

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**AZ ELEKTROMOS SZINAPSZISOK SZEREPE A FEJLŐDŐ ÉS
FELNŐTT AGYKÉREG EPILEPTOGENEZISÉBEN ÉS
EPILEPTIFORM TEVÉKENYSÉGÉNEK INDUKÁLÁSÁBAN ÉS
FENNTARTÁSÁBAN**

Gajda Zita

Témavezető:

Dr. Sente Magdolna, D.Sc.

egyetemi tanár



Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi kar
Összehasonlító Élettani Tanszék

Szeged, 2006

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az epilepszia spontán visszatérő rohamokkal jellemzett agyi működészavar, melynek háttérében az agyi neuronok excesszív, hiperszinkron kisülése áll. Az utóbbi évtizedekben egyre inkább előtérbe került az a hipotézis, mely szerint a sejtek közötti gap junction (GJ) kapcsolatok (elektromos szinapszisok) fontos szerepet játszhatnak az epileptiform tevékenység háttérében álló fokozott neurális szinkronizáció kialakulásában. A feltevés helyességét ma már számos elektrofiziológiai és anatómiai adat támasztja alá. Az utóbbi időkben *in vitro* epilepszia modellekben kimutatták, hogy a GJ-ok funkcionális állapotának megváltoztatása hatással van a görcstevékenység különböző paramétereire, azonban hiányoztak a bizonyíték a GJ-ok epileptiás működészavarban betöltött szerepéről *in vivo* körülmények között.

A klinikai tapasztalatok és kísérletes eredmények azt mutatják, hogy a fejlődő idegrendszer fokozottabban érzékeny a görcsindukáló behatásokra, mint a felnőtt idegrendszer. A jelenség háttérében álló neurológiai tényezők összességében még nem teljesen ismertek, mégis van néhány jellegzetes neurobiológiai tulajdonság, amely magyarázatul szolgálhat. Számos közlemény számol be arról, hogy a fejlődő idegrendszerben lényegesen nagyobb számban vannak jelen GJ-ok és, hogy a GJ-kon keresztül megvalósuló intercelluláris kommunikáció elterjedtebb formája a sejtek közötti párbeszédnek az agyfejlődés korai szakaszában, mint a felnőtt idegrendszerben. Ezért adódik a feltételezés, hogy összefüggés lehet a fejlődő idegrendszer fokozott görcskészsége és a GJ-okon keresztül megvalósuló kommunikáció magas szintje között. Azonban ez a terület még számos nyitott és megválaszolásra váró kérdést vet fel.

Napjainkban egyre inkább egyértelművé válik, hogy a glia sejtek nélkülözhetetlen részei az agy működő hálózatainak. A neuronok és asztrociták sokrétű kapcsolatában, pl. a neuronok szabályozzák az asztrociták hálózati tulajdonságait, ugyanakkor az asztrociták glutamátot és egyéb neuroaktív anyagokat bocsátanak ki, amelyekkel befolyásolják a szomszédos neuronok ingerelhetőségét. Bár számos adat támasztja alá a GJ-okon megvalósuló interneuronális kommunikáció fontosságát a szinkronizációs mechanizmusokban, a glia sejtek közötti GJ-ok szerepét az epileptiform tevékenység indukációjában, fenntartásában és terjedésében eddig még nem tanulmányozták.

A Szegedi Tudományegyetem Összehasonlító Élettani Tanszéke Epilepszai laboratóriumában több évtizede folyik epilepszia alapkutató a 4-aminopyridine (4-AP) *in vivo* epilepszia modellen. Így kínálkozik a lehetőség, hogy a fent említett izgalmas témákat

megvizsgáljuk ezen a modellen. Kísérleti munkánk során a következő kérdésekre próbáltunk választ kapni:

