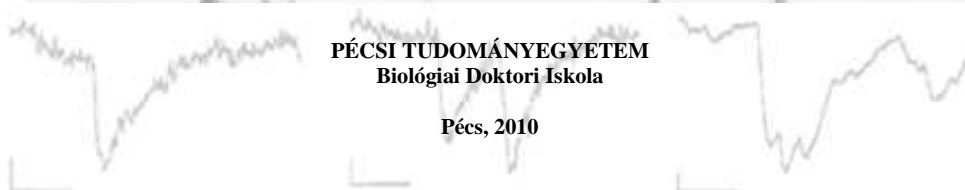
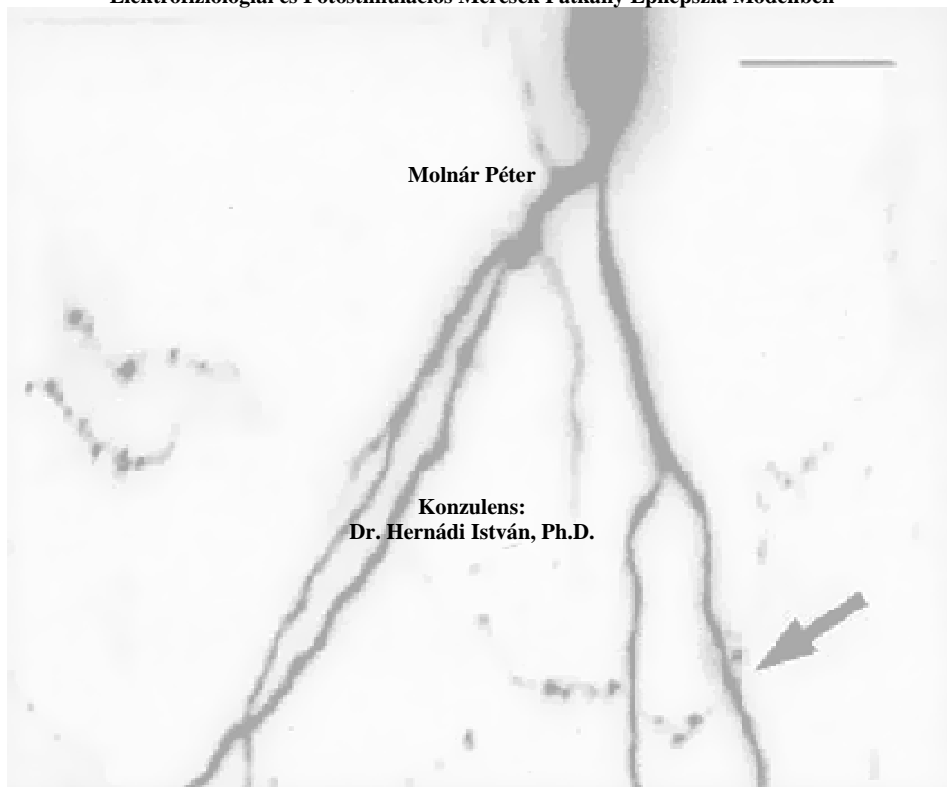


## PhD Disszertáció Tézis

**Szinaptikus Átrendeződés, Mint az Epilepszia Kialakulásának Mechanizmusa -  
Elektrofiziológiai és Fotostimulációs Mérések Patkány Epilepszia Modellben**

## Bevezetés

Felnőttkorban a temporális lebeny epilepszia (TLE) a leggyakrabban előforduló parciális epilepsziás tünetegyüttes (Halász és Fogarasi, 2006). TLE a betegek többségénél visszavezethető valamilyen elsődleges agysérülésre, amely következtében létrejövő funkcionális változások az agyban egy hosszú látens periódus után a spontán rohamok megjelenéséhez vezetnek (Sharma és mtsai., 2007). A betegek 70-80%-ban figyelhető meg hippokampális lézió, amelyet neuronális degeneráció, asztrogliózis, szemcses sejtek diszperziója, aberráns moharost sarjadzás jellemez. A moharost sarjadzás a hippokampusz gyrus dentatusában lévő szemcses sejtek axonjainak (ezek a moharostok) az újrarendeződése melynek során a moharostok megjelennek a szemcses sejtek dendritikus rétegében és ott izgató szinaptikus kapcsolatokat képeznek a szemcses sejtekkel (Sloviter, 1994). Széles körben elfogadott az a nézet, hogy a moharost sarjadzás során létrejövő pozitív visszacsatolás szerepet játszhat az epileptikus rohamok kialakulásában.

A patkányban akut pilokarpin kezeléssel kiváltott krónikus epilepsziás állapotot azért tartják a humán TLE egyik legjobb modelljének, mivel nagymértékben reprodukálja annak nemcsak a fiziológiai és hisztopathológiai tüneteit, de kialakulásának folyamatát is (Curia és mtsai., 2008). Az akut pilokarpin kezelés által kiváltott, elhúzódó generalizált epileptikus roham ugyanis olyan maradandó változásokat okoz az agyban, amelyek hatására (egy 'csendes periódus' után) krónikus epilepszia alakul ki. Ebben a modellben a sejtpusztulás ultrastrukturális szerkezete hasonló ahhoz, amit embereknél írtak le agysérülést követő epilepsziában (Cavalheiro, 1995). A mohasejtek a gyrus dentatus hilusában szinte mind elpusztulnak. A mohasejtek pusztulása egyes elméletek szerint növeli a gyrus dentatus ingerelhetőségét, mivel a mohasejtek fontos szerepet játszanak a feed-back és feed-forward gátlásban a hippokampuszban (Lothman, 1992; Ratzliff és mtsai., 2004). A mohasejtek fő bemenetét a moharostok képezik és főleg gátló interneuronokon képeznek excitátoros szinaptikus kapcsolatokat. A mohasejtek kismértékben kapnak beidegzést a perforáns pálya felől is (Amaral és mtsai., 2007).

A pilokarpin modellben státusz epileptikus hatására drasztikus módon felgyorsul a neurogenesis a hippokampusz gyrus dentatus területén (Parent és mtsai., 2006). A SE hatására újonnan született szemcses sejtek egyrészt hiperexcitabilitásuk, aberráns elhelyezkedésük és szinaptikus kapcsolataik miatt hozzájárulhatnak az epileptikus rohamok kialakulásához, másrészt bizonyos mértékben átvehetik az elpusztult mohasejtek szerepét a rekurrens / feed-forward gátlás folyamatában (Scharfman és mtsai., 2007). Más kutatók szerint az újonnan született szemcses sejtek szerepe kevésbé jelentős az epilepszia kialakulásában (Haas és Frotscher, 2009).

A pilokarpin modellben a státusz epileptikuszt követő csendes szakasz folyamán zajlik le a moharost sarjadzás jelensége (Tauck és Nadler, 1985; Okazaki és mtsai., 1995; Scharfman és mtsai., 2003). Hasonló szinaptikus átrendeződést más agyterületeken is megfigyeltek, de csak a moharostokra létezik szelektív, egyszerűen végrehajtható festési eljárás. Nem világos, hogy a szinaptikus átrendeződésnek mi a szerepe az epilepszia kifejlődésében és fenntartásában, ugyanis az új pályák, attól függően, hogy milyen sejten végződnek, egyaránt erősíthetik a serkentő, valamint a gátló mechanizmusokat a különböző agyterületeken.

Elektrofiziológiai tulajdonságai alapján a gyrus dentatust tartják a hippocampusz 'kapuőrjének' (Lothman és mtsai., 1992. *In vivo* és *in vitro* mérések bizonyítják, hogy normál esetben nagyon nehéz epileptikus aktivitást kiváltani a gyrus dentatusban, amit elsősorban az erős negatív feed-back és feed-forward gátlás jelenléte, valamint az excitációs pozitív visszacsatolás hiánya magyaráz (Ribak és Peterson, 1991; Acsady és mtsai., 1998). Státusz epileptikus hatására azonban ez a helyzet megváltozik; a moharsejtek pusztulása jelentősen megváltoztatja a feed-back és a feed forward gátlást (Magloczky és Freund, 2005). Ezzel párhuzamosan a gyrus dentatusban a moharost sarjadás létrehozza azt a pozitív visszacsatolást, ami számos kutató szerint magyarázatot adhat a gyrus dentatus epileptikus aktivitással szembeni ellenállásának meggyengülésére (Cronin és mtsai., 1992; Hardison és mtsai., 2000). Kísérletek bizonyították, hogy a moharost sarjadás során kiterbélyesedett szemcsesejt-axonok szinaptikus kapcsolatokat létesítenek a szemcsesejtekkel, de ezzel egyidejűleg gátló interneuronokkal is (Ribak, 1985; Sharma és mtsai., 2007). Elektrofiziológiai kísérletek azt is bizonyították, hogy a létrejött szemcsesejt-szemcsesejt kapcsolatok funkcionálisak és excitátorosak (Molnar és Nadler, 1999; Scharfman és mtsai., 2003).

A moharost sarjadás nemcsak a pozitív visszacsatolás létrejöttén keresztül járulhat hozzá a gyrus dentatus epileptikus szinkronizált aktivitással szembeni ellenállásának meggyengüléséhez, hanem azzal is, hogy a moharostok nagy koncentrációban tartalmaznak cinket, amely aktivitásfüggően ürül a preszinaptikus terminálokból és cink gátolhatja a posztszinaptikus GABA<sub>A</sub> receptorokat. Epilepszia esetén a GABA<sub>A</sub> receptorok cink érzékenysége drasztikusan megnő (Buhl és mtsai., 1996). Ezzel ellentétes hatású folyamat, hogy a glutamáttal együtt ürülő cink gátolja az N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptorokat, ez a hatás antiepileptogén (Vogt és mtsai., 2000). A cink szerepe az mediotemporális epilepsziában még mindig vitatott, mivel mind epileptogén, mind antiepileptogén hatásait leírták (Timofeeva és Nadler, 2006; Noyan és mtsai., 2007; Foresti és mtsai., 2008).

