Zselatinázok aktivitásának vizsgálata különböző epilepszia modellekben - Az MMP-9 lehetséges szerepe az aktivitás függő homeosztatikus plaszticitásban

Doktori értekezés

TAKÁCS ESZTER

Témavezetők:

Dr. Juhász Gábor
tudományos tanácsadó, D.Sc.

Dr. Czurkó András
tudományos főmunkatárs, PhD

ELTE, Biológiai Intézet, Proteomikai Laboratórium
ELTE, Biológia Doktori Iskola, Molekuláris Sejt- és Neurobiológia Program
Iskolavezető: Dr. Erdei Anna D.Sc.
Programvezető: Dr. Sass Miklós D.Sc.

2011

TARTALOMJEGYZÉK

ÁBRÁK JEGYZÉKE **4**

RÖVIDITÉSEK JEGYZÉKE **5**

BEVEZETÉS **6**

IRODALMI ÁTTEKINTÉS **8**

1. A Mátrix Metalloproteinázok (MMP-k) 8

1.1. Az MMP-kről általában 8

1.2. A zselatinázok (MMP-2, MMP-9) a központi idegrendszerben 9

1.2.1. A zselatinázok doménszerkezete 10

1.2.2. A zselatinázok szabályozása 11

1.2.2.1. Géntranszkripció és szignáltranszdukció 12

1.2.2.2. Poszttranszkripciós szint 13

1.2.2.3. Az enzim aktivációja 14

1.2.3. A zselatinázok szubsztrátjai a központi idegrendszerben 16

1.2.4. A zselatinázok funkciói a központi idegrendszerben 17

1.2.4.1. A zselatinázok funkciói a központi idegrendszer fiziológiás folyamataiban 18

1.2.4.2. A zselatinázok funkciói a központi idegrendszer patológiás folyamataiban 19

2. Plaszticitási folyamatok a központi idegrendszerben 20

2.1. Homeosztatikus plaszticitás – az idegi aktivitás stabilitásáért felelős mechanizmusok 20

2.1.1. Excitatórikus szinaptikus hangolás – 22

2.2. Epilepszia – az idegi plaszticitás patológiás esete 23

2.2.1. Szimptomatikus - krónikus epilepszia és a hátterében álló plaszticitási folyamatok 25

2.2.1.1. Epileptogenezis – a reaktív idegi plaszticitás aberráns formája 26

2.2.1.2. Az epileptogenezis hátterében álló mechanizmusok 26

2.2.1.3. A szimptomatikus - krónikus epilepszia modelljei 28

2.2.2. Akut epilepsziás rohamok a 4-AP modellben 29

2.2.2.1. A 4-AP-indukált akut epilepszia modell 30

2.2.2.2. A 4-AP hatásmechanizmusa 31

2.2.2.3. Sejtpusztulái mintázat a 4-AP modellben 32

2.2.2.4. Plaszticitási folyamatok a 4-AP modellben 33

2.2.3. A genetikai eredetű krónikus epilepszia a WAG/Rij patkánytörzsben 34

2.2.3.1. Thalamo-cortikális epilepszia a WAG/Rij patkánytörzsben 34

2.2.3.2. A WAG/Rij modell főbb jellemzői 35

3. A zselatinázok szerepe a fiziológiás és aberráns plaszticitási folyamatokban 37

3.1. A zselatinázok és a fiziológiás idegi plaszticitás 37

3.2. A zselatinázok és az epilepszia 40

3.2.1. Az MMP-9 szerepe a rohamokat követő sejtpusztulásban 41

3.2.2. Az MMP-9 szerepe a rohamokat követő aberráns szinaptikus plaszticitási folyamatokban 43

KÉRDÉSFELTEVÉS **45**

CÉLKITŰZÉSEK **46**

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK **47**
1. Kísérleti állatok és vegyszerek 47
2. Kísérleti csoportok 47
2.1. A zselatinázok enzimatikus aktivitásának változásai különböző agyterületeken a 4-AP modellben 47
2.2. Az MMP-2 és MMP-9 enzimatikus aktivitásának változásai az egyedfejlődés során és különbségei a felnőtt genetikailag epilepsziás WAG/Rij és az egészséges SPRD között. 48
2.3. Az MMP-9 enzimatikus aktivitás napi változása korrelál a WAG/Rij rohamgenezisével 48
3. 4-AP kezelés 49
4. Szövet disszekció 49
5. Elektroencefalográfia (EEG) 49
6. Viselkedési mintázat 50
7. MMP-9 és -2 kimutatása zselatin-zimográfiával 51
8. MMP-9 és -2 kimutatása in situ zimográfiával 52
9. Western blot analízis 52
10. Statisztikai analízis 53

EREDMÉNYEK **54**
1. 4-AP modell 54
1.1. A 4-AP kezelés hatására generalizálódó cortikális rohamok 54
1.2. Az MMP-2 és MMP-9 enzimatikus aktivitásának változásai különböző agyterületeken a 4-AP modellben 57
1.2.1. Gél-alapú zselatin zimográfia 57
1.2.2. Az MMP-9 kimutatása Western-blot analízissel 61
1.2.3. Sejtpusztulás hiányának ellenőrzése a 4-AP modellben és MMP-9 párhuzamos kimutatása in situ zimográfiával 62
2. WAG/Rij modell 64
2.1. EEG - tüske-hullám sorozatok WAG/Rij patkányokban 64
2.2. Az MMP-2 és MMP-9 enzimatikus aktivitásának változásai az egyedfejlődés során 64
2.3. Az MMP-2 és az MMP-9 enzimatikus aktivitásának különbsége az SPRD és a WAG/Rij törzsben 67
2.4. Az MMP-9 enzimatikus aktivitás napi változása a WAG/Rij rohamgenezisével párhuzamosan. 67

EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA **69**
1. Az MMP-9 enzimatikus aktivitása és a sejtpusztulás 70
2. A zselatináz szintek változásai az egyedfejlődés során 71
3. A pro-MMP-9 enzimatikus aktivitása emelkedett az epilepsziás WAG/Rij patkányok agyában 72
4. Az MMP-9 aktiváció és szintézis dinamikája 73
5. Az MMP-9 lehetséges homeosztatikus szerepe a sejtpusztulással nem járó epileptikus aktivitást követően 75

KONKLÚZIÓ **78**

ÖSSZEFOGLALÓ **80**

SUMMARY **81**

REFERENCIÁK LISTÁJA **82**

ÁBRÁK JEGYZÉKE

Bevezetés:

1 ábra Az MMP-9 fehérjeszerkezete és a zselatinázok doménösszetéte
2. ábra Az MMP-2 és -9 gének promóter régiói
3. ábra Az MMP-9 szintézisének és aktivációjának sematikus ábrája
4. ábra MMP targetek a szinapszisban
5. ábra Az MMP-k szerepe a szinapszisok aktivitás-függő átalakításában β-disztroglikán hasításán keresztül
6. ábra Az extracelluláris mátrix szerepe az epileptogenezisben (Dityatev, 2010 munkája alapján)

Eredmények:

I. ábra A 4-AP kezelés hatására generalizálódó cortikális rohamok. EEG felvételek és energia spektrum analízis a 4-AP kezelés után közvetlenül (t = 0), a kezelés után 6 illetve 24 órával
II. ábra A műtéti eljárás közvetlen hatása az MMP-9 aktivitására a frontális cortexben, a 4-AP alkalmazás helyétől távol
III. ábra Az MMP-9 enzimatikus aktivitása a 4-AP kezelt állatokban – parietális cortex és hippocampus
IV. ábra Az MMP-9 enzimatikus aktivitása a 4-AP kezelt állatokban – frontális cortex és thalamus
V. ábra Western blot analízis a parietális cortex mintáiból a 4-AP modellben
VI. ábra Sejtpusztulás hiányának ellenőrzése a 4-AP modellben és MMP-9 párhuzamos kimutatása in situ zimográfiával
VII. ábra Absence-típusú epilepszia a WAG/Rij törzsben
VIII. ábra A zselatinázok enzimatikus aktivitása WAG/Rij és SPRD patkányokban
IX. ábra Az MMP-9 enzimatikus aktivitás napi változása WAG/Rij-ban

RÖVIDITÉSEK JEGYZÉKE

MMP: Mátrix Metalloproteináz

TIMP: *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteases:* az MMP-k szöveti inhibitora

4-AP: 4-Aminopiridin

ECM: extracelluláris mátrix

EC: extracelluláris

IC: intracelluláris

SWD*: spike-wave discharge*: tüske-hullám kisülés

SE: *status epilepticus*

tPA*: tissue-type Plasminogen Activator*: szöveti plazminogén aktivátor

uPA: *urokinase-type Plasminogen Activato:* urokináz plazminogén aktivátor

Glu: glutaminsav

GABA*: Gamma-Amino Acid:* gamma-amino-vajsav

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*: mitogén aktivált protein kináz

ERK: *Extracellular-Regulated Kinase*: extracelluláris szignálok által regulált kináz

TEA: Tetraetilammónium

TGF*: Transforming Growth Factor:* transzformáló növekedési faktor

LRP: *Low-densityReceptor related Protein*

LTP :*Long Term Potentiation*: hosszútávú potencírozódás

CSD : *Cortical Spreadig Depression*:

BEVEZETÉS

A neurobiológia egyik legizgalmasabb témája manapság a központi idegrendszer plaszticitásának kérdése. Az idegrendszer a külső környezet változásaira (az ingerekre) illetve az idegrendszer patológiás hiperexcitációjára a szinaptikus jelátvitel plasztikus változásaival reagál. Az ún. szinaptikus homeosztázis mechanizmusai, mint például a szinaptikus hangolás, segítenek fenntartani a neuronok és hálózatok stabil működését akár az idegi működés zavarai esetén is. Ennek hiányában az excitáció és inhibíció közötti egyensúly instabillá válik, amely a központi idegrendszer hiperexcitabilitásához, hiperszinkronizált aktivitásához vezet. Az így bekövetkező molekuláris változások az agy patológiás reorganizációjához vezethetnek, ebben az esetben ún. aberráns plaszticitásról beszélünk. Néhány ilyen változás csak átmeneti, míg más esetekben a változás kiterjedt és hosszútávú következményekkel jár. Ez a mechanizmus feltehetően fontos szerepet játszik a krónikus epilepsziás állapotok kialakulásában. Annak megértése, hogy mi vezet az egyensúly felborulásához és a homeoszatikus plaszticitás „elszabadulásához", igen fontos a krónikus epilepsziák hátterében álló mechanizmusok megértése végett.

Szinaptikus lokalizációjuknak köszönhetően az utóbbi években jelentős figyelmet fordítanak a mátrix metalloproteinázok (MMP-k) családjába tartozó zselatinázok, legfőképpen az MMP-9 szinaptikus funkciókban, szinaptikus plaszticitásban betöltött szerepének. A mátrix metalloproteinázok ingerfüggő módon bontják illetve módosítják az extracelluláris mátrixot (ECM) alkotó és azokhoz kötődő fehérjéket. A mátrix-makromolekulák és az adhéziós rendszerek hasításán keresztül befolyásolják a sejtek közötti kapcsolatokat, a sejtek jelátviteli útvonalait, hasíthatják a különböző receptorokat, így módosítják működésüket. Ezzel egy proteolitikus, a protein expressziónál gyorsabb szabályozást tesznek lehetővé akár magában a szinaptikus szerkezetben is. Az MMP-9 feltehetően egy olyan pericelluláris hálót bontó degradome része, mely a szinapszis normális működésében fontos ECM molekulákat, növekedési faktorokat vagy membránfehérjéket hasít.

Az MMP-9 aktivitásának összességében fontos szerepet tulajdonítanak a szinaptikus plaszticitás jelenségeiben. Az MMP-9 indukcióját számos tanulási paradigmában, alvás megvonást vagy retinális fényadaptációt követő fiziológiás plaszticitási folyamatban is leírták. Ezzel párhuzamosan szerepüket feltételezték és bizonyították olyan aberráns szinaptikus plaszticitási folyamatokban is, mint a krónikus epilepsziás állapotokhoz vezető epileptogenezis. Már korán felismerték, hogy MMP aktiváció figyelhető meg szinte minden sejtpusztulással járó idegrendszeri folyamatban, miközben a szöveti újraszerveződés kapcsán is jelentős szerepet

tulajdonítottak az MMP–k működésének. A rohamok több epilepsziamodellben (kainát, pilokarpin, kindling) az MMP-9 indukciójához vezetnek már 6 órával az első roham megjelenését követően. A legtöbb szerző az MMP aktivációt a rohamokat követő neurodegenerációért és az aberráns plaszticitási folyamatokért teszi felelőssé. Ennek fényében több klinikai kísérlet is tesztelte az MMP inhibitorokat epilepsziás sejtpusztulás kezelésére, többnyire sikertelenül. Mivel a sejtpusztulás és az MMP aktiváció ok-okozati kapcsolatban feltétlenül nincsenek, felmerül a kérdés miért aktiválódik egy aspecifikus hasítási preferenciával rendelkező proteáz az agyban a rohamok alkalmával. Az sem világos, hogy az MMP-k indukcióját vajon olyan epileptikus roham is kiváltja-e, amely nem jár sejpusztulással, és krónikus, ismétlődő rohamok kialakulásához vezető aberráns plaszticitási folyamatokkal.

Előzetes adataink alapján az MMP aktiváció adaptív és regeneratív jellegű folyamatokban is részt vehet. Korábbi munkánkban sikerült kimutatni MMP-9 aktivációt a szemben fény hatására kialakuló reverzibilis retinopátiában illetve fényadaptációban. Ezen megfigyelések fényében feltételeztük, hogy az MMP-9 aktivációja nem kötődik szükségszerűen a sejtpusztuláshoz vagy az azt követő szöveti reorganizációhoz, hanem lehet egy gyors funkcionális, leginkább „homeosztatikus" molekuláris mechanizmus egyik eleme. Ezt az elképzelést alátámasztja az a tény is, hogy az MMP a szinapszisokban a szinaptikus plaszticitási és tanulási folyamatokban is aktiválódik. Az MMP-9 aktivációt kimutatták LTP-ben és a memóriai konszolidációt befolyásoló alvás deprivációs stresszben is.

Egyetértésben néhány újabb eredménnyel, úgy gondoljuk, hogy az agyi MMP aktivációnak többféle funkcionális szerepe is lehet, beleértve a neuronális aktivitás adaptív befolyásolását vagy a rohamokat követő esetleges „homeosztatikus" szinaptikus plaszticitásban való részvételét. A disszertációban összefoglalt munkáknak e feltevés részleges igazolása a fő célja. Olyan epilepszia modellekben vizsgáltuk a zselatinázok aktivációját, melyek nem járnak kiterjedt degenerációval, így a zselatináz indukció sejtpusztuláshoz és aberráns plaszticitáshoz köthető hatásait kizárhatjuk. Egy kémiailag indukált akut modellt és egy genetikailag epilepsziás krónikus modellt, a WAG/Rij patkánytörzset használtunk vizsgálatainkhoz. Azért, hogy még szélesebb képet kapjunk a zselatinázok aktivációs mintázatáról ezen modellekben, kísérleti csoportjaink kiválasztásához felhasználtuk azt a tényt, hogy az MMP-k a korai agyfejlődésben is szerepet játszanak és a WAGRij állatokban a rohamok csak később, 6 hónapos korban lesznek általánosan meghatározók.

Eredményeink új aspektusból világíthatják meg az MMP-9 szerepét a fiziológiás és aberráns plaszticitási folyamatokban, különös tekintettel az epilepsziában betöltött funkcióikra.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A Mátrix Metalloproteinázok (MMP-k)

1.1. Az MMP-kről általában

A mátrix metalloproteinázok (MMP-k vagy matrixinek) a metzincinek szupercsaládjába tartozó Zn^{2+}-függő endopeptidázok. Egyes MMP-k, endogén inhibitoraikkal (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMP-1-4) karöltve fontos szerepet játszanak a központi idegrendszer extracelluláris mátrixának szigorúan szabályozott lokális/fokális proteolízisében. Az enzimcsalád minden tagja extracelluláris, szekretált molekula, túlnyomórészt pericelluláris, néhány membránkötött formában van jelen. Indukciójuk, aktivációjuk és működésük számos szinten szabályozott. Igen széles szubsztrátspektrummal rendelkeznek, de viszonylag lokálisan hatnak (Chakraborti *et al.*, 2003; Dzwonek *et al.*, 2004).

Az MMP-k általánosan az extracelluláris mátrix turnoverében és degradációjában fontosak. Az utóbbi években számos nem-mátrix proteinről is kiderült hogy az MMP-k szubszrátjai közé tartoznak, úgy mint számos citokin, növekedési faktor vagy sejtfelszíni receptor (Parks *et al.*, 2004). Tehát az MMPk a sejt-sejt és sejt-mátrix signaling szabályozásának is fontos szereplői, elsősorban az inaktív pro-formában keletkező proteinek aktiválásán keresztül. (Parks, 1999; Vu & Werb, 2000; Page-McCaw *et al.*, 2007).

Szerepük elsősorban fiziológiásan, főleg a posztnatális fejlődésben ismert (embriogenezis, sejtmigráció, szöveti átrendeződés), a felnőtt szervezetben leginkább patológiás szerepükről tudunk többet (sebgyógyulás, gyulladási folyamatok, tumorgenezis, epilepszia, ischemia, agyi traumás esetek stb). Az MMP-k újabban felismert szerepei közé tartoznak: a sejtek közötti kapcsolatok modulálása; a sejt-maturáció, illetve sejt-migráció elősegítése; biológiailag aktív molekulák aktivitásának szabályozása - inaktív prekurzorok limitált proteolízis útján történő aktivációja, kötött formákból történő felszabadítás vagy inhibítorok aktivitásának módosítása révén (Vu & Werb, 2000; McCawley & Matrisian, 2001; Brinckerhoff & Matrisian, 2002; Jackson *et al.*).

Emlősökben jelenlegi állás szerint 25 mátrix metalloproteináz ismert, ebből 24 emberben is megtalálható, bár a számuk és a csoportosításuk publikációról publikációra változik (Vu & Werb, 2000; McCawley & Matrisian, 2001; Brinckerhoff & Matrisian, 2002; Jackson *et al.*). Az

enzim-családban a szubsztrát preferencia, evolúciós kapcsolatok és domén struktúra alapján a következő al-csoportok különíthetők el: *archetipikus MMP-k* (kollagenázok, sztromelizinek); *furin-aktivált MMP-k* („membrán-kötött"-MMPk és "szekretált" MMPk); a *matrilizinek* és a *zselatinázok* (IV-típusú kollagenázok) (Yong *et al.*, 1998; Vu & Werb, 2000; Ra & Parks, 2007; Fanjul-Fernández M, 2010; Jackson *et al.*, 2010).

1.2. A zselatinázok (MMP-2, MMP-9) a központi idegrendszerben

A különböző MMP-k közül mindössze néhány fordul elő a felnőtt idegrendszerben és ezek is viszonylag alacsony szinten expresszálódnak. A leggyakrabban vizsgált metalloproteázok az agyban a zselatinázok, az MMP-2 (Zselatináz-A) illetve -9 (Zselatináz-B) (Birkedal-Hansen et al., 1993; Chakraborti et al., 2003; Dzwonek et al., 2004; Nagase and Woessner, Jr., 1999; Sternlicht and Werb, 2001; Van den Steen et al., 2002). Ennek oka valószínűleg az, hogy mivel mindkét enzim képes emészteni a denaturált IV. típusú kollagént, vagy más néven zselatint, viszonylag könnyen detektálhatók és mérhetők mind gél-alapú, mind *in situ* zimográfiával (Dzwonek *et al.*, 2004). A felnőtt emberi agyban mind az egészséges gliában mind a neuronokban kimutatták aktivitásukat (Cuzner *et al.*, 1996; Anthony *et al.*, 1998). A rágcsálók központi idegrendszerében szintén fellelhetőek, eloszlásuk az egyes területektől és sejtípusoktól függően változik (Dzwonek *et al.*, 2004).

A zselatinázok az ECM molekuláinak széles spektrumát bontják/módosítják, úgy az adhéziós és signaling molekulákat (Gall and Lynch, 2004; Kaczmarek *et al*., 2002; Michaluk *et al*., 2007a; Wang *et al*., 2008; Yamada *et al.*, 2001; Yong *et al.*, 1998), mint a neurotranszmitter receptorokat (Michaluk *et al.*, 2009) vagy a sejtközötti térben található növekedési faktorokat (Nagase and Woessner, Jr., 1999; Page-McCaw et al., 2007). Széles szubsztrátspecificitásuk arra enged következtetni, hogy a zselatinázok a sejtfunkciók egész sorában vesznek részt, sejttípustól függően (Szklarczyk *et al.*, 2002). Felnőttkorban, a zselatinázok alapszintű expressziója agyterületenként és sejttípusonként is változik: úgy tűnik, a legmagasabb a hippocampusban, a legalacsonyabb pedig a kisagy területén (Kaczmarek *et al.*, 2002; Dzwonek *et al.*, 2004).

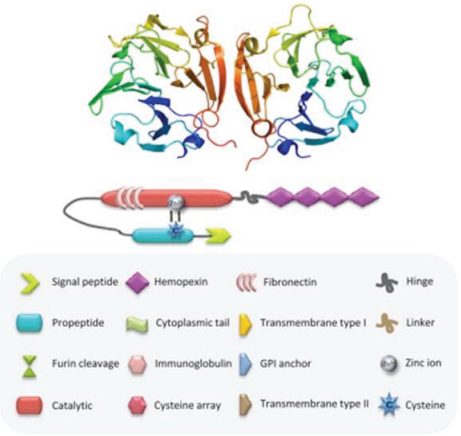
Az MMP-2 (vagy zselatináz A) az agyszövet konstitutívan expresszálódó 72 kDa-os molekulája, szintje minden területen tízszerese a zselatináz B szintjének (Zhang et al., 1998). Az MMP-2 mRNS-ét, a proteint és enzimatikus aktivitását is kimutatták számos agyi struktúrából, ahol leginkább asztrogliális eredetűnek mutatkozott. Egészséges patkányban a kamra falához, a piális felszínhez és az erekhez közeli asztrocitákban lokalizálták (Rosenberg *et al.,* 2002). *In*

vitro kísérletek expressziójukat kimutatták mikrogliában és oligodendrocitákban, sőt neuronokban is (cortex és a kisagyi Purkinje-sejtek).

A 92 kDa-os MMP-9 (vagy zselatináz B – **1. ábra**) normálisan csak viszonylag alacsony szinten expresszálódik a felnőtt központi idegrendszerben. A cortex területén ugyan konstitutívnak tekinthető, de alapvetően indukálható forma (Rosenberg, 2002b; Szklarczyk *et al.*, 2002). Előfordulása főleg a kisagyi, hippocampális és cortikális neuronok sejttestjeiben és dendritjeiben jellemző, expressziója kisebb mértékben asztrocitákban és mikrogliában is kimutatható. (Backstrom *et al.*, 1996; Vaillant *et al.*, 1999; Szklarczyk *et al.*, 2002; Jourquin *et al.*, 2003). A továbbiakban főleg ez utóbbi zselatinázra, a témám szempontjából fontosabb MMP-9-re fogok koncentrálni, kisebb kitérésekkel az MMP-2-re.

1.2.1. A zselatinázok doménszerkezete

Az MMP-gének rendkívül konzervatívak, ez is utal fontos biológiai funkciójukra. Az általunk vizsgált enzim, az MMP-9 fehérjeszerkezetét és doménösszetételét az **1. ábra** mutatja. Az MMPk multi-domén proteinek, amelyek általában egy *szignálszekvenciából*, egy *propeptidből* (ez tartja inaktív állapotban az enzimet), egy *katalitikus doménből* és egy *C-terminális hemopoexin-szerű doménből* (ez adja a szubsztrátspecificitást) épülnek fel (Ra & Parks, 2007; Vincenti & Brinckerhoff, 2007). Az MMP-2 és MMP-9, a két zselatináz aktivitású metalloproteináz esetén a katalitikus doménbe egy háromszorosan ismétlődő, II-es típusú *fibronektin domén* ékelődik, amely lehetővé teszi a kollagénnel valamint a zselatinnal történő kapcsolódást (Gomis-Ruth, 2009). Az MMP-9-ben, a pro-peptid és aktív-enzim N-terminális részein, *N*-glikozilációs helyek találhatók (Nagase & Woessner, 1999; Van den Steen *et al.*, 2002). Ezen glikozilációs állapotoknak a funkcionális jelentősége *in vivo* pontosan nem ismert, de *in vitro* kísérletekben bizonyított, hogy a glikoziláció befolyásolhatja az enzim-aktivitást és szubsztrát affinitást.

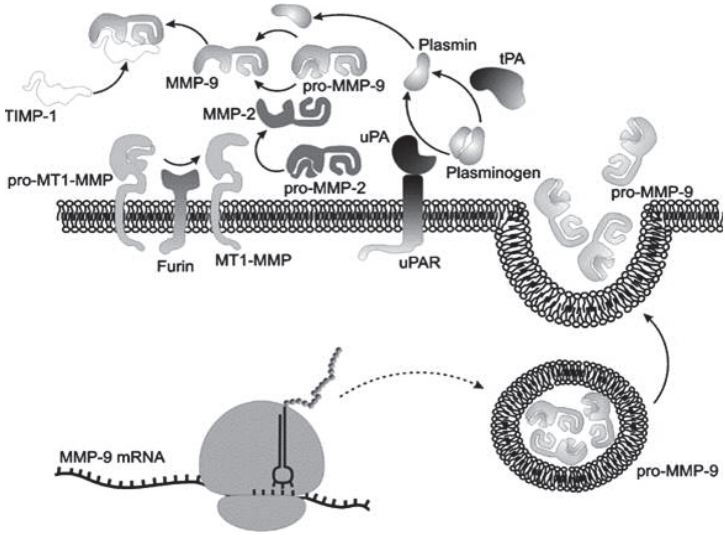


1.ábra Az MMP-9 fehérjeszerkezete és a zselatinázok doménösszetétele (Fanjul Fernandez,2010 után).

1.2.2. A zselatinázok szabályozása

Az MMP-k szerepe szerteágazó a különböző fiziológiás és patológiás folyamatokban (Burrage *et al.*, 2007; Vincenti & Brinckerhoff, 2007), a különböző MMP-k túlzott expressziója illetve aktivitása szöveti destrukcióhoz, degenerációhoz vezet különböző patológiás folyamatokat idézve elő. Mindez valószínűsíti, hogy az MMP-k működésének szigorú szabályozása elengedhetetlen a normális szöveti homeosztázis fenntartásában (Chakraborti *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2008). Az MMP-k regulációjának és szöveti homeosztázisban betöltött szerepének megértése tehát kulcsfontosságú a terápiás megoldások szempontjából is.

