neocortex, *Nature*, 310, 685-687.
42. Connors, B.W. and Amitai, Y., 1993. Generation of epileptiform discharge by local circuits of neocortex. In: *Epilepsy: Models, Mechanisms, and Concepts*, P.A. Schwartzkroin ed. Cambridge University Press, pp. 388-423.
43. Conti, F. and Weinberg, R.J., (1999) Shaping excitation at glutamatergic synapses, *Trends Neurosci.*, 22, 451-458.
44. Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M., (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11, 327-335.
45. Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R.S., Avoli, M., (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, *J. Neurosci. Methods*, 172, 143-157.
46. D'Arcangelo, G., D'Antuono, M., Tancredi, V., Avoli, M., (2006) Neocortical hyperexcitability in a genetic model of absence seizures and its reduction by levetiracetam, *Epilepsia*, 47, 1144-1152.
47. Danober, L., Deransart, C., Depaulis, A., Vergnes, M., Marescaux, C., (1998) Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat, *Prog. Neurobiol.*, 55, 27-57.
48. Darstein, M., Petralia, R.S., Swanson, G.T., Wenthold, R.J., Heinemann, S.F., (2003) Distribution of kainate receptor subunits at hippocampal mossy fiber synapses, *J. Neurosci.*, 23, 8013-8019.
49. de Curtis, M. and Pare, D., (2004) The rhinal cortices: a wall of inhibition between the neocortex and the hippocampus, *Prog. Neurobiol.*, 74, 101-110.
50. de Guzman, P., D'Antuono, M., Avoli, M., (2004) Initiation of electrographic seizures by neuronal networks in entorhinal and perirhinal cortices in vitro, *Neuroscience*, 123, 875-886.
51. Del Rio, P., Montiel, T., Massieu, L., (2008) Contribution of NMDA and non-NMDA receptors to in vivo glutamate-induced calpain activation in the rat striatum. Relation to neuronal damage, *Neurochem. Res.*, 33, 1475-1483.
52. Deller, T. and Frotscher, M., (1997) Lesion-induced plasticity of central neurons: sprouting of single fibres in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion, *Prog. Neurobiol.*, 53, 687-727.
53. Derkach, V.A., Oh, M.C., Guire, E.S., Soderling, T.R., (2007) Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity, *Nat. Rev. Neurosci.*, 8, 101-113.
54. Deschenes, M., Veinante, P., Zhang, Z.W., (1998) The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity, *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 28, 286-308.
55. Di Filippo, M., Tozzi, A., Costa, C., Belcastro, V., Tantucci, M., Picconi, B., Calabresi, P., (2008) Plasticity and repair in the post-ischemic brain, *Neuropharmacology*, 55, 353-362.
56. Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F., (1999) The glutamate receptor ion channels, *Pharmacol. Rev.*, 51, 7-61.
57. Doczi, J., Banczerowski-Pelyhe, I., Barna, B., Vilagi, I., (1999) Effect of a glutamate receptor antagonist (GYKI 52466) on 4-aminopyridine-induced seizure activity developed in rat cortical slices, *Brain Res. Bull.*, 49, 435-440.
58. Douglas, R. and Martin, K., 1998. Neocortex. In: *The Synaptic Organization of the Brain*, G.M. Shepherd ed. Oxford University Press, New York, pp. 459-509.
59. Doyle, K.P., Simon, R.P., Stenzel-Poore, M.P., (2008) Mechanisms of ischemic brain damage, *Neuropharmacology*, 55, 310-318.

60. Engel, J. and Schwartzkroin, P.A., 2006. What Should Be Modeled? In: Models of Seizures and Epilepsy, A. Pitkanen, P.A. Schwartzkroin, S.L. Moshe eds. Academic Press, pp. 1-14.
61. Erreger, K., Dravid, S.M., Banke, T.G., Wyllie, D.J., Traynelis, S.F., (2005) Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles, *J. Physiol*, 563, 345-358.
62. Fayuk, D., Aitken, P.G., Somjen, G.G., Turner, D.A., (2002) Two different mechanisms underlie reversible, intrinsic optical signals in rat hippocampal slices, *J. Neurophysiol.*, 87, 1924-1937.
63. Federico, P. and MacVicar, B.A., (1996) Imaging the induction and spread of seizure activity in the isolated brain of the guinea pig: the roles of GABA and glutamate receptors, *J. Neurophysiol.*, 76, 3471-3492.
64. Feldmeyer, D., Lubke, J., Sakmann, B., (2006) Efficacy and connectivity of intracolumnar pairs of layer 2/3 pyramidal cells in the barrel cortex of juvenile rats, *J. Physiol*, 575, 583-602.
65. Fisher, R.S., (1989) Animal models of the epilepsies, *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 14, 245-278.
66. Fragozo-Veloz, J., Massieu, L., Alvarado, R., Tapia, R., (1990) Seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine, and their potentiation by nifedipine, *Eur. J. Pharmacol.*, 178, 275-284.
67. Franceschetti, S., Buzio, S., Sancini, G., Panzica, F., Avanzini, G., (1993) Expression of intrinsic bursting properties in neurons of maturing sensorimotor cortex, *Neurosci. Lett.*, 162, 25-28.
68. Frankiewicz, T. and Parsons, C.G., (1999) Memantine restores long term potentiation impaired by tonic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation following reduction of Mg<sup>2+</sup> in hippocampal slices, *Neuropharmacology*, 38, 1253-1259.
69. Friedman, L.K., Pellegrini-Giampietro, D.E., Sperber, E.F., Bennett, M.V., Moshe, S.L., Zukin, R.S., (1994) Kainate-induced status epilepticus alters glutamate and GABAA receptor gene expression in adult rat hippocampus: an *in situ* hybridization study, *J. Neurosci.*, 14, 2697-2707.
70. Friedman, L.K. and Veliskova, J., (1998) GluR2 hippocampal knockdown reveals developmental regulation of epileptogenicity and neurodegeneration, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 61, 224-231.
71. Gashi, E., Avallone, J., Webster, T., Friedman, L.K., (2007) Altered excitability and distribution of NMDA receptor subunit proteins in cortical layers of rat pups following multiple perinatal seizures, *Brain Res.*, 1145, 56-65.
72. Geiger, J.R., Melcher, T., Koh, D.S., Sakmann, B., Seeburg, P.H., Jonas, P., Monyer, H., (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS, *Neuron*, 15, 193-204.
73. Gielen, M., Siegler, R.B., Mony, L., Johnson, J.W., Paoletti, P., (2009) Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits, *Nature*, 459, 703-707.
74. Gogas, K.R., (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: NR2B receptor antagonists, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 6, 68-74.
75. Gottlieb, J.P. and Keller, A., (1997) Intrinsic circuitry and physiological properties of pyramidal neurons in rat barrel cortex, *Exp. Brain Res.*, 115, 47-60.
76. Greger, I.H. and Esteban, J.A., (2007) AMPA receptor biogenesis and trafficking, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 17, 289-297.
77. Grooms, S.Y., Opitz, T., Bennett, M.V., Zukin, R.S., (2000) Status epilepticus decreases glutamate receptor 2 mRNA and protein expression in hippocampal pyramidal cells before neuronal death, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 3631-3636.
78. Gu, Y., Ge, S.Y., Ruan, D.Y., (2004) Effect of 4-aminopyridine on synaptic transmission in rat hippocampal slices, *Brain Res.*, 1006, 225-232.

