

TÉZISEK

**AGYI INGERÜLETI FOLYAMATOK SZEREPE FELNŐTT ÉS FEJLŐDŐ
IDEGRENDSZER AGYKÉRGI EPILEPTIKUS TEVÉKENYSÉGBEN**

Barna Barbara

témavezető:

Dr. Sente Magdolna D.Sc.
egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Összehasonlító Élettani Tanszék

Szeged
2003

BEVEZETÉS

Az epilepszia spontán visszatérő rohamokkal jellemzett agyi működészavar, melynek háttérében az agyi neuronok excesszív, hiperszinkron kisülése áll. Az epilepsziás folyamatok során az idegrendszerben az ingerlés és gátlás érzékeny fiziológiai egyensúlya megbomlik, az izgalmi folyamatok féktelenedése, az idegi gátlás átrendeződése következtében kórosan fokozott ingerlékenységi állapot alakul ki (*epileptogenezis*), és a betegeknél változó gyakorisággal „spontán”, klinikailag rohamszerű tünetek jelentkeznek (*iktogenezis*). Mivel az epilepsziás tevékenység sejt- és hálózat-szintű patomechanizmusa még számos ponton kérdéses, és a fejlődő medicina ellenére az epilepszia eredményes gyógyítása még ma sem teljesen megoldott, ezért az epileptológiai kutatások továbbra indokoltak.

Ismeretes, hogy az idegrendszer legfőbb serkentő neurotranszmittere a glutamát, és az arra érzékeny glutamát receptorok, kulcsfontosságú szerepet töltenek be az idegrendszer számos neurodegeneratív elváltozásában, így pl. az epileptogenezis folyamatában. Ezeket a receptorokat farmakológiai és molekuláris biológiai szempontok figyelembevételével két fő csoportba soroljuk, megkülönböztetünk ionotróp (iGluR), azaz membránba épült, belső ioncsatornát működtető receptorokat, és metabotróp (mGluR) receptorokat, melyek G-fehérjén keresztül, a másodlagos hírvivő rendszer aktiválásával fejtik ki hatásukat. Az ionotróp, és a metabotróp GluR-ok által mediált szinaptikus ingerületátvitel különböző módon és változatos hatásmechanizmussal járul hozzá az idegi epileptikus aktivitáshoz.

Kísérleti munkánkban három fő témára koncentráltunk:

(1) Elsődlegesen célul tűztük ki, hogy kiderítsük a glutamát receptorok, ezen belül az AMPA, NMDA és I, II típusú mGluR-ok szerepét az agykérgi epilepsziás működészavar kialakulásában, fenntartásában és idegi terjedésében *in vivo*, a 4-AP görcsmodellen. Az egyes receptorok epileptogenezisben betöltött szerepének vizsgálatához nagy szelektivitású, vagy kevésbé specifikus receptor antagonisták, agonisták vegyületeket használtunk. A kísérleti protokollt úgy választottuk meg, hogy tanulmányozhassuk az egyes receptorok szerepét, mind az epileptikus aktivitás indukciós folyamataiban, mind fenntartásában és terjedésében.

(2) Kísérleti munkánkban tanulmányoztuk továbbá, hogy hogyan változik az agykérgi serkentő és gátló folyamatok fiziológiai egyensúlya, és hogyan befolyásolható az agykérgi epileptikus aktivitás, ha nem a receptorok működésére hatunk, hanem olyan endogén intra-, vagy extracelluláris anyagcsere folyamatokat befolyásolunk, mint pl. transzmitterek

szintézise, lebontása, receptor-aktivációt szabályozó mechanizmus. Ennek tanulmányozására egy komplex biokémiai hatással rendelkező anyagot, az aminooxiacetsavat (AOAA) választottuk, amely nem-specifikus transzamináz blokkoló, számos piridoxál-foszfát-függő enzim működését befolyásolja, és megvizsgáltuk hatását az agykéreg fiziológias tevékenységére és az emlős idegrendszer epileptogenezisére.