A moharost sarjadás pontos kiváltó oka nem ismert (Curia és mtsai., 2008). Egyes feltételezések szerint a moharsejtek pusztulásával a moharostok rekurrens ágai elvesztik célsejtjeiket és a moharost sarjadás folyamán más célt keresnek maguknak. Ennek ellentmond az a megfigyelés, hogy a kindling modellben sejtpusztulás nélkül is létrejön moharost sarjadás. Más elméletek szerint az epileptikus aktivitás bizonyos növekedési faktorok valamint axon vezérlő molekulák fokozott termelődését / átrendeződését okozza, ami hozzájárulhat a moharost sarjadás serkentéséhez (Morimoto és mtsai., 2004).

A moharost sarjadás szerepe a mediotemporális epilepszia kialakulásában ma is erősen vitatott (Morimoto és mtsai., 2004). Egyrészt megmutatták, hogy ha cyclohexamiddel meggátolják a moharost sarjadást akkor is kialakulhatnak epileptikus rohamok (Longo és Mello, 1998), másrészt még az epileptikus hippocampusban is, ahol a moharost sarjadás jelentős, nehezen váltható ki epileptikus neuronális aktivitás *in vitro*. Valószínűleg a moharost sarjadás csak egy (bár jelentős) azok közül a mechanizmusok közül amik lehetővé teszik az epileptikus rohamok keletkezését és terjedését mediotemporális epilepsziában.

## Célkitűzések

- (1) Az spontán epileptikus rohamok kialakulása folyamán létrejövő szemcsesejt – szemcsesejt szinaptikus kapcsolatok funkcionális jellemzése a pilokarpin epilepszia modellben.
- (2) Szemcsesejt – szemcsesejt szinaptikus kapcsolatok farmakológiai jellemzése különös tekintettel a szinaptikus áram NMDA komponensére.
- (3) A moharostokból szinaptikus úton ürülő cink posztszinaptikus GABA<sub>A</sub> és NMDA receptorokra kifejtett hatásainak jellemzése epileptikus állapotokban.

## Módszerek

### *Pilokarpinnal kiváltott státusz epileptikus*

Hím Sprague-Dawley patkányokat (150–200 g) 2 mg/kg scopolamin methyl bromiddal majd fél óra múlva 330 mg/kg pilokarpin hidrokloriddal kezeltünk intraperitoneálisan. A státusz epileptikuszt annak kezdete után 3-4 órával Na-phenobarbitállal (50 mg/kg i.p.) állítottuk meg.

### *Szövetteni eljárások*

Pilokarpin kezelés után 10 héttel, egyes kísérletekben 4-6 nappal, 400 µm vastag, a hippokampusz hossz tengelyére merőleges szeleteket készítettünk a kaudális hippokampuszból vibratóm segítségével. A szövettenra szánt szeleteket Na<sub>2</sub>S oldatban 90 percig inkubáltuk, majd 10% foszfát-pufferelt formalinban 4 °C on 1-2 napig fixáltuk. Ezután a szeleteket albumin-gelatinba ágyasztuk be majd 30 µm vastag szeleteket készítettünk. A páratlan szeleteket Timm-festéssel, a páros szeleteket krezil-ibolya festéssel festettük. A neurodegeneráció kimutatására epileptikus és kontroll patkányokat transzkardiálisan 4% foszfát-pufferelt paraformaldehiddel átperfundáltunk, majd 3-20 napig a paraformaldehid oldatban 4°C –on tároltunk. Ezután belőlük 40 µm vastag horizontális vagy koronális szeleteket készítettünk a fagyasztva metszés technikájával. Váltakozó szeleteket vagy krezil-ibolya festéssel, vagy ezüst impregnációs technikával festettük.

### *Extracelluláris elektrofiziológiai mérések*

Elektrofiziológiai mérésekre 400 µm vastag agyszzeleteket használtunk. A mesterséges cerebroszpinális folyadék (ACSF) a következő komponenseket tartalmazta (mM-ban): 122 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 3,1 KCl, 1,8 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 0,4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 10 D-glucose, pH 7,4. Stimulálásra 25 µm vastag monopoláris elektródát használtunk, melyet a hippokampusz CA3b stratum lucidum területére helyeztük, 100 µm-re a hilus nyílásától. Az extracelluláris elektródát (1M NaCl-dal feltöltött üveg elektróda; 2-6 MΩ ellenállás) a szemcsesejt rétegbe helyeztük. A stimulálást 100 µs széles monopoláris pulzusokkal végeztük, a stimuláló áramot úgy választottuk meg, hogy közel maximális választ hozzon létre. Más kísérletekben a stimuláló elektródát a perforáns pályához helyeztük, ott ahol a perforáns pálya belép a hippokampuszba az entorhinális kéreg felől. Azokban a kísérletekben, amelyekben csak a glutamaterg szinaptikus komponensre voltunk

kíváncsiak, 30  $\mu\text{M}$  bicuculline-t ( $\text{GABA}_A$  antagonist) adtunk az extracelluláris folyadékhoz. A visszamaradt szinaptikus komponens glutamaterg voltát NBQX (AMPA antagonist) és D-AP5 (NMDA antagonist) adásával bizonyítottuk.

### *Patch clamp mérések elektromos stimulálással*

Tradicionalis whole-cell patch clamp méréseket végeztünk a gyrus dentatus szemcsesejt rétegében közel az extracelluláris elektródához egy Axopatch 200A erősítővel. Az intracelluláris oldat összetétele a következő volt (mM-ban): 120 cesium gluconate, 10 HEPES, 2 MgATP, és 10 QX-314 (*N*-ethyl lidocaine) chloride, pH 7,2, az ozmolaritás 276–277 mOsm; ellenállás 5–8 M $\Omega$ . A soros ellenállást 75%-ban kompenzáltuk. A jeleket 2 kHz-en szűrtük, 10 kHz-en mintavételeztük és pClamp 6 (Axon) programmal mértük és értékeltük ki. Az antidromikus stimulációval kiváltott excitátoros posztszinaptikus áramokat (EPSC) -80 mV membránpotenciál mellett mértük voltage clamp módban 30-100  $\mu\text{M}$  bicuculline vagy 50  $\mu\text{M}$  picrotoxine mellett és úgy definiáltuk, hogy az az áram, amit 50  $\mu\text{M}$  D-AP5 és 20  $\mu\text{M}$  DNQX vagy 5  $\mu\text{M}$  NBQX blokkol. Az antidromikus stimulációval kiváltott gátló posztszinaptikus potenciálokat (IPSC) 0 mV membránpotenciál mellett mértük és úgy definiáltuk, hogy az az áram, amit 30  $\mu\text{M}$  bicuculline vagy 50  $\mu\text{M}$  picrotoxine blokkol. Az EPSC AMPA és NMDA receptorok által mediált komponenseit egyrészt feszültségfüggésük, másrészt farmakológiájuk alapján különítettük el. Az AMPA receptor mediálta áramot -80 mV-on, bicuculline és D-AP5 jelenlétében mértük és úgy definiáltuk, hogy az a komponens amit DNQX blokkol. Az NMDA receptor mediálta áramot -22 mV-on, bicuculline jelenlétében mértük és úgy definiáltuk, hogy az a komponens amit D-AP5 blokkol.

### *Fotostimuláció*

Egy 80 mW Coherent Enterprise 653 argon ion UV lézert egy Nikon Optiphot-2 mikroszkóphoz kapcsolunk az epifluoreszcens porton keresztül egy üvegszál kábel segítségével. A mikroszkóp fel volt még szerelve egy Noran Odyssey konfokális mikroszkóp rendszerrel. A lézer fényét egy 40x Olympus víz-immersiós objektívvel fókuszáltuk. Fotostimulációhoz 200  $\mu\text{M}$   $\gamma$ -(CNB-caged) L-glutamátot használtunk. Először patch clamp mérést végeztünk egy szemcsesejten -80 és / vagy -20 mV membránpotenciál mellett. Ezután a szemcsesejttől 75  $\mu\text{m}$ -re kezdve fotostimulációt végeztünk a szemcsesejt rétegben. A fotostimuláció 4 ms széles, 50mW teljesítményű lézer pulzusokból állt, amit 15 s-ként alkalmaztunk. Más kísérletekben megpróbáltunk mohasejt – szemcsesejt kapcsolatokat találni, ilyenkor a stimuláló fényimpulzus helyét nem a szemcsesejt rétegen futtattuk végig, hanem a hiluson, ahol a mohasejtek várhatóan elhelyezkedtek. Más kísérletekben 50  $\mu\text{M}$  D-AP5 adásával elkülönítettük az EPSC NMDA és AMPA receptorok mediálta komponenseit.

### *A fotostimuláció helyének valamint a moharost – szemcsesejt kapcsolat megjelenítése*

DiI hidrofób fluoreszcens festéket forró csukamáj olajban oldottuk fel és egy pipettából injektáltuk a fotostimuláció helyére. Ezzel párhuzamosan a mért szemcsesejtet is feltöltöttük Lucifer Yellow fluoreszcens festékkel. Fixálás után 50  $\mu\text{m}$  szeleteket készítettünk és a konfokális mikroszkóppal képeket készítettünk 488 nm excitáció és egy 510 nm-es felüáteresztő szűrő mellett.

### *Külsőleg adott cink direkt hatásának a mérése GABA<sub>A</sub> és NMDA receptorokon*

Cinket az extracelluláris oldatban adtuk 200  $\mu\text{M}$  koncentrációban. Egy üveg mikroelektrodát (nyílásátmérő: 5-10  $\mu\text{m}$ ) használtunk a GABA<sub>A</sub> agonista (muscimol, 400  $\mu\text{M}$ ) közvetlenül egy mért szemcsesejt dendritjéhez juttatásához. NMDA-receptor mediálta áramokat a perforáns pálya elektromos ingerlésével váltottunk ki és -20 mV membránpotenciálon, 5  $\mu\text{M}$  NBQX és 30  $\mu\text{M}$  bicuculline jelenlétében mértük.