- Az ideg- és/vagy glia sejtek közötti GJ kommunikáció a felnőtt neocortexben:
 - befolyásolja-e az agykérgi fiziológias folyamatokat (ECoG, kiváltott potenciál),
 - hozzájárul-e az epileptogenezishez illetve a görcskészség alakulásához,
 - részt vesz-e a rohamok indukciós és fenntartási mechanizmusában,
 - van-e szerepe az iktális periódusok hosszának szabályozásában?
- A neuron specifikus Cx36 GJ kommunikáció milyen mértékben járul hozzá az epileptogenezis és ictogenezis folyamataihoz, valamint a görcspotenciálok terjedéséhez felnőtt állatokban?
- Milyen funkcionális jelentőséggel bírnak az ideg- és/vagy glia sejtek közötti GJ kapcsolatok a fejlődő idegrendszer fokozott görcskészségében és epileptiform tevékenységében?
- Hogyan változnak a Cx26 (fiatalkori, neuron specifikus), 32 (oligodendrocyta specifikus), 36 (felnőttkori, neuron specifikus), és 43 (astrocyta specifikus) mRNS-ek alap expressziós szintjei a fejlődés során?
- Az ismételt rohamtevékenység okoz-e változást ezen mRNS szintekben a fejlődő és felnőtt agykéregben?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Állatok

Az elektrofiziológiai és molekuláris biológiai méréseket mindkét nemhez tartozó Wistar felnőtt (200-300g) és 9-28 napos (18-50 g) fejlődő patkányokon végeztünk. Az állatokat standard laboratóriumi körülmények között tartottuk szabad víz és élelem hozzáférés mellett. Az állatkísérletek mind a Magyar Köztársaság (XXVII/1998 és 243/1998), mind az Európai Közösség (86/609/EEC) által hozott, a laboratóriumi állatok védelmére és kísérleti felhasználására vonatkozó jogszabályainak megfelelően, a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság engedélyével zajlottak.

Anyagok

Az elektrofiziológiai és farmakológiai kísérleteinkben felhasznált anyagok és beszerzési helye: 4-AP, trimethylamin (TMA), carbenoxolon, octanol, kinin (Sigma, St.Louis, USA).

A molekuláris biológiai méréseinkhez felhasznált anyagok és beszerzési helyeik: RNazol B reagens (Tel-Test Inc., Friendswood, TX, USA); RNase-mentes DnaseI (Boehringer-Mannheim, Germany); dNTP (Roche, Indianapolis, IN, USA); M-MuLV reverz transcriptáz, Taq polymeraz, 1.5% agarose gél, β -actin és a Cx26, 32, 36 and 43 konnexinek primerei (Sigma, St.Louis, USA).

Elektrofiziológiai kísérletek

In vivo kísérleteinket Na-pentobarbitáttal altatott patkányokon végeztük, az iktális epileptiform tevékenységet a feltárt jobboldali szomatoszenzoros kéreg felszínére helyezett 4-AP kristállyal indukáltuk. Az electrocortikogramot (ECoG) ezüst elektródok segítségével vezettük el a primer fókuszból (Pf), az ellenoldali agyfélteke azonos pontjáról, a tükör fókuszból (Tf), és két, a Pf- és Tf-től posterior irányba eső kérgi területekről. Az ECoG-ot a kísérlet teljes ideje alatt nyolccsatornás elektroencefalográffal írtuk ki, és a későbbi off-line adatfeldolgozáshoz számítógépen is rögzítettük.

A GJ kommunikáció farmakológiai eszközökkel történő manipulálása

Kísérleteinket két protokoll szerint hajtottuk végre. Az „előkezelés” során a GJ csatornák funkcionális állapotát a fiziológiás (intakt) agykéregben módosítottuk, majd ezt követően alakítottuk ki a görccsfókuszot. Ezekben a kísérletekben arra voltunk kíváncsiak, hogy

a GJ-k befolyásolják-e az epileptogenezis mechanizmusait és a görcskészséget. A „közbenkezelés” során a GJ csatornák állapotát a már aktív epileptikus tevékenységet mutató (20-30 roham/óra) Pf-ban manipuláltuk, arról szerezve információt, hogy a GJ-k módosítják-e a görcestevékenység indukciós, fenntartási és terjedési folyamatait.

