



A kisagy szerepe az akut generalizált konvulziókban

Az értekezés tézisei

Tóth Zoltán M.D.

Témavezető: Prof. Dr. Mihály András M.D., Ph.D., D.Sc.

Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Anatómiai, Szövet,-és
Fejlődéstani Intézet

Szeged

2020

A TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

I. Tóth Z, Molnár G, Mihály A, Krisztin-Péva B, Morvai M, Kopniczky Z.

Immunohistochemistry of cerebellar seizures: mossy fiber afferents play an important role in seizure spread and initiation in the rat.

Acta Histochem. 2015 Jan;117(1):47-55. doi: 10.1016/j.acthis.2014.11.002. Epub 2014 Nov 22.

IF: 1,347

II. Tóth Z, Mihály A, Mátyás A, Krisztin-Péva B.

Non-competitive antagonists of NMDA and AMPA receptors decrease seizure-induced c-fos protein expression in the cerebellum and protect against seizure symptoms in adult rats.

Acta Histochem. 2018 Apr;120(3):236-241. doi: 10.1016/j.acthis.2018.02.004. Epub 2018 Feb 22.

IF:1,719

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AOI:	area of interest;
AMPA:	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid;
ANOVA:	analysis of variance;
4-AP:	4-aminopyridine;
DAB:	3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride;
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid;
fMRI:	functional magnetic resonance imaging
GABA:	γ -amino butyric acid;
GFAP:	glial fibrillary acidic protein;
GTCS:	generalized tonic-clonic seizure;
IgG:	immunoglobulin G;
i.p:	intraperitoneal;
MCP:	middle cerebellar peduncle;
MCPL:	middle cerebellar peduncle lesion;
MRI:	magnetic resonance imaging
mRNA:	messenger ribonucleic acid;
NMDA:	N-methyl-D-aspartic acid;
PAP:	peroxidase-anti-peroxidase;
PBS:	phosphate buffered saline;
PVDF:	polyvinylidene fluoride;
RT-PCR:	reverse transcription polymerase chain reaction;
SDS-PAGE:	sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis;
SOC:	sham-operated control.

1. BEVEZETÉS

1.1 Neuropathológiai elváltozások epilepsziában

A hippocampalis sclerosis mellett, a leggyakrabban előforduló és régen felismert elváltozás a cerebelláris károsodás. A kisagyi atrofia okai között szerepel a görcs következtében kialakuló celluláris károsodás, a krónikus phenytoin kezelés, a keresztezett cerebelláris hemiatrófia miatti cerebelláris degeneráció, az ischaemiás sejt-károsodás a görcs alatt, vagy ezen hatások kombinációja, vagyis a neuropathológiai események szinergizmusa. Megfigyelések szerint a generalizált tónusos-klónusos görcsök száma és intenzitása, valamint a kisagyi atrophia mértéke korrelációt mutat. A kisagy sorvadása egyes esetekben, postmortem, makroszkóposan is látható epilepsziások kórboncolása során. A legjellemzőbb elváltozás a foliumok vékonyodása a vermis vagy a hemisphaeriumok területén, amely megfigyelhető mind az elülső, mind a hátsó lebenynél. A mikroszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy a görcsökre leginkább a Purkinje-sejtek érzékenyek. Krónikus epilepsziás betegekben a Purkinje-sejtek számának 50%-os csökkenése és kifejezett Bergmann gliosis mutatható ki a kontrollhoz képest. A cerebellumot jellemző térfogat-arányváltozások, melyek a görcsrohamok intenzitásával állnak összefüggésben, arra utalnak, hogy ezek epilepszia alatti sérülések vagy predisponáló faktorok a másodlagos generalizáció kialakulásában. A számos tény ellenére viszonylag kevés konkrét adat áll a rendelkezésünkre a kisagy epilepsziában betöltött szerepére vonatkozóan.

1.2 Glutamát transzmisszió a cerebellumban

A kisagyi szemcsesejtek glutamáterg neuronok, amelyek AMPA és NMDA receptorokkal egyaránt rendelkeznek. A szemcsesejtek dendritjei erős afferenciát kapnak a moharostok közvetítésével. A glutamát receptor aktiváció hatására a poszt-szinaptikus neuron membránján keresztül jelentős Ca^{2+} beáramlás történik. A kisagykéreg jelentős részének aktivációjáért felelnek a hídban található nuclei pontis és azok efferensei. Epilepsziában a megnövekedett extracelluláris glutamát mennyiség neuron degenerációt és végső soron sejtpusztulást okozhat. A moharostok által felszabadított glutamát nyilvánvalóan nagy számú szemcsesejtet aktivál. Ahogy azt korábbi kísérleteink során bizonyítottuk, ez a fokozott glutamát felszabadulás és neuron aktiváció masszív c-fos protein expressziót okoz.