### *Cink hatásának mérése a spontán mini gátló posztzinaptikus áramokra (mIPSC)*

Cinket az extracelluláris oldatban adtuk 200  $\mu\text{M}$  koncentrációban. Ezekben a mérésekben CsCl-ot használtunk az intracelluláris oldatban. Az extracelluláris oldat 5  $\mu\text{M}$  NBQX-t, 50  $\mu\text{M}$  D-AP5-t valamint 1  $\mu\text{M}$  tetrodotoxint tartalmazott. A méréseket PO<sub>4</sub>/SO<sub>4</sub>-mentes ACSF-ben végeztük.

### *Moharostokból felszabaduló cink hatásának mérése a GABA<sub>A</sub> receptor mediálta áramokra*

A moharostokat antidromikus stimulálással aktiváltuk NBQX és D-AP5-jelenlétében PO<sub>4</sub>/SO<sub>4</sub> mentes ACSF-ben. A GABA<sub>A</sub> mediálta áramokat  $\gamma$ -aminobutyrate,  $\alpha$ -carboxy-2-nitrobenzyl ester-t (cGABA; 200  $\mu\text{M}$ ) UV aktiválásával váltottuk ki. A lézert a mért és Alexa 488 fluoreszcens festékkel feltöltött sejt szómájára, majd attól 50, 75 és 100  $\mu\text{m}$  távolságra fókuszáltuk az apikális dendrit mentén. A cinket a moharostok nagyfrekvenciájú (10 vagy 100 Hz, 1 s –ig vagy 10 Hz, 5 percig) antidromikus stimulálásával bocsátottuk ki. Közben 10 s-ként mértük a GABA<sub>A</sub> áramot. Néhány kísérletben további lépéseket tettünk, hogy megnöveljük a stimulációval kibocsátott cink mennyiségét, pld. eltávolítottuk a magnéziumot is az extracelluláris oldatból, felemeltük a kálium koncentrációját 6 mM-ra valamint a hőmérsékletet 33°C-ra.

### *cGABA hatásának mérése a monoszínaptikus IPSC-re*

Egy bipoláris stimuláló elektródát helyeztünk a gyrus dentatus szemcsesejt rétegébe, 200–500  $\mu\text{m}$  távolságra a mért szemcsesejttől. A stimuláláshoz 100  $\mu\text{s}$  hosszúságú négyzetű impulzust használtunk és a stimulus áramot úgy választottuk meg, hogy a mért szemcsesejtben közel maximális IPSC-t váltsunk ki. A stimulálást 30 s-ként végeztük. A patch clamp méréseket 0 mV membránpotenciálnál végeztük 5  $\mu\text{M}$  NBQX és 50  $\mu\text{M}$  D-AP5 jelenlétében. Egyes mérésekben a membránpotenciált 10 mV lépésenként változtattuk.

### *CaEDTA (cink kelátor) hatása a moharost és a perforáns pálya ingerléssel kiváltott EPSC NMDA receptor mediálta komponensére*

Az EPSC-eket antidromikus moharost és perforáns pálya ingerléssel váltottuk ki. Az EPSC NMDA receptor mediálta komponensét NBQX-szel szeparáltuk és D-AP5-tel gátoltuk. Ezekben a kísérletekben 1 mM CaEDTA, egy magas affinitású és specifikus cink kelátor hatását teszteltük a moharost (amely nagy koncentrációban tartalmaz cinket) valamint a perforáns pálya (amely nem tartalmaz cinket) stimuláció által kiváltott NMDA áramokra gyrus dentatus szemcsesejteken epileptikus állapotokban.

## Eredmények

### *Sejtpusztulás, moharost sarjadzás és spontán epileptikus rohamok a pilokarpinnal kiváltott státusz epileptikus után<sup>1</sup>*

Pilokarpin (330 mg/kg, i.p.) státusz epileptikuszt váltott ki az állatok 2/3-ban. A státusz epileptikus 4 órája alatt ezeknek az állatoknak az 1/3-a elpusztult. Azokat az állatokat, amelyek nem mutatták az epilepszia jeleit, kontrollnak tekintettük, mivel semmilyen további mérés alapján nem tudtuk megkülönböztetni őket a nem kezelt, vagy fiziológiás sóoldattal kezelt állatoktól. A státusz epileptikus után 3 héttel figyelhettük meg az első spontán komplex parciális roham megjelenését. A rohamok frekvenciája nagy variációt mutatott (heti egytől napi 3-4 roham között). A spontán rohamok frekvenciája az 5. hét végére stabilizálódott és stabil maradt a kísérletsorozat végéig, vagyis a pilokarpin injekciót követő 10. hét végéig. A szövettani és az elektrofiziológiai méréseket pilokarpin adása után 4-6 nappal végeztük, amikor az állatok már felépültek a státusz epileptikus akut hatásaiból, de még spontán epileptikus rohamok (sem moharost sarjadzás) nem alakult ki, valamint 10 héttel a státusz epileptikus után, amikor a spontán rohamok frekvenciája elérte a maximumot és stabilizálódott.

A Timm-féle festési eljárás a moharostokban nagy koncentrációban található cink kimutatására szolgál. Minden epileptikus állatnál megfigyelhető volt az erős moharostokra jellemző festődés a gyrus dentatus belső molekuláris rétegében 10 héttel a kezelés után, míg kontroll állatban sohasem találtunk a szinte észrevehetetlen szporadikus jeleknél erősebb festődést. Státusz epileptikus után 4-6 nappal a moharost sarjadzás még kimutathatatlan volt.

Státusz epileptikus után 1-3 nappal kiterjedt sejtpusztulás volt megfigyelhető több agyterületen a hippokampuszt is beleértve. A hippokampuszon belül elszórt neuronális degeneráció volt látható a CA1 és CA3 piramisest rétegében valamint a gyrus dentatus szemcsesejt rétegében. A legerősebb degeneráció a gyrus dentatus hilusban volt, ott a sejtek kb. fele elpusztult. Erős axonális degeneráció volt megfigyelhető a gyrus dentatus belső molekuláris rétegében, ahol a hilusban található mohasejtek axonjai végződnek, míg egyáltalán nem volt axonális degeneráció a külső molekuláris rétegben, ahol a perforáns pálya axonjai végződnek. Ezek az adatok azt sugallják, hogy nagyrészt a hilus mohasejtjei pusztultak el. Kontroll állatokban nem lehetett neuron degenerációt kimutatni.

### *A moharost sarjadzás során létrejövő moharost – szemcsesejt szinaptikus kapcsolatok funkcionális jellemzése*

A szemcsesejt – szemcsesejt szinaptikus kapcsolatok vizsgálatát nehezítette, hogy 1) A szemcsesejt – szemcsesejt kapcsolatok valószínűsége nagyon alacsony, vagyis szinte reménytelen két szinaptikusan összekapcsolt szemcsesejtet találni. 2) A moharostok szelektív aktiválása nehéz mivel a moharostok a hiluson keresztül térnek vissza a molekuláris rétegbe, a hilus pedig sokfajta sejtípust tartalmaz.

---

<sup>1</sup> Okazaki, M., P. Molnar és J. V. Nadler, "Recurrent mossy fiber pathway in the rat dentate gyrus: synaptic currents evoked in the presence and absence of seizure-induced growth," J. Neurophysiol. 81:1645-1660 (1999).

Ezeknek a problémáknak a megoldására háromféle (egymást kiegészítő / megerősítő) módszert dolgoztunk ki: 1) Antidromikus moharost stimulálással kiváltott extracelluláris field-potenciálok vizsgálata a szemcsesejt rétegben 2) Antidromikus moharost stimulálással kiváltott szinaptikus áramok vizsgálata patch clamp módszerrel 3) Preszinaptikus szemcsesejt stimulálása glutamát neurotranszmitter fényimpulzussal történő felszabadításával, és ezzel párhuzamosan a szinaptikus áramok mérése a posztzinaptikus szemcsesejtben patch clamp módszerrel.

A moharostok antidromikus stimulálásával egy populációs spike-ot váltottunk ki a szemcsesejtben, valamint szinaptikus úton egy extracelluláris field potenciált hoztunk létre azon a területen, ahol a moharostok végződtek. A szemcsesejtrétegben *extracelluláris elvezetést használva* minden esetben megfigyeltük az antidromikus populációs spike-ot, míg a szinaptikus komponenst csak akkor, amikor a moharostok monoszínaptikus vagy poliszínaptikus stimulálták magukat a szemcsesejtet. Moharostok antidromikus stimulálásával kiváltott glutamát mediálta field potenciált a státusz epileptikuson átesett állatok kevesebb, mint felében találtunk, pedig a kísérleteket akkor végeztük, amikor a moharost sarjadzás maximális volt (10 héttel SE után). Ezt a komponenst NBQX-el blokkolni lehetett. Meglepő módon mind a kezelt, mind a kezeletlen kontroll állatokból származó szeletek egy kis százalékában megfigyelhető volt a glutamaterg szinaptikus komponens, amely NBQX-el blokkolható volt.

*Patch clamp intracelluláris elvezetést használva* minden esetben sikerült antidromikus moharost stimulálással egy GABA<sub>A</sub> receptor mediálta posztzinaptikus áram - komponenst kiválanunk függetlenül attól, hogy epileptikus vagy kontroll állatról volt szó. 4-6 nappal státusz epileptikus után a GABAerg feed-back gátlás szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz viszonyítva. A 10. hétre azonban (a 4-6 naphoz viszonyítva) a kontroll csoportban a GABAerg feed-back gátlás szignifikánsan csökkent, míg az epileptikus állatoknál nem változott, ennek eredményeképpen az epileptikus állatoknál a feedback gátlás a hasonló korú kontrollhoz képest erősebbé vált.