(3) A klinikai gyakorlatból ismert az a tény, hogy az epilepszia gyermekkorban gyakrabban előforduló idegrendszeri működészavar, mint felnőtt korban. Sok kísérleti adat is alátámasztja, hogy a fejlődő idegrendszer érzékenyebben reagál a különböző görcstevékenységet indukáló tényezőre (hipoxia, láz, konvulzánsok), mint a felnőtt. Ezért célul tűztük ki, hogy kísérletesen megvizsgáljuk a fejlődő idegrendszer epileptogenitását a 4-AP görcsmodellben. A fejlődő idegrendszer fokozottabb ingerlékenysége, illetve görcskészsége számos, a felnőtt idegrendszertől eltérő neurobiológiai tulajdonságra vezethető vissza. Ezek közül egy lehet a GABA excitátoros hatása a posztnatális élet korai szakaszában, amely feltehetőleg összefüggésbe hozható a megemelkedett intracelluláris klorid koncentrációval. Ennek kimutatására hisztokémiai módszer kidolgozását is terveztük.

MÓDSZEREK

Elektrofiziológiai kísérletek

Kísérleteinkben Na-pentobarbitállal altatott (i.p. 50 mg/kg) felnőtt (1-3 hónapos), illetve fiatal (10-22 napos) Wistar patkányokat (250-300g) használtunk. Az elsődleges primer fókusz a feltárt jobboldali szomatoszenzoros kérgi területén 4-AP kristály lokális alkalmazásával alakítottuk ki. Az ECoG-ot négy pontból vezettük el: a primer fókuszról (Pf), az ellenoldali félteke identikus pontjából, vagyis a tükör fókuszról (Tf) és két, a Pf- és, Tf-től posterior irányba eső kérgi területről. Az ECoG-ot a kísérlet teljes ideje alatt nyolcsatornás elektroencefalográffal kiírtattuk, és a későbbi off-line adatfeldolgozáshoz számítógépen is rögzítettük. A jobboldali szomatoszenzoros kéreg felszínéről kiváltott választ vezettünk el, továbbá az agykéreg teljes vastagságában, a felszíntől a kéreg alsó rétegéig, 200 μ m-es léptékben haladva. A kiváltott potenciálok réteganalízisét is elvégeztük.

Adatfeldolgozás

Az ECoG-jának analízise során a következő paramétereket vizsgáltuk:

- mértük a latenciaidő, a 4-AP applikációja és az első iktális szakasz megjelenése között eltelt idő,
- megadtuk az iktális szakaszok számát egy órára vonatkozóan,
- meghatároztuk az iktális szakaszok átlagos hossza,
- az iktális szakaszok számát összeszorozva átlagos hosszukkal, meghatároztuk az össziktális tevékenységet,
- mértük a különböző frekvenciájú görcspotenciálok amplitúdóját,
- figyeltük az egyes tüzelési mintázatok %-os arányát,
- mértük az epileptikus tevékenység agykérgi terjedésének (generalizáció) előfordulási valószínűségét és a status epilepticus gyakoriságát.

Farmakológiai vizsgálatok

Acélból, hogy megvizsgáljuk az általunk tanulmányozott receptorok szerepét az agykérgi epileptikus folyamatok indukciójában, fenntartásában és terjedésében különböző receptor antagonisták, agonisták felhasználásával, farmakológiai módszerekkel egészítettük ki elektrofiziológiai méréseinket. Kísérleteinket két protokoll szerint hajtottuk végre: (1) „előkezelés” során a receptor agonista/antagonista vegyületet lokálisan az agykéreg felszínére applikáltuk, (2) „közben-kezelés” során a már aktív epileptikus tevékenységet mutató Pf-ba történő a receptor aktiváló/blokkoló alkalmazása.

Felhasznált anyagok:

- GYKI 52466 szelektív nem-kompetitív AMPA receptor antagonist,
- L-AP5 szelektív NMDA receptor antagonist
- 1S,3R-ACPD nem specifikus mGluR agonista
- DCG-IV szelektív II mGluR agonista
- 3,5-DHPG szelektív I mGluR agonista
- AOAA (aminooxiecetsav) nem specifikus transzamináz gátló

Hisztokémiai vizsgálatok

Hippokampusz szeletet preparáltunk újszülött és felnőtt patkányból. A szeleteket ezüstionok jelenlétében fagyasztva-helyettesítéssel és glutáraldehiddel fixáltuk. A szeletekből készített metszeteket fénymikroszkóposan vizsgáltuk. A szöveti reakciótermék szemcsék (AgCl) analitikai vizsgálatát elektronmikroszkópban elektron spektroszkópia képalkotás (Electron Spectroscopic Imaging, ESI) és elektron energia-vesztési (Electron Energy Loss Spectrometry, EELS) üzemmódban végeztük.