Ahogy minden szekretált proteináz a zselatinázok katalitikus aktivitása is több szinten befolyásolt: Az MMP-k produkciója transzkripciós szinten szigorúan szabályozott térben és időben jól meghatározott specifikus szignálok által (növekedési faktorok, citokinek, kemokinek), a posztranszkripciós reguláció (kompartmentalizáció, proenzim aktiváció, enzim inaktiváció,



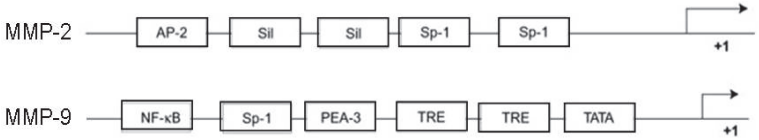
2. ábra Az MMP-9 szintézisének és aktivációjának sematikus ábrája (forrás: Michaluk 2007). A dendritek felé transzlokálódott MMP-9 mRNS helyben transzlálódik és a fehérje szekréciós vezikulákba kerül. A proMMP-9 a sejten kívülre szabadul fel, ahol számos proteolitikus lépésen keresztül aktiválódik. Az aktív forma gyorsan inaktivált állapotba kerülhet a TIMP-1 segítségével.TIMP-1, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1; MMP, matrix metalloproteinase; MT, membrane type; tPA, tissue type plasminogen activator; uPA, urokinase type plasminogen activator; uPAR, uPAR receptor

stb.) ezt módosítja speciális esetekben. A szubsztrát elérhetősége és az enzim szubsztrátaffinitása is fontos faktor a normális enziműködés szempontjából (Ra & Parks, 2007). A zselatinázok szintézisének és aktivációjának sematikus ábrázolását a **2. ábra** mutatja.

1.2.2.1. Géntranszkripció és szignáltranszdukció

Az MMP gének expressziója elsődlegesen transzkripciós szinten meghatározott, ami általában alacsony enzim szinteket eredményez egészséges szövetben. Az enzimszint átmeneti, csúcsszerű növekedését lehet megfigyelni normális szövetben a mátrix átépülése esetén, mint például sebgyógyulás vagy ovuláció esetén (Brinckerhoff & Matrisian, 2002). Ezek a burst-szerű enzimszint növekedések jól mutatják a szigorú szabályozásukat egészséges szövetekben, a homeosztázisban betöltött alapvető szerepüket és magyarázzák a patológiás folyamatokat, melyek expresszió-szabályozásuk zavarából következnek.

3.ábra Az MMP-2 és -9 gének promóter régiói (forrás:Rosenberg, 2002)



A legtöbb MMP azonos cis-elemeket tartalmaz a promoter régiójában, amely lehetővé teszi a szövetspecifikus szigorú szabályozást. Az MMP-k gyakran koexpresszáltak összetett stimulusok hatására. A transzkripciós válasz a stimulustól számítva órák múlva jelentkezik, ami bizonyíték arra, hogy az MMP gének feltehetően a stimulusra azonnal reagáló korai válasz gének downstream targetjei. A korai válasz gének olyan signaling fehérjéket (intermediereket) kódolnak, melyek transzkripciós faktorokat foszforilálnak, majd ezután az MMP génekhez kötnek. Ezek az intermedierek az MMP-k esetében leggyakrabban az NFκB, a mitogen aktiválta protein kinázok (MAPK), a STAT és a Smad proteinek (Chakraborti *et al.*, 2003). Az intermedierek olyan róluk elnevezett signaling útak részei, melyeket számos különböző stimulus aktivál. Ma már számos faktort ismerünk, ami részt vesz/vehet az MMP-k indukciójában. A két legfontosabb talán a növekedési faktorok (pl.: TNF-β, BDNF) és a citokinek csoportja (pl.:IL-1β, TNF-α), de a kémiai ágensek (pl.: phorbol-észterek), a fizikai stressz (pl.: UVB sugárzás, citoszkeleton átrendeződés) vagy az onkogenetikus transzformáció hatása sem elhanyagolható (Tallant *et al.*, 2010). Az indukción felül természetesen léteznek ún. down-reguláló faktorok,

melyek elnyomják a megnövekedett MMP expresszióját, ezek közé tartoznak a TGF (Transforming Growth Factor), egyes retinsavak és glükokortikoidok vagy pl. az interferon (Vincenti & Brinckerhoff, 2007). Az utóbbi időben egyre nyilvánvalóbb, hogy nem csak a szolubilis faktorok, de a sejt-sejt és a sejt-mátrix interakciók is meghatározói az MMP génexpressziónak.

Az MMP-9 gén promoter régiója az un TATA-box és AP-1 helyet is tartalmazza (**3. ábra**), amelyhez a Fos és a Jun családba tartozó transzkripciós faktorok kötnek (AP-1, NF-κB). Az MMP-9 bazális kifejeződése erősen sejt-függő (Vincenti & Brinckerhoff, 2007), konstitutív transzkripcióját kevés esetben írták le, de expressziója indukálható (Van den Steen et al. 2002). Az MMP-2 ezzel szemben sem TATA-box, sem AP-1 régiót nem tartalmaz, így expressziója feltehetően konstitutív, általános expressziós szintje aránylag kevéssé változik növekedési faktorok vagy citokinek hatására (Benbow & Brinckerhoff, 1997), bár növekedett expresszióját számos betegségben leírták (Barrett & Spelsberg, 1998). Ez a konstitutív MMP-2 expresszió feltehetően az ECM folyamatos és jól kontrollált remodelingjét biztosítja.

1.2.2.2. Poszttranszkripciós szint

Bizonyíték van az MMP-2, -3 és a kollagenázok esetében is arra, hogy a citokinek és növekedési faktorok befolyásolhatják az mRNS stabilitását (Kaczmarek *et al.*, 2002; Vincenti & Brinckerhoff, 2007; Clark *et al.*, 2008; Fanjul-Fernández M, 2010). Ezért a szabályozásért a NO-szintet teszik felelőssé (Sternlicht & Werb, 2001). Egy másik érdekes jelenség az MMP mRNS-ének neuronális aktivitás-függő transzlokációja az aktív dendritekhez (Akool el *et al.*, 2003), amit az mRNS-en található ún. A2RE-szekvencia tesz lehetővé (Szklarczyk *et al.*, 2002). Ez felveti a protein-szintézis szinapszis-specifikus kontrolljának lehetőségét, ami fontos lehet a tanulás mechanizmusának megértése szempontjából.

A szintetizált pre-pro-MMP a sejttest és/vagy a dendritek endoplazmatikus retikulumába (ER) kerül, ahol a szignálpeptid lehasítása után a propeptid konzervált ciszteinje a katalitikus domén Zn^{2+}-atomjához köt, így tartja az enzim aktivitást „kikapcsolva", ez az állapot a pro-MMP forma. További ER-ban történő módosítást jelenthet még a pro-forma glikozilációja is (Shan *et al.*, 2003) vagy homo-dimerizációja. A fehérje ezután vezikulákban transzportálódik az extracelluláris térbe, még inaktív formában. A pro-enzim felszabadulása az indukciót követő 2-6 órával történik (Szklarzcyk *et al*., 2002). Vezikuláris szekréció útján csak a glikozilált, inaktív, pro-formák (zimogének) kerülnek ki az extracelluláris térbe (Kotra *et al.*, 2002).

Számos *in vitro* tanulmány bizonyítja, hogy az MMP-k szubsztrátjai között jelentős átfedések vannak, amely biokémiai redundanciához vezet (Olson *et al.*, 2000). A szubsztrát szelektivitás *in vivo* feltehetően kétféle módon szabályozott, egyrészt az enzim szubsztrát kötő affinitásán keresztül, másrészt a kompartmentalizáció által. Egy szöveti környezetben, amely számos potenciális szubsztrátot tartalmaz, az MMP katalízis szelektivitását, az aktív enzim koncentrációján túl, a preferált szubsztrát más potenciális szubsztrátokhoz viszonyított koncentrációja határozza meg (Sternlicht & Werb, 2001). A kompartmentalizáció, amely meghatározza az MMP-k felszabadulását, tárolását, lokalizációját, szintén fontos a proteolízis specificitásának és az enzim-szubsztrát interakciók irányításának szempontjából. Feltehetően a szekretált MMP-k egy kompartment-specifikus lokalizációs mechanizmust igényelnek a normális működéshez. Az MMP-k sejtmembránhoz történő horgonyzása nagy lokális enzim koncentrációt és ezáltal egy célzottabb proteolízist tesz lehetővé az extracelluláris térben. A membrán-horgonyon kívül előfordul más MMP-sejt kapcsolat is, mint például az MMP-2 esetén az MMP-integrin kapcsolat (Ra & Parks, 2007). A sejtmembránhoz történő horgonyzás lehetővé teszi a zymogén allosztérikus aktivációját is a cys-switch mechanizmus elősegítése által (lásd következő fejezet). Tehát a horgony nem csak elősegíti a viszonylag specifikus enzim-szubsztrát létrejöttét, hanem szubsztrát kötése esetén az enzim aktivációját is favorizálja.

1.2.2.3. Az enzim aktivációja

A pro-forma aktivációja kaszkád-folyamat. Számos reguláló faktor jut szerephez ebben a meglehetősen összetett rendszerben, amely lehetővé teszi az MMP-k igen pontos szabályozását térben és időben. Az enzim pro-formát katalitikusan inkatív formában tartja a thiol (a prodomén cystein maradéka) és a katalitikus domén Zn^{2+} ionja közötti kapcsolat. Az aktív enzim (az össz-enzimkoncentráció kb 1%-a) a cisztein-Zn^{2+} kapcsolat megszüntetésével („cystein-switch" vagy cystein-kapcsoló mechanizmus) és a pro-peptid lehasításával keletkezik feltehetően egy intermedier formán keresztül, ami ezután autokatalízissel nyeri el végső aktivitását (Brooks *et al.*, 1996; Nagase & Woessner, 1999). Fontos megjegyezni, hogy a prodomén lehasítása nem előfeltétele a zymogén aktivitásának, ahhoz a thiol-Zn^{2+} kapcsolat megszakítása kizárólagosan elegendő. A legjobb bizonyítéka ennek a zselatinázok detektálására használt zimográfia, ahol az SDS a nagyobb molekulatömegű proformát is aktiválja, habár ez az aktiváció egy mesterséges módja. *In vivo,* az aktiváció utolsó lépése feltehetően a prodomén lehasadása.

Egyes szerin proteázokat, ezek közül kiemelten a plazmint és az általa hasított fibrint az MMP-k fontos *in vivo* aktivátorainak tartják (Van Wart HE, 1990; Carmeliet *et al.*, 1997). A tPA

(tissue-plasminogen activator) közvetlenül vagy közvetetten a plazmin aktiválásán keresztül is hathat az MMP-k aktivitására (Creemers *et al.*, 2000; Chakraborti *et al.*, 2003). A prodomén hasítást elvégezheti más MMP (Ra & Parks, 2007), az azonban nem tisztázott, hogy az „aktiváló MMP-k" ko-expresszáltak vagy ko-lokalizáltak a szubsztrát MMP-kkel (Nagase & Woessner, 1999; Kaczmarek *et al.*, 2002). A pro-MMP-9-et hasítja az aktív MMP-3, melynek aktivitására ugyancsak hathat a plazmin vagy akár a plazmin aktiválta MMP-1 is (Ra & Parks, 2007). Az MMP-9 propeptid lehasítását végezheti ezen kívül az MMP-2, amely legtöbbször a gliából szabadul fel, ezen proteáz aktivitását az ún. MT(membrane-type)-MMP/TIMP-2 komplex szabályozza (Imai *et al.*, 1995; Dzwonek *et al.*, 2004). Különböző leukociták és egyéb sejtek által felszabadított szabad gyökök szintén aktiválhatják (illetve inaktiválhatják) az MMP-ket a prodomén thioljának oxidációján keresztül. *In vivo* kevés a bizonyíték az aktiváció ezen módjára, az egyik ilyen eset az ischemiás agyban a proMMP-9 aktivációja NO-dal történő S-nitrozilációval (Itoh *et al.*, 2001).

1.2.2.4. Az aktív MMP-k modifikációja, gátlása és lebontása

Az MMP-ket aktiválásukat követően is érheti modifikációs hasítás: egyes enzimek teljesen inaktiválják, míg mások, például a hemopexin domén specifikus eltávolításával olyan „megcsonkított" enzimeket hoznak létre, melyek elvesztik képességüket egy-egy szubsztrát hasítására, de aktívak maradnak és más szubsztrátokat továbbra is megtartanak (Gu *et al.*, 2002). Az aktív MMP-ket érő proteolízis befolyásolhatja például gátolhatóságukat vagy akár kapcsolatukat a sejtmembránnal.

Az enzim aktivitásának legfontosabb regulátorai az MMP-k endogén inhibítorai, a TIMP-ek (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases). Négyféle TIMP molekuláról tudunk (TIMP-1,-2,-3,-4) (Nagase & Woessner, 1999) s ezek mindegyike expresszálódik a nem stimulált agyban. Kis molekulatömegű (20-30 kDa-os) fehérjékről van szó, melyek 1:1-es nem kovalens kötéseket hozhatnak létre az aktív MMP-kkel. Kapcsolódnak az enzim molekula aktív helyéhez és a C-terminális hemopexin-szerű doménhez, így formálva olyan komplexet, ami megakadályozza az akív MMP-k működését. Transzkripciójuk szabályozásában az MMP-gének kifejeződését is irányító AP-1 transzkripciós faktor is részt vesz. Szelektivitásuk az egyes MMP-kre nézve igen alacsony (Nagase & Woessner, 1999; Brew *et al.*, 2000; Stetler-Stevenson & Seo; Murphy & Nagase, 2008; Tallant *et al.*, 2010). Témánk szempontjából a legfontosabb a TIMP-1 (cortex, hippocampus, kisagy neuronjai), mely elsősorban az MMP-9 működését regulálja. Az extracelluláris mátrix átépülésekor az MMP-9 szintje mellett a TIMP-1 szint is megemelkedik,

megakadályozva ezzel az MMP-k túlműködését. Az MMP inhibítorok alkalmazása ischemiát követően csökkenti a kialakuló ödéma mértékét és megakadályozza a további szöveti károsodást, amely tüneteket többek között az oxigén-hiányos állapot hatására megnövekedett MMP-szint okoz (Dzwonek *et al*., 2004). Az MMP-k nem specifikus inhibítora az α2-makroglobulin, amely tőrbe csalja az arra érzékeny enzimeket, miután azok elhasították az ún 'csalétek' régióját. Ez a makroglobulin/MMP komplex ezután endocitózisra kerül és megemésztődik. (Chakraborti *et al*., 2003)

Az MMP-9 példájánál maradva, az aktív enzim internalizálódását és degradációját az LRP (low-density receptor related protein), mint az MMP-9 receptora mediálja (Tallant *et al.*, 2010). Az LRP hathat a géntranszkripcióra is az AP-1 transzkripciós faktoron keresztül. A már említett tPA-t kötve az LRP-hez ilyen módon plasmin-független úton is szabályozza az MMP-9 indukcióját.

Alábbi megfigyelések alapján úgy tűnik, hogy az MMP-k produkciója, aktivációja és inhibíciója között olyan egyensúly áll fenn, amely elengedhetetlen a sejt homeosztázisának fenntartása szempontjából. Ezen egyensúly megbomlása esetén a károsodott és kontrollálatlan proteolízis komoly patológiás folyamatokhoz vezethet, ahogy ezt megfigyelték a rák, az arthritis, az atherosclerosis vagy az Alzheimer-kór esetében is (Hahn-Dantona *et al.*, 2001; Rosenberg, 2002b).

1.2.3. A zselatinázok szubsztrátjai a központi idegrendszerben

Mint az MMP-k általában, a zselatinázok is sokféle extracelluláris mátrix makromolekulát hasítanak, részben átfedő szubsztrát preferenciával. Az MMP-k *in vitro* szubsztrátjai igen sokfélék, az *in vivo* targetekről viszont annál kevesebbet tudunk (Sternlicht & Werb, 2001). Sokáig úgy gondolták, hogy az MMP-9 és -2 szubsztrátjai nagyjából közösek, azonban nemrégiben kiderült a két fehérje degradómját összehasonlítva, hogy jelentős különbség van a két enzim szubsztrátspecificitása között: azonos körülmények között, az MMP-2 201 szubsztrátot bont, míg az MMP-9 csak 19-et (Woessner, 1999). Szubsztrátspecificitásuk viszonylag alacsony, amelyet aktivitásuk időbeli és térbeli szigorú szabályozása ellensúlyoz *(„hic et nunc activity" Dzwonek et al. 2004)* – lásd az MMP-k szabályozásáról szóló előző fejezetet. Az enzimcsalád legismertebb molekuláris partnerei ECM-proteinek, többek között számos kollagén, elasztin, fibronektin, aggrekán és laminin (Nagase & Woessner, 1999; Overall,

2002; Prudova *et al.*, 2010). A zselatinázok szubsztrátjai közé sorolnak egyes adhéziós (integrinek, cadherinek) illetve extracelluláris signaling molekulákat melyeket normál és patológiás esetekben is leírtak (Sternlicht & Werb, 2001; Kaczmarek *et al.*, 2002; Dzwonek *et al.*, 2004; Gall & Lynch, 2004). Ma már az is köztudott hogy számos növekedési faktor, mint például a TGF-β (Michaluk *et al.*, 2007; Page-McCaw *et al.*, 2007), illetve citokin, mint például a pro IL-1β (Yu & Stamenkovic, 2000) hasításában is részt vesznek. A legutóbbi években egyes neurotranszmitter receptorok módosításában is feltételezik a szerepét (McQuibban *et al.*, 2002). Speciálisan a felnőtt idegrendszerben előforduló MMP-szubsztrátokra koncentrálva, már sokkal bonyolultabb a helyzet, ugyanis sejtjeinek extracelluláris mátrixa nem tartalmazza a klasszikus ECM proteineket és az idegszövetben alaphártya sem fordul elő (Dzwonek *et al.*, 2004; Michaluk *et al.*, 2009). A konstitutívan és legtöbb agyterületen expresszálódó MMP-2 feltehetően főleg az extracelluláris mátrix fiziológiai turnover-ében vesz részt. Az indukálható MMP-9 *in vivo* szubsztrátjainak felderítésére közben több figyelem fordult.

A központi idegrendszerben eddig bizonyítást nyert MMP-9 szubsztrátok közül csak néhányat emelnék itt ki, amelyekről még a következő, az MMP-k funkcióit tárgyaló fejezetben részletesebben is szó lesz: a fehérállomány mielin felépítésében szerepet játszó mielin (myelin basic protein, MBP), a vér-agy gát integritásáért felelős zonae occludens-1 (ZO-1) (Sugita *et al.*, 2001) az Alzheimer-kór hátterében álló β-amyloid protein (Asahi *et al.*, 2001); valamint a tanulási kísérletekben felfedezett posztszinaptikus elhelyezkedésű β-disztroglikán, egyes integrinek, az asztrociták által felszabadított TNF-α és végül, de nem utolsó sorban az NMDA receptor (Backstrom *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 2001; Kaczmarek *et al.*, 2002; Michaluk *et al.*, 2007).

1.2.4. A zselatinázok funkciói a központi idegrendszerben

Az extracelluláris mátrix dinamikus, helyben és időben szabályozott lebontása alapvető fontosságú a szöveti átrendeződésben az ontogenezis folyamán, illetve élettani és patológiás körülmények között egyaránt. Az ECM egyes molekulái a sejt-sejt és sejt-mátrix kapcsolatok kialakításában vesznek részt; sejtfelszínhez kötött vagy szolubilis proteázai a pericelluláris proteolízis révén a sejtek alakváltoztatását és migrációját teszik lehetővé, míg a mátrix makromolekulák által megkötött növekedési faktorok, citokinek, stb. proteolitikus felszabadítása útján a sejtek túlélésében vagy pusztulásában, gyulladásos folyamatok kiváltásában, stb. játszanak egyre jobban körvonalazott szerepet.

1.2.4.1. A zselatinázok funkciói a központi idegrendszer fiziológiás folyamataiban

A korai elképzelés szerint az MMP-k az ECM „takarítómunkásai" voltak, strukturális alapozást végezve a szöveti átépüléshez. Ma már azonban tudjuk, hogy funkciójuk ennél jóval kiterjedtebb, mind fiziológiás, mind patológiás körülmények között. A mátrix metalloproteinázok képessége, hogy befolyásolják a sejtek működését, differenciációját, morfológiáját vagy akár a túlélését is az extracelluláris mátrix hangolása által, arra enged következtetni, hogy fontos szerepet töltenek be a különböző szövetek normális működésében, a homeosztázis fenntartásában, a zselatinázok is ebbe a csoportba tartoznak (Michaluk *et al.*, 2009).

Az MMP-k expresszálódnak a fejlődő központi idegrendszerben, ahol széleskörű előfordulásuk és eloszlásuk arra utal, hogy számos fejlődési folyamatban vesznek részt (Ra & Parks, 2007). Az egyedfejlődés során az MMP-9 expressziója pontos időbeni szekvenciát követ különböző szövetekben, mely összefüggést mutat a sejtek migrációjával, maturációjával, a mielinizáció folyamatával és a kiterjedt morfológiai átrendeződéssel általában (Yong *et al.*, 1998). Az MMP-k felszabadulva a növekedési kúpból elősegítik az axonok növekedését is, azáltal, hogy kommunikálnak a növekedést szabályozó szignalizációs útvonalakkal - a ligandumok vagy akár a receptorok módosításán keresztül - aktiválva, vagy elnyomva azt (Vaillant *et al.*, 1999). A növekvő axonok növekedési kúpja rengeteg MMP-2-t expresszál és szekretál a környezetébe, amely segíti a neurit növekedését azáltal, hogy inaktiválja a növekedést amúgy gátló kondroitin-szulfát proteoglikánokat. A mátrix degradációja által a zselatinázok támogatják a sejtmigrációt, így működésük ebből a szempontból is lényeges az embriogenezis és az egyedfejlődés folyamataiban.

Felnőtt idegrendszerben a zselatinázok, elsősorban a konstitutívan expresszálódó MMP-2, részt vesznek az ECM molekulák (például a kollagén és a proteoglikánok) illetve a mielin normális turnoverében, a szövetek átépülésében (remodeling), igy különböző regenerációs folyamatokban, sebgyógyulásban, hegszövetképzésben is. A zselatinázok ún. fibronektin-kötő helyet tartalmaznak, ami lehetővé teszi többek között, hogy kapcsolatot teremtsenek az alaphártya makromolekuláival. A zselatinázok valószínűleg fontosak a gliatalpacskák normális működésében, így fontos szerepük lehet az agy folyadék-egyensúlyában, a vér-agy gát szabályozásában és az angiogenezisben (McFarlane, 2003). Ezen folyamatok és a zselatinázok aktivitás szabályozásának zavara igen fontosak bizonyos később említésre kerülő patológiás folyamatokban.

Az MMP-9 a szinapszis normális működésében fontos ECM molekulákat, növekedési faktorokat vagy membránproteineket is hasít (Overall, 2002; Rosenberg, 2002b), így az utóbbi években jelentős figyelmet fordítanak az MMP-9 szinaptikus plaszticitásban betöltött szerepének. Az MMP-9 indukcióját számos tanulási paradigmában (Sternlicht & Werb, 2001; Meighan *et al.*, 2006; Nagy *et al.*, 2006; Bozdagi *et al.*, 2007; Meighan *et al.*, 2007), alvás megvonást (Wright *et al.*, 2003) vagy retinális fényadaptációt (Taishi *et al.*, 2001) követő plaszticitási folyamatokban is leírták. Az MMP-9 aktivitásának fontos szerepet tulajdonítanak a szinaptikus plaszticitás jelenségében (Wright *et al.*, 2003; Meighan *et al.*, 2006; Nagy *et al.*, 2006), amely funkcióról később részletesebben is értekezem.

1.2.4.2. A zselatinázok funkciói a központi idegrendszer patológiás folyamataiban

A zselatinázok számos esetben nem expresszálódnak egészséges szövetben, addig amíg bizonyos patológiás folyamatok nem indukálják a gén átírását a beteg vagy gyulladt szövetben. A legtöbb MMP-9 szerepéről szóló kutatás a központi idegrendszerben a sejtpusztulással hozza összefüggésbe a megnövekedett enzimaktivitást. A celluláris stressz indukálja az MMP-9-et, melynek a glutamáterg excitotoxicitásban, a sejtpusztulásban, és a szöveti struktúra masszív elváltozásában tulajdonítottak negatív szerepet. Ezekben a patológiás modellekben az MMP-9 indukcióját nemcsak a neuronokban, hanem reaktív mikrogliákban és asztrogliákban is kimutatták (Rosenberg *et al*., 2002)

A zselatinázok expressziója fokozódik a központi idegrendszer *tumoros* elváltozásai (Bodey *et al.*, 2001; Papp *et al.*, 2007), gyulladás (Rosenberg *et al.,* 2002), ischemia (Planas *et al.*, 2001; Egeblad & Werb, 2002; Rivera *et al.*, 2002), agyi trauma (Rosenberg *et al.*, 1996) esetén is. Megemelkedett MMP szinteket tapasztaltak neurodegeneratív betegségekben, mint például az Alzheimer kór (Backstrom *et al.*, 1996; Vilalta *et al.*, 2008) esetében.

Az elmúlt években számos publikáció foglalkozott a zselatinázok lehetséges szerepeiről a patológiás fokozott idegi aktivitással és az ahhoz köthető aberráns plaszticitási folyamatokkal kapcsolatban is. Az utóbbi időben az epilepszia különböző krónikus modelljében is (Szklarczyk *et al.*, 2002; Jourquin *et al.*, 2003; Inspector *et al.*, 2005; Konopacki *et al.*, 2007) kimutatták az MMP-9 szintjének változását a rohamokat követően igen hamar. Feltételezhető, hogy a zselatinázok, elsősorban az MMP-9, jelentős szerepet töltenek be a rohamokat követő sejtpusztulásban, szöveti átrendeződésben és általánosságban a patológiás idegi aktivitást követő plaszticitási folyamatokban is, melyek krónikus epilepsziás állapot kialakulásához vezetnek.