Nem csak az epileptikus, hanem a kontroll állatok viszonylag magas százalékában is megfigyeltünk antidromikus moharost stimulálással kiváltható izgató posztzinaptikus áramokat (EPSC). EPSC-t leggyakrabban a státusz epileptikuson átesett állatok esetén 10 hét elteltével figyelhattunk meg, a vizsgált szeletek 74%-ban. A kezelt kontroll esetén 38%, míg a kezeletlen kontroll esetén 26% volt ez az arány. Az EPSC maximális amplitúdója is szignifikánsan nagyobb volt a státusz epileptikuson átesett állatok esetén. Az epileptikus állatoknál, ritkán, késleltetett EPSC-eket is megfigyeltünk (több 100 ms késés), amelyek amplitúdóban elérhették a 700 pA is. Az EPSC amplitúdója valamint a Timm-festés alapján megbecsült moharost sarjadzás mértéke között nem volt nyilvánvaló korreláció. Más elektrofiziológiai paraméterekben (membránpotenciál, membrán ellenállás) nem találtunk a csoportok között szignifikáns eltérést. Szintén nem találtunk eltérést a csoportok között semmilyen paraméterben sem 4-6 nappal a pilokarpin adása után.

Az antidromikus moharost stimulálással kiváltható EPSC NMDA receptor mediálta komponensét NBQX, majd később D-AP5 adásával határoztuk meg. 10 hét túlélési idő mellett a státusz epileptikus csoportban nagyobb NMDA áramokat találtunk a kontrollhoz viszonyítva. Az NMDA receptor mediálta áram az AMPA komponenshez



viszonyítva is nagyobbak adódott. Nem találtunk különbséget az NMDA komponens feszültségfüggésében a csoportok között.

A moharostokkal szemben a perforáns pályával kapcsolatban nem mutattak ki szinaptikus átrendeződést temporális lebeny epilepsziában. Mi sem találtunk fiziológiai különbséget a kontroll és a státusz epileptikuszon átesett csoportok között a perforáns pálya ingerléssel kiváltott válaszokban (GABA<sub>A</sub>erg, AMPA vagy NMDA receptor mediálta áramok). Az állatok kora, ahogyan azt a moharostok antidromikus stimulálása esetén is megfigyeltük, szignifikánsan befolyásolta a GABA<sub>A</sub> receptor által mediált komponens nagyságát, az állatok korának előrehaladtával ez a komponens csökkent.

A *fotostimuláció módszeré*<sup>2</sup> azért vezettük be, hogy kisszámú szemcsesejtet szelektíven tudjunk stimulálni. Ezekben a kísérletekben egy olyan glutamát analógot használtunk az extracelluláris oldatban, amelynek az aktiválásához egy UV fényimpulzus szükséges. Megállapítottuk, hogy a fotostimulálásnál használt paraméterekkel kb. 12 µm távolságból tudunk akciós potenciált kiváltani szemcsesejtekből. A szemcsesejt réteg fotostimulációval történő ingerlése a legnagyobb gyakorisággal a státusz epileptikuszon átesett állatok esetében váltott ki EPSC-t a szemcsesejtékben. Általában 7 stimulációs helyet kellett kipróbálnunk, mielőtt találtunk egy szinaptikus kapcsolatot, vagyis kb. 176 – 266 sejtet kellett tesztelnünk. Különböző típusú EPSC-eket figyelhattunk meg. Optimális esetben hirtelen (kb. 10 – 20 ms késéssel) jelentkező egyedi, kb. 30 – 100 pA amplitúdójú egy exponenciális időkonstanssal hanyatló befelé irányuló áramokat láthattunk. Nem mindegyik stimulus indukált EPSC-t, a hiba százalék 60-70% volt. Más sejtek esetén a fotostimuláció komplex EPSC-eket váltott ki, amelyek vagy több egymásra, egymás után szuperponált egyszerű EPSC-ből állt, vagy pedig egymástól elkülöníthetetlen komplex, polisszinaptikusnak tűnő áramokból. Nem találtunk szignifikáns különbséget az EPSC-k tulajdonságaiban (csak a gyakoriságban) a státusz epileptikuszon átesett és a kontroll állatok között.

A szemcsesejt – szemcsesejt szinaptikus kapcsolatok további jellemzése során megállapítottuk, hogy NMDA receptorok részt vesznek a szinaptikus transzmisszióban. Néhány kísérletben a stimuláció helyét egy hidrofób fluoreszcens festékkel (DiI) jelöltük, míg a mért sejtet Lucifer Yellow-val töltöttük fel. A jelölt, feltehetően szemcsesejt axonok párhuzamosan haladtak a szemcsesejt réteggel és látszólag szinapszist képeztek a jelölt szemcsesejttel. Megfigyelhetőek voltak az óriás (~2 µm) varikozitások a jelölt axonon, ami jellemző a moharostokra.

*A moharostok által tartalmazott és szinaptikusan kibocsátott cink hatása a szemcsesejtek excitabilitására epileptikus állatokban*<sup>3</sup>

Külsőleg adott cink csak PO<sub>4</sub>/SO<sub>4</sub>-mentes ACSF-ben gátolta külsőleg adott muscimollal kiváltott GABA<sub>A</sub> és perforáns plálya stimulálással kiváltott NMDA mediálta áramokat.

---

<sup>2</sup> **Molnar P.** és J. V. Nadler, “Mossy fiber - granule cell synapses studied with whole cell patch clamp recording and laser photostimulation,” J. Neurophysiol. 82:1883-1894 (1999).

<sup>3</sup> **Molnar P.** és J. V. Nadler, “Lack of effect of mossy fiber-released zinc on postsynaptic GABA<sub>A</sub> receptors in the pilocarpine model of epilepsy,” J. Neurophysiol. 85:1932-40 (2001).

Külsőleg adott cink szintén gátolta a spontán mini gátló szinaptikus áramokat (mIPSC)  $PO_4/SO_4$ -mentes ACSF-ben.

A moharostokból ürülő cink posztszinaptikus  $GABA_A$  receptorokra kifejtett hatásait a moharostok nagyfrekvenciás (10 és 100 Hz) antidromikus stimulálásával vizsgáltuk, miközben a  $GABA_A$  receptorokat egy GABA prekursor fényimpulzussal történő felszabadításával teszteltük. A  $GABA_A$  receptorokat ott stimuláltuk, ahol a feltételezett moharostok terminálisai találhatóak, vagyis 100  $\mu m$ -nél közelebb a mért és fluoreszcens festékkel feltöltött szemcsesejt szómájához a jelölt dendrit mentén. Mivel megfigyeltük, hogy cGABA gátolta a spontán IPSC-eket, ezért a kísérleteket nem folytattuk addig, amíg meg nem győződünk arról, hogy a cGABA ezen tulajdonsága nem befolyásolja a méréseink eredményét<sup>4</sup>. Megállapítottuk, hogy az extracelluláris oldatban adott 160-200  $\mu M$  cGABA szinte teljesen blokkolta az IPSC-eket és szinte alig módosította az EPSC-eket. Ezzel szemben 200  $\mu M$  cGABA csak kismértékben gátolta a  $GABA_A$  receptor mediálta áramokat. Ezekből a mérésekből azt a következtetést vontuk le, hogy cGABA csak kismértékben befolyásolhatja az eredeti mérésünk eredményét. Hogy maximalizáljuk annak a valószínűségét, hogy cink valóban kibocsátódott a szinapszisokból, különböző stimulációs protokollokat (10 Hz, 100 Hz, zéró magnézium, magas kálium, folytonos stimulálás, magasabb hőmérséklet) próbáltunk ki. Ennek ellenére nem találtuk olyan esetet, amikor a moharostok stimulációja megváltoztatta volna a  $GABA_A$  áramokat a szemcsesejteken.

A moharostokból szinaptikus úton ürülő cink hatását az NMDA receptorokra egy magas affinitású és specifikus cink kelátor, CaEDTA segítségével végeztük, valamint kihasználtuk azt a tényt, hogy a moharostok tartalmaznak, míg a perforáns pálya rostjai nem tartalmaznak cinket<sup>5</sup>. Az extracelluláris oldatba adott 1 mM CaEDTA növelte a moharost stimulációval, de nem változtatta meg a perforáns pálya stimulációval kiváltott NMDA áram amplitúdóját.

## Megbeszélés

Ebben a kísérletsorozatban a temporális lebeny epilepszia kialakulása során jelentkező moharost sarjadzás jelenségét vizsgáltuk hisztológiai, elektrofiziológiai, fotostimulációs és farmakológiai módszerekkel a pilokarpin patkány modellben. Megállapítottuk, hogy a caudális hippocampusban normál, státusz epileptikuson nem átesett és spontán epileptikus rohamokat nem mutató állatokban is létrejönnek funkcionális szemcsesejt – szemcsesejt monoszínaptikus kapcsolatok, csak alacsony gyakorisággal. Korábban normál, nem epileptikus állatban szemcsesejt – szemcsesejt monoszínaptikus kapcsolatokat nem figyeltek meg (Wuarin és Dudek, 1996). Egyik lehetőség, hogy technikai nehézségek miatt nem csak szemcsesejteket, de a dentát hilusban található mohasejteket is stimuláltuk. Ennek ellentmond az a megfigyelés, hogy minden, antidromikus moharost stimulálással vagy fotostimulálással kiváltott EPSC-nek mérhető

---

<sup>4</sup> Molnar P. és J. V. Nadler, "O-(CNB-caged) GABA selectively blocks inhibitory synaptic transmission in rat hippocampal slices," *Eur. J. Pharmacol.* 391:255-262 (2000).

<sup>5</sup> Molnar P. és J. V. Nadler, "Synaptically-released zinc inhibits N-methyl-D-aspartate receptor activation at recurrent mossy fiber synapses," *Brain Res.* 910:205-207 (2001).

volt az NMDA-receptor mediálta komponense NBQX jelenlétében, vagyis nagy valószínűséggel monoszinaptikus EPSC-ről volt szó. Ezen kívül a fotostimulációs mérésekben egyértelműen megfigyelhettünk monoszinaptikusnak tűnő szemcsesejt – szemcsesejt kapcsolatokat a kontroll állatokban is. Ezek alapján az adatok alapján el kellett fogadnunk, hogy legalábbis a caudális hippocampusban, kis valószínűséggel, de létrejönnek monoszinaptikus szemcsesejt-szemcsesejt kapcsolatok egészséges állatokban is.

