

A 3,4-DIAMINOPIRIDIN KONVULZIV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA
ÉTI CSIGA NEURONOKRA

Egyetemi doktori értekezés

Készítette Papp András
tudományos ösztöndijas

Témavezető Dr. Fehér Ottó
egyetemi tanár

Készült a
József Attila Tudományegyetem
Összehasonlító Élettani Tanszékén

Szeged, 1984.

T A R T A L O M

	<u>Oldal</u>
BEVEZETÉS	1
MÓDSZEREK	7
EREDMÉNYEK	14
DISZKUSSZIÓ	41
ÖSSZEFOGLALÁS	46
IRODALOM	47

BEVEZETÉS

Az epilepszia valószínűleg egyidős az emberiséggel. Erre már a legrégebbi feljegyzésekben találunk utalásokat. Az epilepsziás roham külső jegyei - eszméletvesztés, görcsroham, máskor ámokfutásszerű "őrült" cselekvéssorozat - minden bizonnyal félelemmel teli csodálatot váltottak ki az ókori, középkori emberből. Az epilepsziásokat az abnormálisokon belül is kitüntetett figyelemmel övezték és kulturától függően isteni /innen a "morbus sacer" kifejezés/ vagy sátáni eredetűnek könyvelték el a betegséget.

Kísérleti uton viszonylag régóta hoznak létre epilepsziás működést állatok idegrendszerében. Számos módszerrel dolgoztak ki, melyek három csoportba sorolhatók. Mechanikai uton az agyállomány megsértésével, tartós nyomás alá helyezésével, az agyburok sértésével, hegesítésével lehet epilepsziát létrehozni. Emberi epilepszia is indulhat ki koponyasérülésből vagy gyulladásos heg hatására. Elektromos ingerléssel is kelthető epileptikus állapot; egyszeri erős ingerrel /elektrosokk/ vagy tartós, ismétlődő kezeléssel /pl. az ugynevezett kindling/. A kísérleti munkában leggyakoribb a kémiai epileptogének használata. Egyes

vegyületek ilyen jellegű hatását a 20-as években fedezték fel. Napjainkig nagyszámu epileptogén anyag vált ismertté - ezek közé tartoznak növényi mérgek /sztrichnin, pikrotoxin/, az idegrendszer természetes anyagai /acetilkolin - ezerinnel együtt adva/, mikrobiális eredetű /penicillin/, valamint szintetikus vegyületek /pentiléntetrazol, aminopiridin/. Legnagyobb jelentősége az utóbbi háromnak van. A kémiai görcskeltők előnye, hogy hatásuk gyorsan, hosszas procedura nélkül alakul ki, könnyen kezelhetők, adagolhatók és hatásuk megfordítható.

Az epilepszia kísérleti modelljei nagy jelentőségre tettek szert, minthogy általuk a betegség sokoldaluan elemezhető lett. Az emlősök agyán kialakított mesterséges görcsfókusz aktivitása igen hasonló az emberi epilepszia elektroenkefelo- ill. kortikogrammjához. Lehetővé vált ezáltal az is, hogy a "makroszkópos" kortikográfiás képet - nagy amplitudójú, ritmikus, szinkronizált hullámok - egyes neuronok vagy neuroncsoportok működésével hozzák kapcsolatba. Jelentős felfedezést tett ezen a téren Matsumoto és Ajmone-Marsan /20/. Penicillinnel görcsfókuszt hoztak létre macska agykérgén. Leírták, hogy a fókuszba eső sejtek többségéből az akciós potenciáloknál sokkal tartósabb,

platószerű depolarizációk vezethetők el, és ezek határozott kapcsolatban vannak a felszíni potenciálokkal. A jelenséget paroxizmális depolarizációs eltolódásnak /shiftnek/, röviden PDS-nek nevezték el és feltételezték, hogy az az érintett kérgi sejtek membránjának megváltozott működéséből ered. Általánosan elfogadottá vált, hogy a PDS a kérgi epilepsziával szoros oki összefüggésben áll, jelenlétét többen leírták /2,3,4/. A PDS-ben működő mechanizmusok felderítését célzó kutatásokra a kérgi neuronok csak bizonyos korlátokkal alkalmasak. Már a PDS leirói utaltak rá azonban, hogy egyes epileptogének alacsonyabbrendűek neuronjain is hatásosak /1,18/. Másrészt ismertté vált, hogy csigafajok egyes központi neuronjai természetes állapotban is - a PDS-sel rokonságot mutató - kisülési sorozatokat /burst/ produkálnak /5,6,12,17/. Innen származik az elgondolás, hogy az epilepszia sejtszintű folyamatainak megértéséhez a puhatestűek neuronjain végzett kísérleti munka jelentős segítséget nyújthat. Csiganeuronokban az agykéregből regisztráltakhoz hasonló PDS-ek idézhetők elő epileptogén szerekkel /28/, így ezek hatása az emlős agynál sokkal könnyebben és egyszerűbben kezelhető csiga-ganglionon tanulmányozható. A puhatestűekkel végzett kísérleti munka további előnye, hogy - mivel

a nagyobb neuronokba akár két üveg mikroelektrodot is be lehet vezetni - lehetővé vált az un. feszültségzár /voltage clamp/ technika /ld. Módszerek/ bevonása az epilepsziakutatásba. Így a PDS-sel kapcsolatos membrán-áramok megfigyelhetővé és elemezhetővé váltak. Témáját és célkitűzését tekintve jelen dolgozat is a kutatásnak ebbe az irányába kapcsolódik.

Csiga-neuronokból többen irtak le PDS-t /1,8,28/. Tanulmányozták a természetes és mesterséges potenciál-ingadozásokat és a nekik megfelelő áramokat. Gola /11, 12/ munkássága ezen a téren alapvető jelentőségű. Bevezette az áram-feszültség karakterisztika felvételét feszültségzárban közvetlen módon /ld. Módszerek/ és hangsúlyt fektetett annak tanulmányozására. Megállapította, hogy - bursting-működésű Aplysia-sejteknel - az áram-feszültség karakterisztikán egy negatív hajlásu, negatív konduktanciájú szakasz van. E szakaszon a membránon állandó befelé irányuló áram folyik, tehát ott a membrán instabil állapotban van. A kisülési sorozatok úgy jönnek létre, hogy a membránpotenciál egy depolarizált /tüzelés/ és egy hiperpolarizált /csend/ stabil pont között leng.

A paroxizmális depolarizáció fenti leírása formális

jellegű, a PDS-ben működő mechanizmusok mibenlétéről nem sokat mond. A mechanizmus megértéséhez továbblépésre volt szükség. Baranyi és Fehér írták le agykérgi neuronokból /4/, hogy PDS alatt a membrán összkonduktanciája jelentősen megnő. A PDS alatti megnövekedett konduktancia arra utal, hogy a depolarizációs plató fellépte valamely membránárammal kapcsolatos. Áramhordozóként két olyan ion jöhet számításba, melyeknek nyugalmi potenciálon az elektrokémiai potenciálja nagy - elsősorban a Na, valamint a Ca. Mindezek alapján a kísérletes epilepszia, pontosabban a PDS, ionmechanizmuson alapuló modelljét lehetett megalkotni. A modell helytállóságát számítógépes szimuláció is alátámasztotta /10/. Lényege, hogy az epileptogén hatás által a membránban olyan Na- és/vagy Ca-ioncsatornák jönnek létre, melyek - szemben a korábbi ismeretekkel - hosszan képesek nyitva maradni /a konduktanciát fokozni/, így a membrán tartósan, platószerűen depolarizálódik. Ezek a csatornák potenciálfüggők, a PDS-t beindító akciós potenciál hatására nyílnak ki, és záródásuk csak lassan, a bekövetkezett depolarizáció hatására megy végbe. A szerzők feltevése szerint ezek a csatornák a membránban eleve meglevő K-ioncsatornák elváltozásával jönnek létre.

Jelen munka ezen a ponton kapcsolódik be a tanszéken folyó epilepszia-kutatásba. Feladata, célkitűzése a következőkben fogalmazható meg:

- Epileptogén vegyületekkel kezelni a csiga-gangliont, PDS-t létrehozni.
- Megállapítani, mely ion felelős a PDS-ért, illetve a vele kapcsolatos negatív konduktanciáért. Elsősorban a Na és a Ca szerepét kell vizsgálni.
- Leírni a PDS-ért felelős áram kinetikai jellemzőit.
- A fentiek alapján megállapítani, milyen ioncsatornákon folyik ez az áram.

E doktori értekezés az első három részfeladatban elért eredményeken alapul.

MÓDSZEREK

Preparátum

A kísérleteket éti csiga - *Helix pomatia* - garatalatti ganglion-csoportján, a dorzális felszín neuronjain végeztük. Az állatból kiemelt ganglionról Ringer-oldat alatt finoman lenyúztuk a kötőszövetet, amíg a sejtek szabaddá nem váltak. Enzimes kezelést nem végeztünk. Az így kipreparált gangliont a kísérleti kamrába tettük és annak szilikongumi fenekéhez rögzítettük finom acéltűk segítségével. A kamra plexiből készült, alapja egy üveg tárgylemez volt, melyen keresztül, alulról világítottuk meg a preparátumot.

A Ringer magasra helyezett üvegedényből, csappal szabályozottan folyt a kamrába, elszívását vizsugárszivattyú biztosította. Az áramlási sebesség 0,5-1 ml/perc volt, ekkor a kamra 3-4 perc alatt mosódott át teljesen /ezt festékkoldattal lehetett kimérni/. Közegváltás alkalmával az átáramlási sebességet esetenként felgyorsítottuk, pl. a hatóanyag gyors kimosása érdekében.

A kamra mikroszkópból származó mozgatható tárgyasztalra került, a gangliont sztereomikroszkópon át le-

hetett szemlélni. Az elektród vízszintes mozgását és beszúrását háromdimenziós Narishige mikromanipulátorral végeztük. Ez mágneses talppal rögzült az egész berendezés alapjául szolgáló súlyos vas asztalhoz.

Oldatok és hatóanyagok

Normál /Kerkut-Thomas szerinti/ és megváltoztatott ionösszetételű Ringer-oldatokat használtunk /I. táblázat/. Az oldatok pH-ját 7,4-7,6-os értékekre állítottuk, szobahőfokon /20-30 °C/ dolgoztunk. A hatóanyagokat a Ringerben oldottuk föl, az ozmolaritás utólagos kiegyenlítése nélkül /igy megmaradt az eredeti iontartalom/. Az anyagokat a folyamatos perfúzióval vittük rá a ganglionra.

Elektronika, regisztrálás

Az elektronikus berendezés központi eleme egy házi építésű egycsatornás feszültségzár-készülék /29/, mely alkalmas áramzár /current clamp/ és feszültségzár /voltage clamp/ üzemre is /1. ábra/. A sejteket egyetlen, 3-10 Mohm ellenállású, K-citrát töltésű mikroelektróddal szurtuk meg. Az elektród FET-bementű előerősítőn át csatlakozott a feszültségzár-készülék-

hez. Az optimális feszültségzárast - 2 ms körüli beállási idő, jól kiegyenlített akciós potenciálok - esetről esetre a készüléken be kell állítani. Ehhez változtatni lehet az időállandót, a kapacitás-kompenzálást, a visszacsatolás erősítését és a mintavétel/tartás frekvenciáját /8 kHz körüli/. A mintavétel/tartási cikluson belüli időarányt $1/2 - 1/2$ -re állítottuk, mivel az az árammérést befolyásolja. A készülék feszültség- és áramkimenetét Tektronix tároló oszcilloszkóphoz és Medicor-EMG gyártmányu X-Y-íróhoz csatlakoztattuk. Egy további oszcilloszkóp a mintavétel/tartás periódusát jelezte ki. Az áram- és feszültségimpulzusokat a feszültségzár-készülék vezérlő /command/ bemenetére kapcsolt házi gyártmányu négyszög-háromszög jelgenerátor adta /mindkét házi építésű készülék Gyulai Ferenc villamosmérnök munkája/. A berendezés áramzár-üzem módjában a membránpotenciál szabadon, illetve a beadott áramimpulzusok hatására változik. Áttérve feszültségzárba, a készülék a membránpotenciált egy beállított értéken /holding potenciál; V_h / tartja, illetve a külső vezérlő impulzusok szerint változtatja meg. A mért paraméter a potenciál tartásához szükséges áram, ami a membránon átfolyó árammal egyenlő. A kísérletek kezdetén a készülék áramzár-üzem módban van. Ekkor az elektród beszurása után kb.