79. Gulyás-Kovács A., Dóczy J., Tarnawa, I., Détári L., Banczerowski-Pelyhe I., Világi I. Comparison of spontaneous and evoked epileptiform activity in three in vitro epilepsy models. 2002.  
Ref Type: Generic
80. Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.B., Moser, E.I., (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex, *Nature*, 436, 801-806.
81. Harich, S., Kinfe, T., Koch, M., Schwabe, K., (2008) Neonatal lesions of the entorhinal cortex induce long-term changes of limbic brain regions and maze learning deficits in adult rats, *Neuroscience*, 153, 918-928.
82. Hebb, D.O., 1949, *The Organization of Behaviour*, John Wiley and Sons Inc., New York.
83. Heinemann, U., Kann, O., Schuchmann, S., 2006. An Overview of In Vitro Seizure Models in Acute and Organotypic Slices. In: *Models of Seizures and Epilepsy*, A. Pitkanen, P.A. Schwartzkroin, S.L. Moshe eds. Academic Press, pp. 35-44.
84. Herin, G.A. and Aizenman, E., (2004) Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function, *Eur. J. Pharmacol.*, 500, 101-111.
85. Hestrin, S. and Galarreta, M., (2005) Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons, *Trends Neurosci.*, 28, 304-309.
86. Hoffman, S.N. and Prince, D.A., (1995) Epileptogenesis in immature neocortical slices induced by 4-aminopyridine, *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 85, 64-70.
87. Hollmann, M., Hartley, M., Heinemann, S., (1991) Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition, *Science*, 252, 851-853.
88. Holtkamp, M., Buchheim, K., Siegmund, H., Meierkord, H., (2003) Optical imaging reveals reduced seizure spread and propagation velocities in aged rat brain in vitro, *Neurobiol. Aging*, 24, 345-353.
89. Hubel, D.H. and Wiesel, T.N., (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex, *J. Physiol*, 160, 106-154.
90. Huguenard, J.R. and McCormick, D.A., (2007) Thalamic synchrony and dynamic regulation of global forebrain oscillations, *Trends Neurosci.*, 30, 350-356.
91. Isaac, J.T., Ashby, M., McBain, C.J., (2007) The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity, *Neuron*, 54, 859-871.
92. Jane, D.E., Lodge, D., Collingridge, G.L., (2009) Kainate receptors: Pharmacology, function and therapeutic potential, *Neuropharmacology*, 56, 90-113.
93. Jia, Y.H., Zhu, X., Li, S.Y., Ni, J.H., Jia, H.T., (2006) Kainate exposure suppresses activation of GluR2 subunit promoter in primary cultured cerebral cortical neurons through induction of RE1-silencing transcription factor, *Neurosci. Lett.*, 403, 103-108.
94. Johansen, T.H., Chaudhary, A., Verdoorn, T.A., (1995) Interactions among GYKI-52466, cyclothiazide, and aniracetam at recombinant AMPA and kainate receptors, *Mol. Pharmacol.*, 48, 946-955.
95. Johnson, J.W. and Ascher, P., (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons, *Nature*, 325, 529-531.
96. Johnson, J.W. and Kotermanski, S.E., (2006) Mechanism of action of memantine, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 6, 61-67.
97. Johnston, D. and Amaral, D.G., 1998. Hippocampus. In: *The Synaptic Organization of the Brain*, G.M. Shepherd ed. Oxford University Press, New York, pp. 417-458.
98. Jones, R.S. and Heinemann, U., (1987) Pre- and postsynaptic K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> fluxes in area CA1 of the rat hippocampus in vitro: effects of Ni<sup>2+</sup>, TEA and 4-AP, *Exp. Brain Res.*, 68, 205-209.
99. Kadish, I. and van Groen, T., (2003) Differences in lesion-induced hippocampal plasticity between mice and rats, *Neuroscience*, 116, 499-509.
100. Kawaguchi, Y. and Kondo, S., (2002) Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex, *J. Neurocytol.*, 31, 277-287.

101. Kenan-Vaknin, G. and Teyler, T.J., (1994) Laminar pattern of synaptic activity in rat primary visual cortex: comparison of in vivo and in vitro studies employing the current source density analysis, *Brain Res.*, 635, 37-48.
102. Kew, J.N. and Kemp, J.A., (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology, *Psychopharmacology (Berl)*, 179, 4-29.
103. Kharazia, V.N. and Prince, D.A., (2001) Changes of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate receptors in layer V of epileptogenic, chronically isolated rat neocortex, *Neuroscience*, 102, 23-34.
104. Kohling, R., Qu, M., Zilles, K., Speckmann, E.J., (1999) Current-source-density profiles associated with sharp waves in human epileptic neocortical tissue, *Neuroscience*, 94, 1039-1050.
105. Kohn, A., Metz, C., Quibrera, M., Tommerdahl, M.A., Whitsel, B.L., (2000) Functional neocortical microcircuitry demonstrated with intrinsic signal optical imaging in vitro, *Neuroscience*, 95, 51-62.
106. Kotti, T., Riekkinen, P.J., Sr., Miettinen, R., (1997) Characterization of target cells for aberrant mossy fiber collaterals in the dentate gyrus of epileptic rat, *Exp. Neurol.*, 146, 323-330.
107. Kubova, H., Vilagi, I., Mikulecka, A., Mares, P., (1997) Non-NMDA receptor antagonist GYKI 52466 suppresses cortical afterdischarges in immature rats, *Eur. J. Pharmacol.*, 333, 17-26.
108. Landmark, C.J., (2007) Targets for antiepileptic drugs in the synapse, *Med. Sci. Monit.*, 13, RA1-RA7.
109. Langdon, R.B. and Sur, M., (1990) Components of field potentials evoked by white matter stimulation in isolated slices of primary visual cortex: spatial distributions and synaptic order, *J. Neurophysiol.*, 64, 1484-1501.
110. Lapchak, P.A., (2006) Memantine, an uncompetitive low affinity NMDA open-channel antagonist improves clinical rating scores in a multiple infarct embolic stroke model in rabbits, *Brain Res.*, 1088, 141-147.
111. Lason, W., Turchan, J., Przewlocka, B., Labuz, D., Mika, J., Przewlocki, R., (1997) Seizure-related changes in the glutamate R2 and R5 receptor genes expression in the rat hippocampal formation, *J. Neural Transm.*, 104, 125-133.
112. Le Bon-Jego, M. and Yuste, R., (2007) Persistently active, pacemaker-like neurons in neocortex, *Front Neurosci.*, 1, 123-129.
113. Lindquist, C.E., Dalziel, J.E., Cromer, B.A., Birnir, B., (2004) Penicillin blocks human alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 1 gamma 2S GABAA channels that open spontaneously, *Eur. J. Pharmacol.*, 496, 23-32.
114. Lingenhohl, K. and Finch, D.M., (1991) Morphological characterization of rat entorhinal neurons in vivo: soma-dendritic structure and axonal domains, *Exp. Brain Res.*, 84, 57-74.
115. Lisman, J.E., (1999) Relating hippocampal circuitry to function: recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions, *Neuron*, 22, 233-242.
116. Loftis, J.M. and Janowsky, A., (2003) The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications, *Pharmacol. Ther.*, 97, 55-85.
117. Loscher, W. and Honack, D., (1994) Effects of the non-NMDA antagonists NBQX and the 2,3-benzodiazepine GYKI 52466 on different seizure types in mice: comparison with diazepam and interactions with flumazenil, *Br. J. Pharmacol.*, 113, 1349-1357.
118. Lubke, J. and Feldmeyer, D., (2007) Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex, *Brain Struct. Funct.*, 212, 3-17.
119. Lujan, R., Shigemoto, R., Lopez-Bendito, G., (2005) Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain, *Neuroscience*, 130, 567-580.
120. Lynch, M.A., (2004) Long-term potentiation and memory, *Physiol Rev.*, 84, 87-136.