EREDMÉNYEK

(1) A nagy szelektivitású, nem kompetitív AMPA receptor antagonistá GYKI 52466 antikónvulzív hatású. Szupresszálja az epilepsziás működészavar kialakulását, expresszióját, ugyanakkor facilitálja a deprimált kérgi abnormalitás terjedését. Az AMPA receptorok jelentős szerepet töltenek be a 4-AP-indukálta agykérgi epileptikus tevékenység indukciójában és fenntartásában, de aktivációjuk az epileptikus tevékenység indukciós folyamataiban, dominánsabb, mint közreműködésük a fenntartási folyamatokban.

(2) A Tf neuronhálózatában keletkező, AMPA receptorok működése által mediált serkentő ingerület a callosális pályán keresztül a Pf-ba konvergálva erős pozitív feed-back hatást közvetít, ezáltal hozzájárul a Pf abnormalis tevékenységének tartós expressziójához.

(3) A nagy szelektivitású NMDA receptor antagonistá L-AP5 is szupresszálja az epileptikus aktivitást. Az NMDA receptorok nem feltétlenül szükségesek az agykérgi epileptikus tevékenység indukálásához, ugyanakkor aktivitás-függő módon dominánsan közreműködnek az agykérgi epileptikus tevékenység fenntartásában. Az NMDA receptorok kitüntetett szerepet töltenek be a 4-AP-nel kiváltott epileptikus tevékenység cortico-thalamo-cortikális és cortico-cortikális terjedésében.

(4) A Pf-ban lévő, NMDA receptorokon keresztül aktiválódó callosálisan projektáló neuronok folyamatosan triggerelik és táplálják a Tf iktális tevékenységének indukciós és fenntartó mechanizmusait. A két epileptogén fókusz összehangolt szinkron tevékenységének fenntartásához elengedhetetlenül szükséges az NMDA receptorok által közvetített szinaptikus kapcsolat.

(5) A nagy szelektivitású mGluR I agonista 3,5-DHPG prokónvulzív hatású, fokozza az epileptikus aktivitás intenzitását, fenntartását, facilitálja agykérgi terjedését. Az I típusú mGluR-ok fontos szerepet játszanak neuronális hiperszinkronizáció kialakulásában. Az I típusú mGluR-ok aktívan közreműködnek az iktális tevékenység expressziójában, tartós fenntartásában, és az epileptiform kisülések vertikális, cortico-thalamo-cortikális és horizontális, intracortikális propagációjában.

(6) A specifikus mGluR II agonista DCG-IV antikónvulzív hatással rendelkezik, késlelteti az epileptikus aktivitás kialakulását, gátolja az iktális jelenségek fenntartását, agykérgi terjedését. A II mGluR-ok aktivációja csökkenti a neuronális szinkronizációt, hatékonyan gátolja az agykérgi epileptikus tevékenység indukcióját, expresszióját és az abnormalis ingerület cortikális terjedését.

(7) Az aminosav (AOAA), amely nem-specifikus transzamináz blokkoló révén számos piridoxál-foszfát-függő enzim működését befolyásolja, koncentráció-függő módon fokozza, vagy gátolja az epileptikus tevékenységet. Transzmitterek szintézisének vagy endogén neuroprotektív mechanizmusok modulálásával az epilepsziás működés befolyásolható.

(8) Az állatok fejlődésével párhuzamosan az agykérgi alap elektromos tevékenységében és 4-AP jelenlétében indukálódó epilepsziás jelenségekben progresszív változások történnek. A fejlődő idegrendszer görckészsége 16-17 napos korban átmenetileg fokozottabb, mint felnőtt korban.