A megfogalmazott kérdések megválaszolása érdekében a felnőtt állatokban carbenoxolon és octanol széles spektrumú blokkolókat használtunk a neuronális és gliális connexinek együttes blokkolására. Kinint alkalmaztunk a neuronális Cx36 fehérje szelektív blokkolására, valamint TMA-t használtunk a GJ csatornák nyitott állapotban tartására. A fejlődő állatokban a felsorolt drogok közül carbenoxolont és TMA-t alkalmaztunk.

Molekuláris biológiai mérések

Szemi-kvantitatív reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció mérési technikát alkalmaztunk a különböző connexin mRNS-ek alap expressziós szintjének mérésére és annak nyomon követésére, hogy az ismételt rohamtevékenység okoz-e változást ezen mRNS szintekben a fejlődő és felnőtt patkányok agykérgében.

A felnőtt állatokban a szövetmintákat a Pf és Tf területéről metszettük ki az egy órás rohamtevékenységet követően. Mivel az epileptiform tevékenység generalizált formában jelentkezett a fejlődő állatok esetében, a mintavételezés itt a Pf területéről történt. A kontroll állatokban a szövetmintákat a Pf-nek és Tf-nek megfelelő kérgi területekről vettük.

Statisztikai analízis

Elektrofiziológiai kísérleteinkben az adatfeldolgozás során vizsgáltuk az első roham megjelenéséig eltelt latencia időt, a rohamok számát és hosszát, az össziktális tevékenységet (a rohamok számának és hosszának szorzata 20 perces időintervallum alatt) valamint a görcspotenciálok mintázatát (amplitúdó, frekvencia). Az adatok kiértékelése a Digidata 1200B (BD, BNC, Axon Instruments, Inc.) számítógépes program segítségével történt. A szignifikáns különbségek megállapítása a kontroll és a farmakológiai beavatkozáson átesett csoportokból származó adatok között Student t-teszttel történt (szignifikancia kritérium $P \leq 0.05$).

Molekuláris biológiai méréseinkben a statisztikai analízist két-próbás ANOVA teszttel végeztük. Szignifikáns különbségek esetén Tukey HSD tesztet alkalmaztunk a csoportok közötti post hoc összehasonlítás érdekében (szignifikancia kritérium $P \leq 0.05$).

EREDMÉNYEK

Felnőtt állatokon végzett megfigyelések:

(1) A GJ-ok funkcionális állapotának módosítása a felnőtt agyban, kontroll, fiziológias körülmények között (*előkezelés*) látszólag nem változtatta meg az alap ECoG-t, és nem befolyásolta jelentősen a görcspotenciálok indukcióját és manifesztálódását. Eredményeink arra utalnak, hogy fiziológias körülmények között a GJ kommunikáció valószínűleg csak kismértékben befolyásolja a felnőtt neocortex görcskészségét és az epileptogenezis mechanizmusait (*Szente et al, Neuroscience; 115/4:1067-1078, 2002*).

(2) Ezzel szemben, a GJ-ok blokkolása az aktív epilepsziás fókuszbán (*közben-kezelés*) markáns antikonvulzív, míg nyitásuk erőteljes prokonvulzív hatással volt az epileptiform tevékenységre. Carbenoxolon illetve octanol közbenkezelés jelentősen csökkentette a rohamok hosszát, a görcspotenciálok amplitúdóját és az epileptiform tevékenység terjedését más kérgi területekre. Nyitott állapotban tartásuk TMA-al ugyanakkor, a GJ-ok blokkolásával ellentétes hatást fejtett ki, és szignifikánsan megnövelte az előbb említett paraméterek értékeit. Az aktív epilepsziás fókuszbán, az előzőeken kívül, szignifikáns növekedést figyeltünk meg a Cx32, 36 és 43 mRNS-ek expressziójában. Eredményeink arra utalnak, hogy ismételt rohamtevékenység következtében felerősödik a GJ kommunikáció az idegsejtek és/vagy gliasejtek között fokozva a sejtek abnormális szinkron tevékenységét, amely hatékonyan hozzájárul a további görcstevékenység fenntartásához és terjedéséhez. Ezen kívül, a GJ-ok átjárhatósági állapotának dinamikus változása fontos szerepet játszik a rohamok hosszának szabályozásában (*Szente et al, Neuroscience; 115/4:1067-1078, 2002; Gajda et al., Epilepsia; 44/12:1610-1615, 2003*).