121. Malenka, R.C., 1995. Synaptic plasticity in hippocampus and neocortex: a comparison. In: *The Cortical Neuron*, M.J. Gutnick, I. Mody eds. Oxford University Press, New York, pp. 98-108.
122. Malva, J.O., Carvalho, A.P., Carvalho, C.M., (1998) Kainate receptors in hippocampal CA3 subregion: evidence for a role in regulating neurotransmitter release, *Neurochem. Int.*, 32, 1-6.
123. Manns, I.D., Sakmann, B., Brecht, M., (2004) Sub- and suprathreshold receptive field properties of pyramidal neurones in layers 5A and 5B of rat somatosensory barrel cortex, *J. Physiol.*, 556, 601-622.
124. Marescaux, C., Vergnes, M., Depaulis, A., (1992) Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg—a review, *J. Neural Transm. Suppl.*, 35, 37-69.
125. Martin, S., Nishimune, A., Mellor, J.R., Henley, J.M., (2007) SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission, *Nature*, 447, 321-325.
126. Mathern, G.W., Adelson, P.D., Cahan, L.D., Leite, J.P., (2002) Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited, *Prog. Brain Res.*, 135, 237-251.
127. McBain, C.J., (2008) Differential mechanisms of transmission and plasticity at mossy fiber synapses, *Prog. Brain Res.*, 169, 225-240.
128. Medina-Ceja, L., Morales-Villagran, A., Tapia, R., (2000) Action of 4-aminopyridine on extracellular amino acids in hippocampus and entorhinal cortex: a dual microdialysis and electroencephalographic study in awake rats, *Brain Res. Bull.*, 53, 255-262.
129. Meierkord, H., Schuchmann, S., Buchheim, K., Heinemann, U., (1997) Optical imaging of low Mg(2+)-induced spontaneous epileptiform activity in combined rat entorhinal cortex-hippocampal slices, *Neuroreport*, 8, 1857-1861.
130. Mello, L.E., Cavalheiro, E.A., Tan, A.M., Kupfer, W.R., Pretorius, J.K., Babb, T.L., Finch, D.M., (1993) Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting, *Epilepsia*, 34, 985-995.
131. Mihaly, A., Borbely, S., Vilagi, I., Detari, L., Weiczner, R., Zador, Z., Krisztin-Peva, B., Bagosi, A., Kopniczky, Z., Zador, E., (2005) Neocortical c-fos mRNA transcription in repeated, brief, acute seizures: is c-fos a coincidence detector?, *Int. J. Mol. Med.*, 15, 481-486.
132. Moddel, G., Jacobson, B., Ying, Z., Janigro, D., Bingaman, W., Gonzalez-Martinez, J., Kellinghaus, C., Prayson, R.A., Najm, I.M., (2005) The NMDA receptor NR2B subunit contributes to epileptogenesis in human cortical dysplasia, *Brain Res.*, 1046, 10-23.
133. Mody, I. and Pearce, R.A., (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors, *Trends Neurosci.*, 27, 569-575.
134. Morales-Villagran, A. and Tapia, R., (1996) Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo, *Neurochem. Int.*, 28, 35-40.
135. Mountcastle, V.B., (1957) Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex, *J. Neurophysiol.*, 20, 408-434.
136. Myhrer, T., Enger, S., Aas, P., (2008) Anticonvulsant impact of lesions in the ventrolateral forebrain of rats challenged with soman, *Brain Res.*, 1226, 241-247.
137. Nadler, J.V., Perry, B.W., Cotman, C.W., (1978) Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells, *Nature*, 271, 676-677.
138. Nishi, M., Hinds, H., Lu, H.P., Kawata, M., Hayashi, Y., (2001) Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner, *J. Neurosci.*, 21, RC185.
139. Nissinen, J., Large, C.H., Stratton, S.C., Pitkanen, A., (2004) Effect of lamotrigine treatment on epileptogenesis: an experimental study in rat, *Epilepsy Res.*, 58, 119-132.
140. Oguro, K., Oguro, N., Kojima, T., Grooms, S.Y., Calderone, A., Zheng, X., Bennett, M.V., Zukin, R.S., (1999) Knockdown of AMPA receptor GluR2 expression causes delayed neurodegeneration and increases damage by sublethal ischemia in hippocampal CA1 and CA3 neurons, *J. Neurosci.*, 19, 9218-9227.

141. Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K., (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system, *Prog. Neurobiol.*, 54, 581-618.
142. Paoletti, P. and Neyton, J., (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 7, 39-47.
143. Pare, D., (2004) Presynaptic induction and expression of NMDA-dependent LTP, *Trends Neurosci.*, 27, 440-441.
144. Park, E.H. and Durand, D.M., (2006) Role of potassium lateral diffusion in non-synaptic epilepsy: a computational study, *J. Theor. Biol.*, 238, 666-682.
145. Parsons, C.G., Danysz, W., Quack, G., (1999) Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data, *Neuropharmacology*, 38, 735-767.
146. Parsons, C.G., Stoffler, A., Danysz, W., (2007) Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse, *Neuropharmacology*, 53, 699-723.
147. Pascual-Marqui, R.D., (1999) Review of methods for solving the EEG inverse problem, *International Journal of Bioelectromagnetism*, 1, 75-86.
148. Pellegrini-Giampietro, D.E., Gorter, J.A., Bennett, M.V., Zukin, R.S., (1997) The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders, *Trends Neurosci.*, 20, 464-470.
149. Pena, F., Bargas, J., Tapia, R., (2002) Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine *in vivo*, *Neuropharmacology*, 42, 807-812.
150. Petersen, C.C., (2007) The functional organization of the barrel cortex, *Neuron*, 56, 339-355.
151. Pickard, L., Noel, J., Henley, J.M., Collingridge, G.L., Molnar, E., (2000) Developmental changes in synaptic AMPA and NMDA receptor distribution and AMPA receptor subunit composition in living hippocampal neurons, *J. Neurosci.*, 20, 7922-7931.
152. Pierret, T., Lavallee, P., Deschenes, M., (2000) Parallel streams for the relay of vibrissal information through thalamic barreloids, *J. Neurosci.*, 20, 7455-7462.
153. Pinheiro, P.S., Rodrigues, R.J., Rebola, N., Xapelli, S., Oliveira, C.R., Malva, J.O., (2005) Presynaptic kainate receptors are localized close to release sites in rat hippocampal synapses, *Neurochem. Int.*, 47, 309-316.
154. Pisani, A., Bonsi, P., Martella, G., De, P.C., Costa, C., Pisani, F., Bernardi, G., Calabresi, P., (2004) Intracellular calcium increase in epileptiform activity: modulation by levetiracetam and lamotrigine, *Epilepsia*, 45, 719-728.
155. Pongs, O., (1999) Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement, *FEBS Lett.*, 452, 31-35.
156. Powell, K.L., Kyi, M., Reid, C.A., Paradiso, L., D'Abaco, G.M., Kaye, A.H., Foote, S.J., O'Brien, T.J., (2008) Genetic absence epilepsy rats from Strasbourg have increased corticothalamic expression of stargazin, *Neurobiol. Dis.*, 31, 261-265.
157. Prescott, C., Weeks, A.M., Staley, K.J., Partin, K.M., (2006) Kynurenic acid has a dual action on AMPA receptor responses, *Neurosci. Lett.*, 402, 108-112.
158. Pruss, R.M., Akeson, R.L., Racke, M.M., Wilburn, J.L., (1991) Agonist-activated cobalt uptake identifies divalent cation-permeable kainate receptors on neurons and glial cells, *Neuron*, 7, 509-518.
159. Puranam, R.S. and McNamara, J.O., (1999) Seizure disorders in mutant mice: relevance to human epilepsies, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 9, 281-287.
160. Racine, R.J., (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 32, 281-294.
161. Sarkisian, M.R., (2001) Overview of the Current Animal Models for Human Seizure and Epileptic Disorders, *Epilepsy Behav.*, 2, 201-216.
162. Sauer, D., (1993) EAA Receptors and excitotoxicity, *DN&P*, 6, 88-94.



163. Scharfman, H.E., Hodgkins, P.S., Lee, S.C., Schwarcz, R., (1999) Quantitative differences in the effects of de novo produced and exogenous kynurenic acid in rat brain slices, *Neurosci. Lett.*, 274, 111-114.
164. Schubert, D., Kotter, R., Staiger, J.F., (2007) Mapping functional connectivity in barrel-related columns reveals layer- and cell type-specific microcircuits, *Brain Struct. Funct.*, 212, 107-119.
165. Sheth, S., Nemoto, M., Guiou, M., Walker, M., Pouratian, N., Toga, A.W., (2003) Evaluation of coupling between optical intrinsic signals and neuronal activity in rat somatosensory cortex, *Neuroimage.*, 19, 884-894.
166. Silva, A.V., Regondi, M.C., Cipelletti, B., Frassoni, C., Cavalheiro, E.A., Spreafico, R., (2005) Neocortical and hippocampal changes after multiple pilocarpine-induced status epilepticus in rats, *Epilepsia*, 46, 636-642.
167. Skoglund, T.S., Pascher, R., Berthold, C.H., (1996) Aspects of the quantitative analysis of neurons in the cerebral cortex, *J. Neurosci. Methods*, 70, 201-210.
168. Sloviter, R.S., (1992) Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats, *Neurosci. Lett.*, 137, 91-96.
169. Snead, O.C., III, (1988) gamma-Hydroxybutyrate model of generalized absence seizures: further characterization and comparison with other absence models, *Epilepsia*, 29, 361-368.
170. Somjen, G.G., 2004. Ion Fluxes during Spreading Depression. In: *Ions in the Brain - Normal Function, Seizures, and Stroke*, G.G. Somjen ed. Oxford University Press, New York, pp. 270-284.
171. Sommer, B. and Seeburg, P.H., (1992) Glutamate receptor channels: novel properties and new clones, *Trends Pharmacol. Sci.*, 13, 291-296.
172. Son, H., Hawkins, R.D., Martin, K., Kiebler, M., Huang, P.L., Fishman, M.C., Kandel, E.R., (1996) Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase, *Cell*, 87, 1015-1023.
173. Soto, D., Coombs, I.D., Kelly, L., Farrant, M., Cull-Candy, S.G., (2007) Stargazin attenuates intracellular polyamine block of calcium-permeable AMPA receptors, *Nat. Neurosci.*, 10, 1260-1267.
174. Stone, T.W. and Addae, J.I., (2002) The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection, *Eur. J. Pharmacol.*, 447, 285-296.
175. Stricker, N.L. and Haganir, R.L., 2002. AMPA/kainate receptors. In: *Receptor and Ion-Channel Trafficking: Cell Biology of Ligand-Gated and Voltage-Sensitive Ion Channels*, S.J. Moss, J. Henley eds. Oxford University Press, New York, pp. 131-155.
176. Sutor, B. and Hablitz, J.J., (1989) EPSPs in rat neocortical neurons in vitro. II. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in the generation of EPSPs, *J. Neurophysiol.*, 61, 621-634.
177. Swindale, N.V., (1990) Is the cerebral cortex modular?, *Trends Neurosci.*, 13, 487-492.
178. Sykova, E. and Chvatal, A., (2000) Glial cells and volume transmission in the CNS, *Neurochem. Int.*, 36, 397-409.
179. Szentagothai, J., (1975) The 'module-concept' in cerebral cortex architecture, *Brain Res.*, 95, 475-496.
180. Talley, E.M., Solorzano, G., Depaulis, A., Perez-Reyes, E., Bayliss, D.A., (2000) Low-voltage-activated calcium channel subunit expression in a genetic model of absence epilepsy in the rat, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 75, 159-165.
181. Tao, L., Masri, D., Hrabetova, S., Nicholson, C., (2002) Light scattering in rat neocortical slices differs during spreading depression and ischemia, *Brain Res.*, 952, 290-300.
182. Tarnawa, I., Engberg, I., Flatman, J., Lubec, G., Rosenthal, G., (1990a), GYKI 52466, an inhibitor of spinal reflexes is a potent quisqualate antagonist, ESCOM Science Publishers B. V., Leiden, 546 pp.