(9) A szöveti klorid eloszlás kimutatására hisztokémiai módszert fejlesztettünk, amely a szöveti klorid ionok, fixálás során ezüst ionokkal történő kicsapásán alapul. Újszülött és felnőtt patkány hippocampusában a szöveti klorid eloszlásbeli különbözik. Újszülött patkányban, a felnőtt állapottól eltérően, intracellulárisan emelkedett klorid ion koncentráció mutatható ki. A módszerrel kimutatható, hogy epilepsziás körülmények között megváltozik a szöveti klorid eloszlás.

GYAKORLATI JELENTŐSÉG

- A GYKI 52466 és más 2,3-benzodiazepin analógok, vagy az I mGluR-okat antagonizáló, illetve a II mGluR-okat agonizáló készítmények a jövőbeli antiepileptikum-kutatás, illetve pszichiátriai és egyéb neurodegeneratív betegségek kezelését célzó gyógyszerkutatás ígéretes célpontjai lehetnek.
- Bizonyos anyagcsere-folyamatok befolyásolása, egyes enzimek funkciója is a kifejlesztésre kerülő antiepileptikumok célpontjai lehetnek.
- A szöveti klorid ionok, ezüst ionokkal történő kicsapásán alapuló hisztokémiai módszer alkalmas lehet a korai posztnatális korban tapasztalható GABA excitátoros hatás és a fejlődő idegrendszer fokozottabb görckészségének hátterében álló neuronális folyamatok további tanulmányozására.

A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

B. Barna, M. Sente, A. Szász, The anticonvulsive effect of non-NMDA antagonist GYKI 52466 on 3-aminopyridine-induced primary and secondary cortical ictal activity in rat. *Acta Biologica Hungarica*, 50: 257-267, 1999. (impact: 0.219)

B. Barna, A. Szász, I. Világi, M. Sente, Anticonvulsive effect of AMPA receptor antagonist GYKI 52466 on 4-aminopyridine-induced cortical ictal activity in rat. *Brain Research Bulletin*, 51:3, 241-248, 2000. (impact: 1.977)

B. Barna, A. Szász, R. Laczkó, Z. Szupera, L. Vécsei add M. Sente, Role of metabotropic glutamate receptor activation in the 4-aminopyridine-induced cortical epileptiform activity in rats. *Journak of Neurophysiology*, 526:66, 2000 (impact: 4.455)

B. Barna, U. Kuhnt, L. Siklós, Chloride distribution in newborn and adult hippocampus by light microscopic histochemistry. *Histochemistry and Cell Biology*, 115:105-116, 2001. (impact: 2.367)

Z. Somogyvári, **B. Barna**, A. Szász, M.B. Sente, P. Érdi, Slow dynamics of epileptic seizure: analysis and model. *Neurocomputing*, 38-40:921-926, 2001. (impact: 0.360)

B. Barna, A. Szász, Z. Szupera, L. Vécsei, H. Houtzager, M. Sente, Concentration- and time-dependent effect of aminooxyacetic acid on cortical epileptogenicity. *Acta Biologica Hungarica*, 53(3):245-256, 2002. (impact: 0.219)

A DOKTORI ÉRTEKEZÉSBNEM TÁRGYALT EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

O. Pascual, M.P. Morin-Surun, **B. Barna**, M. Denavit-Saubié, J.M. Pequignot, J. Champagnat, Progesterone reverses the neuronal responses to hypoxia in rat nucleus tractus solitarius in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 544.2:511-520, 2002. (impact: 4.455)

A. Szász, **B. Barna**, Z. Gajda, Z. Galbács, M. Kirsch-Volders, M. Sente, Effects of continuous low-dose exposure to mercury on the epileptogenicity of developing rats. (is submitted) *NeuroToxicology*, 23:197-206, 2002. (impact:1.75)

A. Szász, **B. Barna**, Z. Szupera, G. DeVisscher, Z. Galbács, M. Kirsch-Volders, M. Sente, Chronic low-dose maternal exposure to methylmercury enhances epileptogenicity in developing rat. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 17:7, 733-742, 1999. (impact: 1.425)

J. Dóczi, I. Banczerowszky-Pelyhe, **B. Barna**, I. Világi, Effect of a glutamate receptor antagonist (GYKI 52466) on 4-aminopyridine-induced seizure activity developed in rat cortical slices. *Brain Research. Bulletin*, 49:6, 435-440, 1999. (impact: 1.977)

B. Barna, A. Szász, Z. Gajda, Z. Galbács, M. Kirsch-Volders, M. Sente, Effects of chronic, intrauterine organic and inorganic mercury intoxication on the epileptogenicity of developing rat. *Central European Journal of Public Health*, 8:73-75, 2000.