1.3 Az AMPA és NMDA receptor antagonisták

Az ionotróp NMDA receptor antagonisták közül az MK-801 ((+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cycloheptan-5,10-imine maleate, dizocilpine) egy szelektív, non-kompetitív antagonist, aminek antikonvulzáns és neuroprotektív hatása is van. Az amantadine (1-aminoadamantane) egy alacsony affinitású NMDA receptor antagonist, amelynek szintén hasonló antikonvulzáns és neuroprotektív hatása van. A GYKI-52466 (1-(4-aminophenyl)-4-methyl-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepine hydrochloride) egy szelektív, nem kompetitív antagonist, amely az AMPA receptorokon fejti ki hatását. Intézetünk korábbi kísérletei során bizonyítottuk, hogy a neocortexben és a hippocampusban görcsök által keltett c-fos protein expresszió szignifikánsan csökkent MK-801, amantadine és GYKI-52466 előkezelések után. Jelen munkánk célja, hogy megvizsgáljuk a kisagyi szemcsesejtek görcsök által indukált c-fos expressziójának változásait MK-801, amantadine és GYKI-52466 előkezelések után 4-AP akut modellben.

1.4 Az akut konvulzív modell

Kísérleteinkben 4-aminopyridint használtunk, amely a feszültségfüggő K^+ csatornákat blokkolja (K_a csatorna és K_v csatorna). Az elhúzó repolarizáció elnyújtja az akciós potenciál időtartamát, fokozza a Ca^{2+} beáramlását a preszinaptikus axon végződésekre és ezáltal növeli a transzmitter felszabadulást. A megnövekedett transzmitter mennyiség növeli mind a serkentő- mind a gátló posztzinaptikus potenciálokat és kiterjedt görcsöket okoz *in vivo* és *in vitro* egyaránt. A 4-aminopyridin gyorsan átjut a vér-agy gáton, bejut a cerebrospinalis folyadékba, majd a vesén keresztül teljesen kiürül. Sem a vegyület, sem az általa okozott akut konvulzió nem okoz maradandó neurológiai károsodást ezért alkalmas a kísérletes epileptogenesis indukciójára. A c-fos proto-onkogén az indukálható transzkripció faktorok közé tartozik. A c-fos gént számos extracelluláris tényező aktiválhat beleértve azon neurotranszmittereket, amelyek serkentik a Ca^{2+} beáramlást a posztzinaptikus neuronba. A glutamát fokozza a Ca^{2+} beáramlást és intracelluláris protein kináz kaszkádok által intenzív c-fos expressziót okoz. A c-fos protein a sejtmagba kerül, ahol transzkripció faktoroként más gének működését szabályozza és hatással van a központi idegrendszer fejlődési, adaptációs és degenerációs mechanizmusaira epilepsziában is. A c-fos fehérje expressziója erős szinaptikus aktivitás eredménye, jól korrelál a glutamát felszabadulással és immunhisztokémiai módszerekkel vizsgálható, ezért alkalmas a neuronális aktivitás vizsgálatára

2. CÉLKITŰZÉSEK

- I. Megvizsgálni és leírni az aktiválódott kisagyi szemcsesejtek időbeli és anatómiai eloszlásának változásait 4-AP által előidézett akut konvulziók után immunhisztokémiai módszerekkel és Western blot analízissel.
- II. Célunk volt egy új módszer kifejlesztése a középső kisagykar műtéti átmetszésére laboratóriumi patkányokban.
- III. Célkitűzéseink között szerepelt a moharostok szerepének felderítése a görcsök által keltett kisagyi aktivációban c-fos immunhisztokémiával egyoldali középső kisagykar átmetszés után.
- IV. Megvizsgáltuk a c-fos immunoreaktív szemcsesejtek számának változásait NMDA és AMPA receptor antagonistákkal történt előkezelés után 4-AP indukált konvulziók során.