183. Tarnawa, I., Farkas, S., Berzsenyi, P., Patfalusi, M., Andrási, F., (1990b) Reflex inhibitory action of a non-NMDA type excitatory amino acid antagonist, GYKI 52466, *Acta Physiol Hung.*, 75 Suppl, 277-278.
184. Thompson, S.M., Madison, D.V., Mody, I., 1995. Synaptic actions of amino acid neurotransmitters. In: *The Cortical Neuron*, M.J. Gutnick, I. Mody eds. Oxford University Press, New York, pp. 80-97.
185. Thomson, A.M. and Bannister, A.P., (1998) Postsynaptic pyramidal target selection by descending layer III pyramidal axons: dual intracellular recordings and biocytin filling in slices of rat neocortex, *Neuroscience*, 84, 669-683.
186. Tomczyk, T., Haberek, G., Zuchora, B., Jaroslawska-Zych, A., Kowalczyk, M.S., Wielosz, M., Urbanska, E.M., (2007) Enhanced glutamatergic transmission reduces the anticonvulsant potential of lamotrigine but not of felbamate against tonic-clonic seizures, *Pharmacol. Rep.*, 59, 462-466.
187. Tonnes, J., Stierli, B., Cerletti, C., Behrmann, J.T., Molnar, E., Streit, P., (1999) Regional distribution and developmental changes of GluR1-flop protein revealed by monoclonal antibody in rat brain, *J. Neurochem.*, 73, 2195-2205.
188. Touret, M., Parrot, S., Denoroy, L., Belin, M.F., Didier-Bazes, M., (2007) Glutamatergic alterations in the cortex of genetic absence epilepsy rats, *BMC Neurosci.*, 8, 69.
189. Tracey, D., 2004. Somatosensory System. In: *The Rat Nervous System*, G. Paxinos ed. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 797-815.
190. Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., Turski, L., (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study, *Behav. Brain Res.*, 9, 315-335.
191. van Luijtelaar, E.L. and Coenen, A.M., (1986) Two types of electrocortical paroxysms in an inbred strain of rats, *Neurosci. Lett.*, 70, 393-397.
192. Varga, V., Jenel, Z., Janaky, R., Saransaari, P., Oja, S.S., (1997) Glutathione is an endogenous ligand of rat brain N-methyl-D-aspartate (NMDA) and 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors, *Neurochem. Res.*, 22, 1165-1171.
193. Versteeg, D.H., Heemskerk, F.M., Spierenburg, H.A., de Graan, P.N., Schrama, L.H., (1995) 4-Aminopyridine differentially affects the spontaneous release of radiolabelled transmitters from rat brain slices *in vitro*, *Brain Res.*, 686, 233-238.
194. Vilagi, I., Klapka, N., Luhmann, H.J., (2001) Optical recording of spreading depression in rat neocortical slices, *Brain Res.*, 898, 288-296.
195. Vilagi, I., Takacs, J., Gulyas-Kovacs, A., Banczerowski-Pelyhe, I., Tarnawa, I., (2002) Protective effect of the antiepileptic drug candidate talampanel against AMPA-induced striatal neurotoxicity in neonatal rats, *Brain Res. Bull.*, 59, 35-40.
196. Vilagi, I., Dobo, E., Borbely, S., Czege, D., Molnar, E., Mihaly, A., (2009) Repeated 4-aminopyridine induced seizures diminish the efficacy of glutamatergic transmission in the neocortex, *Exp. Neurol.*
197. Villers-Sidani, E., Tahvildari, B., Alonso, A., (2004) Synaptic activation patterns of the perirhinal-entorhinal inter-connections, *Neuroscience*, 129, 255-265.
198. von Wegerer, J., Hesslinger, B., Berger, M., Walden, J., (1997) A calcium antagonistic effect of the new antiepileptic drug lamotrigine, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 7, 77-81.
199. Waite, P.M.E., 2004. Trigeminal Sensory System. In: *The Rat Nervous System*, G. Paxinos ed. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 817-851.
200. Wei, A., Jegla, T., Salkoff, L., (1996) Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project, *Neuropharmacology*, 35, 805-829.
201. Weiczner, R., Krisztin-Peva, B., Mihaly, A., (2008) Blockade of AMPA-receptors attenuates 4-aminopyridine seizures, decreases the activation of inhibitory neurons but is ineffective against seizure-related astrocytic swelling, *Epilepsy Res.*, 78, 22-32.
202. Weissingner, F., Buchheim, K., Siegmund, H., Heinemann, U., Meierkord, H., (2000) Optical imaging reveals characteristic seizure onsets, spread patterns, and propagation

- velocities in hippocampal-entorhinal cortex slices of juvenile rats, *Neurobiol. Dis.*, 7, 286-298.
203. Weissinger, F., Buchheim, K., Siegmund, H., Meierkord, H., (2005) Seizure spread through the life cycle: optical imaging in combined brain slices from immature, adult, and senile rats *in vitro*, *Neurobiol. Dis.*, 19, 84-95.
204. Wilding, T.J. and Huettner, J.E., (1995) Differential antagonism of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazolepropionic acid-preferring and kainate-preferring receptors by 2,3-benzodiazepines, *Mol. Pharmacol.*, 47, 582-587.
205. Wisden, W. and Seeburg, P.H., (1993) A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain, *J. Neurosci.*, 13, 3582-3598.
206. Witte, O.W., Niermann, H., Holthoff, K., (2001) Cell swelling and ion redistribution assessed with intrinsic optical signals, *An. Acad. Bras. Cienc.*, 73, 337-350.
207. Witter, M.P. and Amaral, D.G., 2004. Hippocampal Formation. In: *The Rat Nervous System*, G. Paxinos ed. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 635-704.
208. Witter, M.P. and Moser, E.I., (2006) Spatial representation and the architecture of the entorhinal cortex, *Trends Neurosci.*, 29, 671-678.
209. Wong, M., Wozniak, D.F., Yamada, K.A., (2003) An animal model of generalized nonconvulsive status epilepticus: immediate characteristics and long-term effects, *Exp. Neurol.*, 183, 87-99.
210. Woolsey, T.A. and Van der, L.H., (1970) The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units, *Brain Res.*, 17, 205-242.
211. Wu, H.Q. and Schwarcz, R., (1996) Seizure activity causes elevation of endogenous extracellular kynurenic acid in the rat brain, *Brain Res. Bull.*, 39, 155-162.
212. Xu, X. and Callaway, E.M., (2009) Laminar specificity of functional input to distinct types of inhibitory cortical neurons, *J. Neurosci.*, 29, 70-85.
213. Yamada, K.A. and Turetsky, D.M., (1996) Allosteric interactions between cyclothiazide and AMPA/kainate receptor antagonists, *Br. J. Pharmacol.*, 117, 1663-1672.
214. Yamaguchi, S., Donevan, S.D., Rogawski, M.A., (1993) Anticonvulsant activity of AMPA/kainate antagonists: comparison of GYKI 52466 and NBOX in maximal electroshock and chemoconvulsant seizure models, *Epilepsy Res.*, 15, 179-184.
215. Yang, L. and Benardo, L.S., (1997) Epileptogenesis following neocortical trauma from two sources of disinhibition, *J. Neurophysiol.*, 78, 2804-2810.
216. Yang, L. and Benardo, L.S., (2002) Laminar properties of 4-aminopyridine-induced synchronous network activities in rat neocortex, *Neuroscience*, 111, 303-313.
217. Yuan, L.L. and Chen, X., (2006) Diversity of potassium channels in neuronal dendrites, *Prog. Neurobiol.*, 78, 374-389.
218. Yuen, E.Y., Gu, Z., Yan, Z., (2007) Calpain regulation of AMPA receptor channels in cortical pyramidal neurons, *J. Physiol*, 580, 241-254.
219. Zaitsev, A.V., Gonzalez-Burgos, G., Povysheva, N.V., Kroner, S., Lewis, D.A., Krimer, L.S., (2005) Localization of calcium-binding proteins in physiologically and morphologically characterized interneurons of monkey dorsolateral prefrontal cortex, *Cereb. Cortex*, 15, 1178-1186.
220. Zhu, L.J., Chen, Z., Zhang, L.S., Xu, S.J., Xu, A.J., Luo, J.H., (2004) Spatiotemporal changes of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit levels in rats with pentylenetetrazole-induced seizures, *Neurosci. Lett.*, 356, 53-56.