A fiziológiás plaszticitási folyamatokban, a tanulásban és adaptációs folyamatokban leírt szerepük azonban arra enged következtetni, hogy epilepsziához köthető plaszticitási folyamatokban a zselatinázok egy másik szerepet is betölthetnek: működésük szintén fontos lehet a túlzott idegi aktivitást még kompenzálni képes homeoszatikus plaszticitási folyamatokban. Dolgozatom később bemutatásra kerülő saját eredményei is erre utalnak.

2. Plaszticitási folyamatok a központi idegrendszerben

2.1. Homeosztatikus plaszticitás – az idegi aktivitás stabilitásáért felelős mechanizmusok

Az idegrendszeri plasztictás a központi idegrendszer hálózatainak illetve szinapszisainak képessége, hogy a válaszerősséget szabályozza az idegi aktivitás függvényében (Hughes, 1958). A neuronális plaszticitás jelentheti a már létező szinapszisok hatékonyságának és/vagy a szinapszisok számának változását. Számos mechanizmus ismert a szinaptikus plaszticitás hátterében, beleértve a neurotranszmitter felszabadulást és a neurotranszmitter receptorok összetételének és felszíni-koncentrációjának változásait. Jelenlegi tudásunk szerint a hosszútávú memórianyomok is ilyen molekuláris átrendeződések eredményeként alakulnak ki, a tanulás folyamatának hátterében szinaptikus plaszticitási folyamatok állnak.

A neuronok válaszának flexibilitása a környezeti behatásokra csak egy idegrendszeri homeosztázis hátterén jöhet létre. Az idegrendszeri plaszticitásban tehát fontos szerepet játszik a szinaptikus plaszticitáshoz képest lasabban reagáló ún. szinaptikus homeosztázis amely egyfajta szinaptikus stabilitást biztosít. A szinaptikus homeosztázis mechanizmusai segítenek fenntartani a neuronok és hálózatok stabil működését akár az idegi működés zavarai esetén is. Az egyedfejlődés során a pályarendszereket kialakító illetve az idegi aktivitás tartós változásait követő szinaptikus változások például ebbe a körbe tartoznak. A plaszticitás ezen formája negatív feedback mechanizmusokat alkalmaz a szinaptikus tulajdonságok bizonyos értékintervallumban való beállítására/módosítására, hogy a szinaptikus aktivitást egy valamilyen belső küszöbhöz közel tartsa. Feltételezhetően a szinaptikus homeosztázisnak többféle formája létezik, melyek külön signaling és expressziós mechanizmusokkal működnek. Mind az excitatórikus, mind az inhibítoros szinapszisok részeit képezik ennek a szinaptikus regulációnak. A plaszticitás formája egy adott szinapszisban a szinapszis idegi hálózatban betöltött szerepével függ össze. Bár a neuronok azonosítása és szinaptikus, valamint hálózati-plaszticitásuk

tanulmányozása elektrofiziológiai és neurokémiai módszerekkel hosszú múltra tekint vissza, újabban felismert tulajdonság az intrinsic neuronális excitabilitás aktivitás-függő változása (Moyer *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2004a; Li *et al.*, 2004b; Wilczynski *et al.*, 2008), mely végső soron kritikus meghatározója a neuron szinaptikus bemenetre adott válaszának.

A központi idegrendszer legtöbb neuronja komplex és önmagába visszatérő mikrohálózatokba rendeződik, amely serkentő és gátló bemeneteket is fogad. A stabil idegműködés fenntartása ezen hálózatokban egyáltalán nem egyszerű, a serkentés-gátlás egyensúlyának legkisebb zavara is jelentős destabilizáló hatással lehet a hálózat működésére. Számos olyan térben és időben, expressziós mintázataiban eltérő stabilizáló mechanizmust találtak az elmúlt években melyek ezen hatásokat képesek kompenzálni (Thompson *et al.*, 1996; Turrigiano & Nelson, 2000). Ezeket a folyamatokat nevezzük összefoglaló néven tehát homeosztatikus szinaptikus plaszticitásnak. Fontos funkciója a központi idegrendszerben a hálózatok működésének stabilizálása, az idegi aktivitás megfelelő szintjének fenntartása a szinapszisok erősségének és számának szabályozásán keresztül. Ezen mechanizmusok nagyrészt a posztszinaptikus receptorok módosításán vagy a preszinaptikus neurotranszmitter felszabadulás szabályozásán keresztül fejtik ki hatásukat. A módosítás helye lényeges a hálózat működése szempontjából, hiszen például a preszinaptikus felszabadulás valószínűségében történt változás erősen befolyásolja a rövid távú plaszticitást, így a szinapszisban zajló információáramlást. Eközben a posztszinapszis receptoraiban történt változás a válaszkészséget állítja a szinaptikus transzmisszió rövid távú dinamikájának befolyásolása nélkül (Turrigiano & Nelson, 2004).

A szinapszisok molekuláris szerkezetét több, egymással összekapcsolt folyamat szabályozza. A szinapszisokhoz közeli poliriboszóma szerkezetben található RNS-ek és ezeket gátló micRNS-ek által megvalósuló helyi protein szintézis a gyors, dinamikus változások egyik mechanizmusa. Az axoplazmatikus transzporttal a szinapszis fehérje, RNS és mitokondrium utánpótlást kap, amit szabályozott szorter mechnizmus csatol a szinapszishoz, ani lassú, több órás folyamat. Ezekkel ellentétes hatású a receptorok internalizációja, illetve a receptor fehérjék és hibás fehérjék lebontása. Így tehát evidens, hogy a szinapszis a folyamatos épülés és lebontás dinamikus egyensúlyi állapotában van, ami nagyfokú plaszticitást, gyors átalakulást és jelentős stabilitást jelent egyszerre.

2.1.1. Excitatórikus szinaptikus hangolás – a szinaptikus erősség beállítása az idegi aktivitás függvényében.

A idegi aktivitás befolyásolása a glutamáterg szinapszisokban kétirányú, mind a pre-szinapszis, mind a posztszinapszis részt vesz a homeosztatikus plaszticitás folyamataiban. A preszinapszisban lezajló folyamatok és jelátviteli mechanizmusai kevésbé ismertek. Feltételezhető, hogy a preszinapszisban lezajló változások a homeosztatikus plaszticitás egy későbbi fázisát jelenti.

A posztszinapszisban a kompenzatórikus folyamatok változásokat okoznak a pre-szinapszisból felszabadult transzmitter kvantumok által kiváltott mEPSC-k (miniatűr Excitatórikus Posztszinaptikus Potenciál vagy miniatűr véglemez potenciál) amplitúdójában (Turrigiano, 2004; Turrigiano 1998). Azt a mechanizmust, mely egy adott szinapszisban az mEPSC-k amplitúdójára hatva állítja „feljebb" vagy 'lejjebb" a szinaptikus erősséget (vagy szinaptikus hatékonyságot), a posztszinapszisban lezajló 'szinaptikus hangolásnak' nevezzük (Turrigiano *et al.*, 1998; Abbott & Nelson, 2000). Ez a hangolási mechanizmus lehetővé teszi a szinaptikus erősség egyenkénti beállítását az egyes szinapszisokban, miközben a szinapszisok között fenálló relatív különbségek megmaradnak.

A folyamat fontos eleme az AMPA típusú glutamát receptorok számának növekedése illetve csökkenése a posztszinaptikus membránban az idegi aktivitás csökkenése illetve növekedése következtében (Lissin *et al.*, 1998; Turrigiano *et al.*, 1998; Turrigiano & Nelson, 2004). Mivel a cortexben a kiváltott szinaptikus traszmisszió jóval nagyobb mint azt az mEPSC-k összegéből várnánk, a hatásban valószínűleg szerepet játszik a Na^+ csatornák számának változása is a dendriteken. A két mechanizmus együttműködve befolyásolja a kiváltott szinaptikus transzmissziót (Turrigiano & Nelson, 1998). Az AMPA receptorok alegység kompozíciójában történő változások befolyásolják a csatorna-receptorok egyenirányítását, kinetikáját és Ca^{2+} áteresztő-képességét, így ezek az aktivitás-függő változások nemcsak stabilizáló hatással bírnak, de érdekes következményekkel járhatnak a központi idegrendszer szinapszisainak funkcióira és plaszticitására nézve (Wierenga *et al.*, 2005; Isaac *et al.*, 2007).

A glutamáterg szinapszisokban az AMPA receptorok mellett az NMDA receptorok is szerepet játszanak a szinaptikus plaszticitás számos formájában (Thiagarajan *et al.*, 2007), számuk és alegység-összetételük változik az idegi-aktivitás függvényében (Malenka & Bear, 2004; Perez-Otano & Ehlers, 2005). Az NMDA receptor függő plaszticitáshoz kötődő folyamatok az NMDA receptor függő Ca^{2+}-influxot módosítják a szinaptikus aktivitásnak

megfelelően. Az NMDA receptorok gátlása még önmagában nem indukálja a szinaptikus hangolási folyamatokat, bár gyorsíthatja azt egyes esetekben.

Hogyan vezet a megváltozott idegi aktivitás a fent említett homeosztatikus változásokhoz? Hogyan fordítódik le az idegi aktivitás olyan szignállá, amelyet a szinapszisok értelmezni tudnak? Az első szóbajött „aktivitás" szignál a BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), mely a kortikális piramissejtekből aktivitás-függő módon szabadul fel és elsősorban csökkenti az mEPSC-k amplitúdóját az excitatórikus szinapszisokban (Philpot *et al.*, 2001). Számos kísérletben a BDNF növelheti is az mEPSC-k amplitúdóját (Rutherford *et al.*, 1998), tehát valószínű, hogy a BDNF krónikus hatása több faktor függvénye (BDNF mennyisége, sejttípus, agyterület, az agy fejlettségi állapota, stb.). A közelmúltban több tanulmány is megmutatta, hogy az elsősorban gliális eredetű TNF-α gyorsan növeli az mEPSC-k amplitúdóját és az AMPA receptorok számát a sejtfelszínen (Beattie *et al.*, 2002; Copi *et al.*, 2005). Az egész hálózatokra kiterjedő homeosztatikus változások befolyásolják a TNF-α és/vagy BDNF szinteket, melyek ezek után felelősek a sejtfelszíni AMPA receptorok számáért.

2.2. Epilepszia – az idegi plaszticitás patológiás esete

A normálisan működő központi idegrendszerben a homeosztatikus plaszticitás folyamatai úgy módosítják a serkentő és gátló folyamatokat, hogy a tüzelési frekvenciát és különösen a szinkronizált idegi aktivitást a fiziológiás tartományban tartsák. Ennek hiányában az excitáció és inhibíció közötti egyensúly instabillá válik, amely a központi idegrendszer hiperexcitabilitásához, hiperszinkronizált aktivitásához vezet. Az így bekövetkező molekuláris változások az agy patológiás reorganizációjához vezethetnek, ebben az esetben ún. aberráns plaszticitásról beszélünk. Néhány ilyen változás csak átmeneti, míg más esetekben a változás kiterjedt és hosszútávú következményekkel jár. Ez a mechanizmus okozza feltehetően a krónikus epilepsziás állapotok kialakulát is.

Az epilepszia kapcsán mérhető neuronális plaszticitás jó modellje az ingerek hatására mérhető plasztikus szinaptikus molekuláris átrendeződésnek. A homeosztatikus plaszticitás előző fejezetben említett mechaniznusai fontos szerepet játszhatnak az olyan epilepsziás jelenségekben, melyek során az agy valamilyen formában, részben vagy egészben kompenzálni képes a fokozott és abnormális idegi aktivitás hosszútávú negatív hatásait, és az első rohamot követően nem alakul ki krónikus epilepsziás állapot. Ezen folyamatok azonban kóros mértékű elváltozások is lehetnek, melyek hozzájárulnak a rohamok folyamatos fenntartásához és a betegség ezáltal önnfenntartóvá válásához. Annak megértéséhez, hogy mi vezet az egyensúly

felborulásához és a plaszticitási folyamatok „elszabadulásához", igen fontos, hogy megértsük mind a krónikus epilepsziák, mind az akut, visszatérő rohamokkal nem járó epilepsziás állapotok hátterében álló mechanizmusokat.

Az epilepsziás roham olyan klinikai esemény, mely abnormális és túlzott idegi aktivitás eredménye. A roham során az idegi aktivitás normális mintázata egy időre zavart szenved, így az agy idegsejtjei „spontán" szinkronizált tüzelésbe kezdenek, a neuronok összehangolt, tömeges kisülése jellemző. Egyszeri roham az ún. *status epilepticus* (SE), amely az általános definíció szerint egy legalább 30 percig tartó folyamatos roham, vagy rohamsorozat, ahol az egyes epizódok között a beteg nem tér magához (Herman, 2002). Ha a jelenséget illetve a rohamkészséget átmenetileg fokozó tényezők provokálják (láz, akut idegrendszeri betegség, mint gyulladás, trauma, görcsre hajlamosító anyagcsere- vagy elektrolit-eltérések), *akut epilepsziás rohamról* beszélünk, melyet az epilepszia betegségtől el kell különíteni. *Epilepsziáról*, mint krónikus kórképről csak akkor beszélünk, ha az epilepsziás rohamok felismerhető provokáló ágens nélkül, spontán ismétlődve lépnek fel - kettő vagy több spontán roham is előfordul és a rohamok között legalább 1 nap telik el.

Az epilepsziák csoportosítása sokféle, megkülönböztetik eredet szerint, klinikai tünetek vagy az EEG alapján is. A klinikumban a leggyakoribb, a klinikai képet figyelembe vevő osztályozás alapján két fő típusba sorolhatók: a generalizált és a részleges vagy parciális rohamformák megjelenésével (Chang & Lowenstein, 2003). A parciális rohamokat az agykéreg valamely körülírt területének a kezdeti kóros aktivációja hozza létre. Fő típusai: elemi (szimplex) parciális rohamok és összetett (komplex) parciális rohamok. A generalizált rohamok esetén a góc körülírt anatómiai lokalizációja nem igazolható. Fő típusai: absence, mioklónusos roham, klónusos roham, tónusos roham, tónusvesztéses roham, tónusos-klónusos (grand mal) roham. Az ún. másodlagosan generalizált rohamok során a parciális rohamból a terjedés során generalizált forma fejlődik ki. Az epilepszia részletesebb klinikai jellemzésétől és csoportosításától dolgozatomban eltekintek.

A különböző típusú, lefolyású és eredetű epilepsziás rohamok vizsgálatára számos krónikus (visszatérő rohamokat produkáló állatok) és akut modell (egyszeri rohamsorozatot produkáló állatok) is létezik. A krónikus modelleknek a rohamok eredete szerint, a humán csoportosításnak is megfelelően két csoportja ismert: a *szimptomatikus* (szerzett, angol: acquired után rövidítés: AE) és az *idiopátiás* (genetikus, röv: IE) epilepsziát utánzók. A következőkben három csoportban tárgyalom a témám szempontjából fontos epilepsziás állapotokat, melyekben feltehetően különböző mértékű és lefolyású plaszticitási folyamatok zajlanak:

- Szimptomatikus - krónikus epilepszia és a hátterében álló aberráns plaszticitási folyamatok
- Akut epilepsziás rohamok és a 4-AP modell;
- Genetikai eredetű krónikus epilepszia és modellje a WAG/Rij patkánytörzs.

2.2.1. Szimptomatikus - krónikus epilepszia és a hátterében álló plaszticitási folyamatok

Az epilepsziás esetek mintegy 50%-ában a rohamok hátterében valamilyen neurológiai károsodás áll, az epilepszia ezen típusait szerzett (szimptomatikus) epilepsziának nevezzük (Stellwagen & Malenka, 2006). Az első korai (tüneti) rohamok a sérüléssel együtt jelentkeznek, amelyek jól jelzik a károsodás komolyságát. A sérült területen ezután olyan morfológiai és funkcionális változások indulnak el, amelyek hónapokkal vagy akár évekkel később hiperexcitabilitáshoz és spontán jelentkező rohamok kialakulásához, azaz krónikus epilepsziás állapothoz vezetnek (Delorenzo *et al.*, 2005). A krónikus epilepszia kifejlődése és lefolyása mögött a szinaptikus excitabilitás tartós növekedése áll. Epilepsziában a központi idegrendszer plaszticitásáért felelős molekuláris és génexpressziós változások annyira felerősödhetnek, hogy ezen folyamatok az agy patológiás reorganizációjához vezethetnek.

A szerzett, krónikus epilepszia 3 fázisban fejlődik ki (1) a központi idegrendszer valamilyen sérülése (2) *epileptogenezis* (látens fázis, aberráns plaszticitási folyamatok) és (3) *krónikus epilepszia* (spontán visszatérő rohamok) (Herman, 2002).

A szerzett epilepsziák legalább 10 százalékában az epileptogenezis folyamatait kiváltó tényező a *status epilepticus* (SE) (Herman, 2002). Kialakulásának oka lehet toxikus hatás, metabolikus zavar vagy bármi, ami a cortex strukturális károsodásához vezet (trauma,meningitis, elekrolit zavar, stroke, hypoxia stb.), de az öröklött epilepsziák súlyosabb eseteiben is előfordul. Különösen fontos az ezt követő látens fázis vagy ún. *epileptogenezis* előtt és alatt zajló molekuláris folyamatok megértése, amely újabb kezelések kifejlesztésével segíthet megelőzni a krónikus rohamok kialakulását, vagy enyhíteni a már meglévő tüneteket. Az epileptogenezis alatti változások magában foglalják a sejtpusztulást, axonburjánzást, bizonyos neurális hálózatok reorganizációját, változásokat a neurotranszmitter felszabadulásban és a neurogenezist, melyek tulajdonképpen aberráns szinaptikus plaszticitási folyamatok sorozataként is felfoghatók.

2.2.1.1. Epileptogenezis – a reaktív idegi plaszticitás aberráns formája

Számos kísérlet igazolta, hogy a „rohamok rohamokat" okozhatnak. Felnőtt agyban a limbikus rohamok sejtpusztuláshoz és új szinapszisok keletkezéséhez vezetnek. A kiváltó jelenség a szinaptikus hatékonyság növekedése, amely az axonsarjadzást kiváltó molekuláris kaszkádokhoz vezet. Az újonnan keletkező szinapszisok a kontrollokban nem megfigyelhető helyeken jelennek meg, így ezek az új kapcsolatok aberránsnak tekintendők. Ezen folyamatok következtében illetve ezzel párhuzamosan a receptorok érzékenysége, domén összetétele és membrán-koncentrációja is megváltozik a szinapszisokban. Az epileptogenezis folyamataira általánosan jellemző az inhibíció és excitáció közötti egyensúly megbomlása. Az epileptogenezishez köthető hiperexcitabilitás például ok-okozati összefüggésben lehet olyan inhibítoros GABAerg interneuronok pusztulásával is, melyek normális esetben ellensúlyozzák, szabályozzák más neuronok excitabilitását. Az átrendeződött és „áthangolódott" neuronális hálózat a továbbiakban a normálistól eltérően működik. A reaktív idegi plaszticitás aberráns formájáról (Pitkanen *et al.*, 2002) van tehát szó, amely az epileptogenezis alapjául/táptalajául szolgál. Ezt a reaktiv plaszticitást számos más idegrendszeri betegségben leírták és feltételezhetően szoros összefüggésben lehet a neurodegeneratív betegségek krónikus lefolyásával.

Az epilepszia plaszticitási folyamatait leginkább a hippocampusban vizsgálják, melynek számos oka van. Először is ez a terület, mely az egyik legérzékenyebb a rohamok hatásaira és számos különböző típusú epilepsziában fontos szerepe van a hippocampusnak, ennek jó példája a humán temporális epilepszia (TLE-Temporal Lobe Epilepsy) és annak krónikus, a következő fejezetben említett modelljei. A másik fontos szempont, hogy a hippocampus réteges szerkezete feltehetően sokkal látványosabb változásokat eredményez, mint más agyterületeken, ahol a szerkezet homogénebb. A hippocampuson belül is ki kell emelni a gyrus dentatust és különösen annak speciális sejttípusát, a szemcsesejtet. Az agynak ezen régiója és sejttípusa, egyelőre ismeretlen okokból, igen jelentős változásokon esik keresztül a rohamokat követően.

2.2.1.2. Az epileptogenezis hátterében álló mechanizmusok

A *status epilepticus* hatására sejtek pusztulnak (Magloczky & Freund, 1993; Ben-Ari *et al.*, 2008), míg más sejtekben jelentős változások figyelhetőek meg a membrán receptorok és csatornák expressziójában (Sater & Nadler, 1988; Misonou *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2004). valamint új szinaptikus körök keletkeznek (Sutula *et al.*, 1988; Epsztein *et al.*, 2005). A krónikus epilepsziák hátterében álló okok különbözőek, de közös bennük egy fontos, a kezdeti inzultust

szinte azonnal követő molekuláris folyamat: az extracelluláris glutamát koncentráció növekedése, amely növeli az idegsejtek $[Ca^{2+}]^i$ szintjét és így sejtkárosodáshoz, sejthalálhoz vezet (Patrylo & Dudek, 1998). A degeneráció leginkább a hippocampust érinti, de állatokban és emberben is megfigyelhető sejtpusztulás a limbikus rendszer egyéb struktúráiban is. A rágcsáló modellekben kimutatott piramissejt-pusztulás és a szemcsesejtes réteg enyhe „szétszóródása", az ún. hippocampális szklerózis, emberben is megfigyelhető.

Azok a neuronok melyek túlélik a kezdeti sejtpusztulás fázisát, a különböző biokémiai változásokon kívül hosszútávú strukturális és funkcionális változásokon mennek keresztül. A strukturális plaszticitásnak számos példája létezik, amit megfigyeltek epilepszia során. A gyrus dentatusban a példa a lézió által kiváltott axonkollaterális növekedés a molekuláris rétegbe. A szemcsesejtek axonsarjadzása (moharostok) volt az első axonnövekedési jelenség, melyet epilepsziás hippocampusban leírtak, mind állatkísérletes modellben (Represa *et al.*, 1990; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2007), mind humán mintákban (Sutula *et al.*, 1992). Kontrollban a szemcsesejtek axonja a hílusban és a CA3 régióban ad végződéseket, mohasejteket, CA3 piramisokat és interneuronokat idegez be (Houser, 1990). Ez az axonterminális szám növekedés jelentősen megemeli a szemcsesejtekre érkező serkentő bemenetek mennyiségét, és az epilepsziás túlserkentés egyik forrását képezheti (Houser, 1990; Acsady *et al.*, 1998). Állatkísérletes modellben kimutatták, hogy a moharostok sarjadzása már a sejtpusztulás előtt megindul, illetve gerjesztéses epilepszia modellben (kindling) (Sloviter, 1994) és 4-AP által kiváltott epilepszia modellben is megfigyelhető, ahol jelentős sejtpusztulás nincsen.

Epilepsziás mintákban megfigyelték, hogy egyes sejttípusok elhelyezkedése megváltozik, bizonyos mértékű sejtvándorlás is megfigyelhető. A szemcsejtek diszperzióját nagyszámú epilepsziás betegben leírták (Tian *et al.*, 2009), bár ez nem feltétele a krónikus epilepsziának. A gyrus dentatus subgranuláris zónája azon ritka régiók egyike a felnőtt agyban, mely neurogenezisre képes. Számos epilepszia modellben megfigyelték, hogy a rohamok után ezen régióban felgyorsul a neurogenezis (Houser, 1990; Bengzon *et al.*, 1997) és akár hetekkel a stimulus után is megfigyelhető az intenzív sejtosztódás. A szemcsesejtek száma érdekes módon jelentősen megnő epilepsziában (Scott *et al.*, 2000), azonban a sejtosztódás nem olyan mértékű, mint a sejtpusztulás, és a képződött sejtek nem pótolják az elpusztultakat. Feltehetően az újonnan képződött szemcsesejtek részt vesznek az epilepsziás gyrus dentatus hiperaktív működésében (Gu *et al.*, 2010).

A glia aktivációja szintén fontos szerepet játszik a fenti folyamatokban (Scharfman *et al.*, 2000; Wetherington *et al.*, 2008), az epileptogenezis során immun- és gyulladásos válasz figyelhető meg (Vezzani *et al.*, 1999).

Számos elmélet, megfigyelés létezik a roham-indukált illetve rohamokhoz kötött változásokat illetően. Gyakori elgondolás, hogy az epileptogenezis alatt megfigyelhető változások hasonlítanak az egyedfejlődés során lezajló folyamatokhoz (Vezzani & Granata, 2005), ezt megerősíti a gyrus dentatusban megfigyelt neurogenezis is (Cohen *et al.*, 2003; Balu & Lucki, 2009), amely jelenség hozzájárul az aberráns kapcsolatok kialakulásához. Egy további nagyon jó példa a GABAa receptor α6 alegységének expressziója az epileptogenezis alatt, mely egyébként csak a fejlődő központi idegrendszerben figyelhető meg (Kuruba *et al.*, 2009). Az elképzelést alátámasztja a növekedési faktorok és a neurotrophinok szintjének emelkedett szintje is. A szinaptogenezis folyamataihoz köthető molekulák expressziója szintén kimutatható, az extracelluláris mátrix pedig az egyedfejlődés során megfigyelhető folyamatokhoz hasonló változásokon megy keresztül.

Az még nem teljesen tiszta, hogy a fent említett folyamatok hogyan viszonyulnak a kiváltó okhoz, egymáshoz és a rohamokhoz, de egy azonban biztos, e jelenségek összessége hiperexcitabilitáshoz és végül visszatérő rohamok kifejlődéséhez vezet.

2.2.1.3. A szimptomatikus - krónikus epilepszia modelljei

Status epilepticus (SE) egészséges állatokban kiváltható kémiailag vagy elektromos stimulációval. A rágcsálókban SE kiváltására használt legismertebb vegyületek a pilokarpin és a kainsav (kainát). A pilokarpin a muszkarinos acetil-kolin receptorok agonistája és mint ilyen, a paraszimpatikus idegrendszer igen intenzív stimulátora. Felnőtt patkányban, szisztémás adását és az SE-t követő 14-15 napon belül jelentkeznek a temporális lebeny eredetű epilepsziát utánzó spontán visszatérő rohamok. A kainsav az ionotrópos kainát-típusú glutamát receptorok agonistája, szisztémás injekciója akár órákig is fennálló roham-aktivitáshoz (Brooks-Kayal *et al.*, 1998) és hetek múlva spontán visszatérő rohamok kialakulásához vezet.