3. ANYAG-MÓDSZER

3.1 Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez 200-220g súlyú hím Wistar patkányokat használtunk (n=18). Az állatokat az Anatómiai Intézet állatházában tartottuk standard körülmények között (világítás: 6:00-18:00-ig, 23°C). A görcskeltőt fiziológiás sóoldatban oldottuk (0.67 mg 4-AP/1ml 0.9% NaCl oldat) és intraperitonealis (i.p.) injekció formájában adagoltuk 5 mg/kg egyszeri dózisban. A kontroll állatok csak az oldószert kapták. A 4-AP beadásától számított 1,5, 2 és 3 óra után az állatokat egy rövid dietiléteres altatás után transcardiálisan perfundáltuk (500 ml 4%-os paraformaldehid (PFA) 0,1 M-os PBS-ben oldva; pH 7.4), majd decapitáltuk. A kivett agyakat 1 órás posztfixálást követően egy éjszakán át 30%-os szukróz oldatban krioprotektáltuk. Ezt követően 24 µm vastagságú, sagittalis síkú fagyasztott metszeteket készítettünk a vermisből, amelyeken c-fos immunhisztokémiát végeztünk. A c-fos IR sejtmagokat lobulusonként számoltuk (Image Pro Plus 4.5), majd statisztikai számításokat végeztünk (egyutas variancia analízis ANOVA).

3.2 Előkezelés NMDA és AMPA receptor antagonistákkal

Az NMDA receptor antagonistákat (MK-801 és amantadine) fiziológiás sóoldatban oldottuk (Sigma St. Louis MO). Az AMPA receptor antagonista esetében (GYKI-52466) 50%-os DMSO (DMSO:dimethyl-sulphoxide; Sigma, St. Louise, MO) oldószert használtunk. Az állatokat hat csoportra osztottuk, minden csoportban 4 állattal. Az első három csoport tagjait glutamát receptor antagonistákkal Mk-801 (2 mg/kg, amantadine (50 mg/kg), GYKI-52466 (50 mg/kg) előkezeltük. Az injekció után 15 perccel egy intraperitonealisan adott egyszeri dózisu (5 mg/kg) 4-AP adásával generalizált tónusos-klónusos görcsöt váltottunk ki. A mási három csoport esetén csak az oldószereket injektáltuk és 15 perc után a 4-AP-t. A görcsök tüneteit megvizsgáltuk, a GTCS látenciáját mértük. Az előkezelt állatoknál mért időket egyutas varianca analízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze a kontroll csoportban mért időekkel, melyhez SPSS 9.0 szoftvert használtunk. 2 órával a 4-AP injekció után az állatokat éterben altattuk, transzkardiálisan perfundáltuk, az agyak kivétele után azokat c-fos immunhisztokémával vizsgáltuk. A szignifikancia $p < 0,05$ volt.

3.3 A középső kisagykar átmetszése műtéti úton

A műtét során 200-230 g súlyú hím Wistar patkányokat használtunk (n=44). Az állatokat két csoportra osztottuk. Az egyik csoport tagjain elvégeztük a cortico-ponto-cerebellaris pálya átmetszését végeztük, míg a másik az áloperált kontroll csoport volt. A műtét első lépéseként az állat altatószert kapott i.p.(80 mg/kg ketamin+20mg/kg pentobarbital+0.01 mg/kg atropin+2 ml 0.9%-os NaCl oldat). Az alvási idő átlagosan 93.35 min. volt. Az elalvás után az állat fejét sztereotaxiás padon rögzítettük majd a fül mögött vezetett metszéssel a bőrt megnyitottuk. A felületes izmok tompa preparálása után a musculus temporalis alsó szélénél szabaddá tettük a koponyát és azt fogászati fűróval megnyitottuk. A lobus floccularis eltávolítását követően láthatóvá vált a középső kisagykar, amelyet elektrocoagulátor segítségével roncsoltunk. A keletkező vérzés csillapítása diathermiával

és Spongostan® szivaccsal történt. A keletkezett defektust izomlebennyel zártuk, a bőr egyesítéséhez atraumatikus monofil varróanyagot használtunk. A műtétek kivitelezéshez operációs mikroszkópot használtunk. Az áloperált kontroll csoporton ugyanezt a beavatkozást végeztük az agy sértése nélkül. A műtét után két hetes megfigyelési és gyógyulási periódust biztosítottunk. A posztoperatív időszakot követően 2 állat paraffinba beágyazott agyából coronalis síkú metszeteket készítettünk, amelyeken hematoxin-eosin (HE) festést követően ellenőriztük a lézió helyét.