## 1. FÜGGELÉK

### A belső optikai jelek vizsgálata

A doktori értekezés részét képezi egy, a belső optikai jelek mérésén alapuló kísérletsorozat. Mivel az eljárás egyelőre nem kimondottan ismert, szükségét éreztem a metodika alapos leírását elkészíteni, viszont az irodalmi áttekintés gondolatmenetébe ez a téma kevésbé illeszkedik, ezért külön függelékben került elhelyezésre.

Az élő szövet belső optikai jeleinek (IOS; intrinsic optical signal) vizsgálata során a preparátum optikai tulajdonságainak megváltozását mérjük. Mivel minden szövet, még a csontszövet is bizonyos mértékig átjárható a fény számára, azon élettani folyamatok, melyek képesek a szövetek optikai tulajdonságait megváltoztatni, a megfelelő mérőberendezésekkel nyomon követhetők. Az átjutó- és a visszaverődő fény megváltozásai is nyomon követhetők, ezen folyamatok szoros kapcsoltságban állnak egymással.

Amikor a fény áthalad két különböző törésmutatójú közeg határán egy része visszaverődik, más része belépve az új közegbe fénytörést szenved. Az átjutó fény mennyiségét több tényező befolyásolja, ezek a visszaverődés, fénytörés, abszorpció és a szóródás. A közeg fénytani tulajdonsága, jellemzően a törésmutatója határozza meg az átjutó fény mennyiségét. A törésmutató számszerűsítve fejezi ki, hogy vákuumból adott közegbe belépve a fény haladási sebessége mennyire csökken le, és ezzel összhangban, mennyire hajlik el. A új közegben haladva a fény abszorbeálódhat (más energiaformává alakul át) vagy - inhomogén közegben - szóródhat a részecskéknél ütközve. Oldatok, mint például a sejt plazma esetében az átjutó fény mennyiségét főleg az ozmotikus viszonyok határozzák meg. A görcsaktivitás és sok más erős aktivitás jelentős sejtthártyán keresztüli ionmozgásokkal jár, amit általában vízmozgás is követ. Emiatt a makromolekulák koncentrációja megváltozhat, és az oldat törésmutatója is változni fog, akárcsak a fényszóródás mértéke (Aitken és mtsai., 1999).

Mind fiziológiás mind patológiás idegrendszeri folyamatok vizsgálatára használják ezt a módszert. Túlélő agyseletben, és élő állatban más-más tényezők állhatnak a mért aktivitásváltozás hátterében.

*In vivo*, élő preparátumokban az optikai tulajdonságok módosulását elsősorban az agyi vérkeringés megváltozása okozza, az IOS változásokat jellemzően a visszaverődő fény mérésével detektálják. A vizsgálati területen átáramló vér mennyisége mellett a jelen lévő hemoglobin által megkötött oxigén mennyisége is legalább annyira fontos tényező, mivel a deoxi-hemoglobin több fényt abszorbeál mint az oxí-hemoglobin (Sheth és mtsai., 2003; Witte és mtsai., 2001). A vérkeringés lokális eltérésein kívül nagy jelentősége van még a sejttes folyamatoknak is.

Ez utóbbi jelenség *in vitro* agyszövet preparátumokban kiemelten fontos, mivel a vérkeringés hiányában egyedüli tényezőként határozza meg az optikai jelek megváltozásait (Witte és mtsai., 2001). Az idegsejtek élettani folyamatai több módon is befolyásolhatják a szövet optikai tulajdonságait. A sejtmembránon keresztüli ionmozgásoknak, illetve ennek következményeként végbemenő passzív vízmozgásoknak köszönhetően a sejtek duzzadási-zsugorodási folyamatai közvetlenül befolyásolják a fénytörést. Másik lehetséges mechanizmus, hogy a vizeterek térfogatának megváltozása az extra- és intracelluláris tér törésmutatóját módosítja, illetve a jelenlévő makromolekulák koncentrációváltozása a szóródás mértékét befolyásolja. A sejtmembrán lipid kettősrétegének ozmolaritás-függő törésmutató változása szintén jelentős tényező lehet az optikai jel kialakulásában, bár ez utóbbi jelenség okára még nincs magyarázat (Aitken és mtsai., 1999; Andrew és mtsai., 1999). A jelenség megértését bonyolítja, hogy nem kizárólag az idegsejtek sejttestében mehetnek végbe az előbb leírt folyamatok, hanem a dendrittüskékben, mitokondriumokban és egyéb sejtorganelumokban, valamint gliasejtekben is lejátszódhatnak (Andrew és mtsai., 1999; Sykova és Chvátal, 2000).

A sejtek alakváltozásának optikai jelek kialakulásában betöltött szerepét intenzíven kutatják és számos eredmény született már ezzel kapcsolatban (Somjen, 2004). A sejtduzzadásban feltételezhetően a szinaptikus aktiváció jelentős szereppel bír, mivel az ingerlésre adott optikai válasz blokkolható  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes közegben. Az optikai jelek kialakulása gátolható furoszemid segítségével is, ami a gliasejtek felszínén kifejeződő/megjelenő  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  szimporter működését gátolja (Andrew és mtsai., 1999; Witte és mtsai., 2001), ezzel bizonyítva a gliasejtek fontos szerepét. Az idegsejtek duzzadási folyamatainak jelentőségét mutatja, hogy glutamát agonisták hatására hippocampusban kialakuló optikai jelek nem gátolhatók furoszemiddel és a kialakuló

mintázat lamináris (Andrew és mtsai., 1999), a kálium-kloriddal kiváltott optikai denzitás változás pedig hatékonyan gátolható glutaminsav antagonistákkal (Világi és mtsai., 2001). A sejtduzzadás mértéke csökkenthető mannitol segítségével. Ez a vegyület nem képes átjutni a sejtmembránon emiatt képes visszatartani az extracelluláris tér víztartalmát (Witte és mtsai., 2001).