10 percet várunk /hogya a sejt nyugalomba jusson/ majd megállapítjuk a nyugalmi membránpotenciált és a sejt spontán működését. Ha magát a PDS-t tanulmányozzuk, maradunk áramzárban. A perfúzió útján a sejtre visszük a különböző hatóanyag- és iontartalmu oldatokat. A potenciálon megnyilvánuló jelenségeket /tüzelés, PDS/ tároló oszcilloszkópon jelenítjük meg és az ernyő fényképezésével rögzítjük. A paroxizmális depolarizációval kapcsolatos áramokat feszültségzár-üzem módban lehet tanulmányozni. Ekkor egyrészt a sejtek áram-feszültség /I-V/ karakterisztikáját vettük fel az X-Y író segítségével, anyaghatás előtt és alatt. A jelgenerátorral lassu háromszögjelet állítottunk elő - ez került az író X-bemenetére, az Y-ra pedig a lassu hiper- és depolarizációval kiváltott áram. A feszültségzár alatt négyszögjellel kiváltott áramokat ismét a tároló oszcilloszkópon regisztráltuk.

A kísérletek egy részében a regisztrátumokat korrigáltuk a háttéráramra. A háttéráram - leakage - a membrán tökéletlen szigetelőképességéből eredő áram, mely passzív /pontosan követi Ohm törvényét/ és ráakódik a potenciál függvényében megjelenő aktiv áramokra. A korrekcióhoz a sejtet a nyugalmi potenciálhoz képest egyenlő mértékben hiperpolarizáltuk és depolarizáltuk.

A hiperpolarizációval kapott áramokat ellenkező előjellel levontuk a depolarizációval kapottból. Mint-hogy aktiv áramok - a vizsgált sejteken - csak depolarizációra jelentek meg, azok tényleges értéke így megkapható.

I. Táblázat

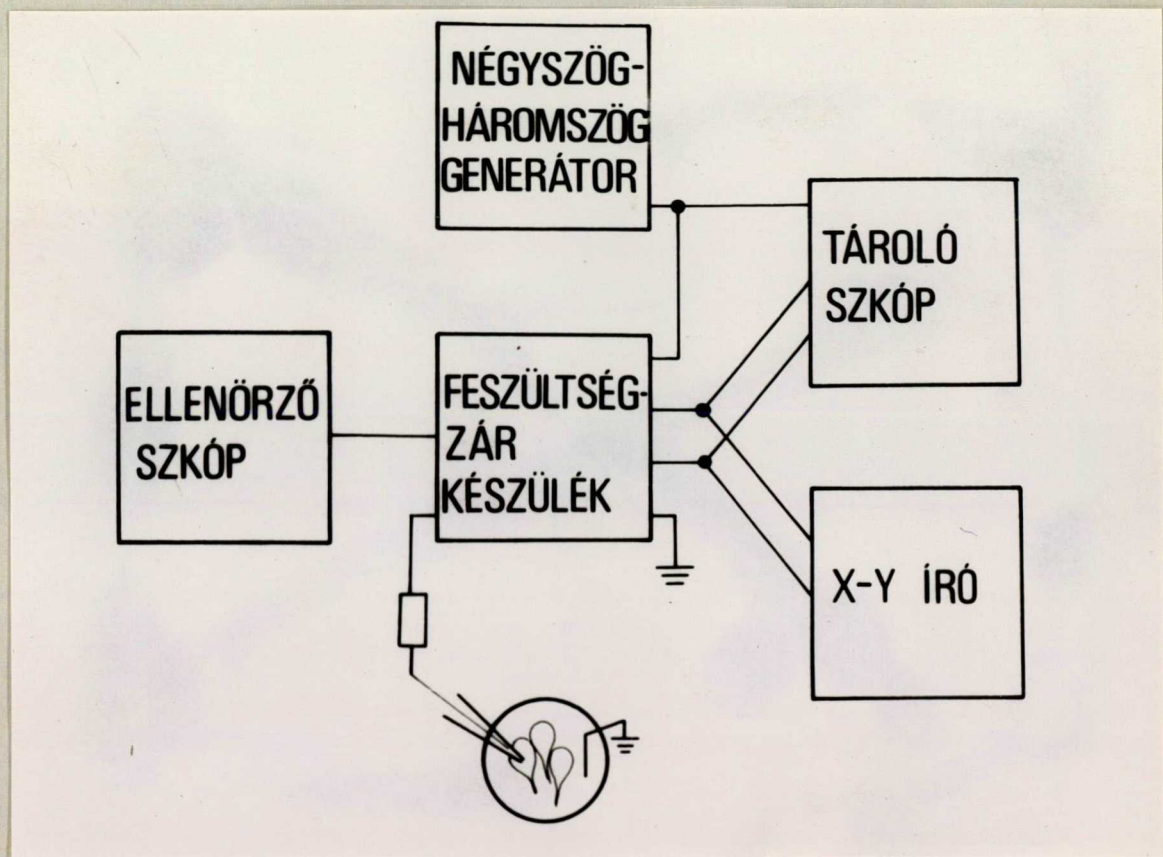
A. Ringer-oldatok összetétele

	Na^+	K^+	Ca^+	Mg^+	Tris^+ /mind Cl^- formában/
normál	80	4	7	5	5
1/4 Na tar.	20	4	7	5	65
Na-mentes	0	4	7	5	85
Na-mentes, emelt Ca	0	4	25	5	67

B. Hatóanyagok töménysége a Ringerben

3,4-diaminopiridin /3,4-DAP/ 1 mM

tetraetilammónium / TEA^+ / 30 mM / Cl^- vagy Br^-
formában/



1. ábra. Az elektronikus berendezés tömbvázlata.
A regisztrátumokat az X-Y íróval és a tároló
oszcilloszkóp fényképezésével nyertük.

EREDMÉNYEK

Az aminopiridinek görcskeltő hatása

Az aminopiridinek görcskeltő hatása emlős agykérgen régóta ismert és tanulmányozott jelenség /4/. Puhatestű neuronon és más gerinctelen objektumon az AP-k főleg mint K-áramblokkolók váltak ismertté /13,15,25/, konvulzív hatást ezeken eddig nem irtak le. Egyedül AP alkalmazásával nekünk sem sikerült PDS-eket létrehozni a Helix ganglionban. Ha azonban a szert a jól ismert K-blokkoló tetraetilammónium ion /TEA/ oldatával együtt használtuk /a koncentrációkat ld. az I. táblázatban/, konvulzív jelenségek léptek föl. Bár ez a hatás a vegyületcsoport egyéb tagjaival is elérhető, a kísérletek nagy részében a 3,4-diaminopiridint alkalmaztuk, minthogy más objektumon ez a vegyületcsoport leghatásosabb tagja /15/.

A vizsgált sejteken először mindig a nyugalmi működést regisztráltuk: a kisülési mintát és az akciós potenciál alakját /2. ábra; A/. A DAP önmagában számottevő változást, főleg működésfokozódást nem okoz, és a spike alakját is legfeljebb kismértékben változtatja meg /2. ábra; B/. DAP és TEA együtt szinte azonnal PDS-ek kialakulásához vezet /2. ábra; C/. A nyugalmi

potenciál esetenként, mint pl. itt is, tartósan csökken, az akciós potenciál a kontrollnál jóval szélesebb és alacsonyabb lesz. Az ábra D és E része mutatja, hogy mind a TEA, mind a DAP hatása megfordítható: az anyagok kimosásával a kiindulási állapotot kapjuk vissza. A PDS-ek általában spontánul, elszórtan jelentkeznek /3. ábra; A/. Előfordul, hogy depolarizáló pulzus /3. ábra; B/, vagy hiperpolarizáció megszakítása vált ki PDS-t. Ha a sejt tartósan depolarizálódott, a PDS-ek eltűnnek, de hosszú hiperpolarizációval előhívhatók /3. ábra; C/. Alakjuk változó, általában lekerekített - a membránpotenciál a csúcspont és az ott megjelenő akciós potenciálok után fokozatosan süllyedve tér vissza a kiindulási szintre. Időbeli lefolyásában tehát az általunk DAP+TEA-val keltett PDS különbözik a PTZ, vagy méginkább a Ba által keltett hosszú, négy- szögletes depolarizációs platóktól /8,9,28/. Áramimpulzusokkal de- és hiperpolarizálva a sejtet, megállapíthattuk a főbb membránparamétereket. A kísérlet eredménye a 4. ábrán és a II. táblázatban található. Az ábrán az áramimpulzusok és a létrejött membránpotenciál-változások regisztrátuma, mellette pedig egy kiváltott akciós potenciál látható. A sorban a kezeletlen sejtől kapott regisztrátum. /A sejt nyugalmi potenciálon néma./ 1 mM DAP hatására nem sok változás

történik, bár a sejt ingerelhetősége /spike kiválthatóság/ ~~nőni~~ látszik /B, C, D sorok/. A membránellenállás csak 35 perces hatás után csökken le, a membrán időállandója nem mutat határozott változást. 30 mM TEA-t is adva /E sor/ már 5 perc alatt lényeges változások történnek. A membránellenállás tovább csökken és ez a változás a további felvételeken is megmarad /F, G/. Az időállandó nagymértékben csökken. Az F és G ideje közt PDS-ek jelentkeztek. A TEA-t elhagyva hatásainak egy része gyorsan felszámolódik. A membránellenállás és az időállandó felveszi korábbi, csak DAP hatás alatt mért értékeit /H, I/. A DAP kimosása után /J/ itt is visszakapjuk az eredeti állapotot. A felvételek alatt folyamatos potenciál-csökkenés látszik. Mivel azonban a spike-amplitudó ennek ellenére nem változik számottevően, a csökkenés látszólagos és az apparátusból eredő egyenáramu szinteltolódásnak tudható be. Az akciós potenciálok alakját a DAP ezuttal sem változtatja meg lényegesen, DAP+TEA együttes hatására a spike kiszélesedik, de az anyagokat kimosva visszaalakul eredeti formájára.

II. Táblázat A membránjellemzők alakulása a DAP, illetve DAP TEA hatása alatt.

A 4. ábra regisztrátumaiból mért és számított jellemzők. A membránellenállást Ohm törvénye szerint, az összes hiperpolarizáló áramimpulzus alapján kiszámítottuk és ezeket felvételenként átlagoltuk. Az időállandókat a hiperpolarizáció lecsengéséből számítottuk ki, az $1/e$ -ed részre csökkenés alapján.

REGISZTRÁTUM	OLDAT	R_m /Mohm/	IDŐÁLLANDÓ /ms/
A	normál	3,64	68
B	1 mM DAP 10 perc	4,00	83
C	1 mM DAP 20 perc	4,00	83
D	1 mM DAP 35 perc	2,69	77
E	1 mM DAP+ 30 mM TEA 5 perc	1,96	25
F	1 mM DAP+ 30 mM TEA 20 perc	2,54	47
G	1 mM DAP+ 30 mM TEA 35 perc	2,40	49
H	1 mM DAP 14 perc	4,30	94
I	1 mM DAP 22 perc	3,98	89
J	normál 15 perc	4,63	94

Az időadatok az oldat kicserélés után eltelt időt jelentik.