A kainát- illetve pilokarpin-indukált krónikus epilepszia modell számos jellemvonásában hasonlít a humán hippocampális szklerózissal járó temporális epilepsziára. Egyrészt a legtöbb - de nem minden - esetben egy nyugalmi periódus után (általában 1-2 hét) kialakulnak a visszatérő spontán rohamok. Másrészt, a kezelés hatására tapasztalt patológiás változások is nagyon hasonlítanak a humán esetekben megfigyeltekre: szelektív neuronpusztulás és reaktív szinaptogenezis jellemző. Az axonok csírázása és az aberráns kapcsolatok kialakulása mindkét faj jellegzetes válasza, amely hiperexcitabilitáshoz és így újabb rohamok kialakulásához vezet. A status epilepticus ezekben az állatokban azonban nem korlátozódik a limbikus struktúrákra, a neuronális károsodás pedig sokkal kiterjedtebb, mint humán esetben, a cortikális és thalamikus

struktúrákat is érintheti (Jourquin *et al*., 2003). Az elektrofiziológiai vizsgálatok pedig azt mutatják, hogy ily módon bármely sérült területről kiindulhat a roham, nem csak a hippocampusból. A humán temporális epilepszia heterogén kórkép, az esetek mindössze 54 százalékában tapasztalható a szklerozis, 22 százalékban csak lézió, 8 százalékban a pontos ok sem ismert. Tehát ennek az egy típusú epilepsziának is csak egy részét fedik le ezek a modellek, azokra az esetekre, ahol kiterjedt sejtpusztulás nem tapasztalható, még nincsenek megfelelő kísérleti rendszerek (Sperk, 1994).

A perforáns pálya, a hippocampus vagy az amygdala elektromos stimulációjával is kiválthatóak enyhébb rohamok illetve status epilepticus is. Az egyik legáltalánosabban alkalmazott és kevésbé „drasztikus" rendszer a *kindling* modell, amely számos faj esetében jól használható (rágcsálók, macska, kutya, majom). Az eljárás során a rohamok hevessége és időtartama folyamatosan alakul ki, az epileptogenezis folyamata jól vizsgálható.

2.2.2. Akut epilepsziás rohamok és a 4-AP modell

Az előző fejezet alapján tehát nyilvánvaló, hogy az epileptikus aktivitás újabb rohamokat gerjeszthet. Az aberráns és szinkronizált idegi aktivitás azonban nem minden esetben vezet epileptogenezishez és a krónikus epilepsziás állapot kialakulásához, ahogy az bizonyos humán epilepsziás esetekben is megfigyelhető. A populáció mintegy 9 %-a tapasztal élete során valamilyen egyszeri ún akut rohamot (first-time seizures) (Hauser, 1995) többnyire láz, vagy akut idegrendszeri betegség (gyulladás, trauma, görcsre hajlamosító anyagcsere- vagy elektrolit-eltérések) következtében. Ezeknek a betegeknek minössze egyharmadánál figyelhető meg krónikus epilepsziás állapot kialakulása.

Mi változik ezen esetekben, milyen folyamatok mennek végbe az agyban melyek végül részben vagy teljesen megakadályozzák, visszafordítják az epileptogenezis folyamatait? A kérdések megválaszolása céljából fontos olyan akut epilepszia modelleket is tanulmányozni, melyekben az első roham nem vezet kiterjedt és hosszútávú következményekkel járó aberráns szinaptikus plaszticitáshoz és így a krónikus epilepszia kialakulásához.

Az akut modellek, naív állatokban, különböző vegyületekkel vagy az agy speciális területeinek stimulációjával kiváltott általában egyszeri rohamsorozatot, abnormális depolarizációs mintázatot, vagy akár status epilepticust jelentenek krónikus epilepszia kialakulása nélkül. A modellekben jól vizsgálhatóak az egyszeri SE alatti és utáni változások és haszos lehet tanulmányozásuk, annak feltárása szempontjából, hogy milyen kritikus folyamatok

vezetnek aberráns plaszticitási folyamatokhoz és melyek inkább olyan homeosztatikus plaszticitási folyamatokhoz, amelyek segítségével az agy elkerüli a krónikus rohamok kialakulását. Az akut modellek a különböző depolarizáló hatású anyagok, például K^+-csatorna blokkolók (TEA, 4-AP) adásával kiváltott rohamok alatti történéseket vizsgálják. A vegyület koncentrációjától, a beadás helyétől és formájától függően különböző hevességű és mintázatú rohamokat idéznek elő (Barna *et al.*, 1999; Morales-Villagran *et al.*, 1999; Sarkisian, 2001). A lezajló molekuláris történéseket párhuzamba állítva az esetleges elektrofiziológiai mérésekkel fontos következtetések vonhatóak le a rohamok alatti sejtszintű változások tekintetében.

2.2.2.1. A 4-AP-indukált akut epilepszia modell

A K^+-csatorna blokkoló 4-aminopiridin (4-AP) rohamokat indukáló hatása már számos *in vivo* és agyszeleten végzett kísérletből jól ismert. Kipróbált vegyületről van szó, amelynek irodalma azonban szerényebb, mint a kainát vagy a pilokarpiné. Amint azt korábban említettem, a kainsav és pilokarpin minden esetben az emberi epilepsziás agyra nem jellemző degenerációt okoz. Ennek fényében a 4-AP modelleknek fontos erénye lehet az a tény, hogy a 4-AP (illetve izomerje a 3-AP) alkalmazása altatott állatban úgy tűnik nem vezet kiterjedt és aránytalan mértékű sejtpusztuláshoz (Pena & Tapia, 1999, 2000). Egy másik ok, amiért a modell figyelemre érdemes, az az általa kiváltott rohamok hasonlósága az embernél tapasztalt grand mal epilepsziához. A vegyületet sokféleképpen alkalmazzák, leggyakrabban oldat formájában adják be mikroinjekcióval vagy mikrodialízisssel a kívánt agyterületre, de az aminopiridin kristály agyfelszínre történő helyezésével is elérhető a kívánt hatás. A 4-AP a cortex felszínén közvetlenül alkalmazva elektrográfiás rohamokat (Mihaly *et al.*, 1997; Slezia *et al.*, 2004), míg szisztémás injekciója esetén tonusos-klónusos (régebbi nevén "grand mal") rohamokat okoz (Mihaly *et al*., 1990). A beadás helye általában jól körülhatárolható fókusza a kifejlődő rohamoknak, amelyek kialakulása és terjedése így viszonylag könnyen követhető. A 4-AP kiváltott epilepszia tipikus fokális epilepsziának indul, amely az anyagbeadás helyétől kiindulva terjed szét az agyban és végül generalizált rohamot eredményez a humánhoz hasonló kifejezett iktális-interiktális szerkezettel. A 4-AP modell jól reprezentálja az emberi fokális jellegű, másodlagosan generalizálódó epilepszia típusokat. A 4-AP mérgezés emberben is hasonló rohamokat okoz (Szente & Baranyi, 1987)

2.2.2.2. A 4-AP hatásmechanizmusa

A vegyület fokozza az EPSP-k és az IPSP-k frekvenciáját, blokkolja a feszültségfüggő K^+ csatornákat, meghoszabbítja az akciós potenciálok időtartamát, amely folyamatok megnövekedett Ca^{2+} beáramláshoz vezetnek (Spyker *et al.*, 1980; Szente & Baranyi, 1987). A fenntartott depolarizáció alatt megnövekedett sejten belüli Ca^{2+} koncentráció mind patológiás, mind protektív változásokhoz vezet a neuronok és gliasejtek fehérjeösszetételében. A proteom ezen változásai az epilepszia kutatás igen népszerű témája manapság, humán vizsgálatok esetén is (Thesleff, 1980; Eun *et al.*, 2004; Greene *et al.*, 2007).

A 4-AP koncentráció-függő módon, kombináltan hat az idegsejtekre: egyrészt közvetlenül stimulálja a neuronok tüzelését, másrészt fokozza egyes aminósavak (elsősorban a glutaminsav) felszabadulását a gátló és serkentő szinapszisokban is, feltehetően oly módon, hogy fokozza a Ca^{2+} belépését az idegvégződésekbe (Avoli *et al.*, 1993; Yang & Zhou, 2009). Ezek a történések intenzív és gyakori epileptikus kisülésekhez (Morales-Villagran *et al.*, 1999; Pena & Tapia, 1999; Barna *et al.*, 2000; Medina-Ceja *et al.*, 2000) és enyhe sejtpusztuláshoz (Pena & Tapia, 1999; Barna *et al.*, 2000; Medina-Ceja *et al.*, 2000) vezetnek.

A 4-AP blokkolja a gyorsan inaktiválódó feszültségfüggő A-típusú K^+ csatornákat (K_A vagy I_A csatorna), így befolyásolja a kisülési frekvenciát a posztszinapszisban. Gátolja továbbá az akciós potenciál repolarizációs fázisáért felelős késői K_V csatornákat, valamint az acetil-kolin mediált K_{Ach} csatornákat is. Ezen hatások elnyújtott preszinaptikus depolarizációhoz, megnövekedett Ca^{2+}-influxhoz és ezáltal fokozott transzmitter-felszabaduláshoz vezetnek (Pena & Tapia, 1999). Valószínüleg feszültség-függő Ca^{2+}-csatorna stimulátorként is funkcionál, ami tovább fokozza erőteljes depolarizáló hatását (Kovacs *et al.*, 2003).

A kialakuló epilepsziás aktivitás kombinációja egy korai membrán depolarizációnak, amiért a nem-NMDA típusú Glu receptorok felelnek, és egy késői, kisebb komponensnek, ami NMDA antagonistákkal gátolható. Úgy tűnik a rohamok kialakulásában az AMPA receptorok játszanak szerepet, fennmaradásukért és a terjedésért az NMDA receptorok felelősek (Barna *et al.*, 2000; Ogita *et al.*, 2005). A tartós depolarizáció hatására a különböző extracelluláris szignálok számos jelátviteli útvonalat aktiválnak, amelyek befolyásolják a szinaptikus transzmissziót, azáltal, hogy hosszútávú változásokat okoznak a gén-expresszióban és a fehérjeszintézisben. Úgy tűnik, hogy a MAPK (mitogen-activated protein kinase, mitogén aktivált protein kináz)- útvonalnak fontos szerepe lehet az epileptikus szinkronizációban. Agyszeleten, hippocampusban megfigyelték, hogy az útvonal egyik szereplője, az ERK1/2 (extracellular-regulated kinase 1/2) aktiválódik 4-AP-val történő inkubáció hatására, amely

egybeesik a rohamok megjelenésével. Az útvonal inhibítorai jelentősen csökkentették a 4-AP indukált epileptikus szinkronizációt (Morales-Villagran & Tapia, 1996).

Az epilepsziás rohamok kialakulására jellemző az excitatórikus és inhibitoros átvivő anyagok között fennálló egyensúly felborulása. Mint ahogy azt számos eredmény bizonyítja, a 4-AP nemcsak közvetlenül befolyásolja az idegsejtek tüzelését, de nagy mértékben fokozza egyes neurotranszmitterek felszabadulását, amely jelenség hozzájárul a kialakuló hiperexcitabilitáshoz és végül az epileptikus kisülések kifejlődéséhez (Morales-Villagran *et al.*, 1999; Medina-Ceja *et al.*, 2000; Merlo *et al.*, 2004).

2.2.2.3. Sejtpusztulái mintázat a 4-AP modellben

A 4-aminopiridin kezelés során tapasztalt bizonyos fokú neurotoxicitás okai még nem teljesen tisztázottak, valószínűleg igen összetett jelenségről van szó. Elsősorban nem a vegyület közvetlen hatása, hanem a nagy mértékben megemelkedett glutamát szintek rovására írható. A viszonylag hosszan tartó, fokozott glutamát felszabadulás az NMDA és kainát-típusú receptorok túlaktivációjához vezet, amely apoptotikus folyamatok beindulását indukálja. A glutamát triggereli a receptor-mediált Ca^{2+} influxot is. A sejtpusztulásban tehát szerepet játszik a kezelés hatására abnormálisan megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} szint, amely intracelluláris proteázok és a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) aktivációjához, így szabad gyökök keletkezéséhez és végül a membránok, struktúrális fehérjék és esszenciális enzimek károsodásához vezet (Pena & Tapia, 1999). A glutamát citotoxicitás (excitotoxicitás) mellett érdekes elképzelés az, hogy a 4-AP hatása közvetlen is lehet, mégpedig a Na^+-K^+-ATP-áz (Na^+-K^+-pumpa) feltételezett gátlásán keresztül. Így úgynevezett hibrid sejthalál jöhet létre, melynek során a sejt egyszerre esik át az apoptózis és a nekrózis eseményein is. Oka az intracelluláris K^+ kiürülésével párhuzamos Ca^{2+} és Na^+ akkumuláció (Wang et al., 2003).

A 4-AP koncentráció-függő módon fejti ki hatását. Öt nappal a hippocampusba történő dialízis után a következő sejtpusztulás mintázat jellemző: 70mM-os 4-AP oldat viszonylag jelentős sejthalált okozott a CA1, CA2 és CA4 régiókban; a 35 illetve a 17.5 mM-os oldatok csak piknotikus sejtmagokat és a piramissejtes réteg vékonyodását eredményezték, a sejtpusztulás nem volt teljes. Érdekes, hogy a CA2 régió és a gyrus dentatus gyakorlatilag nem szenvedett károsodást még a magasabb koncentrációknál sem. Ez abban az esetben is igaz volt, amikor a dialízis probe-ot egészen közel helyezték ezen struktúrákhoz, így a vegyület lokálisan nagyobb koncentrációban volt jelen. Ez a mintázat jól összevág az emberi epilepsziában

tapasztalt sejtpusztulással, ahol a kiterjedt károsodás szintén elkerüli a gyrus dentatust, ami azonban a rohamok hatására jelentős átépülésen megy keresztül (Pena & Tapia, 1999).

A 4-aminopiridint kristály formájában az agyfelszínre helyezve a vegyület közvetlenül "oldódik" és diffundál bele a cortexbe. Az eljárás a lehető legkevesebb sérülést okozza az agyszövetben. Ezen modellben a Gallyas féle ezüstözés technikát (Fujikawa, 2005) használva, csak elszórtan találhatóak ún. „sötét" sejtek 6 órával a kezelés után (Baracskay *et al*., 2008). A „sötét" sejtek olyan a celluláris stressz, rohamok, sérülés által érintett neuronok, melyek ún. „ultrastruktúrális kompakción" (Gallyas *et al*., 2008) esnek át. A rohamokat követő 1-3-dik napnál végzett fény és elektro-mikroszkópos vizsgálatok szerint, a 4-AP hatására keletkező excitotoxikus és intermedier területen a pusztuló sejtek egyrészt morfológiailag sem nekrotikusnak sem apoptotikusnak nem tekinthetők, másrészt az érintett „sötét" sejtek túlélnek (Gallyas *et al*., 2008). Azt a hipotézist, miszerint a Gallyas-módszerrel kapott „sötét" sejtek nagyrészt túlélhetnek, alátámasztja az a korábbi eredmény hogy bizonyos esetekben a hippocampus sérülés után a kompakción átesett sejtek 99%-a visszanyeri eredeti térfogatát néhány órával a sérülés után (Gallyas *et al.*, 1993)

2.2.2.4. Plaszticitási folyamatok a 4-AP modellben

A 4-AP indukált glutamát-felszabadulás forrásai a szinaptikus végződések - mind a glutamát szint növekedés, mind a következetes excitotoxicitás gátolható glutamát- receptor antagonisták és tetrodotoxin által (Pena & Tapia, 2000). Úgy tűnik, hogy ez a szinaptikus jelenség felelős a 4-AP akut epileptogenikus hatásáért, amely növekedett szinaptikus válaszképességet jelent. A 4-AP azonban akut hatásai mellett tartósan is növeli a neurotranszmitter felszabadulást a hippocampus glutamáterg szinapszisaiban (Pena et al., 2002). A változás hátterében álló folyamatok még nem tisztázottak. Az egyik lehetőség, hogy a 4-AP kezelés változásokat okoz a preszinapszis Ca^{2+} homeosztázisában, a másik lehetőség, hogy a vezikuláris glutamát felszabadulásban szerepet játszó bizonyos proteinek foszforilációs állapotát változtatja meg (Csordas *et al.*, 2003).

Az, hogy az említett tartós plasztikus változások mennyiben hasonlítanak a fiziológiás illetve aberráns plaszticitási folyamatokhoz, még nem tisztázott. Egy azonban biztos: a 4-AP-t kristály formájában alkalmazva nem figyelhető meg a kainát modellben leírt kiterjedt sejtpusztulás, valamint a krónikus, spontán visszatérő rohamok kialakulásához vezető mértékű aberráns plaszticitás. Még a legerősebb rohamok is csak kisebb mértékű dendrittüskeszám

csökkenéshez vezetnek (Rensing, 2005). Ezen tulajdonsága alapján a modell alkalmas lehet az epileptogenezissel nem járó epilepsziás állapotok hátterében álló jelenségek vizsgálatára.

2.2.3. A genetikai eredetű krónikus epilepszia a WAG/Rij patkánytörzsben

Néhány évtizede már jól ismert, hogy a genetikai tényezők igen fontos szerepet játszanak a generalizált epilepsziák kialakulásában. Az epilepsziás betegek több mint 60 %-ában feltételezhetőek genetikai okok a rohamok kialakulásának hátterében. Ez különösen igaz a gyakran gyermekkorban megjelenő és „kinőhető" absence ('petit mal') rohamokra, ahol nincs bizonyíték az agy lézióinak kialakulására (Heemskerk *et al.*, 1991). Az absence epilepsziában szenvedő betegek generalizált, görcsökkel nem járó rohamokat produkálnak, a tipikus absence rohamokra a betegek EEG-jében bilaterálisan szinkron megjelenő 3 Hz-es tüske-hullám kisülések (Spike and Wave Discharges –SWDs) jellemzőek, melyek leginkább a csendes ébrenlét illetve az ébredés állapotában tapasztalhatóak (Niedermeyer, 1996).

2.2.3.1. Thalamo-cortikális epilepszia a WAG/Rij patkánytörzsben

A spontán kifejlődő SWD-k tanulmányozása kezeletlen Wistar patkányokban vezetett olyan genetikailag epilepsziás, beltenyésztett patkánytörzsek kifejlesztéséhez, amelyek mind elektrofiziológiai, mind a viselkedési és farmakológiai szempontból megfelelnek az absence epilepszia modelljének. A WAG/Rij állatok EEG-je spontán módon megjelenő 8-10 Hz- es ún. tüske-hullám kisüléseket mutat életük negyedik hónapjától kezdődően (Guey *et al.*, 1969; Meeren *et al.*, 2005). Az SWD-k gyakorisága a korral nő, elérheti akár a napi 300-400 kisüléssorozatot is. Az SWD-k nagyon hasonlóak a lassú hullámú alvás (NREMS) 2. stádiumában jelentkező alvási orsókhoz, melyeknek 7-14 Hz a frekvenciájuk, 1-3 másodperc az időtartamuk, és 3-10 másodpercenként is előfordulhatnak (Meeren *et al.*, 2002). A WAG/Rij törzs akkor vált az absence rohamok elfogadott modelljévé, amikor kiderült, hogy az ember és a patkány absence epilepszia hátterében álló patomechanizmus, sőt a rohamok alatti viselkedés és EEG mintázat is hasonló (Steriade *et al.*, 1993). Az SWD-k kialakulása cirkadián ritmust követ, kora reggel illetve késő délután, este jelentkeznek a legnagyobb frekvenciával az alvás-ébrenlét közötti átmeneti fázisban (Coenen *et al.*, 1991; Drinkenburg *et al.*, 1991; Coenen *et al.*, 1992; Coenen & Van Luijtelaar, 2003).

Az elmúlt húsz évben a WAG/Rij törzs a humán absence epilepszia tanulmányozásának egyik validált referencia modelljévé vált (Coenen & Van Luijtelaar, 2003). Segítségével jó eséllyel jósolható a fejlesztés alatt álló antiepileptikus drogok absence rohamokra gyakorolt hatása, illetve az adott drogok központi idegrendszerre gyakorolt mellékhatásai is. Egy másik elfogadott törzs patkányban a GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rat of Strassbourg), amelynek tüske-hullám sorozatai hosszabbak és gyakrabban jelentkeznek, mint a WAG/Rij esetén (Van Luijtelaar & Coenen, 1988; Danober *et al.*, 1998). Hasonló törzsek egerek esetében is léteznek („tottering mouse", „stargazer mouse").

2.2.3.2. A WAG/Rij modell főbb jellemzői

Az egyik legújabb és legelfogadottabb nézet, hogy az absence epilepszia kialakulása mögött ezekben az állatokban a thalamo-cortikális rendszer működési zavara áll (Buzsaki *et al.*, 1991; Marescaux *et al.*, 1992; Danober *et al.*, 1998; Meeren *et al.*, 2005). Meeren és munkatársai részletesen vizsgálták a rohamok kialakulását WAG/Rij patkányokban. A thalamikus léziók illetve önmagában a nucleus reticularis thalami (nRt) specifikus léziója az SWD-k megszűnéséhez vezettek kísérleteik során. Ezzel bizonyították, hogy a thalamus általában, a retikuláris mag pedig különösen fontos az SWD-k létrejöttében. A cortex szerepének tisztázására átmenetileg ún. CSD-vel (Cortical Spreading Depression) deaktiválták a teljes agykérget, amely következtében a kisülések megszűntek mind a thalamusban, mind a cortexben. Ez arra utal, hogy a funkcionálisan érintetlen cortex szintén elengedhetetlen feltétele a kisülések létrejöttének (Meeren *et. al.,* 2002). Az ún. „cortikális fókusz teória" szerint a rohamok fókusza a szomatoszenzoros cortex periorális régójában található, ahonnan a rohamaktivitás gyorsan generalizálódik és az egész cortexre majd a thalamusra is kiterjed. Az első pár ciklusban tehát a cortex vezeti a thalamus aktivitását, majd egymást vezetik, ezáltal fenntartva és felerősítve a ritmusos kisüléseket. Az állatok agyában látszólag nem található elváltozás az abszence típusú rohamok hátterében álló cortikális-thalamikus körökben (Coenen & van Luijtelaar, 2003; Meeren et al., 2002, 2005).

Molekuláris szinten az SWD rohamok kialakulása mögött ismert, leggyakrabban a sejtmembrán Ca^{2+}-permeabilitását befolyásoló mutációk állnak, melyek zavart okoznak a Ca^{2+}-válaszban. Általában olyan génmutációkról van szó, amelyek a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornákat alkotó proteineket érintik. A T-típusú Ca^{2+}-csatornák például fontos szerepet játszanak a nucleus reticularis thalamii neuronjaiban létrejövő 7-10 Hz frekvenciájú excitatórikus és inhibítorikus posztszinaptikus potenciálok (EPSP és IPSP) kialakulásában, ún. Ca^{2+}-spike-ot (Ca^{2+}-

potenciálhullámot) generálnak (Meeren *et al.*, 2002). Egész sejt patch-clamp mérések egy növekedett amplitúdójú és alacsony (lassú) csillapítású Ca^{2+} folyam létezését mutatták ki az nRT sejtekben (Golomb *et al.*, 1996) a kontroll állatok nRT sejtjeihez képest. Ez a jelenség megnöveli a valószínűségét a visszatérő intrathalamikus kisüléseknek, ezáltal erősítve a thalamocortikális szinkronizáló mechanizmusokat.. A T-típusú Ca^{2+}-csatorna fontos szerepére utal, hogy a hosszú ideig egyetlen, és még ma is használatban lévő gyógyszer az absence epilepszia kezelésére az ethosuximid, szelektíven csökkenti az alacsony küszöbű T-típusú Ca^{2+}-csatornák ionáramát a thalamusban (Tsakiridou *et al.*, 1995).

Anatómiai eltéréseket nem találtak a két rendszerben a genetikailag epilepsziás és a kontroll állatok között. Úgy sejtik, hogy az absence rohamokhoz vezető idegi hiperexcitáció és hiperszinkronizáció részben a GABA és a glutamát (Glu) neurotranszmissziója közötti egyensúly felborulásának az eredménye (van Luijtelaar *et al.*, 2000). Számos elektrofiziológiai és farmakológiai vizsgálat feltételezi a GABA és Glu rendszer jelentőségét a tüske-hullám sorozatok iniciációjában és tovaterjedésében. A thalamus és a cortex emelkedett extracelluláris GABA szintet (Rihards et al., 1995) és megváltozott GABA-receptor alegységösszetételt mutatnak (Touret *et al.*, 2007). Szintén kimutatták, hogy szabadonmozgó GAERS patkányok cortexében a Glu felvétel szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontroll állatoké, amely eredmény a szinaptikus elváltozásokkal együtt az epilepsziás patkányok glutamát véghálózatának károsodására utal (Touret *et al.,* 2007). Elektrofiziológiai mérések megnövekedett választ mutattak az NMDA és nem NMDA típusú glutamátreceptorok aktivációja során a GAERS állatok cortexében (Pisu *et al.*, 2008).

Érdekes módon ezekben az állatokban azonban nehezebben válthatók ki másodlagosan generalizált rohamok kainátal (Pumain *et al.*, 1992) vagy az ún „kindling módszerrel" (Eskazan *et al.*, 2002; Akman *et al.*, 2008; Gurbanova *et al.*, 2008). Kainát kezelés hatására mind a status epilepticus, mint a spontán visszatérő konvulzív rohamok kifejlődése tapasztalható, azonban a genetikailag epilepsziás patkányok esetében a látens fázis, azaz a spontán konvulzív rohamok kifejlődése lassabb (Gurbanova et al., 2008). A moharostok burjánzása is csak három hónappal a kezelés után figyelhető meg, amely jelenség jól összevág a fokális limbikus rohamok lasabb másodlagos generalizációjával (Gurbanova et al., 2008).

Mindez arra mutat, hogy a genetikus epilepsziás patkányok hippocampusának (és feltehetően egyéb agyterületeinek) válaszképessége különbözik az egészséges állatokban megfigyeltektől. Ezek az eredmények felvetik, hogy a genetikailag epilepsziás agyban esetleg olyan plaszticitási folyamatok is zajlanak a folyamatos absence aktivitás mellett illetve annak következtében, melyekkel az agy mintegy „védi" magát az erőteljes rohamok ellen. Ennek

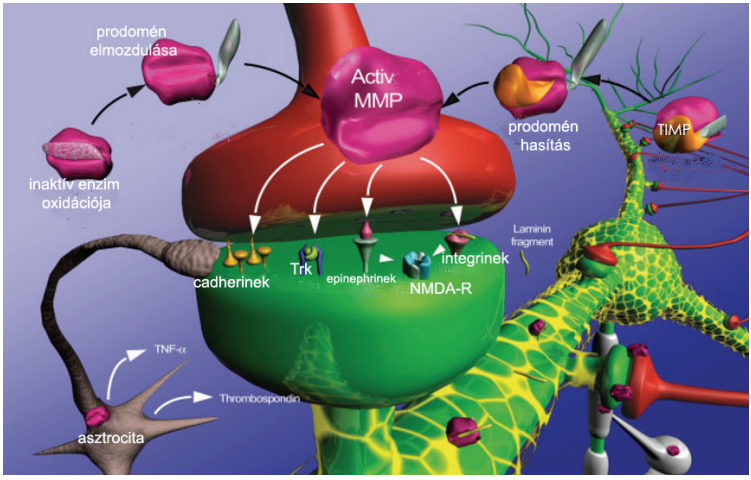
megfelelően a WAG/Rij patkánytörzs egy érdekes modell lehet az epileptogenezist visszatartó, lassító mechanizmusok vizsgálata szempontjából.