(3) A neuron specifikus Cx36 szelektív blokkolása kininnel 25-30 ismételt rohamtevékenység után, egy új görcspotenciál mintázat megjelenését eredményezte a rohamok kezdetén, jellemzően 15Hz feletti frekvenciával, amely együtt járt a rohamok számának növekedésével is. Annak ellenére azonban, hogy a rohamok száma megnőtt, a kinin közbenkezelés antikonvulzív hatást fejtett ki a rohamok hosszának jelentős rövidülése következtében, amely az összikális tevékenység szignifikáns csökkenését eredményezte. A görcspotenciálok amplitúdói többnyire csökkentek, a 11-12 Hz frekvenciájú görcspotenciálok kivételével, melyek amplitúdói nőttek. Eredményeink azt mutatják, hogy az epileptiform tevékenységet indukáló és fenntartó mechanizmusok eltérő módon érintettek a GJ

kommunikáció intenzitásának változásakor. Azt feltételezzük, hogy a Cx36 GJ kommunikáció kontroll alatt tartja azon neuronhálózat(ok) működését, amely(ek) involvált(ak) a rohamok indukálásában (*Gajda et al., Epilepsia; 46(12):1998-2004, 2005*).

(4) A globális connexin blokkolás (glia is) a neuronális Cx36 blokkolását követően tovább csökkentette az össziktális tevékenységet, a görcspotenciálok amplitúdóit és további rövidülést eredményezett a rohamok hosszának alakulásában. Az előbbieken kívül, szignifikáns növekedést tapasztaltunk az astrocyta specifikus Cx43 és oligodendrocyta specifikus Cx32 expressziójában. Eredményeink arra utalnak, hogy mind a neuronok közötti, mind pedig a glia sejtek közötti GJ kommunikáció hozzájárul a felnőtt neocortex epileptiform tevékenységének manifesztációjához és terjedéséhez, azonban, valószínű eltérő mértékben és módon (*Gajda et al., Epilepsia; 46(12):1998-2004, 2005*).

Fejlődő állatokon végzett megfigyelések:

(5) A fejlődő állatokban mind az alap ECoG mind a 4-AP-el indukált tevékenység jellegzetes változásokat mutatott a kor előrehaladtával: magasabb frekvenciájú és gyorsabb komponensek jelentek meg az alap ECoG-s tevékenységben. A fiatal állatoknál jellemzően generalizált, és többnyire folyamatos görcspotenciálok egyre inkább az elsődleges- és a tükörfókuszos helyére korlátozódtak, és időben iktális és interiktális szakaszokra tagolódtak. E folyamatokkal párhuzamosan gyorsabb és magasabb frekvenciájú görcspotenciálok jelentek meg, illetve a görcspotenciálok amplitúdói frekvencia szerint differenciálódtak. A fejlődő idegrendszer görcskészségét a korai fokozott epileptogén állapot után egy átmeneti csökkenés (P13-14) majd növekedés (P15-16) és végül ismételt csökkenés után (P23 körül) a felnőtt korra jellemző állapot jellemezte (*Gajda et al., Epilepsia; 47(6):1009-1022, 2006*).

(6) A Cx36, 32, 26 és 43 mRNS expressziója a fiziológiás és epilepsziás kéregben Cx altípustól és életkortól függő változásokat mutatott. A Cx mRNS alap szint szignifikánsan megnövekedett P16 körül (a Cx26 kivételével). A Cx26, 36 és 43 gén indukálhatósága P16 körül volt a legmagasabb, ezután pedig szignifikánsan csökkent (*Gajda et al., Epilepsia; 47(6):1009-1022, 2006*).