Státusz epileptikus után 10 héttel (de nem 4-6 nappal) az epileptikus állatokban drasztikusan megnövekedett a szemcsesejt – szemcsesejt szinapszisoknak a száma. A fotostimulációs mérések adatait használva kiszámolhattuk, hogy SE hatszorosára növeli a szemcsesejt – szemcsesejt kapcsolatok számát, valamint hogy a szinaptikus kapcsolat valószínűsége két szemcsesejt között epileptikus állatokban kb. 0.5%. A státusz epileptikus szelektíven befolyásolta a moharostok által mediált szinaptikus transzmissziót, mivel a perforáns pálya ingerlésével a szemcsesejtekben kiváltott válaszok nem különböztek epileptikus vs kontroll állatokban. Ezek az eredmények összhangban vannak más kutatók korábbi eredményeivel is a moharost sarjadás funkcionális következményeivel kapcsolatban. A mi fotostimulációs méréseinkhez hasonló elrendezésben glutamát lokális injekciója a szemcsesejt rétegbe megnövelte a spontán excitatórikus posztzinaptikus áramok frekvenciáját a szemcsesejteken (Wuarin és Dudek, 1996). A mi fotostimulációs méréseink demonstrálták először egyértelműen a szemcsesejt – szemcsesejt monoszinaptikus kapcsolatok létezését és fiziológiai jellemzőit. A méréseink arra is rávilágítottak azonban, hogy funkcionális szemcsesejt – szemcsesejt szinaptikus kapcsolatok még az epileptikus állatokban is, amelyekben hisztológiai módszerekkel nagyon erős moharost sarjadás mutatható ki, viszonylag ritkák. Ha ehhez hozzávesszük, hogy normál aktivitás esetén a szinaptikus hiba százalék viszonylag magas ezekben a szinapszisokban, akkor nem tűnik valószínűnek, hogy a moharost sarjadás és az újonnan képződött szemcsesejt – szemcsesejt szinaptikus kapcsolatok az elsődleges / egyedüli okai az epileptikus rohamok kialakulásának temporális lebeny epilepsiában.

### *Szemcsesejt – szemcsesejt monoszinaptikus EPSC-k tulajdonságai*

Az fotostimulációval kiváltott monoszinaptikus EPSC-k amplitúdója (~30 pA) kisebbnek bizonyult a szemcsesejt – CA3 piramissejt esetében korábban leírtaknál (~70 pA) (Jonas és mtsai., 1993) de nagyobbak a hippocampusz más területein leírt EPSC-knél (Allen és Stevens, 1994; Kneisler és Dingledine, 1995). Ez a megfigyelés összhangban van korábbi hisztológiai adatokkal, ugyanis a moharostok axon terminálisai a gyurus dentatus molekuláris rétegében kisebbek, mint a CA3-ban, de mindenképpen nagyobbak mint egy átlagos axon terminális (Okazaki és mtsai., 1995). A mi kísérleteinkben Az EPSC-k időbeli lefutása a szemcsesejteken lassabb volt, mint amit korábban mások a CA3 piramissejtek esetében megfigyeltek (Jonas és mtsai., 1993). Egy lehetséges magyarázat, hogy mi a kísérleteinket öreg állatokon végeztük, és a szemcsesejtek elektrofiziológiai tulajdonságai korfüggőek lehetnek. A viszonylag magas szinaptikus hiba százalék (failure rate), amit kísérleteink során tapasztaltunk, összhangban van mások megfigyeléseivel a moharost – CA3 szinaptikus kapcsolatokra (Jonas és mtsai., 1993), valamint a Schaffer kollaterális – CA1 piramissejt kapcsolatokra (Allen és Stevens, 1994) vonatkozóan. A moharost – kosársejt szinapszisok esetén a

mienkhez hasonló körülmények között a szinaptikus hiba százalék 33%-nak bizonyult (Kneisler és Dingledine 1995).

#### *Szemcsesejt – szemcsesejt kapcsolatok AMPA és NMDA komponense*

Mindhárom mérési módszerünk egybehangzóan bizonyította, hogy mind kontroll, mind epileptikus állatokban a glutamaterg szemcsesejt – szemcsesejt szinaptikus transzmisszióban mind AMPA, mind NMDA receptorok részt vesznek. NMDA receptorok szerepét korábban leírták a moharost – CA3 piramis sejtek (Weisskopf és Nicoll, 1995) valamint a moharost – gátló kosársejtek (Kneisler és Dingledine, 1995) szinaptikus kapcsolatok esetén is. Kísérleteink szerint az NMDA komponens amplitúdója nagyobb volt az epileptikus állatokban, mint a kontroll állatokban (legalábbis, amikor a moharostokat stimuláltuk). Epileptikus fokozott aktivitás során ez kiemelt jelentőségű lehet, mivel ilyenkor a szemcsesejtek depolarizálódnak és a lassan inaktíváló NMDA receptorok fokozott aktivációja elősegítheti az epileptikus szinkronizált aktivitás terjedését a gyrus dentatuson keresztül (Dingledine és mtsai., 1990; Traub és mtsai., 1994). Ezt azok a korábbi megfigyelések is alátámasztják, amelyek szerint D-AP5, egy NMDA antagonist, gátolta az antidromikus moharost ingerléssel kiváltható epileptikus aktivitás kialakulását a gyrus dentatusban (Patrylo és Dudek, 1998). Az a mechanizmus, amivel az antidromikus moharost stimulálással kiváltott EPSC-k NMDA komponense epileptikus patkányokban többszörösére növekedett, amíg a perforáns pálya ingerléssel kiváltott EPSC-k NMDA komponense nem változott, nem ismert. A fotostimulációs kísérleteinkben nem tapasztaltuk a monoszynaptikus EPSC-k NMDA receptor mediálta komponensének növekedését epileptikus állatokban. Egy lehetséges magyarázat, hogy az antidromikus moharost stimulálás esetén az EPSC-ben nem csak a szinapszisban, hanem az extraszinaptikusan elhelyezkedő NMDA receptorok is részt vehettek. A fotostimulációs kísérletben a stimuláció erőssége sokkal kisebb volt, vagyis valószínűleg az extraszinaptikus NMDA receptorok kevésbé jutottak szerephez.

#### *GABAerg gátlás epilepsziában*

Az antidromikus moharost stimulálással kiváltott gátló posztzinaptikus áramok (IPSC) amplitúdója mintegy 40%-al kisebbnek bizonyult státusz epileptikuson átesett patkányokban mint a kontroll állatokban 4-6 nappal a státusz epileptikus után mérve. Ez valószínűleg annak az eredménye, hogy a moharsejtek, amelyek kiemelt szerepet játszanak a gátló interneuronok stimulálásában, szelektíven elpusztulnak státusz epileptikuszt követően (Obenaus és mtsai., 1993). Az igazán meglepő eredmény azonban az volt, hogy kontroll állatokban a moharost-függő GABAerg gátlás szignifikánsan csökken az állatok korának előrehaladtával, és ez a csökkenés nem következik be epileptikus állatokban. Vagyis valamilyen mechanizmus, amely összefügghet a moharost sarjadzással, növeli a moharost-függő GABAerg gátlást a gyrus dentatusban epilepsziás állatokban. Ezt az is alátámasztja, hogy bár a perforáns pálya stimulálással kiváltott IPSC-k amplitúdója is csökkent az állatok korának az előrehaladtával, de itt nem volt különbség az epileptikus és a kontroll állatok között.

A moharsejtek pusztulásán kívül a gátló interneuronok szelektív pusztulása is magyarázatot adhat a moharost-függő GABAerg gátlás szelektív csökkenésére a gyrus dentatusban SE után (Buckmaster és Dudek, 1997; Lurton és mtsai., 1997). Korábbi

eredmények azt sugallják, hogy a GABAerg interneuronok száma csökken az állatok korának az előrehaladtával (Shetty és Turner, 1998). Az elpusztuló interneuron populáció azonos lehet azzal, amely SE után pusztul el, ez magyarázatot adhat arra, hogy az SE utáni sejtpusztulás lezajlása után a GABAerg gátlás nem csökken tovább epileptikus állatokban.

#### *A moharostokból szinaptikusan ürülő cink szerepe epilepsiában*

Az extracelluláris oldathoz adott cink csökkentette mind a muscimol helyi adásával kiváltott GABA<sub>A</sub> receptor mediálta áramokat, mind a perforáns pálya ingerlésével kiváltott NMDA receptor mediálta áramokat, de csak akkor, amikor a kétértékű anionokat eltávolítottuk az extracelluláris oldatból. Cink szintén csökkentette a spontán gátló posztszinaptikus áramok amplitúdóját. Cink a mi kísérleteinkben jelentősen gyengébben gátolta a GABA<sub>A</sub> receptorokat mint ahogyan azt más kutatók korábban leírták (Gibbs és mtsai., 1997). Ennek egy lehetséges magyarázata lehet, hogy mi a szemcsesejtek dendritjén, a gyrus dentatus belső molekuláris rétegében teszteltük a GABA<sub>A</sub> receptorokat agyszeletben, míg a korábbi kísérleteket izolált sejteken, a sejt szómáján elhelyezkedő receptorokon végezték.

Antidromikus moharost stimulálás NBQX és D-AP5 jelenlétében semmilyen hatással sem volt a szemcsesejtek dendritjén fotostimulálással kiváltott GABA<sub>A</sub> receptor mediálta áramokra epileptikus állatokban, még olyan körülmények között sem, amikor a cink ürülésének valószínűségét megnöveltük. A kísérletek technikai nehézségei miatt ez az eredmény nem jelenti azt, hogy 100% biztonsággal kizártuk ezt a lehetőséget, de mindenesetre a valószínűsége annak, hogy ez bekövetkezzék a mi méréseink alapján nagyon alacsony. Ahhoz, hogy a moharostokból ürülő cink gátolhassa a GABA<sub>A</sub> receptorokat, először is elég nagy koncentrációban kell kilépnie a terminálisokból ahhoz, hogy a szinaptikus részből kijutva elérje a szomszédos GABAerg terminálisokat még elég magas koncentrációban ahhoz, hogy gátolni tudja azokat. A cink szabad diffúzióját a szinaptikus részből két folyamat is gátolja. Az egyik: a neurotranszmitterekhez hasonlóan létezik olyan transzporter, amelynek a feladata cink visszavétele a preszinaptikus terminálisba, vagyis preszinaptikus aktivitás után a cink koncentrációja nagyon gyorsan csökken a szinapszisban, nem a viszonylag lassú diffúzió a meghatározó tényező (Howell és mtsai., 1984). Másodsorban a sejt közötti folyadék mindig tartalmaz kétértékű anionokat, amelyek megkötik a szabad cinket így azt hatástalanítják. A cinknek ezek a tulajdonságai magyarázatul szolgálhatnak a negatív eredményünkre.