3. A zselatinázok szerepe a fiziológiás és aberráns plaszticitási folyamatokban.

3.1. A zselatinázok és a fiziológiás idegi plaszticitás

Szinaptikus lokalizációjuknak köszönhetően az utóbbi években jelentős figyelmet fordítanak a zselatinázok, de legfőképpen az MMP-9 szinaptikus funkciókban, szinaptikus plaszticitásban betöltött szerepének. Az MMP-9 egy olyan pericelluláris hálót bontó degradome része, mely a szinapszis normális működésében fontos ECM molekulákat, növekedési faktorokat vagy membránproteineket is hasít (Overall, 2002; Onat *et al.*, 2007b) **(4.ábra).** Az MMP-9 indukcióját számos tanulási paradigmában (Wright et al. 2003; Nagy et al., 2006; Meighan et al.,2006; Bozdagi et al., 2007), alvás megvonást (Taishi et al. 2001) vagy retinális fényadaptációt (Papp et al., 2007) követő plaszticitási folyamatban is leírták. Az MMP-9 aktivitásának fontos szerepet tulajdonítanak a szinaptikus plaszticitás jelenségében.

Jól ismert hippocampus-függő tanulási paradigma az LTP-modell (Long Term Potentiation -hosszútávú potencírozódás). A modellt alkalmazva az MMP-9 aktivációja az erős elektromos /kémiai ingerlést követő 30-60 percben volt kimutatható hippocampus-szelet CA1 régiójában, az ingerlést követő 120 perccel az aktív MMP-9 mennyiségének kontroll-szintre csökkenése volt megfigyelhető. Az MMP-9 null-mutáns patkányok/egerek csökkent amlitúdójú LTP-vel válaszoltak ugyanarra az ingerlésre (Meighan *et al*., 2006), amely ellensúlyozható volt rekombináns MMP-9 alkalmazásával (Sternlicht & Werb, 2001; Bozdagi *et al.*, 2007). A mutáció nem befolyásolta az LTD-t és az MMP-2 szintjének változása nem volt hatással az LTP-re. Érdekes módon az MMP-9 gátlása csak az LTP fenntarthatóságára és nem pedig a kiválthatóságára van hatással, az inhibítorok alkalmazása 30-60 perccel az LTP kiváltása után nem befolyásolja a megnövekedett transzmissziót (Nagy *et al.*, 2006).

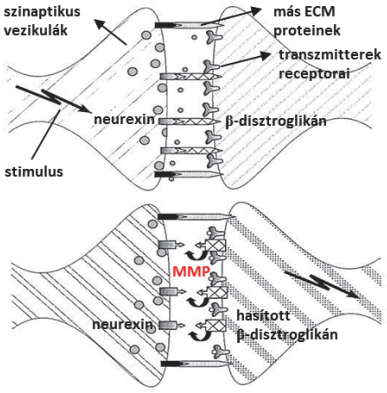


4 ábra MMP targetek a szinapszisban.

Egy serkentő szinapszis sematikus ábrája (Ethell, 2007). A bal felső sarokban látható pro-MMP az ún cys-switch mechanizus által aktiválódik. A jobb felső sarokban a TIMP-MMP komplex elősegíti a prodomain lehasadását és az enzim aktivációját. A posztszinapszisban MMP-k által befolyásolt signaling útvonalak láthatóak: cadherinek, BDNF/TrkB, ephrins/Ephs, laminin/integrin, amelyek befolyásolják az NMDA receptor aktivitást. Az MMP-k szintén indukálják a TNF-α aktivációt és felszabadulást.

Meighan és munkatársai kimutatták, hogy az MMP-9 szintje jelentős emelkedést mutat az ún. Water Maze teszt során, amely szintén a hippocampus-függő tanulást modellezi (Nagy *et al.*, 2006). A dorsális hippocampusba injektált MMP inhibitor jelentősen rontotta a patkányok teljesítményét a teszt során illetve az LTP amplitúdója is csökkent (Meighan *et al.*, 2006). Az MMP-9 gátlása specifikus kémiai inhibítorokkal vagy a TIMP-1 túlexpressziója által befolyásolja a késői fázisú LTP kialakulását, de nincs hatással az indukcióra a szabadon mozgó patkányok prefrontális cortexében vagy agyszeleten *in vitro* (Wright *et al.*, 2003). Ezen folyamatok hátterében álló molekuláris mechanizmusok még jórészt ismeretlenek, de számos potenciális szubsztrát jöhet szóba, amelyen keresztül az MMP-9 szerepet játszhat a fiziológiás szinaptikus plaszticitás jelenségében. Eddig feltételezett fontos partnermolekula a β-disztroglikán, az integrin és a laminin, valamint egyes növekedési faktorok és kemokinek, amelyek mind struktúrális, mind jelátviteli szempontból fontosak.

A β-disztroglikán molekula membránba ágyazott és kötődik más sejt-felszíni (α-disztroglikán) és ECM molekulához (pl. laminin), így alkotva az ún disztroglikán-komplexet, amely szoros kapcsolatot biztosít a sejt és a mátrix között. A komplex a posztszinapszistól nyúlik ki a preszinapszis felé, ahol kapcsolódik a neurotranszmitter-felszabadulást szabályozó neurexinekhez. Feltételezik, hogy az MMP hasítja a disztroglikán molekulát (Okulski *et al.*, 2007) ami kihatással van a sejtorganizációra és/vagy a szignál transzdukcióra a pre- és a posztszinaptikus oldalon egyaránt **(5. ábra).** Ily módon ez a jelenség fontos szerepet tölthet be az idegi plaszticitásban, mint amolyan retrográd hírvivő, ami a posztszinapszisban aktiválódik a fokozott idegi aktivitás hatására (Kaczmarek *et al.,* 2002). Számos kísérlet bizonyítja, hogy a β-disztroglikán fontos szerepet játszik a szinaptikus plaszticitás jelenségében mind fiziológiás (Moore *at al*, 2002) mind patológiás (Yamada *et al.*, 2001; Kaczmarek *et al.*, 2002) folyamatokban.



5. ábra Az MMP-k szerepe a szinapszisok aktivitás-függő átalakításában β-disztroglikán hasításán keresztül

A β-disztroglikán molekula membránba ágyazott és köt más sejt-felszíni (α-disztroglikán) és ECM molekulához (pl. laminin), s így alkotva az ún disztroglikán-komplexet, amely szoros kapcsolatot biztosít a sejt és a mátrix között. A komplex a posztszinapszistól nyúlik ki a preszinapszis felé, ahol kapcsolódik a neurotranszmitter-felszabadulást szabályozó neurexinekhez. Feltételezik, hogy az MMP hasítja a disztroglikán molekulát ami kihatással van a sejtorganizációra és/vagy a szignál transzdukcióra a pre- és a posztszinaptikus oldalon egyaránt.

Az MMP-k szubsztrátjai közt szereplő integrinekről (Michaluk *et al.*, 2007) leírták, hogy hatással vannak az NMDA receptoron átfolyó áramra, befolyásolják a dendrittüskék és a szinapszis remodelingjét és fontos szerepe van az LTP jelenségében (Chavis & Westbrook, 2001; Gall & Lynch, 2004; Bernard-Trifilo *et al.*, 2005). Az MMP mediálta szinaptikus potencírozódás gátolható az integrin-signaling útvonal blokkolásával, tehát feltételezhető, hogy az MMP részben az integrineken keresztül fejti ki hatását az LTP alatt.

Az MMP-k szintén aktiválhatnak egyes citokineket vagy növekedési faktorokat a proforma hasításával. A gliális eredetű TNF-alfa (Tumor Necrosis Factor) fokozza a szinaptikus aktivitást, úgy hogy az AMPA receptorok számát növeli a posztszinapszisban (Lin *et al.*, 2003). A szinaptikus aktivitás blokkolását követően ugyanez a molekula szükséges a homeosztatikus

szinaptikus hangoláshoz (Beattie *et al.*, 2002), amely jelenségről az előző fejezetben volt szó részletesen.

Az elmúlt évek kísérletei alapján az MMP-9 az NMDA- (Stellwagen & Malenka, 2006) és AMPA- (Michaluk *et al.*, 2009) típusú glutamát receptorokra közvetlenül is hathat, így befolyásolva a szinaptikus szignalingot.

A BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) a szinapszisban feltehetően szintén fontos szerepet játszik az MMP-k idegi aktivitás függő szabályzásában (Gawlak *et al.*, 2009), a kapcsolat feltehetően kértirányú (Sun *et al.*, 2006; Ethell & Ethell, 2007; Hwang *et al.*, 2011)

Végül, de nem utolsó sorban a szinaptikus plaszticitás jelensége a dendrittüskék morfológiájának és számának változásaiban is megnyilvánulhat, amely tükrözi az excitatórikus szinapszisok számát és méretét. Az ötletet, hogy a dendrittüskék formájában és számában bekövetkező változások szerepet játszanak a memória tárolásában a egyes szinapszisok erősítése vagy gyengítése által, már Cajal is felvetette a század elején (Cajal, 1911), de csak a korábbi években bizonyosodott be (Holtmaat *et al.*, 2006; Mizoguchi *et al.*, 2011). Minél nagyobb a dendrittüske "feje", annál nagyobb a posztszinaptikus denzitás és annál több az AMPA receptorok száma a szinapszisban (Holtmaat *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009). Az LTP a dedrittüskék fejének növekedéséhez az LTD pedig azok zsugorodásához vezet (Holtmaat *et al.*, 2008; Yang & Zhou, 2009) Az ECM és különösen az extracelluláris proteázok befolyása a dendrittüskék életében csak nemrégiben került reflektorfénybe (Yang & Zhou, 2009). Oray és munkatársai kimutatták, hogy a tPA/Plasmin rendszer a tüskék motilitásának regulációjában kiemelkedő szerepet játszik. Az MMP-9 szintén fontos szerepet játszik a dendrittüskék morfológiájának változásaiban (Bilousova *et al.*, 2006).

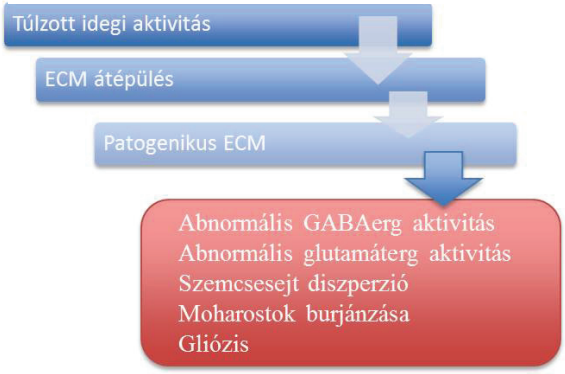
3.2. A zselatinázok és az epilepszia

Mint ahogy az idegi plaszticitásban betöltött szerepüknél már szó volt róla, az MMP-k indukciója és aktivációja erőteljesen függ az idegi aktivitástól. Ez a tény valószínűsíti szerepüket az olyan patológiás folyamatokban, mint a stroke vagy a fej traumája esetében megfigyelhető CSD (Cortical Spreadig Depression) (Oray *et al.*, 2004) és természetesen az epilepszia (Szklarczyk *et al.*, 2002; Jourquin *et al.*, 2003; Gursoy-Ozdemir *et al.*, 2004).

A korábban említett epileptogenezishez köthető változásokban kiemelten fontos szerepet játszik az extracelluláris mátrix (ECM) (**6.ábra**). A felnőtt agyban a mátrix lassú turnover-en megy keresztül, biztosítja a struktúrális plaszticitást, miközben számos fontos fiziológiás

folyamatban is részt vesz, mint például a szinaptikus plaszticitás és a különböző homeosztatikus szabályozó folyamatok. A rohamok az ECM megdöbbentő mértékű átépüléséhez vezetnek, amely folyamat az epileptogenezis része. Ezt az elképzelést megerősítik azok a humán genetikai vizsgálatok, amelyek az epilepszia és az ECM molekulák közötti kapcsolatot bizonyítják; úgy tűnik, hogy az ECM molekulák valamely mutációját hordozó egerekben az epileptogenezis folyamata megváltozik, ezen kívül az ECM szintén meghatározó szerepet tölt be az axonsarjadzásban, a szemcsesejtek diszperziójában és az asztrogliózisban. Ennek megfelelően a matrix átépülésének szabályozása illetve megakadályozása vagy a mátrixhoz kötött szignalizáció elnyomása logikus lépésnek tűnik az epileptogenezis folyamatainak visszafordítása szempontjából. Ehhez viszont először azt érdemes megértenünk, hogy az ECM és különböző enzimjei miként viselkednek az epilepsziás rohamok hatására. A rohamok számos extracelluláris proteázt is aktiválnak, mint például a tPA vagy az MMP-k közé tartozó MMP-9-et, melynek pontos szerepe egyelőre tisztázatlan az epilepsziás állapotokban, de működésének fontossága egyértelmű.

6. ábra. Az extracelluláris mátrix szerepe az epileptogenezisben
(Dityatev, 2010 után)



3.2.1. Az MMP-9 szerepe a rohamokat követő sejtpusztulásban

Az MMP-9 úgy tünik, hogy számos patológiás folyamatban részt vesz a központi idegrendszerben, melyek nagy része a glutamát rendszer diszfunkciójának eredménye. A legnyilvánvalóbb példa erre az excitotoxicitás jelensége: a glutamát receptorok aberráns és

hosszantartó aktivációja a célsejtek sérüléséhez és /vagy halálához vezet, például a hippocampus CA1 és CA3 régiójában KA kezelés hatására (Pollard *et al.*, 1994; Wilczynski *et al.*, 2008). A rohamokat az MMP-k – elsősorban a zselatinázok - szintjének megemelkedése követi, majd később kiterjedt sejtpusztulás, a vaszkuláris rendszer károsodása és gyulladásos folyamatok jelentkeznek, és hetek múlva jelennek meg a visszatérő spontán rohamok.

Jourquin és munkatársai organotipikus hippocampus kultúrákon bebizonyították, hogy az MMP-9 közvetlen kapcsolatba hozható az excitotoxikus sejtpusztulással (Zagulska-Szymczak *et al.*, 2001). Ugyanezen kultúrákban, a TIMP-1 túlzott expressziója neuroprotektív hatással volt glutamát stimuláció esetén (Jourquin *et al.*, 2003).

A kainát által kiváltott excitotoxicitás retinális ganglionsejtekben is megfigyelhető volt (Tan *et al.*, 2003). A KA sejtpusztuláshoz és megemelkedett MMP-9 aktivitáshoz vezetett a retina ganglionsejtes rétegében és a laminin degradációja is megfigyelhető volt. Az excitotoxicitás gátolható volt nem-NMDA típusú receptor antagonisták, vagy a szélesspektrumú MMP inhibítor, a GM6001 alkalmazásával (Zhang *et al.*, 2004). (Zhang *et al.*, 2004).

A hippocampus szinapszisaiban az MMP-9 kolokalizáltan található az NMDA és AMPA receptorokkal. Ultrastuktúrális szinten az olyan dendittüskékből és azok környékéről mutatható ki, melyek aszimmetrikus, glutamáterg szinapszisokat hordoznak (Zhang *et al.*, 2000; Michaluk & Kaczmarek, 2007). Ugyanakkor egy másik tanulmány során megfigyelték, hogy az NMDA receptor függő excitotoxicitás szintén növeli az MMP-9 expresszióját és aktivitását már három órával az NMDA injekciója után (Wilczynski *et al.*, 2008). Érdekes módon ez az aktivitásnövekedés nem figyelhető meg gliasejtekben és nNOS (nitric-oxid szintáz) KO egerekben sem, amely az MMP-9 propeptijének s-nitroziációjával történő aktivációjár utal (Manabe *et al*., 2005). Egy másik MMP inhibítor a GM6001 alkalmazása az NMDA-függő excitiotoxicitás során is csökkenti a retinális ganglionsejtek pusztulásának mértékét (Manabe *et al.*, 2005).

A TIMP1 expressziója – az MMP-9-hez hasonlóan - indukálható és úgy tűnik, érzékeny az idegi aktivitás változásaira. Esetében megfigyelték, hogy mind az mRNS, mind a fehérje szintje megemelkedett a hippocampusban rohamok hatására (Manabe *et al.*, 2005). Ez az aktivitásfüggő TIMP-szint növekedés része lehet a rohamokat követő neuroprotektív mechanizmusoknak. A TIMP-1 hatása különböző sejtkultúrákon végzett kísérletek alapján inkább anti-nekrotikusnak, mint anti-apoptotikus tűnik. Védő szerepében az MMP-k gátlásán kívül valószínűleg az is közrejászik, hogy lecsökkenti a glutamátra adott Ca^{2+}–választ a sejtben (Tan *et al.*, 2003).

Összegezve tehát a kainát okozta tartós depolarizáció indukálja az MMP-9-et, amelynek fokozott aktivitása hozzájárul az idegsejtek pusztulásához. Ezen eredmények alapján feltételezik,

hogy az MMP-knek - elsősorban az MMP-9-nek - az epilepsziában nem csak a gyulladásos folyamatok kialakulásában van szerepe, hanem a tartós depolarizáció okozta excitotoxikus folyamatokban is, melyek jelentős sejtpusztuláshoz vezetnek. Erre az elképzelésre alapozzák az MMP inhibítorok lehetséges terápiás alkalmazását az epilepsziában (Jourquin *et al.,* 2003; Yin et al., 2010).

3.2.2. Az MMP-9 szerepe a rohamokat követő aberráns szinaptikus plaszticitási folyamatokban.

Szklarczyk és munkatársai kísérletsorozata az MMP-9 egy másik lehetséges funkciójára hívja fel a figyelmet a kainát modellben. Számos metodika segítségével bizonyították, hogy a kainát által fokozott szinaptikus aktivitás növeli az MMP-9 fehérje szintjét és aktivitásának mértékét (már 6 órával a kezelést követően) a gyrus dentatusban, amely a kiterjedt sejtpusztulás helyett struktúrális átépülésen esik át. Az MMP-9 szintje azonban csökken, illetve nem emelkedik azokon a területeken, ahol a rohamok hatására léziók keletkeznek (Rivera *et al.*, 1997). Ezek alapján pedig nincs direkt evidencia arra, hogy az MMP-k lennének felelősek a sejtpusztulásért, sőt a gyrus dentatusban tapasztaltak felvetik annak lehetőségét, hogy fontos szerepet játszanak a dendritikus szerkezet és a sejtkapcsolatok aktivitásfüggő átépülésében.

Az elektromosan vagy kémiailag kiváltott rohamok gyakran használt paradigmák a plaszticitási folyamatok celluláris és molekuláris szintű tanulmányozásához. A legtöbb kísérlet a hippocampust veszi célba, ami egyértelműen átesik azon a szöveti átépülésen, mely képességet struktúrális plaszticitásnak nevezünk. A fokozott idegi aktivitás hatására, a neuronok képesek szinaptikus kapcsolataik átépítésére is. Ehhez a peridendritikus környezet, az extracelluláris mátrix jól kontrollált modifikációja szükséges, amiben pedig úgy tűnik, hogy kulcs szerepet játszanak az MMP-k. Ilyen jellegű átépülés az epilepsziás rohamokat követően is megfigyelhető, elsősorban a gyrus dentatusban (Szklarczyk *et al.,* 2002).

A rohamok a piramissejtek tömeges pusztulását okozzák a hippocampus CA régiójában, a limbikus cortexben és az amygdala magban 24-72 órával a KA adminisztráció után (Szklarczyk *et al.*, 2002). Ezen sejtpusztulás következményeképpen a gyrus dentatus szemcsesejtjei elvesztik a CA3 régióban található célsejtjeiket és az enthorinális cortexből érkező bemeneteiket. A szemcsesejtek az új kapcsolatok kialakítása céljából heves, aberráns szinaptikus plaszticitási folyamatokon mennek keresztül (Zagulska-Szymczak *et al.,* 2001).

A dendrittüskék számának, formájának változása ismert jelenség tartós depolarizáció esetében (Ún. „spine-pruning") (Zagulska-Szymczak *et al.*, 2001). Kezdetben eltűnnek a dendrittüskék, majd a szemcsesejtek axonjai aberráns burjánzásba kezdenek (ún. axon "sprouting"), amelyet autaptikus szinaptogenezis követ a szemcsesejtek dendritjein. Ezen folyamatok következtében alakulnak ki azok, az önmagukba visszatérő serkentő kapcsolatok, melyek felelősek lehetnek a krónikus rohamok kialakulásáért például a KA modellben (Poolos, 2008).

Zhang és Szklarczyk megnövekedett MMP-9 aktivitást találtak a KA modellben amely térben és időben is jól korrelált a gyrus dentatusban megfigyelhető plaszticitási folyamatokkal (Ben-Ari, 2001; Szklarczyk *et al.*, 2002). Az MMP-9 mRNS szintjének növekedése még a dendritikus fa legtávolabbi ágaiban is megfigyelhető volt, beleértve a posztszinaptikus membránhoz közel eső dendrittüskéket (Zhang *et al.*, 1998). Úgy tűnik tehát, hogy az MMP-9 mRNS olyan aktivitásfüggő dendritikus transzporton esik át, amely az aktív szinapszisok helyi fehérjeexpresszióját szolgálja. Ne felejtsük, hogy a dendritikus mRNS transzlokáció a szinaptikus plaszticitás jelensége mögött álló egyik legalapvetőbb mechanizmus (Konopacki *et al.*, 2007; Bramham, 2008).

Funkcionális szempontból úgy tűnik, hogy az MMP-9 a rohamok eredményeképpen a dendrittüskék eltüntetésében, a szemcsesejtek dentritarborizációján végbemenő aberráns szinaptikus plaszticitásban vesz részt (Wilczynski *et al.,* 2008). Az MMP-9 ezen fiziológiai szerepe MMP-9 KO egerek, kémiai inhibítorok vagy TIMP-1 alkalmazásával is bebizonyosodott.

A kainát által indukált *status epilepticus*-t követő ún**.** aberráns szinaptikus plaszticitás feltételezhetően fontos szerepet játszik az epileptogenezisben, azaz a később megjelenő, visszatérő spontán rohamok kialakulásában. Wilczynski és munkatársai bemutatták, hogy az MMP-9 knock-out egerek az epileptogenezisre kevésbé érzékenyek, míg az MMP-9-et túlexpresszáló állatokban a visszatérő rohamok kiváltása sokkal könnyebb. Az MMP-9 a hippocampus serkentő szinapszisainak dendrittüskéin lokalizált, ahol mind szintje, mind enzimatikus aktivitása megnövekszik a rohamok hatására. Érdekes módon az MMP-9 hiánya csökkenti az aberráns szinapszisok kialakulásának és a dendrittüske szám változásnak lehetőségét a rohamok után. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy ezen modellekben a szinapszis MMP-9 készletének fontos szerepe van az epileptogenezis folyamataiban.

KÉRDÉSFELTEVÉS

Összefoglalva tehát, az MMP-9 enzim szintjének és aktivitásának növekedését lehet megfigyelni a kainát (Jourquin et al., 2003; Konopacki et al., 2007; Szklarczyk et al., 2002; Zhang et al., 1998, 2000) vagy pilocarpin (Kim et al., 2009) kezelést követő status epilepticus hatására. Ezekben a modellekben az MMP-9 szerepet játszik a sejtpusztulásban (Jourquin et al., 2003; Kim et al., 2009), a dendrittüskék formájának, számának módosításában (Poolos, 2008; Wilczynski et al., 2008) és az aberráns szinaptikus kapcsolatok létrejöttében (Szklarczyk et al.,2002; Wilczynski et al., 2008), az extracelluláris mátrix átépülésében - vagyis az epileptogenezisért felelős folyamatokban.

Azonban köztudott, hogy nem minden epilepsziás állapot jár hosszú távú következményekkel emberben. Gyakran akár súlyos sérülést vagy akár egyszeri rohamot követően sem fejlődik ki krónikus epilepszia, tehát az esetek jelentős részében az iniciatív fázist nem követi epileptogenezis, akkor sem, ha az a sérülés alapján várható lenne. Elképzelhető, hogy ilyenkor az agy képes „helyrehozni" a sérülést és „ellensúlyozni" a hiperexcitabilitást homeosztatikus plaszticitási folyamatai segítségével anélkül, hogy az hosszú távú károsodást okozna.

Ezekben az esetekben az MMP-9 szintjeinek lehetséges változása és annak szerepe kevésbé vizsgált. Egyenlőre tisztázatlan, hogy a végül a rohamok ellen sikeresen „védekező" sejtek szintetizálják-e a zselatinázokat, és ha igen, annak milyen szerepe lehet a rohamokat követő folyamatokban.

Szintén tisztázatlan, hogy az MMP-9 hogyan reagál a genetikus eredetű epilepsziák, mint például az elsősorban gyerekkorban előforduló abszence epilepszia estetében. Az MMP-9 aktivitás-mintázatának vizsgálata a „rohamokhoz szokott" agyban szintén értékes információkat adhat arra vonatkozóan, hogy az MMP-9 milyen szerepet játszik a rohamokat kompenzálni igyekvő homeosztatikus folyamatokban.

Kérdéseink megválaszolásához a már bemutatott akut epilepsziás rohamokat modellező 4-AP modellt és a krónikus-genetikus WAG/Rij epilepszia modellt alkalmaztunk, melyekben az MMP-9 aktiváció feltehetően nem vezet aberráns plaszticitási folyamatokhoz.

CÉLKITŰZÉSEK

- A zselatinázok enzimatikus aktivitási mintázatának vizsgálata kiterjedt degenerációval nem járó akut 4-AP modellben különböző agyterületeken.

- A zselatinázok enzimatikus aktivitási mintázatának vizsgálata az egyedfejlődés során a genetikailag epilepsziás patkányok és az egészséges SPRD patkányok agyában.