A. Szász, **B. Barna**, Z. Galbács, M. Kirsch-volders, M. Sente, Chronic low-dose maternal exposure to methylmercury enhances epileptogenicity in developing rats. *Central European Journal of Public Health*, 8:75-77, 2000.

B. Barna, M. Sente, A. Szász, G. DeVisscher, Z. Galbács, M. Kirsch-Volders, Chronic intrauterine exposure to methylmercury enhances epileptogenicity in developing rats. *Proceedings of Analytical and Environmental Problems*, 4:85-89, 1998.

FOLYÓIRATBAN MEGJELENT ABSTRACT-OK JEGYZÉKE

B. Barna, M. Sente, J. Dóczy, I. Világi, Effects of an AMPA-antagonist on epileptic activity evoked by aminopyridine in *in vivo* and *in vitro* models. *Neurobiology*, 6:104., 1997.

M. Sente, A. Szász, **B. Barna**, G. DeVisscher, Z. Galbács, M. Kirsch-Volders, Proconvulsive effects of chronic developmental exposure to methyl-mercury in rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16:6, 571., 1998.

A. Szász, **B. Barna**, Z. Szupera, M. Sente, Effects of chronic transplacental MeHgCl treatment on epileptogenicity of offsprings. *Clinical Neuroscience*, 51:5-6, 201-202, 1998.

B. Barna, A. Szász, M. Sente, Age dependency of the susceptibility of rats to aminopyridine seizures, *Neurobiology*, 7:281-282, 1999.

B. Barna, A. Szász, M. Sente, Age dependency of the susceptibility of rats to aminopyridine seizure. *Epilepsia*, 40:2, 141., 1999.

A. Szász, **B. Barna**, M. Sente, M. Kirsch-Volders, Effects of chronic intrauterine mercury intoxication on the epileptogenicity of developing rat. *Epilepsia*, 40:2, 142., 1999.

B. Barna, A. Szász, Z. Szupera, L. Vécsei, M. Sente, Role of glutamaterg receptors in the 4-aminopyridine-induced cortical seizure activity in rats. *European Journal of Neuroscience*, 12:11, 106., 2000.

B. Barna, A. Szász, R. Laczkó, Z. Szupera, L. Vécsei, M. Sente, Role of metabotropic glutamate receptor activation in the 4-aminopyridine-induced cortical epileptiform activity in rats. *Journal of Physiology*, 526 P:60, 2000.

KONFERENCIARÉSZVÉTEL-PÓSZTEREK

B. Barna, M. Sente, J. Dóczy and I. Világi, Effects of AMPA-antagonist on aminopyridine-induced epileptic activity in *in vivo* and *in vitro*. MITT IV. Conference, Gödöllő, Hungary, 1997.

B. Barna and M. Sente, The effects of non-NMDA antagonist GYKI 52466 applied in the mirror focus on 3-aminopyridine-induced primary and secondary cortical ictal activity in rat. MITT V. Conference, Debrecen, Hungary, 1998.

A. Szász, **B. Barna**, Z. Szupera, M. Szente, Effects of chronic transplacental MeHgCl treatment on epileptogenicity of offsprings. III. Conference of Hungarian Section of International Liga Against Epilepsy, Kecskemét, Hungary, 1998.

M. Szente, A. Szász, **B. Barna**, G. DeVisscher, Z. Galbács and M. Kirsch-Volders, Proconvulsive effects of chronic developmental exposure to methyl-mercury in rats. 12th Biennial Meeting of International Society for Developmental Neuroscience, Vancouver, USA, 1998.

M. Szente, A. Szász, **B. Barna**, G. DeVisscher, Z. Galbács and M. Kirsch-Volders, Proconvulsive effects of chronic developmental exposure to methyl-mercury in rats. The 4th Symposium on analytical and environmental problems, Szeged, Hungary, 1998.