Más kísérletekben megállapítottuk, hogy a szinaptikusan a moharostokból ürülő cink kismértékben gátolta a posztszinaptikus NMDA receptorokat, vagyis játszhat (eszerint gátló) szerepet az epileptikus rohamok kialakulásában. Későbbi saját mérések és más kutatók vizsgálatai ellentmondó képet festettek a cink lehetséges szerepéről epilepsiában, de általában a cink hatása kicsi volt és igen nehezen kimutatható vagy értékelhető. Legújabb eredmények szerint cink epileptogén hatású a kindling modellben (Foresti és mtsai., 2008), nincs hatása a pilokarpin által kiváltott rohamokra (Noyan és mtsai., 2007) de más szerzőknél facilitálta a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek epileptikus aktivitását kifejlett epilepszia esetén a pilokarpin modellben (Timofeeva és Nadler, 2006).

Az általunk használt GABA prekuzornak korábbi mérések szerint semmilyen aktivitása nem volt  $GABA_A$  receptorokon (Gee és mtsai., 1994). A mi kísérleti rendszerünkben cGABA 200  $\mu$ M koncentrációban egy gyenge  $GABA_A$  receptor antagonistaként viselkedett. Ezzel ellentétben cGABA jelenlétében a GABA mediálta spontán IPSC-k teljesen eltűntek a szemcsejteken mérve. cGABA-nak nem volt mérhető hatása az glutamaterg szinaptikus transzmisszióra a gyrus dentatusban. Méréseink alapján nem tudtuk egyértelműen eldönteni, vajon cGABA hatása a GABAerg szinaptikus transzmisszióra preszinaptikus vagy posztszinaptikus mechanizmussal mediálódik-e. cGABA hatása a GABAerg szinaptikus transzmisszióra hasonlóan mutatkozott, mint amit bizonyos phenothiazine-típusú antipszichotikus gyógyszerek esetén leírtak (Zorumski és Yang, 1988). A mi kísérletünk szempontjából úgy gondoltuk, a cGABA által a  $GABA_A$  receptorokra kifejtett, a mi kísérleti körülményeink között gyenge gátlás nem befolyásolta a méréseink kimenetelét, különösen, hogy cGABA-nak semmilyen hatása sem volt a glutamaterg transzmisszióra és így nagy valószínűséggel a cink szinaptikus ürülésére sem.

## Összefoglalás

Ebben a kísérletsorozatban megmutattuk, hogy funkcionális szemcsesejt-szemcsesejt kapcsolatok normál, nem epileptikus patkányokban is megfigyelhetők a kaudális hippokampuszban. Státusz epileptikus hatására a moharost sarjadás során a funkcionális szemcsesejt – szemcsesejt szinapszisok száma drasztikusan megnő. Ezek az újonnan képződött szinapszisok fiziológiai és farmakológiai tulajdonságaikban nem különböznek a kontroll állapotokban megfigyelhető szemcsesejt – szemcsesejt szinapszisoktól. A szemcsesejt – szemcsesejt szinaptikus jelátvitelben nem csak AMPA, de NMDA receptorok is részt vesznek. A moharostokból szinaptikus aktivitás során ürülő cink folyamatosan és lehet, hogy frekvenciafüggően<sup>6</sup> gátolja a posztszinaptikus NMDA receptorokat, de valószínűleg a szomszédos GABAerg szinapszisok működésére csak minimális hatással van. Ezek az eredmények alátámasztják azt az elméletet, hogy a moharost sarjadás során egy funkcionális pozitív visszacsatolás jön létre a gyrus dentatusban, amely növeli a gyrus dentatus excitabilitását és elősegítheti az epileptikus aktivitás keletkezését / terjedését; azonban a szemcsesejt – szemcsesejt szinaptikus kapcsolatok még epileptikus állapotokban is viszonylag ritkák, vagyis a moharost sarjadás valószínűleg nem lehet az epilepszia kialakulásának elsődleges / egyetlen mechanizmusa.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném nyilvánítani **Dr. Victor Nadlernek**, akinek a laborjában ezeket a méréseket végezhettem, **Dr. Maxine Okazakinak**, aki sokat segített az agyszelet elektrofiziológiai módszerek elsajátításában, **Dr. Hernádi Istvánnak**, jelenlegi konzulensemnek, a sok segítségért, amit kaptam tőle, **Dr. Csoknya Mária Professzor Asszonynak** a dolgozat többszöri átnézéséért és javításáért, valamint az önzetlen segítségéért, **Dr. Gábor Róbert Rektor Úrnak**, a Doktori Iskola vezetőjének hogy lehetővé tette a programban való részvételemet valamint a **Pécsi Tudományegyetem Biológia Doktori Iskola minden közreműködőjének** színvonalas munkájáért.

---

<sup>6</sup> Feng, L., **P. Molnar** és J. V. Nadler: Short-Term Frequency-Dependent Plasticity at Recurrent Mossy Fiber Synapses of the Epileptic Brain. *J. Neurosci.* 23. 5381-5390 (2003).

- Acsady, L., A. Kamondi, A. Sik, T. Freund és G. Buzsáki (1998). "GABAergic Cells Are the Major Postsynaptic Targets of Mossy Fibers in the Rat Hippocampus." *Journal of Neuroscience* **18**(9): 3386-3403.
- Allen, C. és C. F. Stevens (1994). "An Evaluation of Causes for Unreliability of Synaptic Transmission." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(22): 10380-10383.
- Amaral, D. G., H. E. Scharfman és P. Lavenex (2007). "The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies)" *Progress in Brain Research* **163**: 3-22.
- Buckmaster, P. S. és F. E. Dudek (1997). "Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats." *Journal of Comparative Neurology* **385**(3): 385-404.
- Cavalheiro, E. A. (1995). "The Pilocarpine Model of Epilepsy." *Italian Journal of Neurological Sciences* **16**(1-2): 33-37.
- Cronin, J., A. Obenaus, C. R. Houser és F. E. Dudek (1992). "Electrophysiology of Dentate Granule Cells after Kainate-Induced Synaptic Reorganization of the Mossy Fibers." *Brain Research* **573**(2): 305-310.
- Curia, G., D. Longo, G. Biagini, R. S. G. Jones és M. Avoli (2008). "The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy." *Journal of Neuroscience Methods* **172**(2): 143-157.
- Dingledine, R., C. J. McBain és J. O. McNamara (1990). "Excitatory Amino-Acid Receptors in Epilepsy." *Trends in Pharmacological Sciences* **11**(8): 334-338.
- Foresti, M. L., G. M. Arisi, A. Fernandes, C. Q. Tilelli és N. Garcia-Cairasco (2008). "Chelatable zinc modulates excitability and seizure duration in the amygdala rapid kindling model." *Epilepsy Research* **79**(2-3): 166-172.
- Gee, K. R., R. Wieboldt és G. P. Hess (1994). "Synthesis and Photochemistry of a New Photolabile Derivative of Gaba - Neurotransmitter Release and Receptor Activation in the Microsecond Time Region." *Journal of the American Chemical Society* **116**(18): 8366-8367.
- Gibbs, J. W., M. D. Shumate és D. A. Coulter (1997). "Differential epilepsy-associated alterations in postsynaptic GABA(A) receptor function in dentate granule and CA1 neurons." *Journal of Neurophysiology* **77**(4): 1924-1938.
- Haas, C. és M. Frotscher (2009). "Reelin deficiency causes granule cell dispersion in epilepsy." *Experimental Brain Research Published Online*.
- Halász, P. és A. Fogarasi (2006). "Temporal lobe epilepsy--state of art review - Temporalis lebeny epilepszia--"state of art" beszámoló." *Ideggyógyászati szemle* **59**(9-10): 331-352.
- Hardison, J. L., M. M. Okazaki és J. V. Nadler (2000). "Modest increase in extracellular potassium unmasks effect of recurrent mossy fiber growth." *Journal of Neurophysiology* **84**(5): 2380-2389.
- Howell, G. A., M. G. Welch és C. J. Frederickson (1984). "Stimulation-Induced Uptake and Release of Zinc in Hippocampal Slices." *Nature* **308**(5961): 736-738.
- Jonas, P., G. Major és B. Sakmann (1993). "Quantal Components of Unitary Epscs at the Mossy Fiber Synapse on Ca3 Pyramidal Cells of Rat Hippocampus." *Journal of Physiology-London* **472**: 615-663.
- Kneisler, T. B. és R. Dingledine (1995). "Synaptic Input From CA3 Pyramidal Cells to Dentate Basket Cells in Rat Hippocampus." *Journal of Physiology-London* **487**(1): 125-146.
- Longo, B. M. és L. E. A. Mello (1998). "Supragranular mossy fiber sprouting is not necessary for spontaneous seizures in the intrahippocampal kainate model of epilepsy in the rat." *Epilepsy Research* **32**(1-2): 172-182.
- Lothman, E. W., J. L. Stringer és E. H. Bertram (1992). "The Dentate Gyrus as a Control Point for Seizures in the Hippocampus and Beyond." *Epilepsy Research*: 301-313.
- Lurton, D., L. Sundstrom, C. Brana, B. Bloch és A. Rougier (1997). "Possible mechanisms inducing granule cell dispersion in humans with temporal lobe epilepsy." *Epilepsy Research* **26**(2): 351-361.
- Maglóczy, Z. és T. F. Freund (2005). "Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus." *Trends in Neurosciences* **28**(6): 334-340.
- Molnar, P. és J. V. Nadler (1999). "Mossy fiber-granule cell synapses in the normal and epileptic rat dentate gyrus studied with minimal laser photostimulation." *Journal of Neurophysiology* **82**(4): 1883-1894.
- Morimoto, K., M. Fahnstock és R. J. Racine (2004). "Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain." *Progress in Neurobiology* **73**(1): 1-60.
- Noyan, B., M. S. Jensen és G. Danscher (2007). "The lack of effects of zinc and nitric oxide in initial state of pilocarpine-induced seizures." *Seizure-European Journal of Epilepsy* **16**(5): 410-416.