- A zselatináz enzimatikus aktivitási mintázat különbségeinek vizsgálata az egészséges és a genetikailag epilepsziás kezeletlen patkányok agyában.

- A zselatináz enzimatikus aktivitás mintázatának napi változásainak vizsgálata a napi rohamgenezis függvényében, WAG/Rij patkányokban.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok és vegyszerek

A kísérleteket 350-400 g hím Sprague-Dawley patkányokon (Charles River Laboratories, Budapest, Magyarország) és 200-300 g hím WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo/Rijswijk, Netherlands) patkányokon végeztük. Az állatokat 3-4 fős csoportokban, standard körülmények között tartottuk, 12 órás fény-sötét ciklusban (világos: reggel 6h és délután 18h között).

Kísérleteink során az Európai Közösségek Tanácsa 86/609/EEC direktívában, illetve az 1998. évi XXVIII. törvényben (az állatok védelméről és kíméletéről), a 243/1998 kormányrendeletben (az állatkísérletek végzéséről) és az egyetemi állatvédelmi előírásokban foglaltak szerint jártunk el. Mindent elkövettünk az állatok szenvedésének és a kísérletekben felhasznált számuk csökkentésének érdekében.

A használt standard laboratóriumi vegyszerek, az esetenként jelzett kivételektől eltekintve, a Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) termékei voltak.

2. Kísérleti csoportok

2.1. A zselatinázok enzimatikus aktivitásának változásai különböző agyterületeken a 4-AP modellben

A rohamok kémiai indukciójához a parietális cortex felszínére helyezett 4-AP kristályt használtunk, amely fokális és másodlagosan generalizálódó epilepsziás rohamokhoz vezet. A kezelést halothán altatásban végeztük, mivel számos tanulmány bizonyítja, hogy a halothán csökkenti a degeneráció mértékét (Pena & Tapia, 1999; Nishikawa & MacIver, 2000; Steward & Schuman, 2003; Baracskay *et al.*, 2008). A rohamok nem okoznak kiterjedt sejtpusztulást, eltekintve a 4-AP kristály által közvetlen okozott léziótól. A zselatináz aktivitást négy agyterületen vizsgáltuk, a parietális cortexben a beadás helyén (ipsilaterális oldal) és ellentétes oldalon (contralaterális oldal), a thalamusban, a frontális cortexben és a hippocampusban, szintén mindkét oldalon. A rohamokról EEG felvételeket készítettünk, az MMP-9 és -2 szintjének változásait *in situ* és SDS-PAGE zimográfiával illetve Western-blot analízissel vizsgáltuk. Az MMP-9 pro formában szintetizálódik és egy enzimatikus hasítással aktiválódik, módszereinkkel mind a két forma változásait követni tudtuk.

Az EEG felvételek 3 állatból származnak a 4-AP modell esetében. Összesen 35 állatot használtunk a gél alapú zselatin zimográfiához: kezelt állatok: 0, 6 illetve 24 órás túlélés (n=6, minden csoportban); álműtött állatok: 0, 6 illetve 24 órás túlélés (n=5, minden csoportban); 2 db abszolút kontroll (nem műtött, intakt állatok). Három állat, mely nem mutatta a *status epilepticus* viselkedési jeleit a 4-AP kezelés után, ki lett zárva a kísérletekből. A sejtpusztulást és az ezzel párhuzamos *in situ* MMP-9 aktivitást 4 állatban vizsgáltuk.

2.2. Az MMP-2 és MMP-9 enzimatikus aktivitásának változásai az egyedfejlődés során és különbségei a felnőtt genetikailag epilepsziás WAG/Rij és az egészséges SPRD között.

Kísérleteinkben összehasonlítottuk a zselatinázok aktivitásának alapszintjét fiatal (6 hetes) és felnőtt (6 hónapos) WAG/Rij és egészséges (rohamoktól mentes) SPRD patkányokban. Az enzimszinteket a tüske-hullám kisülésekért felelős thalamusban és frontális cortexben, valamint a parietális cortexben és a hippocampusban mértük. A felnőttkori mért értékeket a 6 hetes állatok enzimszintjeinek százalékában adtuk meg. Négy- négy fiatal (6 hetes) és 4-4 felnőtt (6 hónapos) WAG/Rij és SPRD állatnál mértük az MMP aktivitást. A rohamok hiányát 2 fiatal, 6 hetes WAG/Rij állatnál bizonyítottuk EEG felvételekkel.

Szintén összehasonlítottuk a felnőtt WAG/Rij (n=4) és SPRD (n=4) patkányok alap zselatináz szintjei, hogy megtudjuk, hogy vajon van-e a különbség az epilepsziás és az egészséges törzs agyi zselatináz szintjeiben. A WAG/Rij patkányokban mért zselatináz szinteket a SPRD törzsben mért szintek százalékában fejeztük ki.

2.3. Az MMP-9 enzimatikus aktivitás napi változása korrelál a WAG/Rij rohamgenezisével

Mivel az epilepsziás kezeletlen állatok alap proMMP-9 szintje és az egészséges törzsben talált MMP-9 szintek között eltérést találtunk, végül arra is kíváncsiak voltunk, hogy az SWD-k napi genezisével illetve azok megjelenési frekvenciájával is összefüggésben van-e az MMP-9 szintjeinek napi változása. Ennek vizsgálatához összehasonlítottuk a rohamokban gazdag (18:00) és a rohamokban szegény (12:00) időszakokban vett minták MMP aktivitását. Nyolc WAG/Rij patkányt használtunk fel az MMP aktivitás napi ritmusának változásainak vizsgálatára: mintavétel az alacsony rohamszámú időszakban, délben (n=4); mintavétel a magas rohamszámú időszakban 18:00 környékén (n=4). A magas és alacsony rohamszámú időszakokat 2 további WAG/Rij állatnál ellenőriztük EEG-vel.

3. 4-AP kezelés

Kísérleteinkhez hím Sprague-Dawley (SPRD) patkányokat (300-400 g) használtunk, a műtétek során az állatokat sztereotaxikus készülékben rögzítettük és halothán/levegő 1%-os elegyével altattuk. A fejen kb. 2-2,5 cm-es hosszanti vágást ejtettünk, majd a koponya megtisztítását követően 1,5-2 mm-es lyukat fúrtunk a parietális cortex fölött (bregma: anterior: -5.8, lateral: 3.2). A dura óvatos eltávolítása után, a lyukra langyos ACSF-vel (Artificial Cerebrospinal Fluid, mesterséges cerebro-spinális folyadék; összetétel: 3mM KCl_2,1mM glükóz, 1mM HEPES, 25 mM $NaHCO_3$, 1,2 mM $MgCl_2$, 11,8 mM NaCl, 2,5 mM $CaCl_2$, 75 mM, 10 M-os NaOH) átitatott fibrinszivacsot (gelaspon) helyeztünk, megakadályozva ezzel az agyfelszín kiszáradását. A 30 perces regenerációs idő elteltével az állat testsúlyának megfelelő (0,5mg/ttkg) 4-AP kristályt a cortex felszínére helyeztük és ismét lefedtük a nedves fibrinszivaccsal. A kristály még be nem oldódott maradékát mindegyik állatnál 45 perc elteltével 36 ˚C-os ACSF-vel kimostuk. A lyukat ezután csontviasszal lefedtük, a sebet összevarrtuk, majd az altatást megszüntettük és az állatokat egy sötét, nyugodt helyen helyeztük el a viselkedési mintázat megfigyeléséhez. Kontrollnak álműtött állatokat használtunk (a lyukat kifúrtuk, de a kristály felhelyezését a fibrinszivacs cseréjével helyettesítettük). Az álműtött és kezelt állatokat halothán altatásban dekapitáltuk: közvetlenül a 4-AP kezelés után (0h), 6 illetve 24 órával a kezelés után.

4. Szövet disszekció

Az eltávolított agyat a kivétel után közvetlenül szárazjégen preparáltuk, a szükséges agyterületekről (parietális- és frontális cortex, thalamus és hippocampus ipsi- és contralaterális oldal) vett mintákat a feldolgozásig-80°C-on tároltuk. Az agykivételt délben végeztük, ami megfelel a WAG/Rij állatok alacsony rohamszámú időszakának. Négy WAG/Rij állat esetében 18:00-kor történt az agykivétel, a magas rohamszámú időszakban.

5. Elektroencefalográfia (EEG)

Három állatban rögzítettük a 4-AP által kiváltott rohamok EEG jeleit, melyek jól korreláltak a viselkedési mintázatokkal. Az állatokat sztereotaxikus készülékben rögzítettük, a koponya feltárása után a csonthártyát eltávolítottuk és a csontba hat rozsdamentes csavarelektródot építettünk be. Az elektródok elhelyezkedése a következő volt: cortex frontalis ipsilateralis (iFC), cortex frontalis contralateralis (cFC), ipsi- és contralateralis szomatoszenzoros cortex (cSS,

iSS), ipsi- és contralateralis parieto-occiptális cortex (iPO vagy"fókusz", cPO). Az iPO elektród közvetlen közelében a koponyacsontot átfúrtuk és egy 2 mm-es nyílást hagytunk. A nyílás fölé teflon rudat építettünk be, amit könnyen el lehetett távolítani a cementből a 4-AP beadásakor. Az elektródokat 10-pólusú csatlakozóba forrasztottuk és fogászati cementtel rögzítettük. Az állatokat 3 napig hagytuk felépülni, utána kezdtük a méréseket. A 4-AP-t egy héttel később alkalmaztuk. Felvettünk egy alap EEG-t majd halothán altatásban eltávolítotuk a teflon rudat, hogy a 4-APt kristály az előre megfúrt lyukon keresztül a cortex felszínére helyezhessük. A lyukat 45 perc elteltével ACFS-el átmostuk majd csontvisszal fedtük be.

30 perces illetve 1 órás EEG felvételeket készítettünk 6 csatornán a 4-AP alkalmazása előtt, halothán-altatás alatt illetve a 40 perces altatás után 0, 1, 3, 6, 12, 24 órával illetve 7 nappal később (a felvételek közül azokat mutatjuk be, amelyek a szövettani illetve biokémiai kísérletekkel azonos időben készültek). Az EEG aktivitást egy bőr alá ültetett indifferens lemez-elektróddal szemben mértük. Az EEG aktivitást Grass EEG8B EEG készülékkel erősítettük, az adatokat egy CED 1401 pro adatgyűjtő berendezés SPIKE 2v2.1 szoftvere segítségével dolgoztuk fel (Cambridge, UK). Erősítés 7 μV/mm, sávszélesség 03 Hz – 10 kHz között, mintavételezés 3000 Hz (az epilepsziás tüskék miatt). A power spektrum analízist 60 perces felvételekből készítettük a NeuroExplorer v.3.2 (Nex Technologies, MA, USA) szoftver segítségével.

Három WAG/Rij állatban 8 órán keresztül (11:00-19:00) készítettünk EEG felvételeket, hogy kövessük az SWD-k gyakoriságának változásait a cirkadián ritmusnak megfelelően. A 12 órás fény/sötét ciklusban egy hoszabb megvilágítást követően átmeneti „szürkület"-et követően kezdődött a sötét ciklus. Az elektródok elhelyezkedése és az EEG felvétel paraméterei a 4-AP modellnél leírtakkal megegyezőek voltak. Az SWD megjelenésének frekvenciájában történt változásokat a 11:00 és 12:00 óra közötti alacsony rohamszámú időszakhoz viszonyítottuk. A statisztikai összehasonlításhoz egymintás t-próbát alkalmaztunk (átlag rohamszám/óra ± SEM; szignifikancia szint:* $p< 0.05$, ** $p<0.01$). Hosszan-tartó EEG felvételeket készítettünk fiatal WAG/Rij állatoknál (az implantáció és a regisztrátumok paraméterei a korábbiakkal megegyezőek), melyek igazolták az SWD-k hiányát.

6. Viselkedési mintázat

Az állatok viselkedését a 4-AP kezelés után a Racine skálának megfelelően osztályoztuk (Walker *et al.*, 1999), kisebb módosításokkal (Racine, 1972). Gyenge epilepsziás roham: 1-3 stádium; tónusos-clonusos roham (4-5 stádium)**.** *0 stádium*: adverzió, viselkedési arrest, felálló

szőr, izgatottság és gyorsuló lélegzetvétel, *1. stádium*: nyáladzás, az ajkak, nyelv és a bajusz egyoldali mozgásai, *2. stádium*: a fej bólintó mozgása, a fej- és szemek rángásai, *3. stádium*: az első végtagok egy- illetve kétoldali rángása és az ún. "wet dog shakes" (vizes kutya mozgás), *4 stádium*: az első végtagokat érintő clonusos roham, ágaskodás, *5 stádium*: generalizált clonusos roham, eldőlés, kontrollálatlan ugrások, később atónia.

7. MMP-9 és -2 kimutatása zselatin-zimográfiával

A proteinek kezelését és a gélben történő renaturációját Weeks (Malhotra *et al.*, 1997) és Szklarczyk és munkatársai (Szklarczyk *et al.,* 2002) protokollja szerint végeztük, kisebb módosításokkal.

A vizsgálandó agyterületekről származó mintákat jéghideg 10 mM $CaCl_2$, 0,25% TritonX-100 tartalmú pufferben homogenizáltuk (20 µl puffer/ 1mg nedves tömeg). Az első centrifugálás (20 perc, 9100 rpm (6000 g), 4°C) után kapott pelleteket reszuszpendáló pufferben vettük fel (50 mM Tris-HCl*, pH=7,4; 0,1 M $CaCl_2$), majd 60°C-on 15 percig rázattuk. Ezután a reszuszpendált minták centrifugálása következett (20 perc, 11700rpm (10000 g), 4°C). Az így keletkezett felülúszókat (extracelluláris mátrixhoz kötött fehérjéket tartalmazó inszolubilis frakció) abs. etanollal kicsaptuk (500µl mintához 750µl alkohol), majd ismét lecentrifugáltuk (5 perc, 14000 rpm (15000g), 4°C). Az így kapott pelleteket az alkohol leszívása után, merkaptoetanolt nem tartalmazó SDS-kezelőben (125 mM Tris-HCl, 4% SDS*, 20% Glycerol pH 6.8) vettük fel, majd 15 percig 37 °C-on rázattuk. A preparált mintákat a futtatásig – 80°C-on tároltuk. A minták fehérjekoncentrációját megmértük (Bicichoninic Acid Protein Assey Kit), az azonos fehérjetartalmú minták elektroforézisét 0,1%-os FITC-vel jelölt zselatin tartalmú, 7,5%-os poliakrilamid gélen végeztük [*alsó gél*: 7,5% AA:Bis(29:1); 0,4M Tris-HCl, pH=8,8; 0,1% SDS; 0,1% TEMED; 0,1% FITC-zselatin (Sigma-Aldrich Co.) – jelölt FITC készítése Watanabe protokollja után (Weeks *et al.*, 1976); 0,05% ammónium-perszulfát; *felső gél*: 4,5% AA:Bis(29:1); 125 mM Tris-HCl pH 6.5; 0,1% SDS; 0,1% TEMED, 0,05% ammónium-perszulfát; *futtató puffer*: 25mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8.3]. A géleket ezután TritonX-100 2,5% oldatában mostuk (2x15perc), majd aktivitáspufferben (50 mM Tris pH=7,5, 10mM $CaCl_2$, 1µM $ZnCl_2$, 1% TritonX-100, 0,2% NaN_3) inkubáltuk 48 óráig, 37°C-on. A géleket ezután UV fényben fotóztuk (Geldoc1000 system, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) és ImageQuant (Amersham) szoftver segítségével denzitometráltuk. A kezelt állatokból származó minták enzimaktivitását az azonos gélen futtatott kontrollokhoz viszonyítottuk.

8. MMP-9 és -2 kimutatása in situ zimográfiával

(EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay Kit, Molecular Probes)

A kontroll illetve kezelt agyakat a kivétel után azonnal lefagyasztottuk, és - 80°C-on tároltuk. Kriosztáttal (-22°C) 10 µm-es metszeteket készítettük, melyeket ezután a jelölt zselatint (100 mg/ml FITC-cel jelölt DQ-zselatin) is tartalmazó aktivitáspufferben inkubáltunk 48 órán keresztül, 37°C-on, sötétben. Kontrollnak zselatin-szubsztrátot nem tartalmazó aktivitás pufferben inkubált metszeteket használtunk. PBS-es mosás és 4% PFA-s fixálás után a metszeteket Mowiollal fedtük le és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Ex: 495 nm, Em: 515 nm) a sejtmagokat Hoechst 33258 festéssel tettük láthatóvá.

Az *in situ* vizsgálatokkal párhuzamosan a setjpusztulás hiányát Nissl festéssel bizonyítottuk: kriosztáttal 10 µm-es metszeteket készítettünk, melyeket 4%-os PFA-val történő fixálás után 0.1% krezil-ibolya festékkel festettünk és Cresyl Violet és Olympus BX-51 mikroszkóppal vizsgáltunk.

9. Western blot analízis

A mintákat a zimogramokhoz is használt, de enzimgátlókat is tartalmazó pufferben homogenizáltuk (10 mM $CaCl_2$, 0,25% TritonX-100, enzimgátlók: 200 mM Vanadate, 200mM PMSF 100x-os higításban és 10 mM Leupeptin, 2,5 µg/ml Aprotinin, 1mg/ml Pepstatin A 1000x-es higításban; 20µl puffer/ 1mg nedves tömeg.). Húsz perc centrifugálás (9500rpm, 4 °C) után a felülúszókkal dolgoztunk tovább. A felülúszókat mintafelvevő pufferben (125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% glycerol, 2% 2- merkaptoetanol, pH=6.8) vettük fel, majd 5 percig 95°C-on forraltuk a feldolgozásig -80 °C-on tároltuk. A minták fehérje-koncentráció mérését Bicichoninic Acid Protein Assey Kit segítségével végeztük. A fehérjék szeparálásához SDS-PAGE-t alkalmaztunk, a minták összehasonlíthatósága végett a gélekre azonos mennyiségű proteint tartalmazó mintákat vittünk fel. A felvitel előtt a mintákat ismét forraltuk 5 percig, 9 5°C-on. [*alsó gél*: 7,5% AA:Bis(29:1), 0,4 M Tris-HCl pH 8.8, 0,1% SDS, 0,1% TEMED, 0,05% ammónium-perszulfát; *felső gél*: 4,5% AA:Bis(29:1); 125 mM Tris-HCl pH=6,5; 0,1% SDS; 0,1% TEMED, 0,05% ammónium-perszulfát; *futtató puffer*: 25mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8.3]. Az elektroforézis után a proteineket nitrocellulóz (Bio-Rad, Pure Nitrocellulose Membrane, 0,45µm) membránra blottoltuk át, amit ezután 5% sovány tejport és 0,05% TWEEN 20-at tartalmazó TBS oldatban blokkoltunk. A primer MMP-9 ellenanyagot (Torrey Pines Biolab, Houston, TX) a blokkoló oldatban higítottuk (1:500), a membránokat ebben inkubáltuk

2-4 órán keresztül, 4 °C-on. Ezután 4x10 perc mosás következett 0,05% TWEEN 20-at tartalmazó TBS oldatban. Majd a membránokat 1 óráig, szobahőmérsékleten inkubáltuk HRP-konjugált szamár anti-nyúl IgG szekunder ellenanyaggal (DakoCytomation) a megfelelő blokkoló oldatban higítva (1:2000). A csíkok előhívásához kemilumineszcens technikát (ECL, PIERCE, Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate) és röntgen-filmet használtunk (ECL, PIERCE, Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate*)*. Az analízishez a zimogram értékeléséhez is használt denzitometráló szoftvert alkalmaztuk.

10. Statisztikai analízis

Az elektrofiziológia és denzitometria adatok kiértékeléséhez és a grafikai ábrázolásokhoz Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) szoftvert használtunk. A denzitásbeli különbségek analíziséhez egyutas ANOVA tesztet illetve Student-féle *t*-próbát alkalmaztuk * $p< 0.05$, ** $p<0.01$. szignifikancia szintekkel.

Az értékek az adott terület és időponthoz tartozó minták denzitásának átlagát mutatják a kontrollok átlag denzitásának százalékában (standard hibájával –SEM- Standard Error of Mean).

EREDMÉNYEK

1. 4-AP modell

1.1. A 4-AP kezelés hatására generalizálódó cortikális rohamok

Az idegi aktivitás illetve a 4-AP hatására kialakuló epilepsziás rohamok nyomonkövetésére agykéreg felszínéről történő EEG-elvezetést használtunk. A rohamok a 4-AP kezelés helyéről, a fókuszból indultak ki majd generalizálódtak az egész cortex területén „másodlagos status epilepticus" formájában. (**I. ábra**) A viselkedési mintázat a módosított Racine skálának megfelelően alakult (Malhotra *et al.,* 1997).

Ahogy azt a **I.a. ábra** mutatja a halothán-narkózis önmagában jelentősen megváltoztatja a normál EEG-t, lassú hullámok genezisét indukálja. Ez az 1-1.5% halothán által okozott változás az EEG-ben magyarázható a vegyület GABAa receptor agonista hatásával. Sokszor jelennek meg kihegyesedett, nagy amplitúdójú paroxizmális hullámok. Mivel az EEG változása halothán hatására mintegy 30 éve ismert, eltekintettünk az EEG pontosabb spektrális analízisétől.

Az első paroxizmális epileptoid hullámok a fókuszban már 15 perccel a 4-AP beadása után jelentkeztek, azonban az epilepsziás tüske-hullám aktivitás folyamatos sorozatai, azaz a rohamok, csak a narkózis megszünésének idején, mintegy 45-60 perccel a kezelés megkezdése után mutatkoznak. Hasonló mintázat volt megfigyelhető a contralaterális oldalon. A rohamok a kezelés után 3 órával terjedtek ki más cortikális régiókra. (itt nem bemutatott adat). A generalizált konvulzív *status epilepticus* a Treiman és mtsai (1990) által leírt fázisokat követte, az utolsó stádiumot 6 órával a kezelés után figyeltük meg, amelyre a lassú hullámok kifejlődése jellemző. Ekkor az EEG jelek spektrális denzitása 1Hz-hez közeli csúcsot mutatott (**I.b. ábra**) és a nagy amplitúdójú (300–350 mV), alacsony frekvenciájú (1–1.5 Hz) hullámok domináltak.

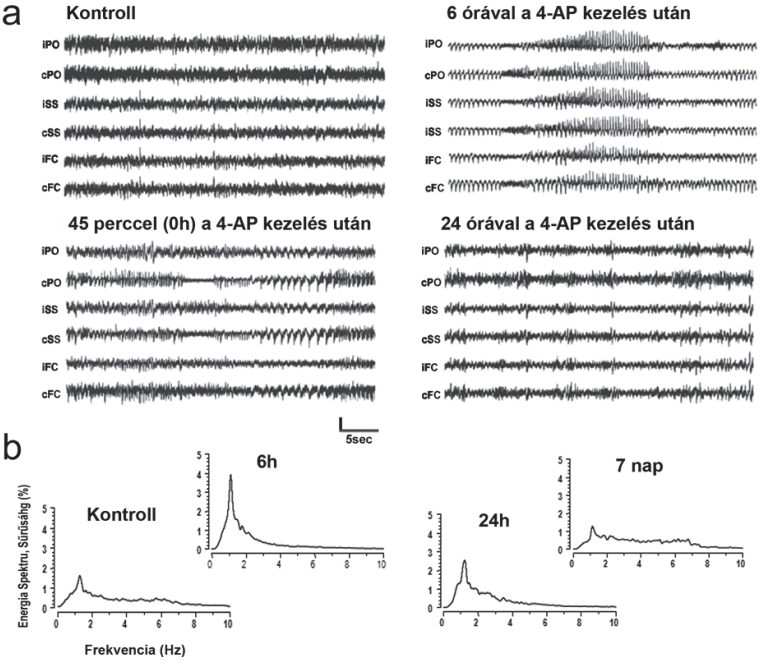
Az elvégzett, de itt nem bemutatott *wavelet*-analízis (frekvenciaanalízis) alapján is jól látszik, hogy a rohamokon belül a domináns frekvenciák eloszlása a kezdeti magas frekvenciák felől lassan tolódik az alacsonyabbak felé. A tüske-hullámok alakja is változik, frekvencia komponensei folyamatosan lassulnak, miközben amplitúdójuk nő.

Az altatás hatásának elmúltával minden a vizsgálatokban szereplő 4-AP kezelt állat számos epilepsziás rohamot mutatott és elérte az 5-ös fázist a Racine skálán (Racine, 1972). A *status epilepticus-t* jellemző hullámok a kezelést követő 24-48 óra elteltével szüntek meg. Az állatok viselkedése visszatért a normálisra, a nagy amplitúdójú alacsony frekvenciás hullámok eltűntek

az EEG ről és az energia-spektrum is visszatért a normális mintázatra. Egy hét elteltével semmilyen epileptikus aktivitás nem volt megfigyelhető és az állatok viselkedése is normálisnak tűnt.

Az MMP aktivitás méréséhez szükséges szövetmintákat a kezelés befejezte után közvetlenül (t=0 h) illetve 6 és 24 óra elteltével vettük ki.

II. ábra A 4-AP kezelés hatására generalizálódó cortikális rohamok. (a) EEG felvételek és (b) energia spektrum analízis a 4-AP kezelés után közvetlenül (t = 0), a kezelés után 6 illetve 24 órával



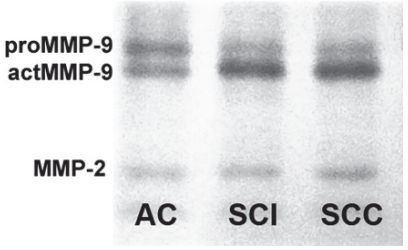
Az EEG elektródok elhelyezkedése: cFC, contralaterális frontális cortex; iFC, ipsilaterális frontális cortex; cSS, contralaterális somatosensoros cortex; iSS, ipsilaterális somatosensoros cortex; cPO, contralaterális parieto-occipitális cortex; iPO, ipsilaterális parieto-occipitális cortex. Amplitúdó kalibráció: 50 mV a kontrollban és 250 mV a többi időpontban. Az első paroxizmális epileptoid hullámok a fókuszban már 15 percccel a 4-AP beadása után jelentkeztek, azonban az epilepsziás tüske-hullám aktivitás folyamatos sorozatai csak a narkózis megszünésének idején, mintegy 45-60 perccel (t=0h) a kezelés megkezdése után mutatkoznak. A generalizált konvulzív status epilepticus utolsó stádiumát 6 órával a kezelés után figyeltük meg, amelyre a nagy amplitúdójú alacsony frekvenciájú hullámok jellemzőek. A *status epilepticus*-ra jellemző hullámok a kezelést követő 24-48 óra elteltével tűntek el az EEG-ről. Az energia spektrum analízist (b) 60 perces felvételekből készítettük 6 és 24 órával valamint 1 héttel a kezelés után. 6 óránál egy új csúcs detektálható 1Hz-nél, ez a csúcs jelentősen lecsökkent 24 óránál és az energia-spektrum mintázata visszatért a normálishoz.