(7) A GJ-ok nyitása görcspotenciálokra emlékeztető ritmikus, szinkron tevékenységet indukált a P9-12 napos korú állatokban. Ellentétben a felnőttekkel, a GJ-ok funkcionális állapotának módosítása hatékonyan befolyásolta az epileptogenezist is és az epileptiform

tevékenység fenntartását is a fiatal állatokban. Elektrofiziológiai, farmakológiai és molekuláris biológiai eredményeink arra utalnak, hogy a GJ populáció jellegzetes mennyiségi és minőségi összetétele alapját képezheti a fejlődő idegrendszer fokozottabb görcskészségének és epileptogenitásának (*Gajda et al., Epilepsia; 47(6):1009-1022, 2006*).

GYAKORLATI JELENTŐSÉG

Az epilepszia az egyik leggyakoribb neurológiai megbetegedés, a lakosság mintegy 4%-át érinti. A műtéti beavatkozással nem gyógyítható epilepsziás betegek ellátásában a legfőbb eszköz az antiepileptikumokkal történő monoterápiás, vagy kombinált gyógyszeres kezelés, amely a betegek 70-80%-ánál hoz javulást, vagy eredményez teljes tünetmentességet. A betegek 20-30%-a azonban nem reagál a gyógyszeres kezelésre, állapotuk nem javul. Ez azt mutatja, hogy a jelenleg rendelkezésre álló antiepileptikumok (amelyek főként a feszültségfüggő Na⁺-csatorna blokkolásán, a GABA receptor-ioncsatorna komplexen megvalósuló gátlás fokozásán, illetve a preszinaptikus glutamát felszabadulás gátlásán alapulnak) nem vesznek célba minden olyan patomechanizmust, amely közreműködik az epilepsziás működészavar kialakulásában és fenntartásában. Új támadási pontokon ható antiepileptikumok kifejlesztésére van szükség és igény. Kutatási eredményeink alapján azt gondoljuk, hogy az elektromos szinapszisok funkcionális állapotát és expressziós szintjét befolyásoló farmakonok kifejlesztése új terápiás eljárás lehetőségét veti fel az epilepsziás betegek kezelésében felnőtt és gyermekkorban egyaránt.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Hálás köszönetemet fejezem ki tanáromnak, Prof. Sente Magdolna egyetemi tanárnak (SZTE, Összehasonlító Élettani Tanszék), szakmai munkám során tett útmutatásáért és nélkülözhetetlen tanácsaiért. Külön köszönettel tartozom azért, hogy az élet minden területén mellettem állt és számíthattam rá bármilyen felmerülő nehézség megoldásában.

Köszönetet mondok továbbá a laboratóriumban dolgozó társaimnak, Dr. Barna Barbarának, Gyengési Erikának és Ressinka Juditnak barátságukért és a kísérletes munkában nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom Dr. Szupera Zoltán doktor úrnak (SZTE, Neurológiai Klinika) értékes és építő szakmai észrevételeiért.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Hermes Editnek és Dr. Said Alinak (SZTE, Biokémiai Tanszék) a molekuláris biológiai mérések elvégzéséért és az eredményes együttműködésért.

Végül, de nem utolsó sorban hálás köszönettel tartozom családomnak, különösen férjemnek, szeretetükért és támogatásukért mindvégig a munkám során.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Folyóiratban megjelent közlemények