Barna B., Szász A., Szente M. A fejlődő agykéreg görcskésztsége, A Debreceni Egyetemi Szövetség I. Idegtudományi Konferenciája, Debrecen, 1998.

B. Barna, A. Szász, M. Szente, Age dependency of the susceptibility of rats to aminopyridine seizure, MITT VI. Conference, Harkány, Hungary, 1999.

A. Szász, **B. Barna**, M. Szente, G. DeVisscher, Z. Galbács, Proconvulsive effects of chronic developmental exposure to methyl-mercury in rats, MITT VI. Conference, Harkány, Hungary, 1999.

B. Barna, A. Szász, M. Szente, Age dependency of the susceptibility of rats to aminopyridine seizure. 23rd International Epilepsy Congress, Prague, Czech Republic, 1999.

A. Szász, **B. Barna**, M. Szente, M. Kirsch-Volders, Effects of chronic intrauterine mercury intoxication on the epileptogenicity of developing rat. 23rd International Epilepsy Congress, Prague, Czech Republic, 1999.

B. Barna, A. Szász, Z. Gajda, M. Szente, Effects of chronic intrauterine organic and inorganic mercury intoxication on the epileptogenicity of developing rat. 6th Meeting of the Central and Eastern European Section in Conjunction with the Annual Meeting of the Union of Hungarian Toxicologists, Balatonföldvár, Hungary, 1999. (előadás)

A. Szász, **B. Barna**, M. Kirsch-Volders, Z. Galbács, M. Szente, Chronic low-dose maternal exposure to methylmercury enhances epileptogenicity in developing rat. 6th Meeting of the Central and Eastern European Section in Conjunction with the Annual Meeting of the Union of Hungarian Toxicologists, Balatonföldvár, Hungary, 1999.

B. Barna, A. Szász, Z. Gajda, Z. Galbács, M. Szente, Comparison of the neurotoxic effects of organic and inorganic mercury compounds. The 6th Symposium on analytical and environmental problems, Szeged, Hungary, 1999. (előadás)

B. Barna, U. Kuhnt, L. Siklós, Chloride distribution in newborn and adult hippocampus by light microscopic histochemistry. MITT VII. Conference, Budapest, Hungary, 2000.

B. Barna, K. Nagy, H. Houtzager, A. Szász, Z. Szupera, L. Vécsei, M. Sente, Is aminooxyacetic acid proconvulsive or anticonvulsive? MITT VII. Conference, Budapest, Hungary, 2000.

Z. Gajda, A. Szász, **B. Barna**, R. Laczkó, M. Sente, Involvement of GABA_A receptor-mediated neurotransmission in the aminopyridine-induced ictal epileptiform activity. MITT VII. Conference, Budapest, Hungary, 2000.

B. Barna, A. Szász, R. Laczkó, Z. Szupera, L. Vécsei, M. Sente, Role of metabotropic glutamate receptor activation in the 4-aminopyridine-induced cortical epileptiform activity. MÉT Conference, Budapest, Hungary, May 2000.

B. Barna, A. Szász, Z. Szupera, L. Vécsei, M. Sente, Role of glutamate receptors in the 4-aminopyridine-induced cortical seizure activity *in vivo* rats. B. Barna, A. Szász, Z. Szupera, L. Vécsei, M. Sente, FENS, Brighton, United Kingdom, June 2000.

Z. Somogyvári, **B. Barna**, A. Szász, M. Sente, P. Érdi, Power dynamic analysis of epileptic activity in rat neocortex. Ninth Annual Computational Neuroscience Meeting, Brugge, Belgium, July 2000.

Z. Somogyvári, **B. Barna**, A. Szász, M. Sente, P. Érdi, Drog-dependent changes in different periods of the epileptic EEG spectrum. MITT VIII. Conference, Szeged, Hungary, 2001.

R. Laczkó, **B. Barna**, T. Asztalos, M. Sente, Role of group I and II metabotropic glutamate receptors (mGluRs) in the 4-aminopyridine-induced cortical epileptiform activity in rat. MITT VIII. Conference, Szeged, Hungary, 2001.