1.2. Az MMP-2 és MMP-9 enzimatikus aktivitásának változásai különböző agyterületeken a 4-AP modellben

1.2.1. Gél-alapú zselatin zimográfia

A 4-AP kezelés hatására az MMP-2 és -9 szintjében bekövetkező térbeli-időbeli változásokat a különböző agyterületekről származó mintákban gél-alapú zselatin zimográfiával detektáltuk. A zimogramokon az MMP-9 enzimatikus aktivitás két csíkot mutat: az első csík 92-100 kDa molekulatömegű pro-MMP-9-nek felel meg, míg a második csík a 88kDa-os aktív formának. A második csík lehet egy intermedier-forma is a pro és aktív forma között (Zhang *et al.,* 1998). Mivel ez az ún. intermedier forma autokatalízissel aktív formává alakul *in vivo* (Chakraborti *et al.,* 2003; Page-McCaw *et al.,* 2007), így a 88kDa-os csíkot aktív, hasított formának tekintettük.

A műtéti eljárás önmagában is befolyásolhatja az MMP aktivitást, akár a kezeléstől távoli területeken is. Ennek lehetőségét mind az ipsi-, mind a contralaterális oldalon megvizsgáltuk: az álműtött, de kezeletlen állatok frontális cortexe enyhe MMP-9 szint növekedést mutatott 6 órával a műtét után az abszolút kontrollokhoz (nem műtött, egészséges állat) képest (n=2) (**II. ábra**). Ennek megfelelően a kezelt minták zselatináz-aktivitását minden esetben a megfelelő túlélési idejű, álműtött állatokból származó kontroll mintákhoz hasonlítottuk.



II. ábra A műtéti eljárás közvetlen hatása az MMP-9 aktivitására a frontális cortexben, a 4-AP alkalmazás helyétől távol

Az MMP-9 enzimatikus aktivitásának növekedését figyeltük meg az álműtött, kezeletlen állatokban (SCI és SCC), 6 óra elteltével az abszolút, műtetlen állatokhoz képest (AC).

Az MMP-2 enzimatikus aktivitásában egyik agyterületen és időpontban sem találtunk változást a 4-AP kezelés hatására, ami egybevág az irodalmi adatokkal.

Az MMP-9 enzimatikus aktivitásának változásait az ipsilaterális (I) és contralaterális (C) parietális cortexben (**III.a ábra),** a hippocampusban (**III.b ábra**), a frontális cortexben (**IV.a ábra**), thalamusban (**IV.b ábra**) vizsgáltuk 0, 6 és 24 órával a kezelés után. A 0h-s időpont a kezelés befejezését, a 45 perccel a kristály cortexre helyezése utáni időpontot jelenti.

45 perccel (0h) a 4-AP kezelés után

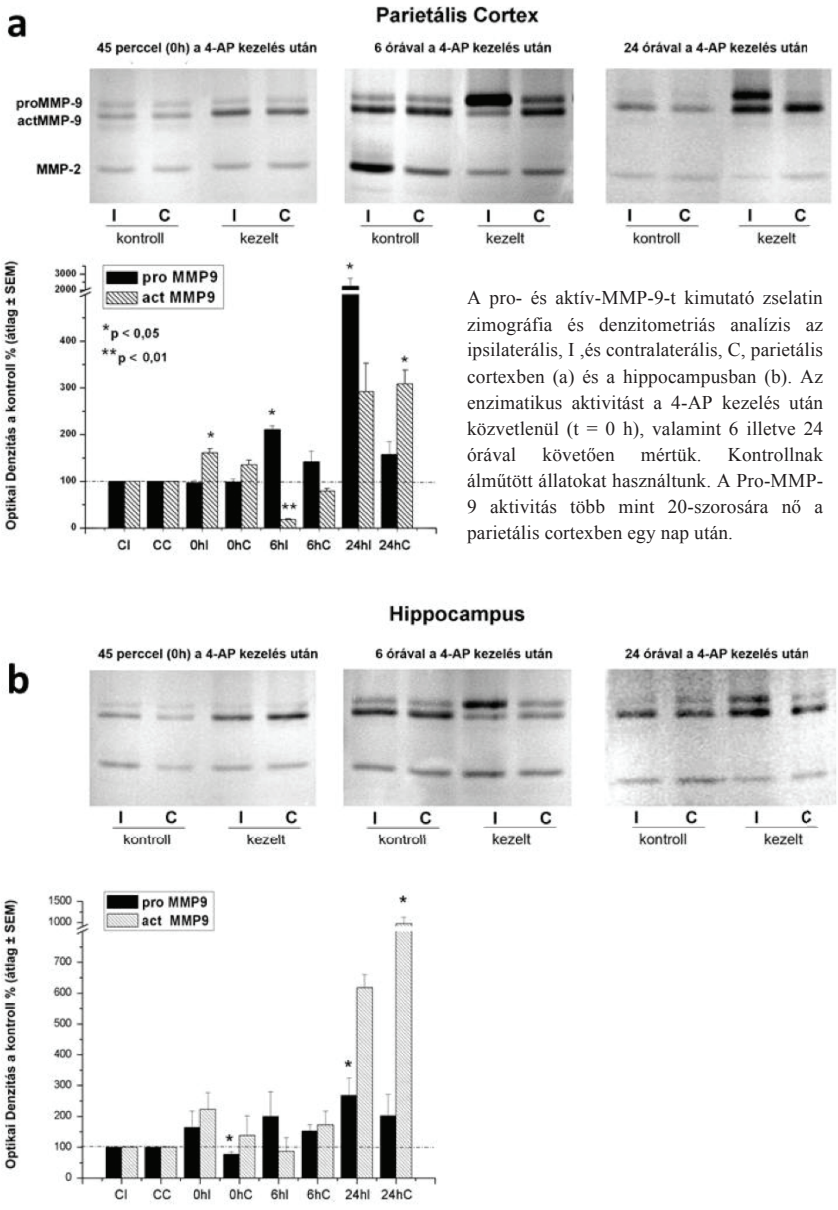
Az aktív és prekurzor forma változást először a parietális cortexben tapasztaltunk. Már 45 perccel a kezelést követően (t = 0h, a kristály kimosásától számítva) az aktív forma növekedését tapasztaltuk a beadás helyén (161±5%, $p < 0.05$, n = 6) és contralaterálisan (136 ± 10%, $p < 0.05$, n = 6) egyaránt. A hippocampus szintén mutatott eltéréseket már 45 percnél, az aktív forma növekedése volt jellemző mindkét oldalon (I: 223 ± 53%, C:138 ± 63%, n=6). Érdekes, hogy a proforma enyhe, de szignifikáns csökkenését lehet megfigyelni a contralaterális hippocampusban (77 ± 8%, $p < 0.05$, n = 6) A frontális cortexből és a thalamusból vett mintákban 45 percnél nem tapasztaltunk eltérést az MMP-9 szintjében az álműtött kontrollhoz képest.

6 órával a 4-AP kezelés után

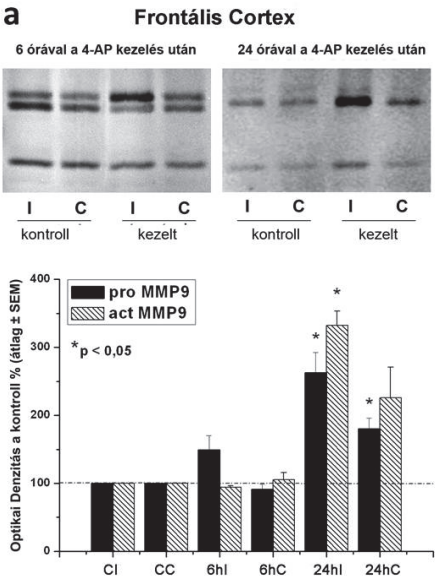
A 4-AP kezelést követő 6. óránál a cortexben jól láthatóan megnövekedett a pro-MMP-9 mennyisége. A változás elsősorban az epilepsziás fókuszt érinti (211± 8%, $p < 0.05$, n = 6), de nem szignifikáns mértékben a contralaterális oldalon is megfigyelhető (142 ± 23%). Ezzel párhuzamosan az aktív forma szintje lecsökken a parietális cortexben, szignifikánsan az ipsilaterális oldalon (18± 2%, $p < 0.01$, n = 6), míg contralaterálisan csak kis mértékben (79 ± 5%). Hasonló mintázat jellemezte a hippocampust, a változás itt is inkább a proformát érinti (I: 200± 81%, C: 152 ± 20 %, n = 6). Az aktív formában nem voltak jelentős különbségek, az ipsilaterális oldalon egyhén alacsonyabb (86 ± 45 %) míg a contralaterális oldalon enyhén magasabb (172 ± 45%), bár ezen eredmények nem szignifikánsak.

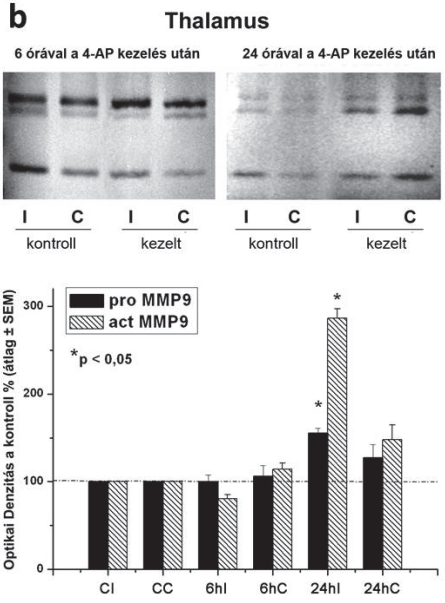
Hat óránál sem az aktív-, sem a proforma szintje nem mutatott jelentős, szignifikáns eltérést a többi agyterületen. Az ipsilaterális frontális cortexben ugyan a proforma 149±21%-ra változott, míg az aktív forma gyakorlatilag változatlan (94±3%). Az MMP-9 enzimatikus aktivitása változatlannak bizonyult a contralaterális parietális cortexben (pro: 142 ± 23%; aktív: 79 ± 5%), frontális cortexben (pro: 91 ± 8%, aktív: 105 ± 10%), thalamusban (pro: 106 ± 12%, act: 114 ± 7%) illetve az ipsilaterális thalamusban egyaránt (pro: 100 ± 7%, aktív: 80 ± 4%).

III. ábra Az MMP-9 enzimatikus aktivitása a 4-AP kezelt állatokban.



A pro- és aktív-MMP-9-t kimutató zselatin zimográfia és denzitometriás analízis az ipsilaterális, I ,és contralaterális, C, parietális cortexben (a) és a hippocampusban (b). Az enzimatikus aktivitást a 4-AP kezelés után közvetlenül (t = 0 h), valamint 6 illetve 24 órával követően mértük. Kontrollnak álműtött állatokat használtunk. A Pro-MMP-9 aktivitás több mint 20-szorosára nő a parietális cortexben egy nap után.





IV.ábra Az MMP-9 enzimatikus aktivitása a 4-AP kezelt állatokban

A pro- és aktív-MMP-9-t kimutató zselatin zimográfia és denzitometriás analízis az ipsilaterális, I ,és contralaterális, C, frontális cortexben (a) és a thalamusban (b). Az enzimatikus aktivitás 6 illetve 24 órával a 4-AP kezelés után. Mivel a kezelés befejezése után közvetlenül nem találtunk változást, a t = 0 h időpont eredményeit itt nem mutatjuk be. Az MMP-9 proformájának és aktív formájának szignifikáns növekedése csak 6 órával a kezelés után látszik, késleltetve a parietális cortex és a hippocampus után.

Egy nappal (24h) a 4-AP kezelés után

Egy nappal a kezelést követően mind a pro-, mind az aktív MMP-9-et érintő változások sokkal szembetűnőbbek, mint 6 óránál. A parietális cortexben jelentős növekedés jellemzi mindkét oldalt, ami a fókuszban szembetűnőbb, ott mindkét molekulatömegű forma jelentősen erősebb csíkot adott a kontrollhoz képest. Contralaterálisan az emelkedés elsősorban az aktív formát érinti.

A kezelés helyéhez közel eső ipsilaterális cortexben a pro-MMP-9 szintje a kontrollhoz képest több mint 20-szoros növekedést mutatott (2240 ± 488%, $p < 0.05$, $n = 6$). Szignifikáns, de enyhébb változások jellemezték rohamok által csak másodlagosan érintett területeket.

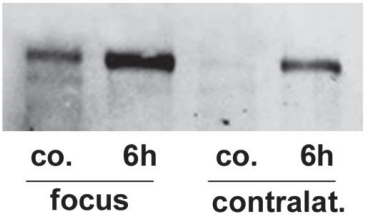
A pro-MMP-9 a contralaterális parietális cortexben 158 ± 27%-ra változott, ehhez hasonló értékeket mutatott a hippocampus (I: 268 ± 56%, $p < 0.05$, $n = 6$; C: 202 ± 69), a frontális cortex (I: 263 ± 30%, $p < 0.05$, $n = 5$; C: 181 ± 16%, $p < 0.05$, $n = 5$) és a thalamus is (I: 155 ± 6%, $p < 0.05$, $n = 5$; C: 128 ± 14%). Az aktív forma hasonlóan változott a parietális cortexben (I: 292 ± 61%; C: 309 ± 29%, $p < 0.05$, $n = 6$), a frontális cortexben (I: 332 ± 21%, $p < 0.05$, $n = 5$; C: 226 ± 45%) és a thalamusban (I: 287 ± 11%, $p < 0.05$, $n = 5$; C: 148 ± 16%). Érdekes módon a hippocampus igen intenzív aktív forma növekedést mutatott egy nap elteltével, mindkét oldalon, de jelentősen contralaterálisan (I:617 ± 43%; C: 969 ± 157%, $p < 0.05$, $n = 6$).

Ezek az eredmények tehát az MMP-9 mindkét formájának szignifikáns, késleltetett indukcióját mutatják a 4-AP által kiváltott rohamok által érintett területeken.

1.2.2. Az MMP-9 kimutatása Western-blot analízissel

Az általunk használt zselatin zimográfia elvileg alkalmas minden zselatináz aktivitású enzim kimutatására, amely az MMP-2 és -9-re optimalizált inkubációs feltételek mellett működni képes, ezért a 4-AP hatására indukálódó, kb. 100 kDa-nál megjelenő dupla csík MMP-9 eredetének validálására nyúlban termelt MMP-9-re specifikus ellenanyagot használtunk.

Mivel a zimográfia alkalmával a cortexben tapasztaltuk a legjelentősebb fokozódást az MMP-9 aktivációjában és indukciójában már 6 órával a kezelés után, ezért a Western-blot analízist is ezen területen végeztük. Az **V. ábrán** jól látható 100 kDa környékén jelentkező specifikus jel az MMP-9-nek felel meg. Jelentős jelerősödés figyelhető meg a 4-AP-vel kezelt állatokban az álműtött kontrollhoz képest. Az ipsilaterális oldalon intenzívebben változott a jel, mint a contralaterális oldalon. A növekedés alátámasztja a zimográfia segítségével kapott eredményeket.



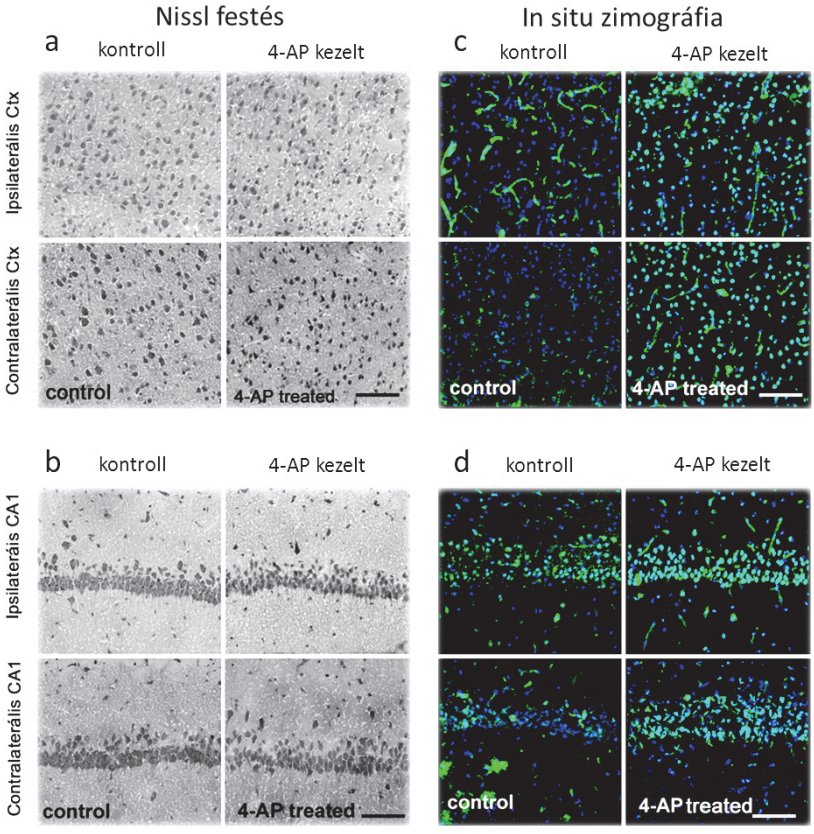
V.ábra Western blot analízis a parietális cortex mintáiból validálja, hogy a zimogramokon 92–100 kDa-nál megfigyelhető csík az MMP-9-nek felel meg, mind a kontrollban (co.) mind a 4-AP (6 h)kezelt állatokban.

1.2.3. Sejtpusztulás hiányának ellenőrzése a 4-AP modellben és MMP-9 párhuzamos kimutatása in situ zimográfiával

Habár korábbi eredmények arra mutatnak, hogy az általunk alkalmazott 4-AP modellben nincs jelentős sejtpusztulás (Slezia *et al.,* 2004 ; Baracskay *et al,* 2008), ezt a teoriát Nissl festéssel kvalitatív módon ellenőriztük 7 nappal a 4-AP kezelés után. Látható sejtpusztulást nem tapasztaltunk a parietális cortexben (**VI.a. ábra**) vagy a hippocampus CA1 (**VI.b.ábra**) régiójában sem. A 4-AP alkalmazási helye alatti területen természetesen megfigyelhető bizonyos mértékű lézió (nem bemutatott adat).

Az *in situ* zimográfia egy érzékeny módszer az MMP-k aktivitásának vizsgálatára, mivel ez a módszer a zselatináz aktivitás sejtszintű lokalizációját is lehetővé teszi. 6 és 24 órával a 4-AP kezelés után, a metszeteken emelkedett zselatináz aktivitást figyeltünk meg, mind a parieto-occipitális cortexben (**VI.c ábra**), mind a hippocampus CA1 régiójában (**VI.d ábra**), ipsi- és contralaterálisan egyaránt. Itt csak az egy nap után kapott eredményeket mutatjuk be. A fluoreszcens jelölés erősebbnek mutatkozott a kéreg piramissejtjein belül, és gyengébbnek a neuropilben. A hippocampus CA1 régiójának piramissejtjei körül is jelentős zselatináz aktivitást figyeltünk meg, mindkét féltekén. A jelölés körülveszi a sejteket, beleértve az apikális dendriteket is. Itt nem bemutatott, de érdekes adat, hogy a gyrus dentatus szemcsesejtjei körül 6 órával a kezelés után detektált erősödött jelölés egy nap után a kontroll szintre csökkent vissza, mialatt a hippocampus egyéb területein a zselatináz aktivitás továbbra is emelkedett Összességében az *in situ* zimogramokon látott változások jól korrelálnak a gél-alapú zimográfiával kapott adatokkal.

Mivel a Nissle festés és az in situ zimográfia bemutatása dolgozatomban leginkább a modell és a gél-alapú zimográfiával kapott eredmények validálására szolgál, a részletesebb anatómiai analízis leírásától itt eltekintek.



VI. ábra.

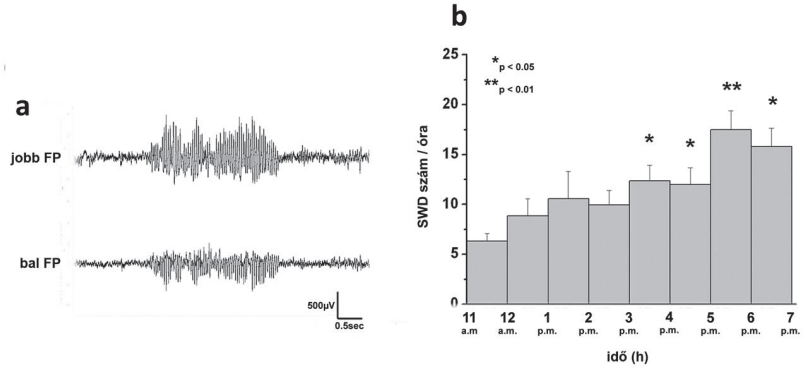
a-b Sejtpusztulás hiányának szemléltesése Nissl-festett metszeteken a cortexben , ctx, (a) és a hippocampus CA1 régiójában , CA1, (b) a kezeléssel azonos (ipsilaterális) és ellentétes (contralaterális) oldalon 7 nappal a 4-AP kezelést követően. Scale bar, 100µm

c-d In situ zimográfia a cortexben, ctx, (c) és a hippocampus CA1 régiójában (d) metszetein 24 órával a 4-AP kezelést követően, fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva. A sejtmagokat Hoechst 33258-val tettük láthatóvá. Scale bar, 100µm

2. WAG/Rij modell

2.1. EEG - tüske-hullám sorozatok WAG/Rij patkányokban

A WAG/Rij állatok tüske-hullám kisülései (SWDs-Spike and Wave Discharges) 8-10Hz-es orsószerű EEG hullámok sorozataiból állnak, amelyek amplitúdója kétszer nagyobb a kontroll delta hullámokhoz képest **(VII.a. ábra).** Az **VII.b ábra** az SWDk megjelenési frekvenciáját mutatja a 11:00 és 19:00 óra között végzett felvételeken (n=4; 8 felvétel/állat). A legalacsonyabb frekvencia 11:00 és 12:00 óra között volt megfigyelhető (6.32 ± 0.76/h), a legmagasabb pedig délután 17:00 és 18:00 óra között (17.46 ± 1.93/h, $p < 0.01$, $n = 3$). Az MMP enzimatikus aktivitásának méréséhez e két időpontban vettünk mintát és ezeket hasonlítottuk egymáshoz, mint alacsony (12:00h) és magas (18:00h) rohamszámú időszakokat.



VII. ábra Absence-típusú epilepszia a WAG/Rij törzsben A genetikailag epilepsziás WAG/Rij patkányokban az absence epilepsziára jellemző tipikus tüske-hullám sorozatokat (SWD) regisztráltuk (a). Az SWD-k óránkénti frekvenciája 11:00–12:00 óra környékén volt a legalacsonyabb és 17:00– 18:00 h között a legmagasabb (b).

2.2. Az MMP-2 és MMP-9 enzimatikus aktivitásának változásai az egyedfejlődés során

A genetikailag szelektált WAG/Rij patkányok az abszence epilepsziához hasonló epileptikus aktivitást mutatnak a felnőtt kor elérésével. Kísérleteinkben összehasonlítottuk a zselatinázok

aktivitásának alapszintjét fiatal (6 hetes) és felnőtt (6 hónapos) WAG/Rij (**VIII.a. ábra**) és egészséges (rohamoktól mentes) SPRD patkányokban (**VIII.b. ábra**). Az enzimszinteket a tüske-hullám kisülésekért felelős thalamusban és frontális cortexben, valamint a parietális cortexben és a hippocampusban mértük. A felnőttkori mért értékeket a 6 hetes állatok enzimszintjeinek százalékában adtuk meg.

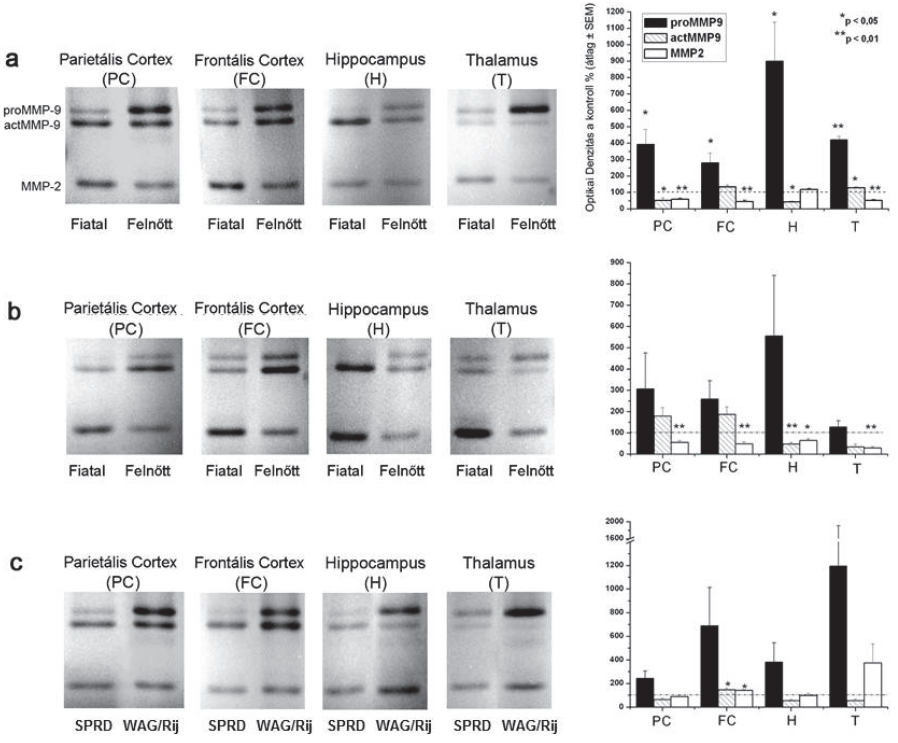
WAG/Rij

Az MMP-2 enzimatikus aktivitása a felnőtt patkányokban szignifikánsan magasabb volt a parietális cortexben (58 ± 7%, $p < 0.01$, $n = 4$), a frontális cortexben (44 ± 8%, $p < 0.01$, $n = 4$) és a thalamusban (50 ± 6%, $p < 0.01$, $n = 4$) és enyhén magasabb a hippocampusban (117 ± 7%). Az aktív MMP-9 alapszintje a felnőtt állatokban magasabb a thalamusban (129 ± 4%, $p < 0.05$, $n = 4$) és a frontális cortexben (133 ± 13%) és alacsonyabb a parietális cortexben (51 ± 14%, $p < 0.05$, $n = 4$) és a hippocampusban (43 ± 5%, $p < 0.05$, $n = 4$) a fiatal állatokhoz képest. A proforma szintje minden agyterületen szignifikánsan magasabb volt a hat hónapos állatokban. A legnagyobb különbséget a hippocampusban mértük (901 ± 236%, $p < 0.05$, $n = 4$), de a thalamusban (421 ± 20%, $p < 0.01$), a parietális cortexben (394 ± 90%, $p < 0.05$, $n = 4$), de még a frontális cortexben (280 ± 60%, $p < 0.05$, $n = 4$) is szembetűnő volt a különbség.