3.4 Western blot

A kísérleti állatokat (7 MCPL; 7 SOC) diethyl-aetherrel altattuk. Az állatok decapitalása után az agyakat jégen eltávolítottuk, a cerebellumot leválasztottuk. A két haemispherium és a a vermis szeparálása után a mintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk. Ezután a mintákat homogenizáltuk jég hideg puffer oldatban (0.1 mm foszfát-puffer (PBS), 5 mM EDTA, proteáz inhibitorok (Complete Mini, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland), 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) és 1% Triton X-100. A fehérjék szeparálására gélelektroforézist alkalmaztunk 12%-os (w/v) polyacrylamide gélen. A fehérjéket PVDF membránra vittük fel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Blokkolás következett PBS oldatban mely (5% (w/v) zsírszegény tejpport tartalmazott. Az elsődleges antitestek, c-fos (sc-52) 1:1,000 hígításban és beta actin (sc-47778) 1:10,000-es hígításban kerültek a mintákra. A mosás PBS-ben történt, amely 1% (w/v) koncentrációban zsírszegény tejpport valamint 0,1 % Tween-20 detergenst tartalmazott. A kötő antitestek anti-mouse IgG (sc-2031; in 1:10,000) vagy anti-rabbit IgG (sc-2030; in 1:2,000) következtek, majd a reakciót kemiluminescens reagenssel RTG filmen tettük láthatóvá. A film később scannelésre került és ImageJ szofverrel (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) statisztikai analízist végeztünk. Az antitesteket a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), a többi vegyszert a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégektől vásároltuk. Az eredményeket egyutas variancia analízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze Bonferroni post hoc teszt után.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Az állatok viselkedésének megfigyelése

A 4-AP injekciót követő 15 percen belül jellegzetes tünet együttes volt megfigyelhető, úgy, mint fokozott explorátoros tevékenység majd a rágóizmok és a végtagok izomzatának remegése, végül generalizált tónusos-klónusos görcsök (GTCS) jelentkeztek. A görcstevékenység hirtelen lép fel és egyértelműen kezdődik, így lehetséges a látenciaidő pontos mérése (átlagosan 32,53 min). A középső kisagykar roncsoláson átesett állatok esetén a látencia átlagosan 41,5 min volt. Statisztikai analízist nem végeztünk ebben a csoportban. Az álműtött állatok nem mutattak semmilyen neurológiai maradványtünetet a műtétet követően. Az MK-801 előkezelésen átesett állatoknál a látenciaidő szignifikáns növekedését tapasztaltuk. Az amantadine és a GYKI-52466 nem változtatta meg szignifikánsan a látenciaidőket, azonban az előkezelésen átesett állatok csoportjaiban csökkent a GTCS megjelenése. Az MK-801 esetében az állatok 80%-a, az amantadine esetében 70%-a és a GYKI-52466 esetében 60%-a mutatott generalizált görcsöt. A többi állatnál csak remegést, a végtagok klónusát és fokozott explorátoros tevékenységet tapasztaltunk. A kontroll csoportban az állatok 100%-a produkált görcsrohamot.

4.2 A c-fos immunreaktív szemcsesejtek számának változása a kisagyi vermisben 4-AP görcsöket követően

A 4-AP beadást követően a c-fos immunreaktív sejtmagok száma már 1,5 h után szignifikáns különbséget mutatott a kontrollhoz képest, majd folyamatos növekedés után 3 óránál érte el a maximumát. A lobus anterior és posterior szemcsesejtjeinek c-fos expressziója 1,5 óra elteltével még hasonló mintázatot mutatott, azonban 2 és 3 óránál már a lobus anterior neuronjainak aktiválódása dinamikusabb a hátsó lebenyhez képest. A

két lebeny aktiválódási különbségére az eltérő afferentáció elfogadható magyarázatot adhat. Ebből kiindulva az azonos afferentáció magyarázhatja azt is, hogy az I. és X. lebenyke idegsejtjeinek nagyon hasonló az aktiválódási mintázata, annak ellenére, hogy eltérő lebenyben helyezkednek el. Megfigyeltük továbbá, hogy a lobus posterioron belül a VIII. és a IX. lebenyke szintén nagyon hasonló c-fos expressziós dinamikát mutat.