- Obenaus, A., M. Esclapez és C. R. Houser (1993). "Loss of Glutamate-Decarboxylase Messenger-Rna Containing Neurons in the Rat Dentate Gyrus Following Pilocarpine-Induced Seizures." Journal of Neuroscience **13**(10): 4470-4485.
- Okazaki, M. M., D. A. Evenson és J. V. Nadler (1995). "Hippocampal Mossy Fiber Sprouting and Synapse Formation after Status Epilepticus in Rats - Visualization after Retrograde Transport of Biocytin." Journal of Comparative Neurology **352**(4): 515-534.
- Okazaki, M. M., P. Molnar és J. V. Nadler (1999). "Recurrent mossy fiber pathway in rat dentate gyrus: Synaptic currents evoked in presence and absence of seizure-induced growth." Journal of Neurophysiology **81**(4): 1645-1660.
- Parent, J. M., R. C. Elliott, S. J. Pleasure, N. M. Barbaro és D. H. Lowenstein (2006). "Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy." Annals of Neurology **59**(1): 81-91.
- Patrylo, P. R. és F. E. Dudek (1998). "Physiological unmasking of new glutamatergic pathways in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-induced epileptic rats." Journal of Neurophysiology **79**(1): 418-429.
- Ribak, C. E. (1985). "2 Different Abnormal Gabaergic Circuits in Experimental-Models of Epilepsy - Loss of Inhibition and Disinhibition." Epilepsia **26**(5): 525-525.
- Ribak, C. E. és G. M. Peterson (1991). "Intragranular mossy fibers in rats and gerbils from synapses with the somata and proximal dendrites of basket cells in the dentate gyrus." Hippocampus **1**(4): 355-364.
- Scharfman, H., J. Goodman és D. McCloskey (2007). "Ectopic granule cells of the rat dentate gyrus." Developmental Neuroscience **29**(1-2): 14-27.
- Scharfman, H. E., A. L. Sollas, R. E. Berger és J. H. Goodman (2003). "Electrophysiological evidence of monosynaptic excitatory transmission between granule cells after seizure-induced mossy fiber sprouting." Journal of Neurophysiology **90**(4): 2536-2547.
- Sharma, A. K., R. Y. Reams, W. H. Jordan, M. A. Miller, H. L. Thacker és P. W. Snyder (2007). "Mesial temporal lobe epilepsy: Pathogenesis, induced rodent models and lesions." Toxicologic Pathology **35**(7): 984-999.
- Shetty, A. K. és D. A. Turner (1998). "Hippocampal interneurons expressing glutamic acid decarboxylase and calcium-binding proteins decrease with aging in Fischer 344 rats." Journal of Comparative Neurology **394**(2): 252-269.
- Sloviter, R. S. (1994). "The Functional-Organization of the Hippocampal Dentate Gyrus and Its Relevance to the Pathogenesis of Temporal-Lobe Epilepsy." Annals of Neurology **35**(6): 640-654.
- Tauck, D. L. és J. V. Nadler (1985). "Evidence of Functional Mossy Fiber Sprouting in Hippocampal-Formation of Kainic Acid-Treated Rats." Journal of Neuroscience **5**(4): 1016-1022.
- Timofeeva, O. és J. V. Nadler (2006). "Facilitation of granule cell epileptiform activity by mossy fiber-released zinc in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy." Brain Research **1078**: 227-234.
- Traub, R. D., J. G. R. Jefferys és M. A. Whittington (1994). "Enhanced Nmda Conductance Can Account for Epileptiform Activity-Induced by Low Mg<sup>2+</sup> in the Rat Hippocampal Slice." Journal of Physiology-London **478**(3): 379-393.
- Vogt, K., J. Mellor, G. Tong és R. Nicoll (2000). "The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses." Neuron **26**(1): 187-196.
- Wuarin, J. P. és F. E. Dudek (1996). "Electrographic seizures and new recurrent excitatory circuits in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-treated epileptic rats." Journal of Neuroscience **16**(14): 4438-4448.
- Zorumski, C. F. és J. Yang (1988). "Non-Competitive Inhibition of Gaba Currents by Phenothiazines in Cultured Chick Spinal-Cord and Rat Hippocampal-Neurons." Neuroscience Letters **92**(1): 86-91.

### A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények

1. Okazaki, M., **P. Molnar** és J. V. Nadler, "Recurrent mossy fiber pathway in the rat dentate gyrus: synaptic currents evoked in the presence and absence of seizure-induced growth," *J. Neurophysiol.* 81:1645-1660 (1999).
2. **Molnar P.** és J. V. Nadler, "Mossy fiber - granule cell synapses studied with whole cell patch clamp recording and laser photostimulation," *J. Neurophysiol.* 82:1883-1894 (1999).
3. **Molnar P.** és J. V. Nadler, "O-(CNB-caged) GABA selectively blocks inhibitory synaptic transmission in rat hippocampal slices," *Eur. J. Pharmacol.* 391:255-262 (2000).
4. **Molnar P.** és J. V. Nadler, "Lack of effect of mossy fiber-released zinc on postsynaptic GABAA receptors in the pilocarpine model of epilepsy," *J. Neurophysiol.* 85:1932-40 (2001).
5. **Molnar P.** és J. V. Nadler, "Synaptically-released zinc inhibits N-methyl-D-aspartate receptor activation at recurrent mossy fiber synapses," *Brain Res.* 910:205-207 (2001).
6. Feng, L., **P. Molnar** és J. V. Nadler: Short-Term Frequency-Dependent Plasticity at Recurrent Mossy Fiber Synapses of the Epileptic Brain. *J. Neurosci.* 23. 5381-5390 (2003).

### A disszertáció alapjául szolgáló konferencia előadások és posztterek

1. **Molnár, P.** és J.V. Nadler: Mossy fiber - granule cell synapses studied with whole cell patch clamp recording and laser photostimulation (27th. Annual meeting of American Neuroscience Association, New Orleans, USA, 1997).

### Egyéb tudományos közlemények

1. Gaál L. és **P. Molnár**, "Effects of vinpocetine on noradrenergic neurons in rat locus coeruleus," *Eur. J. Pharmacol.* 187:537-539 (1990).
2. **Molnár P.** és L. Gaál, "Effect of different subtypes of cognition enhancers on long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo," *Eur. J. Pharmacol.* 215:17-22 (1992).
3. Tarnawa, I., **P. Molnár**, L. Gaál, és F. András, "Inhibition of hippocampal field potentials by GYKI 52466 in vitro és in vivo," *Acta Physiol. Hungarica* 79:169-175 (1992).
4. **Molnár P.**, L. Gaál, és Cs. Horváth, "The impairment of long-term potentiation in rats with medial septal lesion és its restoration by cognition enhancers," *Neurobiology* 2:255-266 (1994).
5. Maksay G., **P. Molnár**, és L. Gruber, "Common modes of action of  $\gamma$ -butyrolactones and pentylene-tetrazol on the convulsant és benzodiazepine sites and channel activity of the GABA receptor-ionophore complex," *Eur. J. Pharmacol. - Mol. Pharmacol. Sect.* 288:61-68 (1994).
6. **Molnár P.** és S.L. Erdő, "Vinpocetine is as potent as phenytoin in blocking voltage-gated sodium channels in rat cortical neurons," *Eur. J. Pharmacol.* 273:303-306 (1995).
7. Lakics V., **P. Molnár**, és S.L. Erdő, "Protection against veratridine toxicity in rat cortical neurons: relationship to sodium channel blockade," *Neuroreport* 7:89-92 (1995).
8. Maksay G., **P. Molnár**, és M. Simonyi, "Thermodynamics and kinetics of t-butylbicyclophosphorothionate binding differentiate convulsant and depressant barbiturate stereoisomers acting via GABAA ionophores," *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 353:306-13 (1996).
9. **Molnár P.** és S.L. Erdő, "Differential effects of five glycine site antagonists on NMDA receptor desensitization," *Eur. J. Pharmacol.* 311:311-314 (1996).
10. Erdő S.L., **P. Molnár**, V. Lakics, J.Zs. Bence, és Zs. Tömösközi, "Vincamin and vincanol are potent blockers of voltage-gated Na channels," *Eur. J. Pharmacol.* 314:69-73 (1996).
11. Das, M., **P. Molnar**, H. Devaraj, M. Poeta és J. J. Hickman: Electrophysiological and morphological characterization of rat embryonic motoneurons in a defined system. *Biotechnology Progress* 19. 1756-1761 (2003)
12. Das, M., **P. Molnar**, C. Gregory, L. M. Riedel és J. J. Hickman: Long-term culture of embryonic rat cardiomyocytes on organosilane surface in serum-free media. *Biomaterials*, 25: 5643-47 (2004)