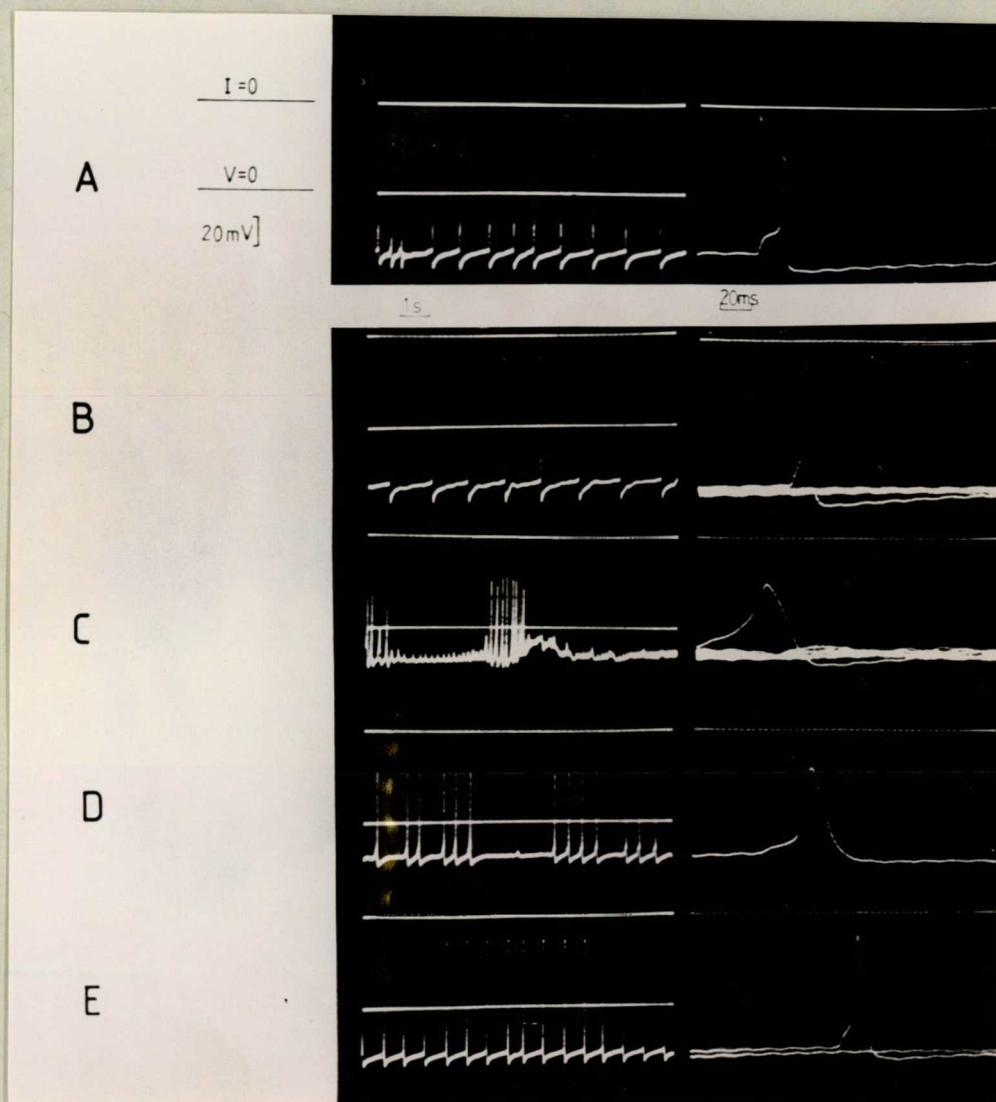
A 3,4-DAP+REA együttes a Helix ganglionsejtek nagy - legalább 2/3 - részén az előbbiekben leírt módon konvulzív hatást fejt ki. A hatás általában reverzibilis és megismételhető. Előfordult, hogy a sejt maradandóan depolarizálódott és ezért letűntek az aktiv membránáramok, néhány sejt pedig nem volt érzékeny az anyagokra.

PDS-t feszültségzár alatt is regisztráltunk. Ilyenkor hosszú, több másodperces bemenő áram látható, melynek időbeli alakulása megfelel a PDS lefutásának /5.ábra/. Eszerint a PDS-ek jelentkezése kapcsolatos egy tartósan fennmaradó, lassan lecsengő bemenő árammal. Ezt az áramot feszültségzár alatt adott polarizáló impulzusokkal kíséreltük meg analizálni.

Lassu, háromszögszerűen fel-lefutó jellel felvettük a membrán I-V karakterisztikáját. Ilyen regisztrátumok láthatók a 6. ábrán. Az alapállapotú görbére a következők jellemzők. Hiperpolarizáló jel hatására kis, a potenciállal mindig arányos áram az un. háttéráram jelenik meg. /Mivel ennek értéke a görbe minden pontjában eleve jelen van, azt utólagos helyesbitéssel küszöbölhetjük ki, ld. Módszerek./ Depolarizációra erős kimenő áram, a lassu K-áram jelentkezik. A K-áram idő-

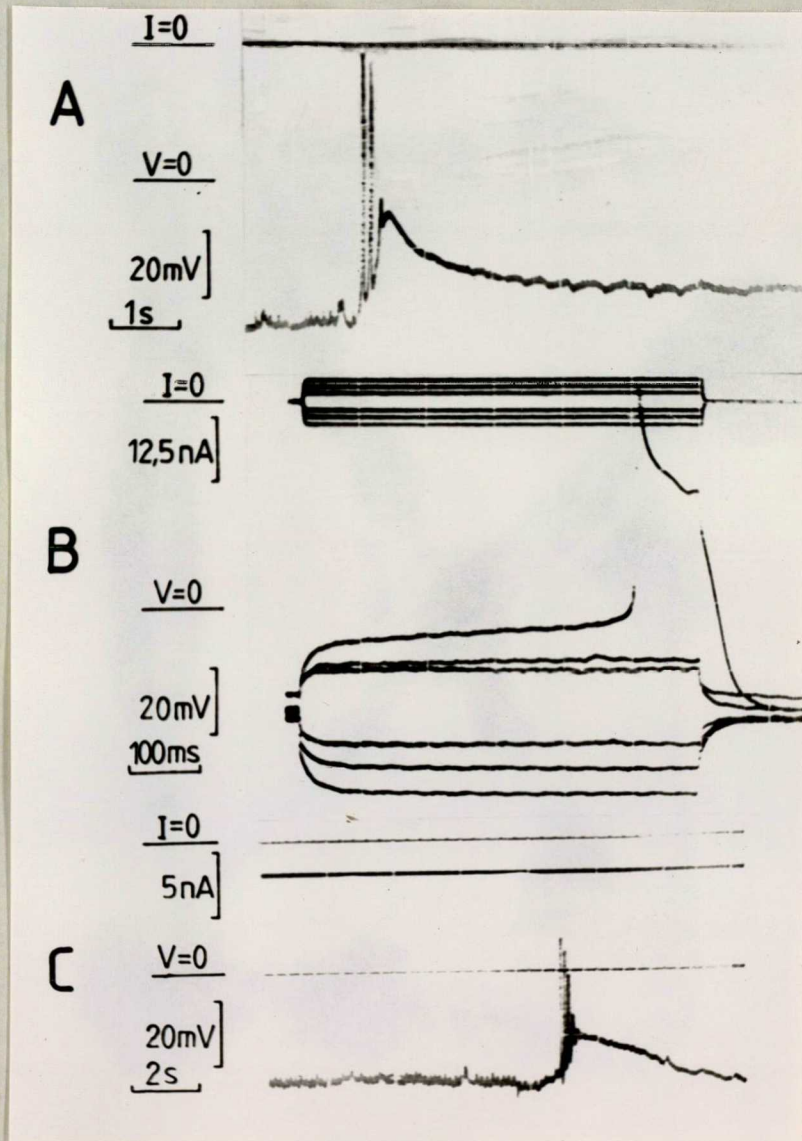
beli alakulásából ered a görbe hiszterézise.

A DAP önmagában a karakterisztikán alapvető változást nem okoz /6. ábra; A/. Az ennél a sejtnél eleve meglevő bemenő áramot megnöveli ugyan, de csak kismértékben, ami a PDS-keltéshez még nem elegendő. TEA-val kombinálva a kimenő áram megszűnik - ez a TEA hatása /23/ - és egy erős, negatív hajlásu, azaz negatív konduktanciájú szakasz jelenik meg a görbén. Ez felel meg a PDS-t okozó lassu bemenő áramnak - minden esetben megfigyelhető, ha a sejt PDS-t produkál. A görbe erős hiszterézist mutat, a visszatérő ágon nincs bemenő áram. Ez a lassu bemenő áram inaktivációjából származik. Hasonló megfigyelést mások is közöltek /17/.

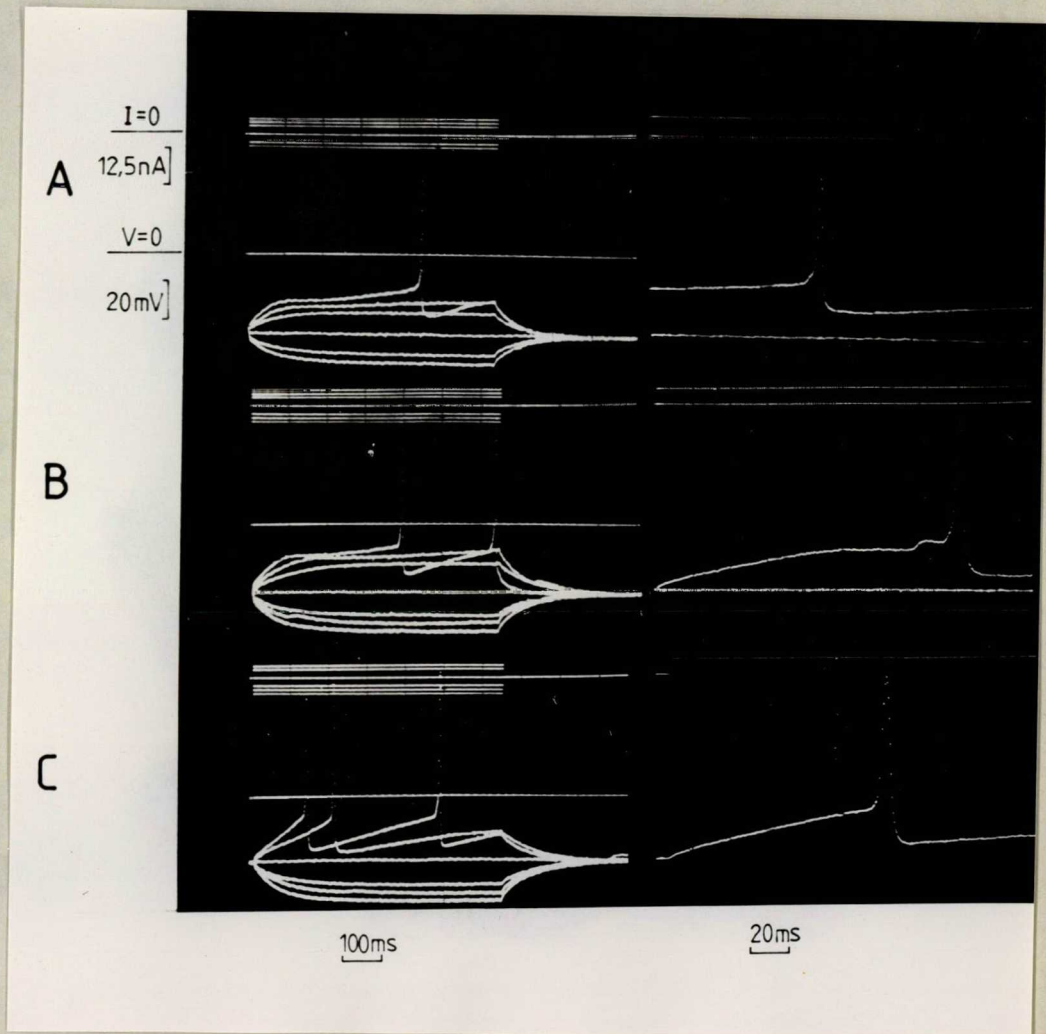


2. ábra. A DAP hatása a sejtaktivitásra magában és TEA-val együtt, áramzár üzemmódban felvéve, az oscilloszkóp ernyőjéről. Spontán működés /bal oszlop/ és egy akciós potenciál /jobb oszlop/. A: kontroll állapot, B: 1 mM 3,4-DAP hatása, C: 1 mM 3,4 DAP + 30 mM TEA hatása, D: a TEA kimosása után, E: ismét kontroll állapot. A felvételek 10-15 perccel az oldat kicserélődése után készültek. Felső sugár: áram / $I=0$ /, alsó sugár: membránpotenciál, ennek nullaszintje $V=0$. Felfelé a depolarizáció és a kimenő áram iránya mutat. Ezek a jelölési konvenciók értelemszerűen érvényesek itt és a további hasonló ábrákon.