Az *in vitro* preparátumok esetén több vizsgálati módszer kidolgozásra került. Léteznek a szöveten áthaladó fény megváltozásait nyomon követő eljárások, de a visszavert fény intenzitásváltozása is mérhető. Az előbbi eljárásban általában alámértült szeletekkel dolgoznak (ún. submerged preparátum), míg utóbbinál főleg a folyadék-gáz fázishatáron lévő túlélő szeletet (ún. interface kamrában) alkalmazzák preparátumként. Természetesen a módszerek kombinálása is lehetséges, de figyelembe kell venni alkalmazhatóságuk korlátait. Az áthaladó fény változásait nyomon követő eljárások nagy előnye, hogy a teljes szövet optikai tulajdonságainak integrálja mérhető, ami jobb jel/zaj arányt jelent, mivel intenzitásában is nagyobb a jel. A visszavert fény detektálásán alapuló módszerek esetében csak a szövet felszínebb rétegeinek jeleit tudjuk mérni. Hogy pontosan milyen mélységig hatol le a fénysugár, az függ az alkalmazott fény hullámhosszától (a nagyobb hullámhosszú fény nagyobb áthatolóképességgel bír), és a szövet átlátszóságától. A fiatal állatokból készült agyszelet preparátumok átlátszósága nagyobb, a mielinizáltság alacsonyabb foka következtében (Witte és mtsai., 2001).

A szövetpreparátumok életben tartása végett alkalmazott inkubáló kamrák számos technikai probléma forrásai lehetnek. Ugyanazon fiziológiai folyamat ellentétes előjelű optikai jelváltozást eredményezhet az alkalmazott inkubáló kamra jellegétől függően. Hypotóniás közeg hatására a sejtek megduzzadnak, ami az áthaladó fény intenzitásának növekedését eredményezi alámértült szeletek esetében, míg interface kamrában fenntartott preparátum csökkenést mutat az átjutó fény intenzitásában. A csökkenés magyarázata a „lencse effektus” lehet. A sejtduzzadás miatt a szelet kiemelkedik a folyadékfázisból, ezáltal a felszíne optikai lencseként kezd működni és a fényelhajlás következtében a detektorba egyre kevesebb fény jut (Aitken és mtsai., 1999; Witte és mtsai., 2001).

Akár az átjutó, akár a visszavert fény intenzitásváltozásait mérjük, mindkettő módszerrel elérhető a kívánt cél, mivel ezen paraméterek szinkronban és közel azonos mértékben, bár ellentétes előjellel változnak meg (Aitken és mtsai., 1999).

## 2. FÜGGELÉK

A krónikus 4-AP kezeléssel átesett állatokon az elektrofiziológiai és kobalt felvétel vizsgálatokon kívül hisztoblot méréseket is elvégeztünk a Szegei Tudományegyetem, Anatómiai Intézetével közösen, Prof. Mihály András közreműködésével. A kísérletek kivitelezését és a hippokampális felvételek kiértékelését Dr. Dobó Endre végezte el, az entorhinális és szomatoszenzoros kérgi felvételek elemzése a mi laborunkban történt.

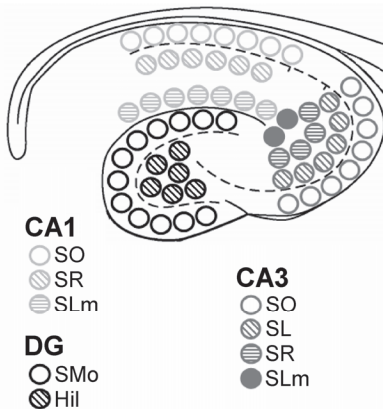
Mivel a szövettani vizsgálatok döntő többségét együttműködő partnereink végezték el, a disszertációba sem a metodikai leírást, sem a kísérleti eredményeket nem állt szándékomban beilleszteni. Viszont az eredményeim megvitatásához felhasználtam a közös adatokat, emiatt fontosnak véltem függelékben elhelyezni a szövettani vizsgálatok ismertetését.

### Hisztoblot metodika

A kísérletekhez 100-250g tömegű Wistar patkányokat használtak fel. Éter narkózisban történő dekapitálás után, az agyat óvatosan kiemelték, izopentánban lefagyasztották és a metszetkészítésig  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolták. Horizontális,  $10\text{ }\mu\text{m}$  vastagságú kriosztát metszeteket készítettek, majd tárgylemezre vitték fel az elkészült szeleteket. Téglalap alakú nitrocellulóz membrán (Schleicher & Schuell, BA85,  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ ) darabokat 15 percre beáztatták  $48\text{ mM}$  Tris-bázis,  $39\text{ mM}$  glicin,  $2\text{ V/V\%}$  SDS és  $20\text{ V/V\%}$  metanol tartalmú elegybe, szobahőmérsékleten. A tárgylemezre felvitt metszetet ráhelyezték a nitrocellulóz membránra és  $30$  másodpercre enyhén rászorították. A továbbiakban a membránt használták fel az immunoblot kísérletekhez.  $5\text{ }\%$ -os PBS-ben oldott zsírtalan tejpórral történt blokkolás után a nitrocellulóz membránokat DNáz I-gyel ( $5\text{ U/ml}$ ) kezelték, mosták, majd  $100\text{ mM}$  Tris-HCl-ban ( $\text{pH } 7,0$ ) oldott  $2\text{ V/V\%}$  SDS és  $100\text{ mM}$   $\beta$ -merkaptoetanol elegyben inkubálták  $60$  percig  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, hogy eltávolítsák a szövetmaradványokat. A mosást követően a lapokat affinitás tisztított alegység specifikus ellenanyagokkal reagáltatták egy éjszakán át  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os blokkoló oldatban. Az alkalmazott ellenanyagok: anti-GluR2 (Chemicon;  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ), anti-GluR1-4 (pan-AMPA, Pickard és mtsai., 2000), anti-GluR1 flop ( $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ , Tonnes és mtsai., 1999), anti-NR1 (PharMingen,  $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ ), anti-NR2A (Chemicon,  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ), anti-NR2B (Molecular Probes,  $0,2\text{ }\mu\text{g/ml}$ ),

anti-KA-2 (Upstate, 1:500). A kötött antitesteket alkalikus foszfatáz konjugált anti-nyúl IgG másodlagos antitesttel (1:500, Promega, USA) jelölték. Az előhívást 0,33% Nitro Blue Tetrazolium, 0,66% 5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát és 70%-os dimetil-formamid oldatával végezték. A különféle struktúrák és sejtrétegek jobb beazonosíthatósága miatt, néhány szelet esetében krezil-ibolya festést alkalmaztak.

A metszetekről síkágyas lapolvasó segítségével digitális képek készültek. A képek kiértékeléséhez az Adobe Photoshop® (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) szoftvert használták a hippokampális vizsgálatok esetében és az AnalySIS 3.2 DOCU (Soft Imaging System GmbH, Münster, Németország) szoftvert alkalmaztuk a szomatoszenzoros és entorhinális kérgi területek denzitometriai kiértékelésekor. A hippokampusz vizsgálatakor 0,1 mm átmérőjű körökben mérték meg az átlagos denzitásértéket, az egyes rétegekben több mintavételi helyet is kijelölve. Az adott réteg összes mintavételi helyeiben mért denzitásértékek átlagait határozták meg (F2.1 ábra). A neokortikális területek vizsgálatakor 50 pixel szélességű és a szürkeállományt pontosan lefedő hosszúságú (300-600 pixel), a piális felszíntől a corpus callosumig terjedő mintavételi téglalapban vettünk fel átlagolt hisztogramot. A nitrocellulóz membrán denzitásértékét 2500 pixel átlagából számoltuk ki, majd ezen értékkel korrigáltuk a hisztogram adatait. A 300-600 értéket tartalmazó adatsort 20 egységre bontottuk fel, majd ezeket korreláltattuk a kérgi réteghatárokkal (Skoglund és mtsai., 1996).