4.3 A c-fos immunreaktív szemcsesejtek számának változása a kisagyi vermisben glutamát antagonistákkal történt előkezelést követően

A c-fos immunreaktív sejtmagokat lobulusonként számoltuk. A korábbi kísérleteinknek megfelelően a kontroll állatoknál (4-AP) a IR pozitív sejtmagok számának növekedési tendenciája és eloszlása a korábbi megfigyeléseink szerint alakult. A vermis összes lebenyében nagy számú immunreaktív sejt volt megfigyelhető, amely 2 órával a 4-AP injekció után szignifikáns volt. A GYKI-52466, MK-801 és amantadine-nal előkezelt állatoknál szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a c-fos immunreaktív sejtmagok számában a kontroll csoporthoz (csak 4-AP-val kezelt) képest. A csökkenés hasonló mértékű volt az elülső és a hátulsó lebenyben és a vermis összes lebenykéjében.

4.4 C-fos immunreaktivitás és Western blot egyoldali középső kisagykar átmetszés után

A kisagykar átmetszés hatását 4-AP görcsöknél a kisagyi szemcsesejtek c-fos expressziójának változásán keresztül kívántuk megvizsgálni. A műtéten átesett állatok 4-AP injekciót kaptak, ezután 2 órával kvantitatív immunhisztokémiát végeztünk. Az áloperált állatok esetében nem tapasztaltunk különbséget a kontrollhoz képest (csak 4-AP). Az operált oldali haemispherium szemcsesejtjeinek c-fos expressziója szignifikánsan csökkent a nem operált oldalhoz és az áloperált haemispheriumhoz képest egyaránt. Az összehasonlítást Western blot segítségével is elvégeztünk kisagyszövet mintákon. Az eredményeink szerint a c-fos fehérje szintje szignifikánsan csökkent a vermis területén és mindkét haemispherium (operált és nem operált) területén a kontrollhoz (áloperált) képest ($p < 0.001$). Az operált oldalon nagyobb mértékű csökkenés volt megfigyelhető, de a két oldal közötti különbség nem volt szignifikáns.

4.5 A kisagykéreg szövettani és immunhisztokémiai vizsgálata középső kisagykar átmetszés után

A műtét után két héttel készített GFAP festés intenzív Bergmann gliosist mutatott a kisagyban, főleg az operált oldalon. A híd területén szintén gliosist találtunk a basis pontisnak megfelelően. A synapsin I immunreaktivitás jelentős csökkenését tapasztaltuk a stratum granulosum és a stratum moleculare területén egyaránt (főként a laesio környezetében), ami arra utal, hogy a cortico-ponto-cerebellaris pálya átmetszésének következtében a moharost axon terminálisok degenerálódnak és a kisagyi glomerulusok összeesnek.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1 A c-fos expresszió változásainak vizsgálata alkalmas a neuronális hyperaktivitás követésére

A neuronális proto-onkogének az idegsejtek működésének változásaiért felelősek. A c-fos proto-onkogén az indukálható transzkripciós faktorok közé tartozik. A c-fos gént számos extracelluláris tényező aktiválhat, beleértve azon neurotranszmittereket, amelyek serkentik a Ca^{2+} beáramlást a posztszinaptikus neuronba. A glutamát fokozza a Ca^{2+} beáramlást és intracelluláris protein kináz kaszkádok által intenzív c-fos expressziót okoz. A c-fos protein a sejtmagba kerül, ahol transzkripciós faktorként más gének működését szabályozza és hatással van a központi idegrendszer fejlődési, adaptáció és degenerációs mechanizmusaira epilepsziában. A c-fos fehérje expressziója erős szinaptikus aktivitás eredménye, jól korrelál a glutamát felszabadulással és immunhisztokémiai módszerekkel vizsgálható, ezért alkalmas a neuronális aktivitás vizsgálatára.

5.2 A kisagyi szemcsesejtek c-fos fehérje expressziós mintázata 4-AP akut konvulziókban

Kimutattuk, hogy a szemcsesejtek c-fos expressziója a konvulzáló állatokban már 1.5 óra után szignifikáns különbséget mutatott a kontrollhoz képest, de a c-fos immunreaktív