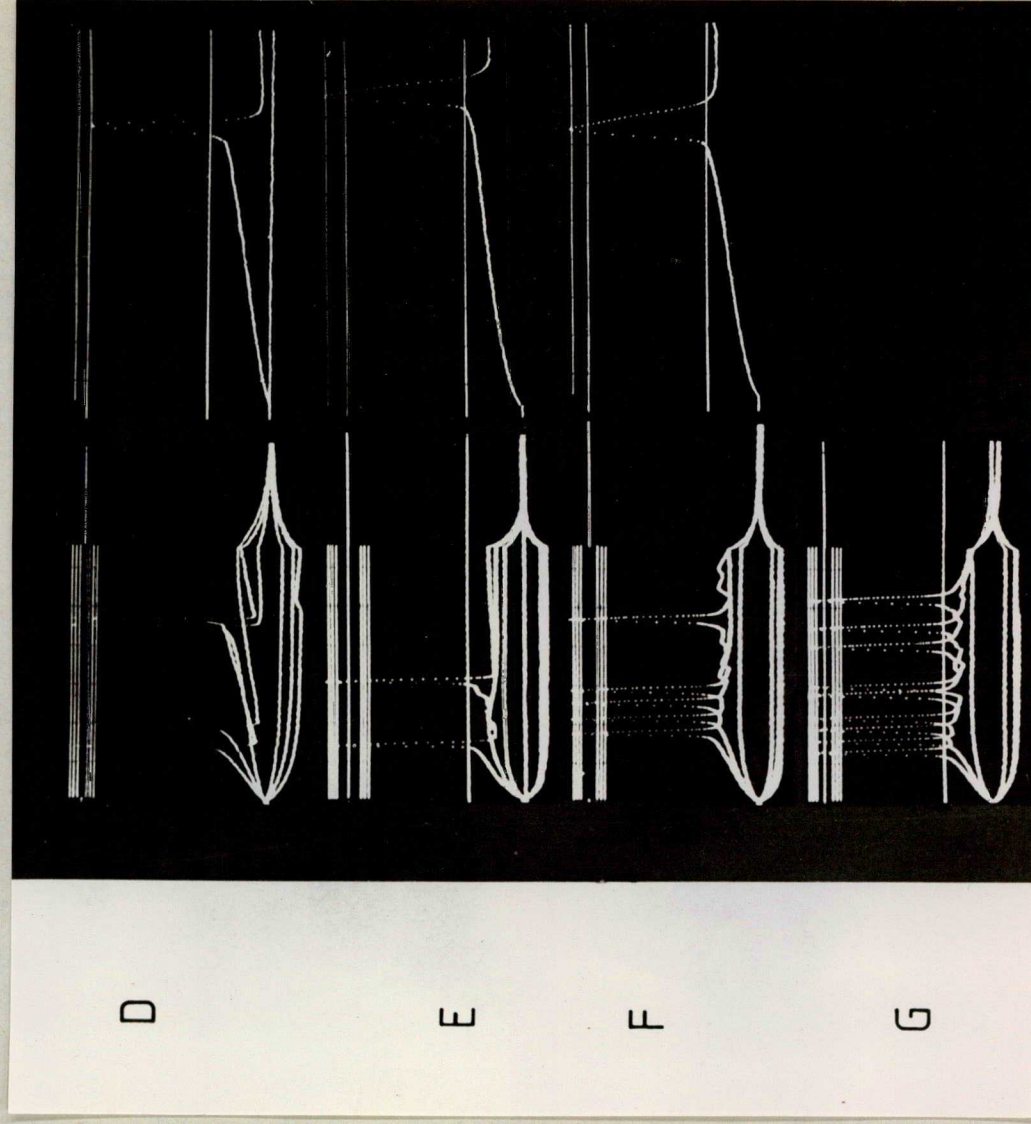


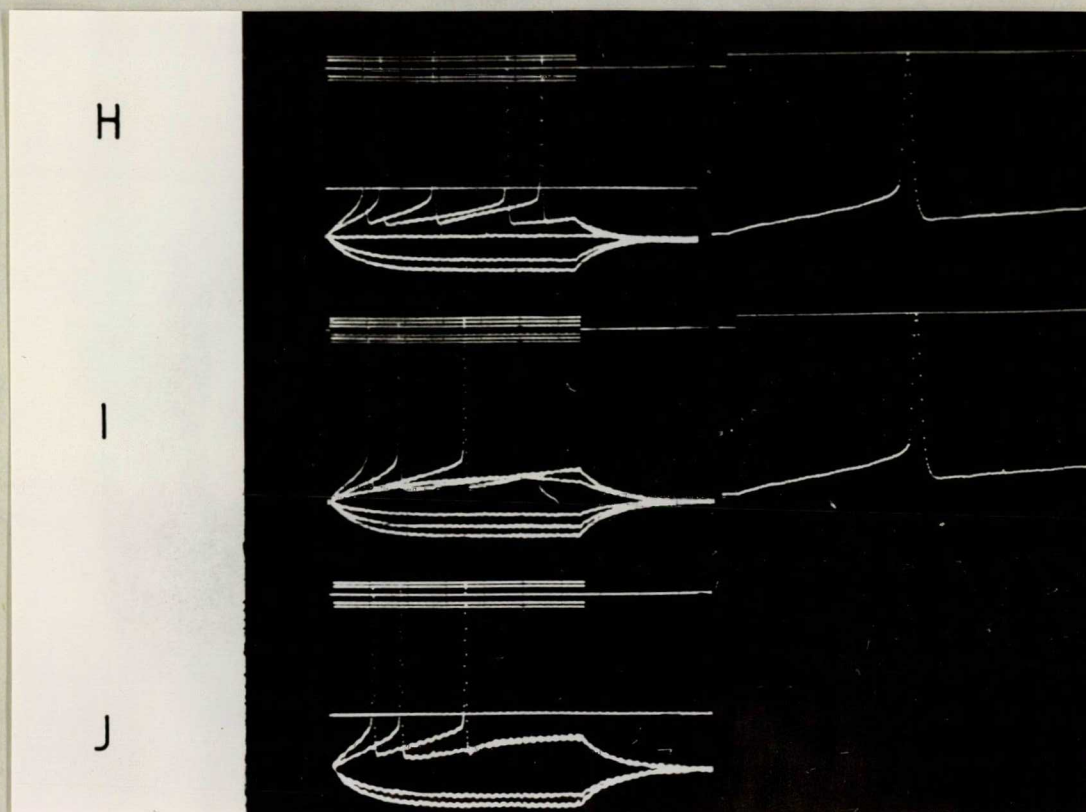


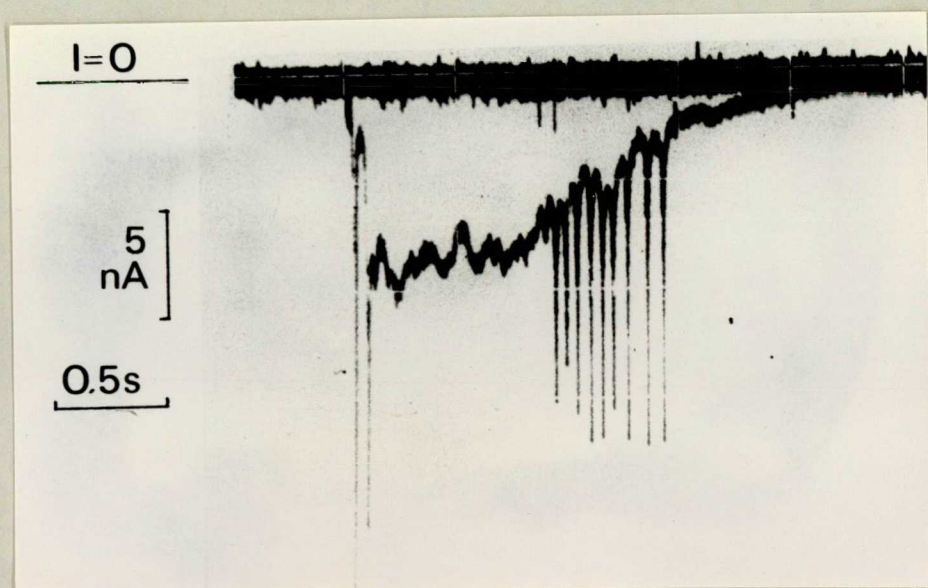
3. ábra. DAP+TEA hatására létrejött PDS-ek. A: spontán keletkezett PDS, B: depolarizációval kiváltott PDS /az áramimpulzusok értéke $\pm 1,2; 2,4; 3,6$ nA/. C: tartósan depolarizálódott sejten hiperpolarizálás alatt megjelenő PDS /-2,5 nA folytonos áraminjekció/.



4. ábra. Konvulzív hatás vizsgálata áramimpulzusokkal /current clamp/. Bal oszlop: a membránpotenciál alakulása, jobb oszlop: egy spike; ezt nem minden esetben regisztráltuk. A: kontroll, B: 1 mM DAP 10 perc, C: ugyanaz 20 perc, D: ugyanaz 35 perc, E: 1 mM DAP + 30 mM TEA 5 perc, F: ugyanaz 20 perc, G: ugyanaz 35 perc, H: ismét csak 1 mM DAP 14 perc, I: ugyanaz 22 perc, J: normál Ringer 15 perc. A kiszámított membránellenállás és időállandó értékek a II. táblázatban találhatóak.



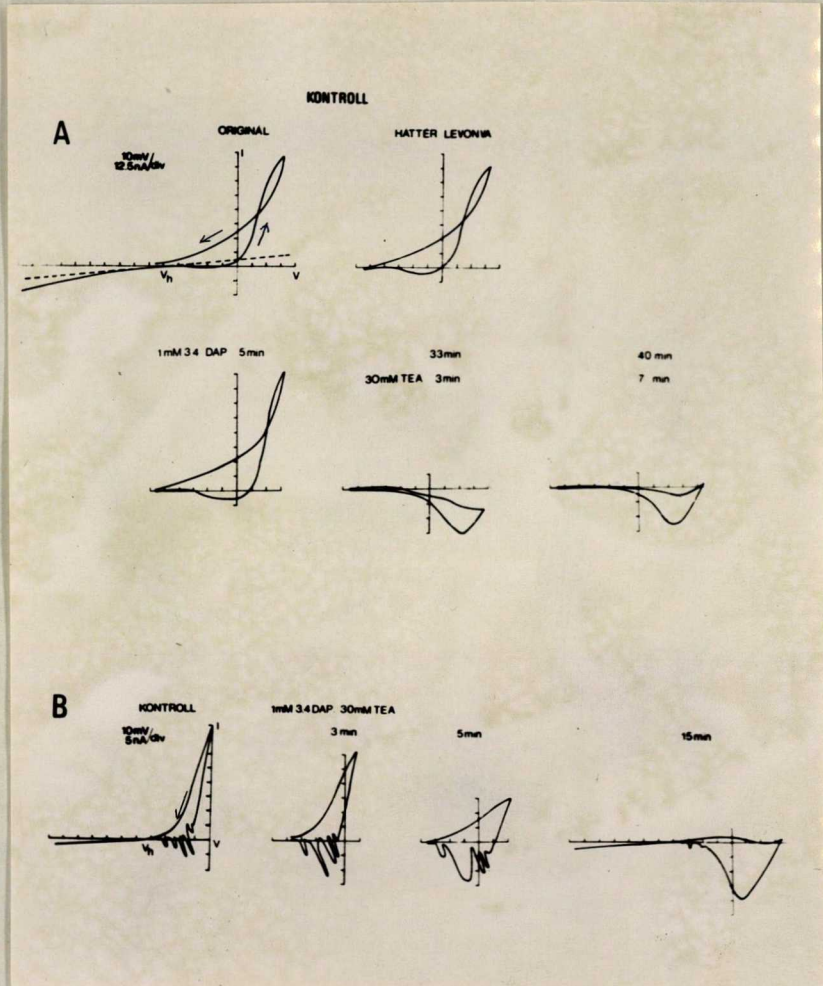




$$V_h = 0$$

5. ábra. PDS-áram feszültségzár alatt regisztrálva. Az áram lefutása megfelel a membránpotenciál PDS alatti változásainak.