13. Natarajan, A., **P. Molnar**, K. Sieverdes, A. Jamshidi és J.J. Hickman: Microelectrode array recordings of cardiac action potentials as a high throughput method to evaluate pesticide toxicity. *In Vitro Toxicology*, 20 (3): 375-81 (2005)
14. Mohan, D. K., **P. Molnar**, és J. J. Hickman: Toxin detection based on action potential shape analysis using a realistic mathematical model of differentiated NG108-15 cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (9): 1804-11 (2006)
15. Das M, Bhargava N, Gregory C, Riedel L, **Molnar P** és Hickman JJ. Adult Rat Spinal Cord Culture on an Organosilane Surface in a Novel Serum-Free Medium. *In Vitro – Animal*, 41 (10): 343-8 (2005)
16. Peng, P.L., Zhong, X., Tu W., Soundarapandian, M.M., **Molnar, P.** Zhu D., Lau L., Liu S. , Liu F. és Lu Y.M. ADAR2-Dependent RNA Editing of AMPA Receptor Subunit GluR2 Determines Vulnerability of Neurons in Forebrain Ischemia. *Neuron*, 49, 719-733 (2006).
17. Xu, T., C. Gregory, **P. Molnar**, S. Jalota, S. B. Bhaduri, T. Boland: Viability and Electrophysiology of Neural Cell Structures made by the Inkjet Printing. *Biomaterials*, 27, 3580-3588. (2006)
18. Das M., C. Gregory, **P. Molnar**, L. M. Riedel és J. J. Hickman: A Defined System to Allow Skeletal Muscle Differentiation and Subsequent Integration with Silicon Microstructures. *Biomaterials*. 27, 4374-80 (2006)
19. **Molnar P.**, W. Wang, A. Natarajan, J. W. Rumsey és J. J. Hickman: Photolithographic Patterning of C2C12 Myotubes using Vitronectin as Growth Substrate in Serum-Free Medium. *Biotechnology Progress*, 23: 265-268 (2007)
20. Wilson K. A., **P. Molnar** és J. J. Hickman: Integration of functional myotubes with a Bio-MEMS device for non-invasive interrogation. *Lab on a Chip*, 7, 920-922 (2007)
21. Das, M., K. Wilson, **P. Molnar**, és J. J. Hickman: Differentiation of skeletal muscle and integration of myotubes with silicon microstructures using serum-free medium and a synthetic silane substrate. *Nature Protocols*, 2, 1795-1801. (2007)
22. Das, M., J. W. Rumsey, C. A. Gregory, N. Bhargava, J. F. Kang, **P. Molnar**, L. Riedel, X. Guo és J. J. Hickman: Embryonic motoneuron-skeletal muscle co-culture in a defined system. *Neuroscience*, 146. 481-488 (2007)
23. Rumsey, J. W., M. Das, J. F. Kang, R. Wagner, **P. Molnar** és J. J. Hickman: Tissue engineering intrafusal fibers: Dose- and time-dependent differentiation. *Biomaterials*. 29. 994-1004 (2008)
24. Ramalingam, M., **P. Molnar**, K. P. Rao és J. J. Hickman: Biomaterial Surface patterning utilizing self assembled monolayers to control neuronal cell behavior. *International Journal of Biomedical Engineering and Technology*. 2, 104 - 134 (2009)
25. Natarajan A., C.J. Chun, J.J. Hickman és **P. Molnar**: Growth and Electrophysiological Properties of Rat Embryonic Cardiomyocytes on Hydroxyl- and Carboxyl-Modified Surfaces. *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*. 19, 1319-31 (2008)
26. Rolland, J., K. , K. S. Lee, L. A. Mahmood, L. Fluck, J. Duarte, I. Kaya, A. Santhanam, P. Meemon, S. Murali, O. Ilegbusi, P. Kupelian, W. Warren, **P. Molnar**, J. J. Hickman és P. E. Kolattukudy. " Collaborative Engineering: 3-D Optical Imaging and Gas Exchange Simulation of In-Vitro Alveolar Constructs." *Studies in health technology and informatics* 132: 426-432. (2008)
27. Thakore, V., A. Behal, **P. Molnar**, D. Leistriz és J.J. Hickman, Nanoscale Nonlinear Dynamic Characterization of the Neuron-Electrode Junction. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, 5, 2164-2169 (2008)
28. Liu, J., J.W. Rumsey, M. Das, **P. Molnar**, C. Gregory, L. Riedel, et al., Electrophysiological and immunocytochemical characterization of DRG neurons on an organosilane surface in serum-free medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 44(5-6): p. 162-168. (2008)
29. Varghese, K., M. Das, N. Bhargava, M. Stancescu, **P. Molnar**, M. S. Kindy és J. J. Hickman: Regeneration and characterization of adult mouse hippocampal neurons in a defined in vitro system . *Journal of Neuroscience Methods*: 177, 51-59 (2009)
30. Dhir, V., A. Natarajan, M. Stancescu, A. Chunder, N. Bhargava, M. Das, L. Zhai, **P. Molnar**: Patterning of diverse mammalian cell types in serum free medium with photoablation. *Biotechnology Progress*: 25, 594-603 (2009)
31. Xu, T., **P. Molnar**, C. Gregory, M. Das, T. Boland és J.J. Hickman: Electrophysiological characterization of embryonic hippocampal neurons cultured in a 3D collagen hydrogel. *Biomaterials*. In Press (2009)

## Egyéb konferencia előadások és poszterek

1. Kang J-F, M. Poeta, L. Riedel, M. Das, C. Gregory, **P. Molnar** és J. J. Hickman, "Patterned Neuronal Networks for Robotics, Neurocomputing, Toxin Detection and Rehabilitation," Proceeding of 24th Army Science Conference, Nov. 29th, 2004.
2. Hickman, JJ, Das, M., Kang, J-F, Chun, ChJ, **Molnar, P.**, Wilson, K., Varghese, K. és Leistriz, D.: Hybrid Biological / Non-biological Systems for Toxin Detection, Functional Drug Screening and as Disease Models. Florida Tech Transfer Conference, Orlando, May 2005. Regional
3. Das, M., Bhargava, N., Patil, S., Riedel, L., **Molnar, P.**, Seal, S. és Hickman, J.J.: Novel In Vitro Cell Culture Model of Adult Mammalian Spinal Cord Cells. In vitro Biology Meeting, Baltimore, June 2005, International
4. **Molnar, P.**, Mohan, D.K. és Hickman, J.J.: Toxin detection based on action potential shape analysis using a realistic mathematical model of differentiated NG108-15 cells. Society for Neuroscience, Washington, November, 2005, International
5. Hickman, J.J., **Molnar, P.**, Das, M., Riedel, L., Kang, J-F., Chun, ChJ. és Wilson, K.: Patterned Neuronal Networks for High-Throughput Functional Drug Screening and for Functional Models of Neurodegenerative Diseases. Society for Neuroscience, Washington, November, 2005, International
6. **Molnar, P.** és Hickman, J.J.: Engineered Neuronal Networks. Winter conference on neuronal plasticity. Guadeloupe, February, 2005, International
7. Mitchell P.O., **Molnar, P.**, Gourdie R.G., Borg, T.K. és Gao, B.Z.: Fibroblast-Myocyte Electrical Coupling in a Micropatterned Cell Coculture Biomedical Engineering Society, Baltimore, September, 2005. International
8. Kerry A. Wilson, Mainak Das, **P. Molnar**, és J. J. Hickman: Reflex-arc on a chip: An in silico cell culture analog American Chemical Society Meeting & Exposition. March 26 - 30, 2006. Atlanta, GA USA
9. **Peter Molnar**, Melissa Kuchma, Anupama Natarajan, Jung-Fong Kang, Neelima Bhargava, Mainak Das és J. J. Hickman: Photolithographical patterning of single cells and cell assemblies on commercial multielectrode arrays. 5th MEA meeting on Substrate Embedded Microelectrode Arrays, July 04-07, 2006, Reutlingen, Germany,
10. **Peter Molnar**, Jung-Fong Kang, Neelima Bhargava, Mainak Das, Anupama Natarajan és James J. Hickman: Design, implementation and characterization of engineered neuronal networks. FENS Forum, July 8-12, 2006, Vienna, Austria
11. **Peter Molnar**, Jung-Fong Kang, Neelima Bhargava, Mainak Das, Anupama Natarajan és James J. Hickman: Characterization and applications of engineered neuronal networks. 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, October 14-18, 2006 Atlanta, GA
12. Thakore, V., A. Behal, **P. Molnar**, D. C. Leistriz és J. J. Hickman: Nonlinear dynamic characterization of the neuron-electrode interface. 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, October 14-18, 2006 Atlanta, GA
13. Kerry A. Wilson, Mainak Das, J. W. Rumsey, **Peter Molnar**, és J. J. Hickman: A Bio-MEMS Device for Modeling the Reflex-arc. 53rd Annual conference of the American Vacuum Society Meeting. November 12-17, 2006, San Francisco,
14. **Peter Molnar**, Neelima Bhargava, Mainak Das, Anupama Natarajan, Kerry Wilson és James J. Hickman: Integration of living cells with silicon nanostructures for MEMS applications. NSTI Nanotech 10th Annual Conference. May 20-24, 2007 Santa Clara, CA, USA
15. Vipra Dhir, Anupama Natrajan, Anindarupa Chunder, Neelima Bhargava, Mainak Das, Lei Zhai, **Peter Molnar**: Micropatterned self assembled polyelectrolyte based cytophobic coatings. 234th ACS National Meeting, August 19-23, 2007. Boston, MA, USA
16. Anupama Natarajan, **Peter Molnar**, Neelima Bhargava, Vipra Dhir, Mainak Das, Kucku Varghese és James J Hickman: Surface modification and photolithographic patterning of microelectrode arrays for cell-based biosensor applications. 234th ACS National Meeting, August 19-23, 2007. Boston, MA, USA
17. Vipra Dhir, Anupama Natrajan, Anindarupa Chunder, Lei Zhai, **Peter Molnar**: Micropatterning cardiac myocytes on self assembled polyelectrolyte multilayers Materials Science Society 2007 Fall Meeting, November 26 - 30, 2007, Boston, MA, USA
18. Kerry A. Wilson, Mainak Das, **Peter Molnar**, Kathy J. Wahl, Richard J. Colton és James J. Hickman: A Bio-MEMS Device for Measuring Contractile Forces of Cultured Myotubes on Microfabricated Cantilevers. AVS 54th International Symposium October 14-19, 2007, Seattle, USA.

19. Anupama Natarajan, Neelima Bhargava, **Peter Molnar**, Mainak Das, James J. Hickman: Surface Modification and Photolithographic Patterning of Microelectrode Arrays for Cell-Based Biosensor Applications. AVS 54th International Symposium October 14-19, 2007, Seattle, USA