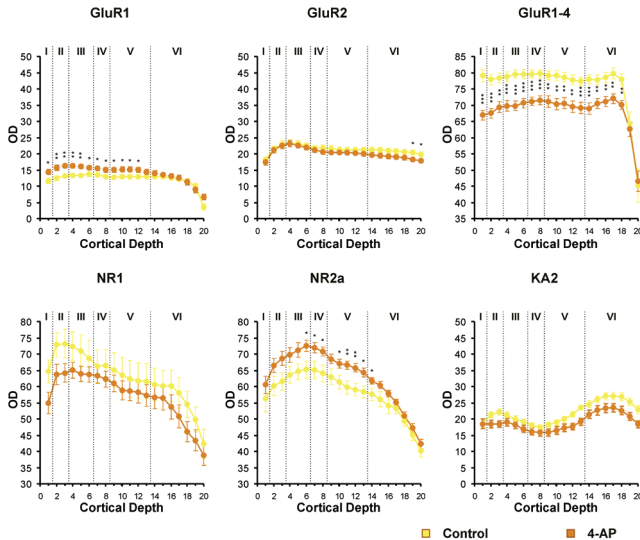


**F2.1 ábra: A denzitometriai vizsgálatok mintavételi helyei a hippokampuszban.** Részletes magyarázat a szövegben. Rövidítések: SO: stratum oriens, SR: str. radiatum, SLm: str. lacunosum-moleculare, SL: str. lucidum, SMo: str. moleculare, Hil: hilum

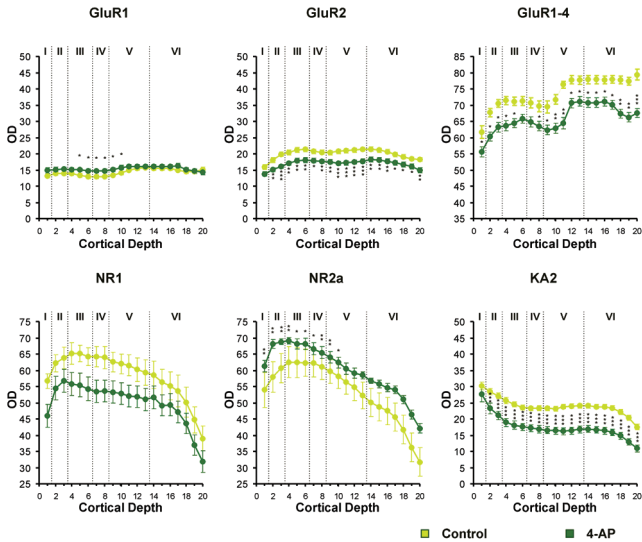


**Histoblot eredmények**

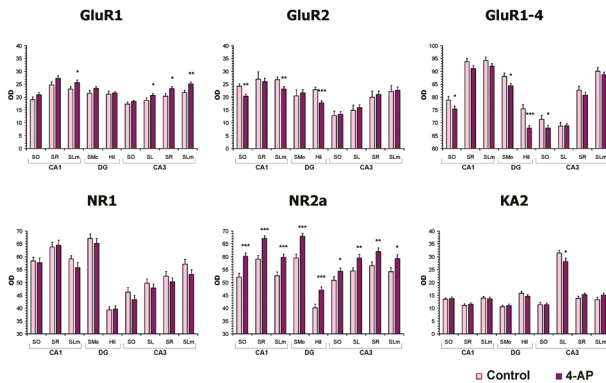
A szomatoszenzoros kéreg, entorhinális kéreg és a hippokampusz CA1 area esetében az egyes glutamát receptor alegységek kifejeződése hasonlóan módosult, viszont a változások mértéke területenként eltérő volt. Szignifikáns mértékű expresszióváltozást a GluR2, GluR1-4 és NR2A alegységek esetében tapasztaltunk, a többi vizsgált alegységnél csak kisfokú eltéréseket kaptunk. A GluR2 alegység mennyisége jelentősen lecsökkent az entorhinális kéregben (F2.3 ábra) és a hippokampusz CA1 areában (F2.4 ábra), míg a szomatoszenzoros kéregben (F2.2 ábra) csak a 6. réteg mutatott jelentős eltérést. A GluR1-4 expressziójában nagymértékű csökkenést tapasztaltunk mindhárom vizsgált területen (F2.2-4 ábrák), míg az NR2A kifejeződése hasonló mértékű, de ellentétes változást mutatott. A fentiekben túl említésre érdemes még az KA-2 alegység nagyfokú expressziócsökkenése az entorhinális kéregben (F2.3 ábra), míg a többi vizsgálati területen ilyen változás nem történt.



**F2.2 ábra:** A glutamát receptor alegységek szomatoszenzoros kéregben tapasztalt expresszióváltozása. \* szimbólum:  $p < 0,05$ ; \*\* szimbólum:  $p < 0,01$ ; \*\*\* szimbólum:  $p < 0,001$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt.



F2.3 ábra: A glutamát receptor alegységek entorhinális kéregben tapasztalt expresszióváltozása. \* szimbólum:  $p < 0,05$ ; \*\* szimbólum:  $p < 0,01$ ; \*\*\* szimbólum:  $p < 0,001$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt.



F2.4 ábra: A glutamát receptor alegységek hippokampusban tapasztalt expresszióváltozása. \* szimbólum:  $p < 0,05$ ; \*\* szimbólum:  $p < 0,01$ ; \*\*\* szimbólum:  $p < 0,001$  ANOVA Newmann-Keuls post hoc teszt.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek Dr. Világi Ildikónak a szakmai irányításért, a lelkiismeretes témavezetői munkáért, és a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségért. Külön köszönettel tartozom Prof. Détári Lászlónak, az elektrofiziológiai kísérletek értékelésében nyújtott segítségért és az inspiráló szakmai beszélgetésekért.

Hálával tartozom még Prof. Mihály Andrásnak és Dr. Dobó Endrének a közös eredményeinkkel kapcsolatos alapos és rendkívül hasznos szakmai eszmecsereért. Köszönet illeti Dr. Somogyvári Zoltánt és Körössy Csabát, az elektrofiziológiai eredmények elemzésében végzett munkájáért.

Köszönettel tartozom még az ELTE TTK Élettani és Neurobiológiai Tanszék minden munkatársának, külön kiemelve Czégé Dávid, Pataj Dávid, Varró Petra és Sándor Zoltánné, a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családom áldozatvállalását és a dolgozat elkészülésekor nyújtott támogatását.