Helix !!
 háromszög felírás;
 mending ?



6. ábra. Helix-neuronok I-V karakterisztikái, feszültségzár alatt regisztrálva. A háromszögjel hossza minden esetben, a további ábrákon is: 4 s. Az origóban $V=0$; $I=0$, a depolarizáció jobbra, a kimenő áram felfelé mutat. A görbe fel- és lefutó ága nyíllal van jelölve. A rész: felső sor - kontroll állapot, és ugyanaz a háttéráramra korrigálva, alsó sor - szintén korrigált görbék az eddigi töménységű DAP illetve DAP+TEA hatásával. A kontroll görbén -30 és 0 mV közt kis bemenő áram mutatkozik. A DAP ezt megnöveli, de nem konvulzív mértékben. DAP és TEA együtt nagy bemenő áramot hoz létre. B: rész: Másik sejten, a konvulzív hatás kialakulása az időben. Nem korrigált görbék. A bemenő áramon spike-artefaktumok láthatók. Minden időadat a hatóanyag felvitelétől értendő.

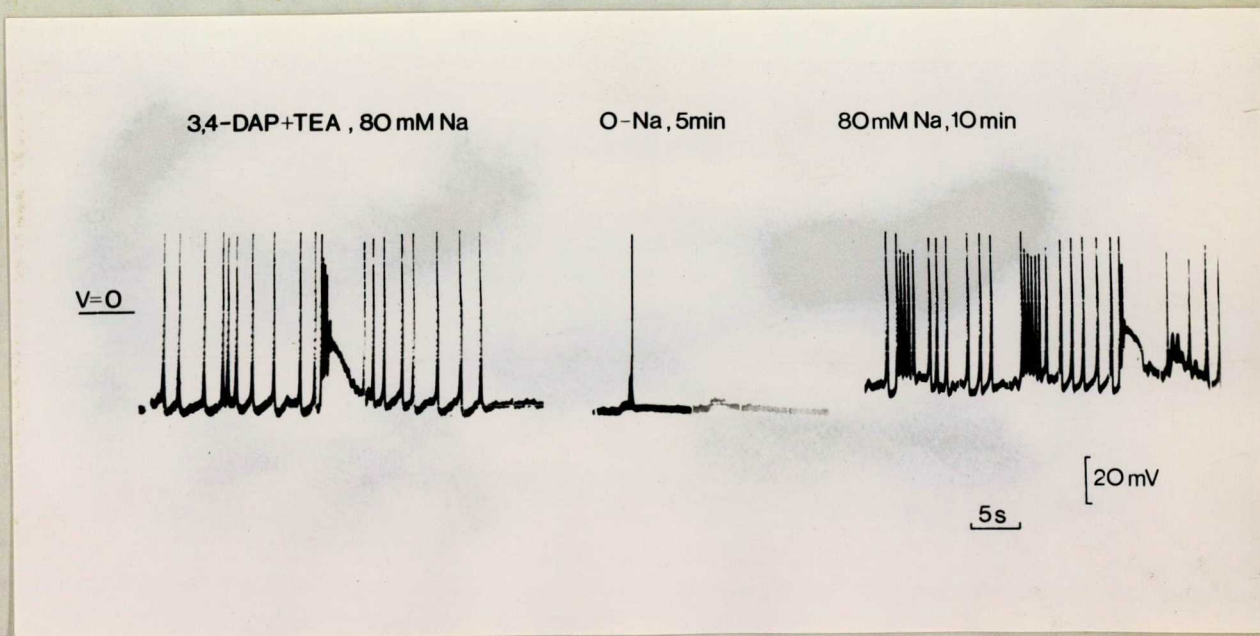
Ionfüggés

A PDS, illetve a lassu bemenő áram ionfüggését első-
sorban a perfúziós oldat ionösszetételének változtatá-
sával állapítottuk meg /I. Táblázat/. A normál Ringer-
ben kialakult PDS-ek Na-mentes oldatban eltűnnek, a
Na-t visszaadva újból megjelennek /7. ábra/. Na hiányá-
ban PDS-t még depolarizációval sem lehet kiváltani -
eszerint maga a PDS-mechanizmus a Na-igényes, nem csak 
iniciáló spike. Ennek alapján a lassu bemenő áram Na-
áramnak adódik.

Az I-V karakterisztikán az ionfüggés megnyilvánulása
nem ennyire egyértelmű. Egyes sejteknél tiszta Na-
függés áll fenn. A DAP+TEA hatására normál Na-tartal-
mu oldatban kialakuló negatív karakterisztika, azaz
lassu bemenő áram Na-mentes közegben erősen lecsökken
- ahogy a 8. ábrán látjuk - de maximumának helye a po-
tenciáltengelyen nem változik. Ismét Na-tartalmu oldat-
ra áttérve a görbe eredeti alakja és nagysága helyre-
áll. Más sejteken Na-mentes közegben a negatív karak-
terisztika erősen pozitív potenciáltartományba eső ré-
sze nem szűnik meg. E szakaszon a bemenő áram nagysága
a közeg Ca-tartalmától függ, a Ca-áramot blokkoló szer-
hatására pedig megszűnik /9. ábra/. Ez határozottan

kettős, Na- Ca- függésre utal. Más, hasonló kettős ionfüggést mutató sejteken néha megfigyelhető, hogy a negatív karakterisztika normál Ringerben két maximumot /illetve minimumot/ mutat. Értelmezésünk szerint ezek az áram Na- illetve Ca- komponensének felelnek meg.

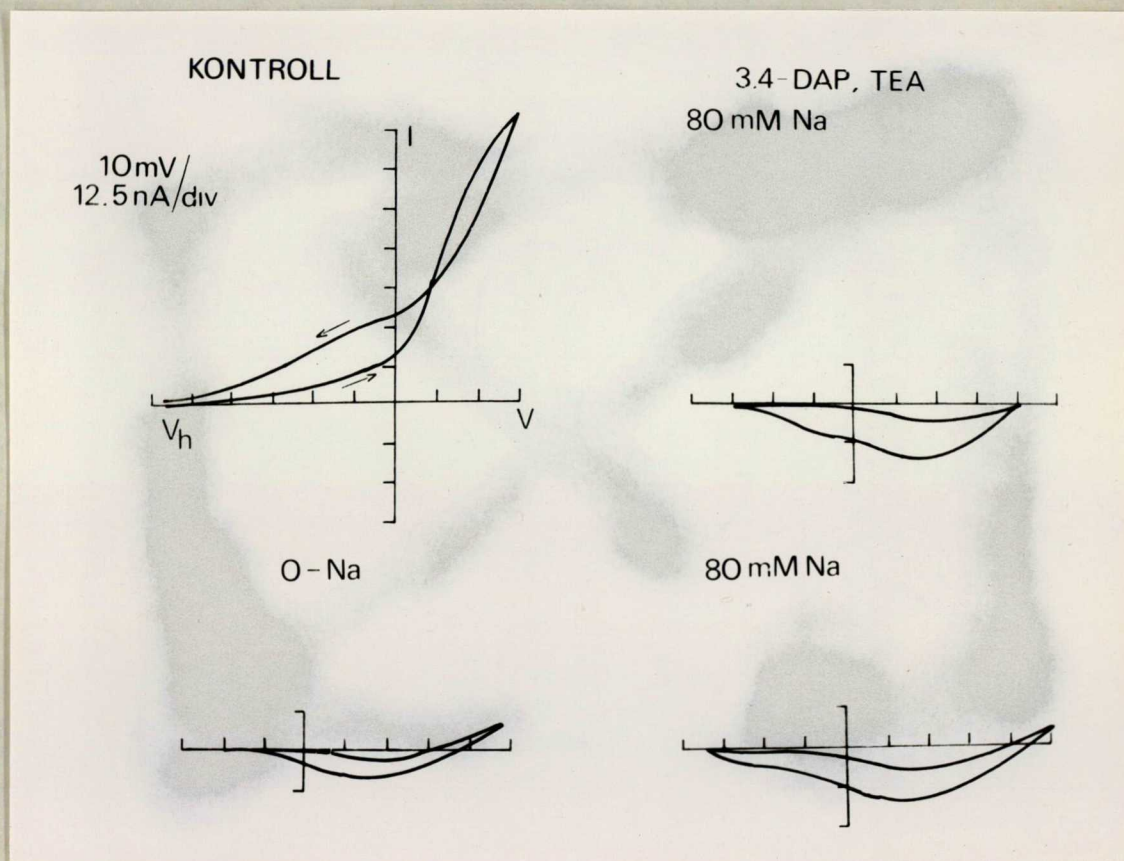
Identifikált sejtek 1/1, 2/0



7. ábra. A PDS Na-függése. Csak normál Na-tartalmu oldatban jön létre PDS.

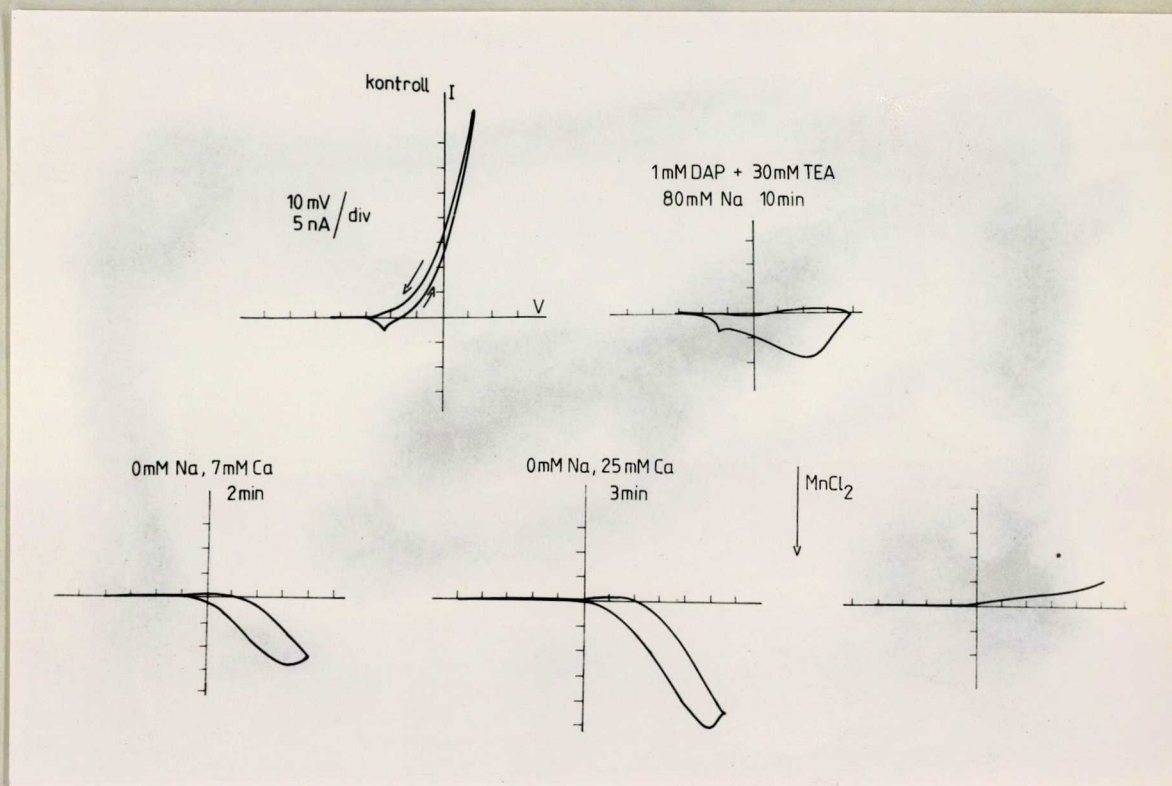


*V_h merési jel ?
A felületi membrán ?*



8. ábra. Tiszta Na-függés megnyilvánulása 1 mM DAP + 30 mM TEA-val kezelt sejt I-V karakterisztikáján. Háttéráramra korrigált ábra. Kontroll: anyaghatás nélkül, normál Ringerben. DAP+TEA hatása alatt a kimenő áram megszűnik és erős lassu bemenő áram jelenik meg. Na-mentes oldatban ez nagymértékben lecsökken, a Na-t visszaadva helyreáll.

feljut memóriához ?
Vh - ?