sejtmagok száma csak 3 órával a 4-AP kezelés után érte el a maximális értéket. A granulás réteg c-fos tartalmú sejteinek többsége szemcsesejt. A szemcsesejtek c-fos expressziójának lassú dinamikája a gátló neuronok hatásával magyarázható, vagyis a sajátos aktiválódási dinamika magyarázata a kisagykéreg belső neuronköreinek sajátosságai rejlik. Az excitatorikus neuronok között nincsenek belső reverberációt segítő szinaptikus kapcsolatok. Ehelyett a glomeruláris szinapszisok vonatkozásában, a Golgi-neuronok felől jövő GABAerg gátlással kell számolnunk. A Golgi-neuron axonja preszinaptikus gátlás formájában szabályozza/gátolja a szemcsesejtek aktiválódását; amely gátlási forma igen hatékony. Miután a Golgi-neuront is a moharost aktiválja, itt egy gátló visszacsatolás érvényesül. Ennek alapján kijelenthetjük, hogy az akut konvulziók során a szemcsesejtek működését a moharostok a Golgi-neuronok révén szabályozzák.

5.3 A glutamát receptor antagonisták szerepe a görcsök tüneteire és a kisagykéreg c-fos expressziójára

A híd magok adják a kisagykéreg nagy részének az afferentációját. A glutamáterg pontocerebelláris rendszer moharostokkal végződik a granulás rétegben és a szemcsesejteket valamint a Golgi sejteket ingerlik. A moharostok főleg glutamáttal működnek, amely a szemcsesejtek AMPA és NMDA receptorain hat. A glutamát receptorok aktiválódása jelentős Ca^{2+} beáramlást okoz a posztzinaptikus membránon keresztül, amely számos transzkripciós faktor aktiválódását okozza. Azt gondoljuk, hogy a kisagykéreg c-fos expresszióját ez a mechanizmus váltja ki a 4-AP konvulziók után. A kémiai NMDA- és AMPA receptor antagonistákkal történő előkezelés szignifikánsan csökkentette a szemcsesejtek c-fos expresszióját, amely szintén alátámasztja ezt a feltételezett mechanizmust. Következtetéseink szerint ezen antagonisták csökkentik a kisagykéreg aktivitását a posztzinaptikus hatásukon keresztül. A szemcsesejtek csökkent aktivitása a kémiai gátlás miatt csökkenti a kisagykéreg c-fos immunreaktivitását. Irodalmi adatok szerint az AMPA receptorok száma igen magas a kisagykéregben, megtalálható mind a szemcse-, mind a Golgi sejtek dendritjein. A GluR1 altípus a Bergmann gliákon található. A gliális AMPA receptorok fontos szerepet játszanak a kisagykéreg glutamáterg transzmissziójában. A GYKI-52466 hatásos antagonistája a Bergmann gliák által mediált aszpartát felszabadulásnak. Míg az MK-801 egy nagy affinitású NMDA receptor

antagonista, az amantadine affinitása lényegesen alacsonyabb az NMDA receptorokhoz. Ezen szerekeknek neuroprotektív szerepe is lehet. Az NMDA receptorok szerepet játszanak kisagyú moharostok szinapszisainak gyors neurotranszmissziójában. Irodalmi adatok szerint a preszinaptikus NMDA receptorok NR2D alegysége szabályozza a GABA felszabadulást a kisagykéregben. Azon antagonisták amelyek ezeken az NMDA receptorokon hatnak (pl.: ifendropil) gátló hatásúak lehetnek a GABA felszabadulásra tovább bonyolítva a glutamát farmakológiai hatásait a kisagyban.