- I. B. Barna, A. Szász, **Z. Gajda**, Z. Galbács, M. Kirsch-Volders, M. Sente. Effects of chronic, intrauterine organic mercury intoxication on the epileptogenicity of developing rat. *Central European Journal of Public Health*, 8:73-75, 2000.
- II. Szász A, Barna B, **Gajda Z**, Galbács Z, Kirsch-Volders M, Sente M. Effects of continuous low-dose exposure to organic and inorganic mercury during development on epileptogenicity in rats. *Neurotoxicology*, 23:197-206, 2002.
IF: 1.659
- III. Sente M, **Gajda Z**, Said Ali K, Hermes E. Involvement of electrical coupling in the *in vivo* ictal epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the neocortex. *Neuroscience*, 115/4:1067-1078, 2002.
IF: 3.457
- IV. **Gajda Z**, Gyendési E, Hermes E, Said Ali K, Sente M. Involvement of gap junctions in the manifestation and control of duration of seizures in rats *in vivo*. *Epilepsia*, 44/12:1610-1615, 2003.
IF: 3.329
- V. **Gajda Z**, Szupera Z, Blazsó G, Sente M. Kinin, a blocker of neuronal Cx36 channels, suppresses seizure activity in rat neocortex *in vivo*. *Epilepsia*, 46(12):1998-2004, 2005.
IF: 3.329
- VI. **Gajda Z**, Hermes E, Gyendési E, Szupera Z, Sente M. The functional significance of gap junction channels in the epileptogenicity and seizure susceptibility of juvenile rats. *Epilepsia*, 47(6):1009-1022, 2006.
IF: 3.329

Konferencia részvétel- absztraktok

- I. **Gajda Z**, Szupera Z, Sente M. Involvement of electrical synapses in the epileptiform activity induced *in vivo* by 4-aminopyridine. VIII. Annual Congress of the Hungarian Society for Neuroscience, 2001.

- II. Szente M, **Gajda Z**, Szupera Z. Involvement of electrical synapses in the epileptiform activity induced in vivo by 4-aminopyridine. The 24th International Epilepsy Congress, Buenos Aires, *Epilepsia* 42:21, 2001.
- III. **Gajda Z**, Gyengési E, Hermes E, Said Ali K, Szente M. Involvement of electrical synapses in the induction and maintenance of cortical seizure discharges. International League Against Epilepsy, Hungarian Faculty, 6th Conference, 2002.
- IV. Gyengési E, **Gajda Z**, Hermes E, Said Ali K, Szente M. The role of gap junctions in generation of seizure discharges and in the transition from ictal to interictal state. IBRO International Workshop, *Neurobiology* 9, 2002.
- V. **Gajda Z**, Hermes E, Said Ali, Szente M. The role of electrical synapses in the maintenance of cortical seizure discharges and in the duration of ictal periods. 9th Annual Congress of the Hungarian Society for Neuroscience, 2003.
- VI. **Gajda Z**, Gyengési E, Presztóczki B, Hermes E, Said Ali, Szente M. Involvement of electrical synapses in the manifestation and duration of seizures. IBRO International Congress, 2003.
- VII. **Gajda Z**, Hermes E, Szente M. Expression levels of different connexin mRNAs and their induction by cortical seizure discharges in developing rats. IBRO International Workshop, Budapest, *Clinical Neuroscience* 57:20-21, 2004.
- VIII. **Gajda Z**, Presztóczki B, Ressinka J, Szente M. Selective blockade of neuronal gap junctions characteristically modifies cortical epileptiform activity in vivo. 4th FENS International Congress, *Program* p.209, 2004.
- IX. Szupera Z, **Gajda Z**, Szente M. Idegspecifikus Cx36 gap junction csatornák farmakológiai blokkolása csökkenti az epileptiform aktivitást patkányban. A Magyar Ideg- és Elmeorvosok Társaságának 34. Nagygyűlése, *Cephalalgia Hungarica*, 15:110, 2005.
- X. **Gajda Z**, Hermes E, Gyengési E, Szupera Z, Szente M. The functional significance of gap junction channels in the epileptogenicity and seizure susceptibility of juvenile rats. IBRO International Workshop, *Program* p.7. 2006.

TÁRSSZERZŐI LEMONDÓ NYILATKOZAT

Nyilatkozom, hogy a jelölt részvétele a Sente M, Gajda Z, Said Ali K, Hermes E. Involvement of electrical coupling in the *in vivo* ictal epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the neocortex. *Neuroscience* 2002; 115/4:1067-1078 közlemény alapját képező kísérletes munkában meghatározó, a jelölt az elektromos szinapszisok szerepét vizsgáló elektrofiziológiai és farmakológiai kísérleteket végezte .

Szeged, 2006. május 2.

Prof. Sente Magdolna
témavezető