9. ábra. A 8. ábrához hasonló kísérletben összetett, Na- Ca-függés megnyilvánulása. Szintén háttéráramra korrigált ábra. A konvulzáns hatására normál Ringerben kialakult bemenő áram maximuma +20 mV-nál van. Na-mentes, 7 mM Ca-tartalmu oldatban ez +30 mV-ra, 25 mM DCa esetén +45 mV-ra tolódik el. Az áram egyidejű Na-elvonásra és Ca-blokkolásra szűnik csak meg.

Kinetikai vizsgálatok

Már az I-V karakterisztikákból kitűnik, hogy a PDS lényegét képező lassu bemenő áramra feszültségfüggő aktiváció és inaktiváció jellemző. Az áram a felfutó depolarizáció egy bizonyos értékénél indul csak meg. Az áram időbeli lefolyását célszerűen négyszög-impulzusokkal lehet vizsgálni.

A 10. ábra négyszög-depolarizációkkal kiváltott bemenő áramokat mutat. Az A részben, gyors sugárfutással, az áram megindulását regisztráltuk. Ha túllépünk egy bizonyos küszöb-depolarizációt, az áram aktiválódik. Növekedésének sebessége és elért maximális értéke egy darabig együtt nő a depolarizációval. Jól látható, hogy inaktiváció felléptéhez a minimális aktiváló értéknél nagyobb depolarizáció szükséges és hogy az inaktiváció - az áram lecsengése - egyre gyorsabb nagyobb depolarizációk esetén. A B rész, lassabb sugárfutással, az áram inaktivációjának időbeli alakulását mutatja.

A bemenő áram aktivációja viszonylag gyors folyamat, de nem olyan gyors, mint az akciós potenciált generáló Na-áramé. Ez a két áram gyakran mégis összefolyik időben, ami a vizsgálatot megnehezíti. Az inaktiváció kifejezetten lassu folyamat, a bemenő áram lecsengése

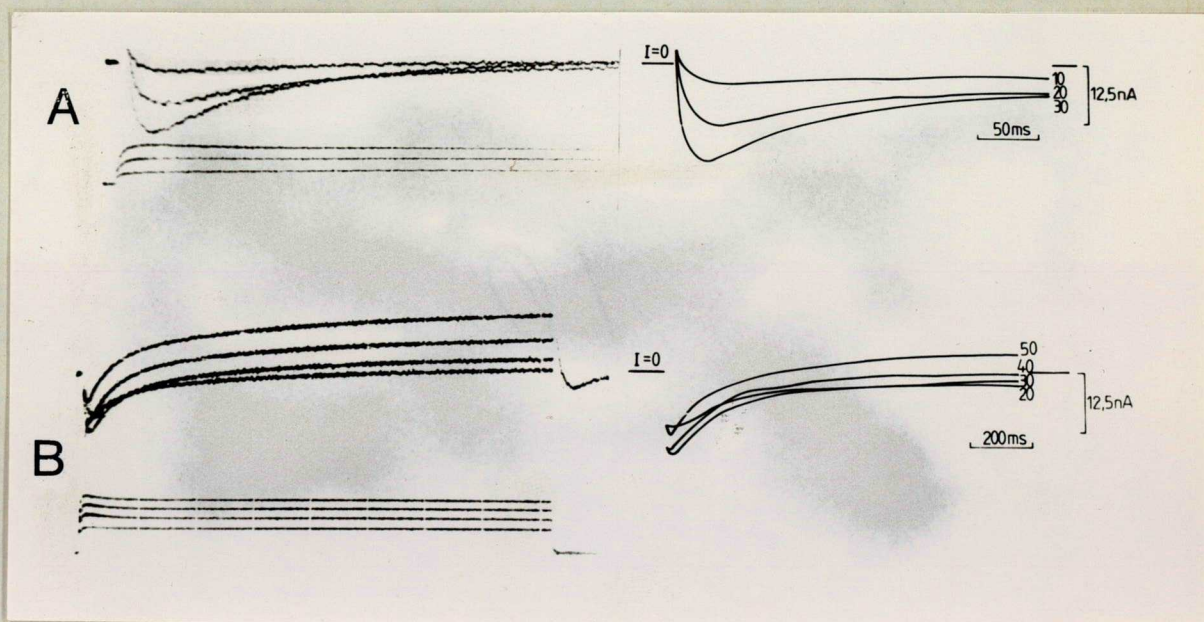
több másodpercet igényel. Az áramgörbékéből - miután a háttéráramra való korrekció által megkaptuk azok tényleges értékét - ki lehetett számítani a folyamatok időállandóit. Az aktiváció egyszerű exponenciális folyamat, egy időállandó írja le /11. ábra/. Az inaktivációt mindig több időállandó jellemzi. Rendszerint egy gyorsabb és egy lassabb inaktiváló folyamat mutatkozik meg /12. ábra/, de ritkán előfordul, hogy három időállandó olvasható le a görbékről. Az időállandókat az áramgörbék logaritmálása után, az egyenes szakaszok iránytangenséből számítottuk ki.

Megvizsgáltuk, hogyan hat a lassu bemenő áramra a holding potenciál szintjének változtatása. Ezzel megállapítható, van-e hatása a tartós hiper- vagy depolarizációnak az áram nyugalmi inaktivációjára. Ugy találtuk, hogy a nyugalmi potenciálnak megfelelő vagy hiperpolarizált holding szint esetén a lassu bemenő áram maximuma ugyanannyi és időbeli lefutása is megegyező. A nyugalminál alacsonyabb - depolarizált - holding esetén viszont a lassu bemenő áram eleve kisebb maximumot ér el, és hamarabb is inaktiválódik /13. ábra/.

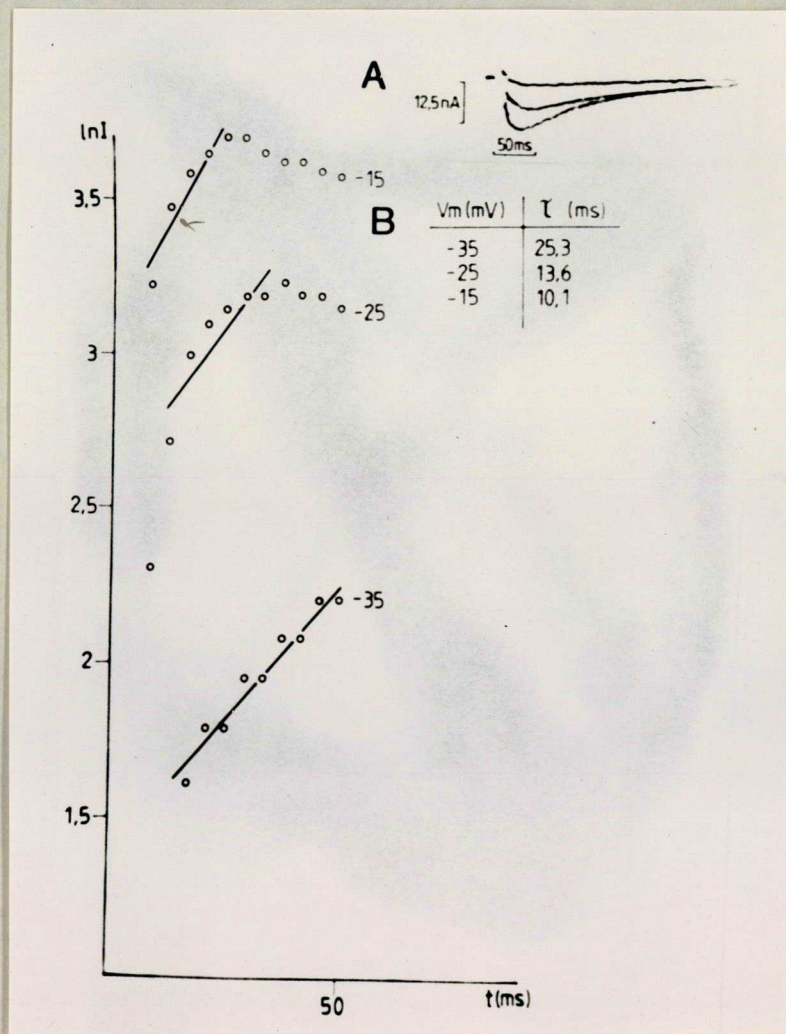
Kellően hosszú depolarizáló impulzussal a bemenő áram teljesen inaktiválható. Ha az első négyszögjel után

változó időközzel - itt pl. 0,9 - 5,3 s-vel - még egy ugyanolyan amplitudójut adunk, az inaktiváció megszűnésével párhuzamosan egyre nagyobb bemenő áramot látnunk /14. ábra/. Az inaktiváció beállításához hasonlóan megszűnése is több másodpercig tartó folyamat. Az utóbbi két vizsgálatnál Hodgkin és Huxley gondolatmenetét követtük.

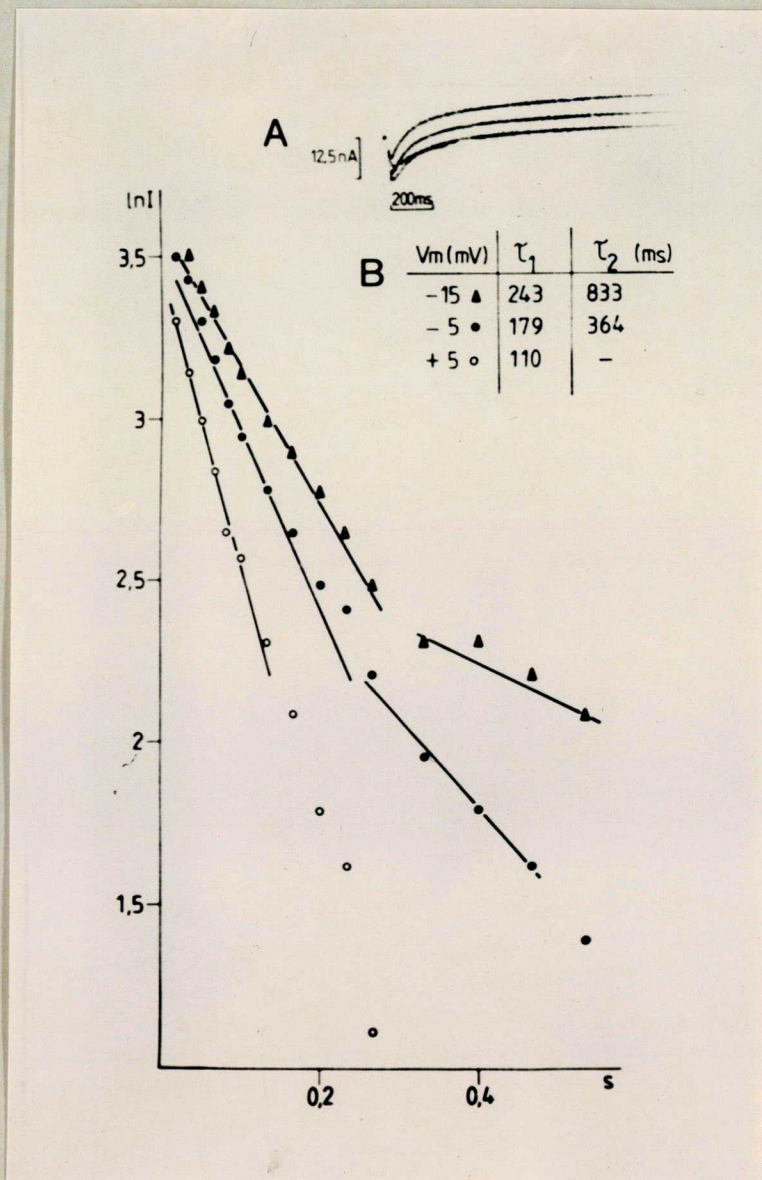
felgyes Ringes ?