5.4 A moharostok szerepe a görcsök a kisagykéreg szemcsesejteinek c-fos expressziójára 4-AP akut konvulziókban

A középső kisagykar roncsolása után kapott eredmények azt bizonyították, hogy az afferensek roncsolása szignifikáns módon csökkenti a granuláris réteg c-fos expresszióját, alátámasztva azt az feltevést, hogy a szemcsesejtek c-fos expresszióját a moharost szinapszisokon érkező (esetleg szinkronizált) excitáció okozza. A szemcsesejt aktiváció idején ECoG segítségével a neocortex felett agykérgi nagy frekvenciájú tükesorozatok figyelhetők meg. Úgy gondoljuk, hogy az akut konvulziók során a kisagykéregre is az agykérgi neuronok hiperszinkron aktivációja tevődik át, a tractus corticopontinus – nucleii pontis – tractus pontocerebellaris révén, amely a középső kisagykaron keresztül ingerli a kisagykéreg neuronjait. Az operált állatok kisagyának egészséges oldalán is szignifikánsan csökken a c-fos expresszió a kontrollhoz képest, amely arra utal, hogy a cortico-ponto-cerebellaris pályán érkező excitáció valamilyen arányban keresztetődik a kisagyban is. Ezt a mechanizmust látszik alátámasztani az a megfigyelésünk, miszerint a középső kisagykar roncsolása megnöveli a generalizált tónusos-klónusos görcsök látenciáját. Másrészt, a középső kisagykar roncsolása bizonyította, hogy az afferensek pusztulása következményes gliózist (ami kisagyú atrófiában is megfigyelhető) okoz. A gliózis mellett jelentős deafferentáció is bekövetkezik, amit a synapsin I immunreaktivitás csökkenése bizonyított. A kisagykéreg atrófiája feltehetően együtt jár a nucleii pontis átrendeződésével és retrográd degeneráció révén, pusztulásával. Ezek a degeneratív változások megszakítják a neocortex – cerebellaris cortex neuronköröket és feltehetően mélyreható módon befolyásolják az epileptogenezist. Első megfigyelésünk, hogy a műtétet követően folyamatosan emelkedik a kisagykéregben és a hídban az astrocyták száma. A Bergmann gliosis krónikus epilepsziás

betegekben is megfigyelhető, amely a középső kisagykar károsodásának a következménye is lehet, vagy az excitotoxicus neuronpusztulás ütemét fokozza. Az astrocyták segítik a neuronok tápanyaghoz jutását, a lebomlási termékek eliminálását, befolyásolják a neurotranszmissziót a neurotranszmitterek visszavétele és lebontása által. Pusztulásuk fokozza az idegsejtek érzékenységét és fokozza az apoptosusra való hajlamukat egyaránt. A hídban kialakuló gliosis magyarázata egy retrográd axon és neuronpusztulás lehet, amelyet a műtét okozott. Mindez arra utal, hogy a műtét után az axon terminálisok kollabálnak és a kisagyi glomerulusok immunreaktivitása csökken. A leszálló cortico-cerebellaris rostok mellett cerebello-corticalis rostokat is leírtak, amelyek inhibitoros hatást fejtenek ki a cortex cerebri aktivitására. Ezen megfigyelések arra engednek következtetni, hogy nem csupán a cortex tudja befolyásolni a kisagykéreg működését és fokozni a cerebellaris atrophia mértékét epilepszia során, hanem a kisagykéreg is befolyásolja a kéreg működését és szerepe lehet az epilepszia pathomechanizmusában, progressziójában vagy a konvulziók szabályozásában.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. 4-AP által előidézett generalizált akut konvulziók során a kisagykéreg szemcsesejtjeinek c-fos expressziója elhúzódó folyamat.
2. A vermis lebenykéi (I-X) hasonló aktivitási mintázatot mutattak a konvulziók során.
3. A középső kisagykar egyoldali műtéti átmetszése jelentős mértékben csökkentette a c-fos immunreaktivitást, bizonyítva a moharostok által közvetített glutamáterg transzmisszió szerepét a cerebelláris konvulziókban.
4. Az NMDA- és AMPA receptorok akut konvulziók során betöltött fontos szerepét bizonyítja a görcs által indukált c-fos immunreaktivitás szignifikáns csökkenése a kisagykéregben receptor antagonistákkal történt előkezelést követően.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Dr. Mihály András professzor Úrnak, aki a TDK munkám kezdete óta mentorálta a tevékenységemet és lehetővé tette számomra, hogy megírjam a diplomamunkámat.

Köszönettel tartozom Dr. Kopniczky Zsolt adjunktus Úrnak (Idegsebészeti Klinika, SZTE, ÁOK) a kísérleti állatok operációiban nyújtott igen hasznos gyakorlati tanácsaiért.

Köszönöm továbbá Krisztinné Péva Beáta egyetemi tanársegédnek (Anatómiai Intézet) az ábrák és diagramok szerkesztésében nyújtott segítségét.

Hálával tartozom Kara Mónikának, Kobolák Andreának és Papp Gabriellának (Anatómiai Intézet) a kísérletekben végzett asszisztensi munkájukért és segítségükért.

Köszönöm továbbá feleségemnek Dr. Palotai Nórának azt a szerető támogatást mely jelentős mértékben hozzásegített céljaim eléréséhez.

Az első kézirat készítése A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával a **TÁMOP 4.2.4A/2-11-1-2012-0001** azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program-Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretei között valósult meg.

A második kézirat elkészítése a GINOP 2.3.2-2015-16-00034 pályázat támogatásával valósult meg.