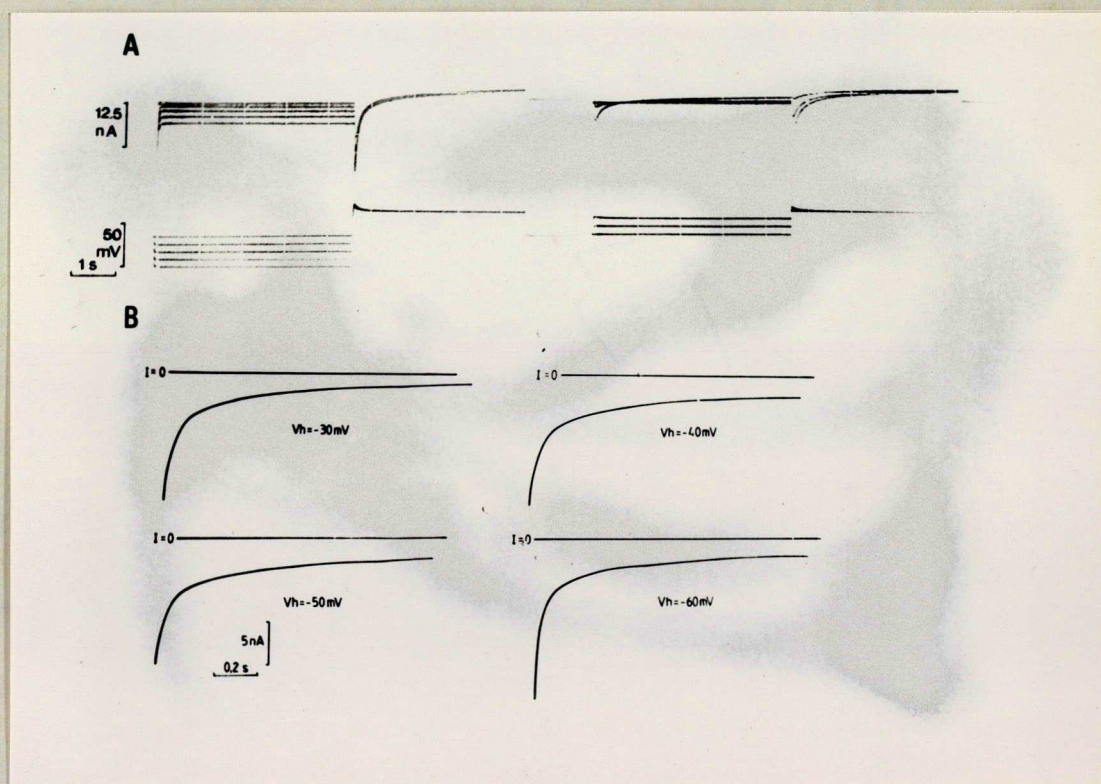
10. ábra. Lassu bemenő áramok, négyszög-depolarizációkkal kiváltva. Baloldalt az eredeti regisztrátum, jobboldalt a háttéráram levonása utáni görbék. A: az áram fokozatos aktivációja egyre nagyobb depolarizációkkal, B: az áram inaktivációjának függése a depolarizáció mértékétől. A depolarizáció szintje minden görbe végénél mV-ban fel van tüntetve, holding potenciál -45 mV.



11. ábra. A lassu bemenő áram aktivációjának időállandói. A nagy ábrán az áramgörbék logaritmált alakja az idő függvényében. A betét: az eredeti áramgörbék, B betét: az időállandó értékei a membránpotenciál függvényében.



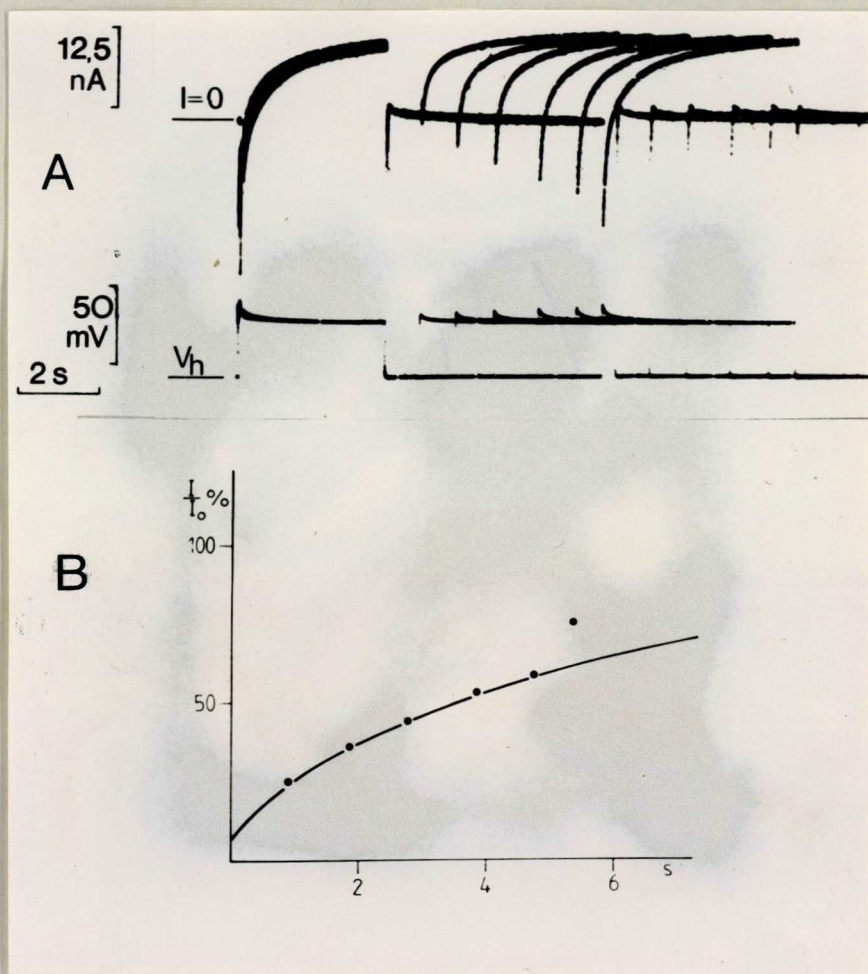
12. ábra. Az inaktiváció időállandói, a 11. ábrának megfelelően.



13. ábra. A holding potenciál szintjének hatása a lassu bemenő áramra.

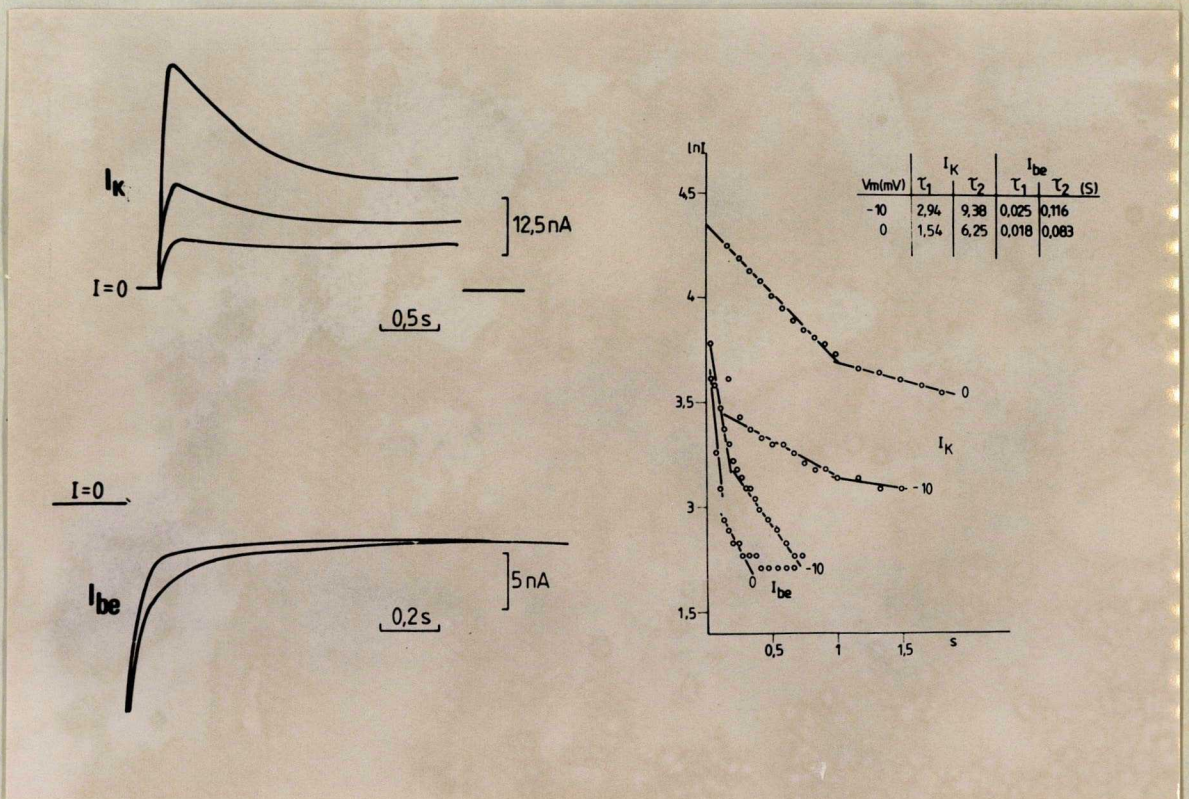
A: különböző előpulsusok után $-45, 55, \dots, 85$; illetve $-45, 35, 25$ mV/ a membránpotenciált ugyanarra a szintre -15 mV/ ugrattuk.

B: Hasonló sorozat, **k**lépésenként regisztrálva és a háttéráramra helyesbitve. $-30, 40, 50, 60$ mV-ról 0 mV-ra/.



14. ábra. Kísérlet két, változó időközzel elválasztott depolarizáló impulzussal. Első impulzus: -5 mV-ra 4 s-ig, második: -5 mV-ra 5 s-ig, holding potenciál -45 mV. A: az eredeti regisztrátum, B: az inaktiváció megszűnése az időben, az áram-maximumok hányadosa alapján. Az első impulzussal kiváltott áram I_0 / maximuma=100%.

$V_h = ?$



15. ábra. A lassu K-áram és a lassu bemenő áram ugyanabban a sejtben. Háttéráramra helyesbitett eredeti áramgörbék és logaritmált görbék az időállandókkal. Látható, hogy a két áram lecsengésének kinetikája hasonló jellegű, de az időállandók jelentősen különböznek.



DISZKUSSZIÓ

A különféle AP-k görcskeltő hatása agykérgen jól ismert /4,22,24/. Puhatestűeken azonban ilyen hatást eddig még nem irtak le. Kisérleteinkben az epileptogén hatást két régóta használatos, többé-kevésbé ismert hatásu szer kombinációjával értük el. Fontos kérdés, hogyan lehet esetleg az új effektust az anyagok már ismert hatásaiból levezetni.

Az AP-k több, ma már jól ismert módon befolyásolják a puhatestű neuronok működését. Legjelentősebb a K-áramokra kifejtett hatás. A 3,4-DAP blokkolja a lassu K-áramot Aplysián /13/, valamint Loligo axonon is /15,16/. Ez kedvező lehet egy tartós depolarizáció kialakulásához, legalább ennyire fontos azonban a transziens K-áramra tett gátló hatás is /25,26/. Ez az áram jelentős szerepet visel a természetes bursting - spontán depolarizációs hullámokat mutató - sejteken; korlátozva, gátolja nagyon hosszú kisüléssorozatok létrejöttét /7/. AP-s kezelésre megváltozhat a sejt tüzelési aktivitása /14/. További ismert hatás, hogy - gerinces szinapszisokban - az AP-k fokozzák a Ca-beáramlást /19/. Belátható azonban, hogy csupán a fenti hatások nem elégségesek a konvulziivitáshoz - bár nem elhanya-

golhatók - így a lassu bemenő áram előidézését a többitől eltérő, különálló jelenségnek kell tekintenünk. Valószínű, hogy Helixen a 3,4-DAP+TEA kombináció görcskeltő hatásáért elsősorban a DAP felelős. Emlős agyon önmagában konvulziv, és a mi kísérleteinkben is mutatott kismértékű bemenőáram-növelő hatást /6. ábra/. A PDS-ek létrejötte tehát úgy képzelhető el, hogy az AP-k eleve meglevő, latens konvulzivitását a TEA felfedi és/vagy megerősíti. A lassu K-áram TEA-s blokkolására feltétlenül szükség van, hogy a lassu bemenő áram érvényre jusson. Emellett azonban - úgy látszik - a TEA direkt módon is hozzájárul a lassu bemenő áram kifejlődéséhez. Az, hogy az AP-k emlős- és puhatestű neuronokon önmagukban eltérő hatásereőségűek, a membránok illetve ioncsatornák eltérő jellemzőivel magyarázható. Így pl. fontos lehet, hogy a K-áramok szerepe a membrán repolarizálásában puhatestűeknél jelentős, míg emlős sejten ezt a feladatot a háttéráram is kielégítően ellátja.

Eredményeink szerint a PDS-keletkezés Na-hoz kötött. Ugyanilyen ionfüggést talált a PTZ hatásánál Ducreux /8/. Ez arra mutat, hogy a PTZ és a DAP+TEA lényegében ugyanolyan módon fejt ki konvulziv hatást. A PDS kötődése Na jelenlétéhez elsősorban abból következtet-

hető ki, hogy Na-mentes oldatban nem keletkezik PDS. Ez egyrészt azért fordulhat elő, mert Na híján nem keletkezik a PDS-t beindító spike. Ennek ellentmond viszont az a - igaz, kisszámu - megfigyelésünk, hogy Na-mentes oldatban depolarizációval sem lehet PDS-t kiváltani. Azt találtuk továbbá, hogy egyes sejteken az I-V karakterisztikán megnyilvánuló bemenő áram Na-Ca-függő. A fentiek értelmében ezt úgy magyarázhatjuk, hogy normális - nem feszültségzár - körülmények között a lassu áram Ca-komponense csak a Na-komponens okozta hosszas depolarizáció hatására indul meg. A PDS tehát így jöhet létre: spike - rövid depolarizáció - lassu Na-áram - tartós depolarizáció / - lassu Ca-áram - további depolarizáció/. A depolarizáció befejeződéséért a lassu áram inaktivációja felelős. A Na- és Ca-áram-komponens egymástól elválasztható, azt azonban, hogy ugyanazon ioncsatornán folynak-e, az eddigi kísérletekből nem lehet eldönteni.

A kísérletek vezérfonalául szolgáló modell szempontjából a lassu bemenő áram kinetikai jellemzői a legfontosabbak. Az áram feszültségfüggő módon aktiválódik, a küszöb az I-V görbéken jól látható. Az inaktiváció szintén feszültségfüggő, és felléptéhez az aktivációs küszöbnél nagyobb depolarizáció szükséges, ahogy az a

10. ábrán látható. Az aktiváció és inaktiváció vég-eredményben feszültség- és időfüggő folyamatok, mégpedig úgy, hogy az aktiváció/inaktiváció sebessége és elérhető mértéke is a depolarizáció függvénye. Az eddigiek alapján következtetéseket tehetünk a lassu bemenő áram ioncsatornáira vonatkozóan. Ezek eredete két módon képzelhető el. Az áram vagy a konvulzáns által elváltóztatott, de eleve meglevő csatornán át folyik, vagy a hatóanyag molekulái maguk alkotnak új csatornákat a membránban. Eredményeink szerint az előbbi eset a valószínű. A lassu bemenő áram kinetikailag viszonylag bonyolult. Az ilyen viselkedés az aktiv membránáramokra jellemző, melyek ioncsatornáit, mint összetett, térbelileg szervezett fehérje-komplexumokat képzeljük el. Nehezen feltételezhető, hogy néhány kis szerves molekula a membránba önállóan beépülve ilyen komplexitású rendszert hozzon létre.

Nagy a valószínűsége annak, hogy a PDS-áram ioncsatornáit a lassu K-áram csatornáiból keletkeznek. Ezt támasztja alá, hogy az általunk megfigyelt sejteken a lassu K-áram és a lassu bemenő áram is két-exponenciális lecsengésű /15. ábra/. A konkrét időállandók nem egyeznek meg - a bemenő áram gyorsabban inaktiválódik - de ez betudható a konvulzáns jelenlétének. Az, ahogyan

a PDS a de- és hiperpolarizációra reagál /ld. 3.ábra/, szintén amellett szól, hogy az általunk vizsgált áram feszültségfüggő csatornán át folyik. A 3. B ábrán a PDS a depolarizáció alatt indul meg, és annak végén megszűnik. Ebben inkább az akciós potenciálokkal rokon, és nem a posztszinaptikus potenciálokkal.

A konvulzánsok csatorna-módosító hatásának mibenléte, a kötődés módja és helye egyenlőre nem ismert. Nem tudni, milyen kémiai folyamattal írható le a konvulzáns kötődése a hatás helyéhez és nem ismert, hogyan befolyásolja azt a depolarizáció. Lehetséges, hogy depolarizációra a hatóanyag leszorul. Az AP-k K-áram blokkoló hatása tekintetében ilyen jelenséget már írtak le /21, 27/. Ebben az esetben a leválás a párhuzamos inaktiváló folyamatok egyike lenne. További - látszólagos - inaktivációt, esetleg késő aktivációt okozhat, hogy a lassu K-áram TEA hatása alatt sem szűnik meg teljesen. A kísérletek során észleltünk erre utaló jeleket. Mindezen kérdéseket további kinetikai vizsgálatok dönthetik el.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben a 3,4-diaminopiridin konvulzív hatását vizsgáltuk *Helix pomatia* központi neuronokon. Egycsatornás feszültségzár-módszert alkalmaztunk.

Konvulzív hatást úgy értünk el, hogy a fenti vegyületet tetraetilammóniummal kombinálva alkalmaztuk. Az ilyen kombináció PDS-keltő hatása új, eddig le nem írt hatás. Regisztráltuk az okozott paroxizmális depolarizációs eltolódásokat, illetve az áram - feszültség karakterisztikán okozott változást, melyek a konvulzáns által létrehozott lassu bemenő áramnak tulajdoníthatók.

A jelenségek ionfüggését vizsgálva megállapítottuk, hogy a PDS keletkezése minden esetben Na-hoz kötött. A lassu bemenő áramegyes esetekben Na-, míg máskor Na-Ca-áramnak bizonyult.

Kinetikai szempontból a lassu bemenő áramra feszültség- és időfüggő aktiváció és inaktiváció jellemző. Meghatároztuk az ezeket leíró időállandókat. Eredményeinkből következtetéseket lehetett levonni a konvulzáns hatásmódjára, a lassu bemenő áram ioncsatornáira vonatkozóan.

IRODALOM

1. Arvanitaki A., Chalazonitis N., Otsuka M.: Activité paroxystique du soma neuronique d'Aplysia sous l'effet de la strichnine
C. R. Acad. Sci. /Paris/ 243 307-309 /1956/.
2. Ayala G. G. et al.: Genesis of epileptic interictal spikes Brain Res. 52 1-17 /1973/.
3. Ayala G. G., Lin S., Vasconneto C.: Penicillin as an epileptogenic agent, its effect on isolated neuron
Science 167, 1257-1260 /1970/.
4. Baranyi A., Fehér O.: Convulsive effects of 3-aminopyridine on cortical neurones
Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 47, 745-751 /1979/.
5. Barker J. L., Smith T. G.: Electrophysiological studies on molluscan neurones generating bursting pacemaker potential activity
in: Abnormal Neuronal Discharges, ed. by N. Chalazonitis and M. Boisson Raven Press, N. Y. 1978.
6. Carnevale N. T., Wachtel H.: Two reciprocating current components underlying slow oscillations in Aplysia bursting neurones
Brain Res. Rev. 2, 45-68 /1980/.

7. Connor J. A., Stevens C. F.: Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neuronal somata
J. Physiol. 213, 21-30 /1971/.
8. Ducreux C.: Pharmacological alteration of the ionic currents underlying slow potential wave generation in molluscan neurons
in: Abnormal Neuronal Discharges, ed. by N. Chalazonitis and M. Boisson,
Raven Press, N. Y. 1978.
9. Erdélyi L.: Convulsant effect of barium ion on Helix central ganglion cells
in: Neurobiology of Invertebrates, ed. by J. Salánki
Akadémiai Kiadó, 1976.
10. Fehér O., Baranyi A., Gyimóthy T.: A model for the ionic mechanism of the paroxysmal depolarization shift
in: Physiology and Pharmacology of Epileptogenic Phenomena, ed. by M. R. Klee,
H.-D. Lux, E. J. Speckmann
Raven Press, N. Y. 1982.
11. Gola M.: Electrical properties of bursting pacemaker neurones
in: Neurobiology of Invertebrates, ed. by J. Salánki
Akadémiai Kiadó, 1976.

12. Gola M.: Neurones á ondas-salves des mollusques
Pflügers Arch. 352, 17-36 /1974/.
13. Hermann A., Gorman A. L. F.: Effects of 4-amino-
pyridine on potassium currents in a molluscan
neuron
J. Gen. Physiol. 78, 63-86 /1981/.
14. Holden A. V., Winlow., Haydon Pl. G.: Effects of
tetraethylammonium and 4-aminopyridine on the somatic
potentials of identified molluscan neurone
Comp. Biochem. Physiol. 73A, 303-310 /1982/.
15. Kirsch G. E., Narahashi T.: 3,4-diaminopyridine,
a new potent potassium channel blocker
Biophys. J. 22, 507-512 /1978/.
16. Kirsch G. E., Narahashi T.: Site of action and active
form of aminopyridines in squid *L. pealei* axon
membranes
J. Pharmacol. Exp. Ther. 226, 174-179 /1983/.
17. Klee M. R.: Effects of convulsants and anticonvulsants
on nerve cells in *Aplysia californica*
in: Neurobiology of Invertebrates, ed. by J. Salánki
Akadémiai Kiadó, 1976.
18. Klee M. R. et al.: Strychnine- and pentylenetetrazole-
-induced changes of excitability in *Aplysia* neurones
Science 197, 1133-1136 /1973/.

19. Lamarca M. V., Collier B.: Effects of 4-aminopyridine of the cat superior cervical ganglion
J. Pharmacol. Exp. Ther. 226, 249-257 /1983/.
20. Matsumoto H., Ajmone-Marsan C.: Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: Interictal manifestations
Exp. Neurol. 9, 286-304 /1964/.
21. Meves H., Pichon Y.: The effect of internal and external 4-aminopyridine on the potassium currents in extracellularly perfused squid giant axons
J. Physiol. 268, 511-522 /1977/.
22. Mihály A., Joó F., Szenté M.: Neuropathological alterations in the neocortex of rats subjected to local aminopyridine seizures
Acta Neuropathol. 61, 85-94 /1983/.
23. Neher E., Lux H.-D.: Differential action of TEA on two K-current components of a molluscan neurone
Pflügers Arch. 336, 87-100 /1972/.
24. Szenté M., Pongrácz F.: Comparative study of aminopyridine-induced seizure activities in primary and mirror foci of cat's cortex
Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 52, 353-367 /1981/.
25. Thompson S.: Aminopyridine block of transient potassium current
J. Gen. Physiol. 80, 1-18 /1982/.

26. Thompson S.: Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurones
J. Physiol. 265, 465-488 /1977/.
27. Ulbricht W., Wagner H. H.: Block of the potassium channels of the nodal membrane by 4-aminopyridine and its partial removal by depolarization
Pflügers Arch. 267, 77-87 /1976/.
28. Williamson T. L., Crill W. E.: The effects of pentylenetetrazole on molluscan neurones, I.
Brain Res. 116, 217-229 /1976/.
29. Wilson W., Goldner M. M.: Voltage clamping with a single microelectrode
J. Neurobiol. 6, 411-422 /1975/.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki:

- Dr. Fehér Ottó professzor urnak munkám elméleti irányításáért és vezetéséért,
- Dr. Erdélyi Lajosnak hasznos és értékes tanácsaiért és módszertani útmutatásáért,
- Joó Edénének és Szücs Józsefnének az értekezés elkészítésében való technikai közreműködésért.