Sprague–Dawley

Ahogy a WAG/Rij törzsnél is, a Sprague–Dawley törzs állataiban is az MMP-2 enzimatikus aktivitása lecsökken 6 hónapos korra minden agyterületen: thalamus (29 ± 7%, $p < 0.01$, $n = 4$), frontális cortex (49 ± 11%, $p < 0.01$, $n = 4$), parietális cortex (56 ± 8%, $p < 0.01$, $n = 4$), hippocampus (65 ± 8%, $p < 0.05$, $n = 4$). A pro-MMP-9 enzimatikus aktivitásának alapszintje, hasonlóan a másik törzshöz, megnövekszik, de egyik területen sem szignifikánsan: thalamus (128 ± 29%), frontális cortex (259 ± 87%), parietális cortex (307 ± 168%), hippocampus (555 ± 285%). Az aktív MMP-9 változásai azonban az SPRD patkányokban nem követnek következetes mintázatot: thalamus (34 ± 13%), frontális cortex (187 ± 36%), parietális cortex (180 ± 39%), hippocampus (47 ± 9%, $p < 0.01$, $n = 4$).

VIII. ábra A zselatinázok enzimatikus aktivitása WAG/Rij és SPRD patkányokban



A pro- és aktív-MMP-9-t kimutató zselatin zimográfia a fiatal (6 hetes) és felnőtt (6 hónapos) WAG/Rij (a) és SPRD (b) patkányokban. A denzitometriás analízis a felnőtt zselatináz szinteket mutatja a fiatalokban mért szintek százalékában a parietális cortexben (PC), a frontális cortexben (FC), a hippocampusban (H) és a thalamusban (T). A Pro-MMP-9 enzimatikus aktivitása 3–9-szeresére növekszik a felnőtt WAG/Rij patkányokban az egyedfejlődés előrehaladtával és az absence epilepszia kialakulásával párhuzamosan. A zselatinázok enzimatikus aktivitásának összehasonlítása felnőtt WAG/Rij és SPRD patkányokban (c). A denzitometriás analízis a WAG/Rij patkányokban mért zselatináz szinteket mutatja a SPRD törzsben mért szintek százalékában. A pro-MMP-9 szintje minden agyterületen magasabb a WAG/Rij patkányokban. A legjelentősebb különbség érdekes módon a két a rohamgenezisben szerepet játszó agyterületen a thalamusban és frontális cortexben volt.

2.3. Az MMP-2 és az MMP-9 enzimatikus aktivitásának különbsége az SPRD és a WAG/Rij törzsben

A 6 hónapos WAG/Rij patkányok agyában az MMP-2 enzimatikus aktivitása kifejezettebb a SPRD patkányokhoz, mint kontrollokhoz, viszonyítva (**VIII.c. ábra**). Az MMP-2 szintje magasabb a thalamusban (374 ± 161%) és a frontális cortexben (144 ± 6%, $p < 0.05$, $n = 4$), azonban a SPRD-ban mért értékhez hasonló a parietális cortexben (91 ± 13%) és a hippocampusban (99 ± 18%). Eközben a pro-MMP-9 szintje konzekvensen, minden agyterületen magasabb a WAG/Rij patkányokban, habár a statisztika nem mutatott szignifikáns adatokat, feltételezhetően az alacsony elemszám miatt. A legjelentősebb különbség érdekes módon a rohamgenezisben szerepet játszó thalamusban volt, ahol több mint tízszeres eltérést detektáltunk a két törzs agymintáit összehasonlítva, a WAG/Rij törzs javára (1195 ± 713%). A tüske-hullám genezisben részt vevő másik fontos agyterületen, a frontális cortexben szintén jelentős volt a különbség (689 ± 324%), de a parietális cortexben (244 ± 62%) és a hippocampusban (383 ± 161%) is magasabb a proforma aránya a genetikailag epilepsziás patkányokban.

Ezzel szemben az aktív MMP-9 enzimatikus aktivitása alacsonyabb a felnőtt WAG/Rij patkányok agyában az SPRD patkányokhoz képest a thalamusban (56 ± 14%), a parietális cortexben (64 ± 12%) és a hippocampusban (56 ± 10) és csak enyhén, de szignifikánsan magasabb a frontális cortexben (146 ± 14%, $p < 0.05$, $n = 4$).

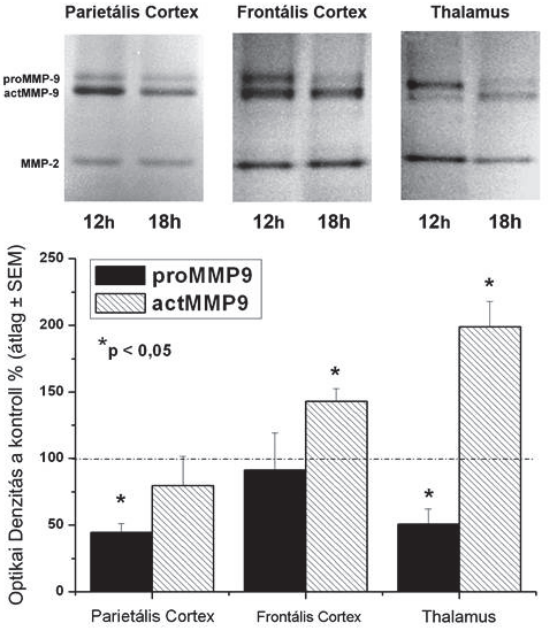
Összességében ezek az adatok az MMP-2 aktivitásának csökkenését mutatják mindkét törzsben az egyedfejlődés során. Ezzel ellentétben a pro-MMP-9 szintje szignifikánsan megnövekszik a négy hónapos koruk után rohamokat produkáló felnőtt WAG/Rij patkányokban és minden agyterületen magasabb az „egészséges" SPRD törzshöz viszonyítva.

2.4. Az MMP-9 enzimatikus aktivitás napi változása a WAG/Rij rohamgenezisével párhuzamosan.

Az MMP-9 enzimatikus aktivitásának dinamikus változásait az SWD-k frekvenciájának napi változásával korreláltuk (Coenen *et al*., 1991; van Luijtelaar & Coenen, 1988).

Amint a VII.b ábra is mutatja, az SWD-k gyakorisága délelőtt 11:00 és 12:00 között a legalacsonyabb, és délután 18:00 és 19:00 óra között, az alvás-ébrenlét közötti átmeneti fázisban a legmagasabb. Ennek megfelelően a 18:00 óránál gyűjtött minták enzimatikus aktivitását (mint magas rohamszámú időszak) hasonlítottuk a 12:00 órakor (mint alacsony rohamszámú időszak) vett mintákhoz (**IX. Ábra**). A zimogramokon az MMP-9 aktív formájának enzimatikus

aktivitása növekedést mutatott a rohamgenezisért felelős agyterületeken, a thalamusban (199 ± 19%, $p < 0.05$, $n = 4$) és a frontális cortexben (143 ± 10%, $p < 0.05$, $n = 4$), de nem változott a parietális cortexben (80 ± 22). Ezzel ellentétben a proforma szintje csökkent a thalamusban (51 ± 11%, $p < 0.05$, $n = 4$) és a parietális cortexben (44 ± 7%, $p < 0.05$, $n = 4$), de változatlan volt a frontális cortexben (91 ± 28%). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az MMP-9 aktivitási mintázata összefüggésben lehet a rohamok megjelenési frekvenciájával a rohamgenezisért felelős területeken.



IX. ábra Az MMP-9 enzimatikus aktivitás napi változása WAG/Rij-ban

Zselatin zimográfia az alacsony rohamszámú (12h) és a magas rohamszámú (18h) időszakban a rohamgenezisben feltehetően résztvevő thalamusban és frontális cortexben illetve a parietális cortexben A denzitometriás analízis az este mért zselatináz szinteket mutatja a délben mért szintek százalékában. A roham-gazdag esti időpontban az MMP-9 aktív formájának enzimatikus aktivitása növekedést mutat a rohamgenezisért felelős agyterületeken, a thalamusban és a frontális cortexben de nem változik a parietális cortexben

EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az itt bemutatott eredmények két különböző epilepszia modellben is igazolják, hogy a szinkronizált cortikális rohamok önmagukban is elegendőek az MMP-9 pro és aktív forma enzimatikus aktivitásának növeléséhez. Az MMP-2 enzimatikus aktivitásának különbségét csak a fiatal és felnőtt WAG/Rij állatok összehasonlításakor figyeltük meg.

Az epilepszia farmakológiai modelljében a parietális cortex felszínére helyezett feszültségfüggő K^+-csatornákat blokkoló 4-aminopiridin (4-AP) kristályt használtunk a rohamok kémiai indukciójához, amely fokális és másodlagosan generalizálódó epilepsziás rohamokhoz vezet. A rohamok nem okoznak kiterjedt sejtpusztulást, eltekintve a 4-AP kristály által közvetlen okozott léziótól. A modellben végzett kísérleteink során sikerült kimutatni az MMP-9 aktivációját és indukcióját, ami összevág a kainátos modellekben tapasztaltakkal (Szklarczyk *et al*.,2002; Zhang *et al.,* 1998). Az EEG alakulása és az állat viselkedésében tapasztalható változások is megfelelnek a 4-AP modellben mások által leírt eredményeknek (Pena & Tapia, 1999; Morales-Villagrán *et al.,* 1996; Barna *et al*., 1999). A generalizált rohamok az MMP-9 enzimatikus aktivitásának növekedését okozták számos vizsgált agyterületen, beleértve az epilepsziás fókusztól távol eső területeket is. Hat óra elteltével a cortexben az MMP-9 indukciója volt tapasztalható az epilepsziás fókuszban és kisebb mértékben a contralaterális oldalon is, míg az MMP-9 expressziójának enyhe fokozódása jellemezte a hippocampust. Egy nap elteltével már jelentős az MMP-9 fokozott indukciója és az enzim aktivációja a cortexben és a hippocampusban is. Ekkor már a prefrontális cortex és a thalamus is viszonylag jól látható változásokat mutat. A másik zselatináz, az MMP-2 szintje változatlan maradt minden vizsgált területen az álműtött állatokhoz képest. *In situ* zimográfia segítségével nem fixált metszetekben is ki tudtuk mutatni az aktív MMP-9 szintjének növekedését 24 órával a kezelés után.

A másik modell a WAG/Rij patkánytörzs volt, amely az absence epilepszia elfogadott modellje. Az állatok 5 hónapos koruktól produkálnak elsődlegesen generalizált tüske-hullám sorozatokat, naponta többször, a cirkadián ritmusuknak megfelelően. Méréseink során összehasonlítottuk a felnőtt és a fiatal állatok zselatináz szintjeit nemcsak az epilepsziás törzsekben, de az egészséges SPRD törzsben is. Azt találtuk, hogy mind a WAG/Rij, mind a SPRD felnőtt állatokban az MMP-9 proforma minden agyterületen erősebb, mint a fiatalban. Az MMP-2 szintje viszont magasabb a fiatal állatokban a WAG/Rij, és az SPRD esetében is, de ez nem meglepő, hiszen az nagyon fontos szerepet játszik az idegrendszer fejlődésében. A

WAG/Rij patkányokban tehát az MMP-9 enzimszintje figyelemreméltóan megnövekszik a thalamo-coticalis rohamok kifejlődésével párhuzamosan.

Azt is megfigyeltük még, hogy az epilepsziás kezeletlen állatok alap proMMP-9 szintje mintegy tízszerese az egészséges SPRD törzsben talált MMP-9 szintekhez képest. Ez az emelkedett alap-enzimszint felveti annak a kérdését is, hogy az SWD-k napi genezisével illetve azok megjelenési frekvenciájával összefüggésben van-e az MMP-9 szintjeinek napszakos változása. Az MMP-9 enzimatikus szintjének napi változása jól korrelál a rohamok megjelenési frekvenciájával. Este, az alvás-ébrenléti átmeneti fázisban a rohamszám megnövekedésével párhuzamosan az enzimszint magasabb, mint a délelőtti, alacsony rohamszámú időszakban. Mikor az SWD-k gyakorisága nagyobb (este 6-7 óra) az MMP-9 proforma lecsökken az aktív forma viszont megnő, a készlet felaktíválódik a megnövekedett SWD szám hatására a „nem rohamozó" időszakhoz képest (dél körül).

1. Az MMP-9 enzimatikus aktivitása és a sejtpusztulás

Az MMP-9 mRNS-ének szintje szignifikánsan megnövekszik a kainát indukálta *status epilepticus* hatására, a hippocampus CA1 régiójában és a hilusban, amely jelentős sejtpusztuláson esik át (Konopacki *et al.*, 2007; Szklarczyk *et al*., 2002). Ezzel szemben a GABA-A agonista bicuculline által kiváltott epileptikus kisülések nem okoznak kiterjedt sejtpusztulást (Ben-Ari *et al.*, 1981; Watanabe & Hattori, 2002), miközben az MMP-9 szintje jelentősen emelkedett 12 órával a kezelés után (Zhang *et al*., 1998). Szintén nem figyelhető meg sejtpusztulás a WAG/Rij állatok absence rohamainak kialakulásához kapcsolódóan sem (Coenen & van Luijtelaar, 2003; Meeren *et al*., 2005, 2002), miközben eredményeink igazolják az emelkedett MMP-9 szintet a 6 hónapos állatokban a rohamokat még nem produkáló 1 hónapos állatok agyában mért enzimszintekhez képest.

Továbbá, az MMP-9 pro és aktív formájának enzimatikus aktivitás növekedését figyeltük meg a 4-AP modellben a másodlagos generalizációért felelős területeken, a contralaterális parietalis cortexben, a hippocampusban, a frontal cortexben és a thalamusban egyaránt, mindkét oldalon. Laboratóriumunk korábbi kísérleteiből kiderült, hogy ezen területek egyikén sem tapasztalható kiterjedt sejtpusztulás a 4-AP hatására (Zhang *et al.*, 1998; Baracskay *et al.*, 2008), amely eredményt más kutatók eredményei is alátámasztanak (Pena & Tapia, 1999; Pena & Tapia, 2000; Slezia *et al*., 2004).

A 4-AP-t kristály formájában alkalmaztuk, amit a cortex durától megtisztított felszínére helyeztünk. Az oldat formájában, kanülön keresztüli injekcióval szemben ennek a módszernek az az előnye, hogy elkerülhetőek a szövetkárosodás vagy az oldószer okozta mellékhatások - ez valószínűleg sokat javított a modellen, mivel a szövetkárosodás és az ahhoz kapcsolódó gyulladási folyamatok jelentős mértékben aktiválhatják a zselatinázokat (Rosenberg, 2002a; Gallyas *et al.*, 2008; Candelario-Jalil *et al.*, 2009). Az alkalmazott anesztetikum, a halothán feltehetően szintén csökkenti a sejtpusztulás mértékét, sőt az akut rohamterjedést is megakadályozza (Baracskay *et al*., 2008; Walker *et al*., 1999).

A Gallyas féle ezüstözés technikát (Rosenberg & Mun-Bryce, 2004) használva, csak elszórtan találhatóak ún. „sötét" sejtek 6 órával a kezelés után (Baracskay *et al*., 2008). A „sötét" sejtek olyan a celluláris stressz, rohamok, sérülés által érintett neuronok, melyek ún. „ultrastruktúrális kompakción" (Gallyas *et al*., 2008) esnek át. A rohamokat követő 1-3 napnál végzett elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint, a 4-AP hatására keletkező intermedier lézió területén ezek a sejtek „túlélnek" (Gallyas *et al*., 2008). Azt a hipotézist, miszerint a Gallyas-módszerrel kapott „sötét" sejtek túlélnek, alátámasztja az az eredmény, hogy a hippocampus sérülés után kompakción átesett sejtek 99%-a visszanyeri eredeti térfogatát néhány órával a sérülés után (Gallyas *et al.*, 1993). Gél-alapú zimográfiával és a Nissl festéssel párhuzamos *in situ* zimográfiával végzett kísérleteink arra engednek következtetni, hogy az MMP-9 enzimatikus aktivitása ezen „felépülési" idő alatt növekszik meg (Baracskay *et al*., 2008; Gallyas *et al*., 2008). Amennyiben ez igaz, úgy az MMP-9 aktiváció modellünkben a 4-AP alkalmazásától távoli területeken feltehetően inkább az epileptikus aktivitáshoz, mint a sejtpusztulás folyamataihoz kapcsolható. Ugyanakkor az enzimatikus aktivitás maximumát a fókuszban, a kristály helyének közelében mértük, ahol megfigyelhető egy kisebb területet érintő nekrózis (Gallyas *et al*., 2008), így az MMP-9 és a sejtpusztulás kapcsolata nem zárható ki teljesen.

Az MMP-2 szintje gyakorlatilag nem változott, ahogy azt más epilepszia modellekben (Jourquin *et al*., 2003; Szklarczyk *et al*., 2002; Wilczynski *et al*., 2008; Zhang *et al*., 1998) vagy a szem fényadaptáció modelljében (Papp *et al*., 2007) is megfigyelték.

2. A zselatináz szintek változásai az egyedfejlődés során

Mivel mind az MMP-2, mind az MMP-9 részt vesz az idegrendszer fejlődésének egyes fontos folyamataiban (Vu & Werb, 2000), így várható, hogy a már fejlett idegrendszerben az enzimek alapszintje alacsonyabb, mint a fiatal állatokban.

Eredményeink szerint ez igaz az MMP-2 esetében, ezzel szemben a pro-MMP-9 készlet mind az SPRD, mind a WAG/Rij törzsben magasabb a felnőtt idegrendszerben. Ennek egyik magyarázata lehet, hogy a feljődő központi idegrendszerhez képest a kifejlett agy kevesebbet „használ el" a pro-MMP-9 készletéből. A pro-MMP-9 alapszintje jelentősen lecsökkent a hippocampusban, mindkét vizsgált corticális régióban és a thalmusban is 6 hónapos SPRD és WAG/Rij patkányokban a 6 hetes állapothoz viszonyítva. A legjelentősebb változást a hippocampusban figyeltük meg és feltételezzük, hogy ez speciális fejlődési mechanizmusokkal áll kapcsolatban. Emellett, az SPRD és az epilepszis WAG/Rij törzset összehasonlítva a thalamus és a frontális cotrex, az SWD genezisért felelős két agyterület (Meeren et al., 2002, 2005) különböztek a leginkább.

3. A pro-MMP-9 enzimatikus aktivitása emelkedett az epilepsziás WAG/Rij patkányok agyában

Az MMP-9 pro- és aktív forma enzimatikus aktivitás változásának különböző idő és térbeli mintázata figyelhető meg a WAG/Rij állatok thalamo-cortikális (van Luijtelaar & Coenen, 1988), valamint a 4-AP által kiváltott generalizált cortikális (Barna *et al.*, 1999; Medina-Ceja *et al.*, 2000; Csordas *et al.*, 2003) rohamok hatására. A WAG/Rij állatok pro-MMP-9 alapszintje, főleg a thalamusban, jelentősen magasabb, mint az SPRD törzsben. Ez az emelkedett szintű készlet egy gyorsan elérhető proforma forrásként szolgálhat a rohamok geneziséért felelős területen. A magas rohamszámú időszakban a proforma készletből történő MMP-9 aktiváció a WAG/Rij patkányok agyában feltehetően a tartós depolarizáció közvetlen következménye, miközben a 4-AP indukált rohamok hatására az MMP-9 aktiváció bizonyos késéssel következik be. Az MMP-9 mind pro-, mind aktív formájának változására vonatkozóan is mutattunk be adatokat. Korábbi vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a pro-MMP-9 készletből viszonylag gyorsan aktiválódhat az enzim működőképes formává (Szklarczyk *et al*., 2002), mialatt a proforma készlet dinamikusan újra feltöltődhet a rohamok által kiváltott transzkripció által (Szklarczyk *et al*., 2002; Konopacki *et al.,* 2007). Felhívjuk a figyelmet továbbá, hogy a pro-MMP-9 szint még egy nappal a 4-AP indukált rohamok után is emelkedett és arra, hogy következetesen magasabb a WAG/Rij állatokban az absence-szerű rohamok kifejlődésével, 6 hónapos korban. Elképzelhető tehát, hogy az MMP-9 emelkedett szintje, megfelelő elérhetősége fontos funkcionális szereppel bír a rohamokat követően.

Az MMP-9 aktivitása különbözött az egyes agyterületeken, melyek különböző szerepet játszanak a roham-aktivitásban. Míg az SWD-k a cortex és thalamus nagy területéről elvezethetők (Szente & Pongracz, 1981; Midzianovskaia *et al.*, 2001; Meeren *et al.*, 2002), addig úgy tűnik, hogy a rohamok kiindulási pontja az anterior somatosensoros cortex. Ezen kívül a frontális régióban több és gyakran nagyobb amplitúdójú SWD-ket lehet megfigyelni az EEG-n mint más rohamok által érintett agyterületeken (Van Luijtelaar & Coenen, 1988; Meeren *et al.*, 2002). Amennyiben van összefüggés a növekedett pro-MMP-9 szint és a rohamaktivitás között, ez könnyen magyarázza a WAG/Rij törzsben megfigyelt enzimkészlet- beli különbségeket például a frontális és a parietális cortex között. Ez az összefüggés meggyőzőbben igazolható lenne az enzimszintek összehasonlításával olyan WAG/Rij patkányokban, melyeket az anti-absence hatású ehosuximiddel (ETX) kezeltek, ami elnyomja az SWD-k kialakulását (Polack *et al.*, 2007). Amennyiben az ETX kezelt felnőtt állatok pro-MMP-9 szintje jelentősen lecsökken, ez a rohamok és az emelkedett enzimszint közötti kapcsolatot igazolja. Ugyanakkor viszont az ETX kezelés hatással van az alvási ciklusra (Declerck & Wauquier, 1991; Blumenfeld *et al.*, 2008), amely bizonyítottan befolyásolja az MMP-9 mRNS szinteket a hippocampusban (Taishi *et al*., 2001).

4. Az MMP-9 aktiváció és szintézis dinamikája

A 4-AP modellben az MMP-9 aktiváció gyors, már 45 perccel a kezelés megkezdése után megfigyelhető a rohamok fókuszának környékén, a parietális cortexben mind ipsi-, mind contralaterálisan. Ez a megfigyelés megerősíti az eddig tapasztaltakat: LTP-ben és agyszeleteket Sp-cAMP-vel inkubálva (elektromos és kémiai ingerlés) az MMP-9 aktivációja 30-60 perc alatt lezajlik, 120 percnél az aktív forma már a kontroll szintet megközelítve csökken vissza (Nagy *et al.*, 2006). Ez a növekedés az aktív formában feltehetően a már meglévő pro-MMP-9 készletből történik, proteolitikus aktivációval. Az aktiváció feltehetően olyan faktoroknak köszönhető, amelyek az idegi aktivitás változásaira igen gyorsan képesek reagálni. Bár erről saját modellünkben adatunk még nincs, de az egyik ilyen és igen valószínű szereplő a tPA, ami az MMP-9 gyakorlatilag legjelentősebb aktivátora és egy óra után már biztosan indukálódik a perforáns pálya-stimuláció vagy kainát alkalmazása esetén (Quian et al, 1993).

A rohamok által kiváltott protein szintézis hatása csak bizonyos késéssel, 6 illetve 24 órával a kezelés után figyelhető meg, a kezelés helyétől távol eső területeken, a thalamusban és a frontális cortexben is. Ez az eredmény nem meglepő, hiszen a proforma megjelenéséhez

minimum 2-6 óra szükséges (Szklarczyk *et al*., 2002). A késleltetett zymogén szintézisért és aktivációért egyrészt az epileptikus aktivitás megjelenésének „késése", mintázatának különbsége, másrészt az MMP-9 eltérő szabályozó mechanizmusai lehetnek a felelősek.

Érdekes ellentétes változást figyeltünk meg a parietális cortexben az MMP-9 pro és aktív formáját illetően 6 óránál, míg 24 óra elteltével mind a két forma szintje jelentősen megnövekedett. A 6 óránál látható aktív forma szint csökkenés és a 24 óránál látható újabb növekedés hátterében számos különböző faktor állhat, amelyek a proforma-aktív forma konverziót vagy a már meglévő aktív enzim szintjét szabályozzák. Például mind az aktív forma inaktiválása proteolízissel, mind a makromolekulásris komplexek létrejötte az aktív MMP-9 és endogén inhibítora, a TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteases) között lecsökkentheti a zimogramokon kapott enzimatikus aktivitást (Jaworski *et al.*, 1999; Chakraborti *et al.*, 2003; Dzwonek *et al.*, 2004; Onat *et al.*, 2007a).

Fontos megjegyezni, hogy az intracelluláris Ca^{2+} szintek növekedése elkerülhetetlennek látszik az epileptikus aktivitás hatására, ami pedig feltehetően önmagában is serkenti az MMP-9 felszabadulást (Rivera *et al.*, 1997). Kísérleteinkben azonban az látszik, hogy epileptikus aktivitás a proforma szintézisét is kiváltja, amely növekedett zymogén szint feltehetően a funkcionálisan aktív enzimszintek megemelkedéséhez vezet. Ezen kívül a hosszan fennmaradó enzimszint változások, főleg a roham fókuszától távolabbi területeken, nem valószínű, hogy a neuronális Ca^{2+} szintektől függenek.

Mind a proforma szintézisét, mind annak aktivációját megfigyeltük a rohamok után. Úgy tűnik ez a két folyamat egymástól függetlenül szabályozott, az azonban nem tiszta, hogy az epileptikus kisüléseknek illetve a rohamok által kiváltott plaszticitásnak milyen szerepe van térben és időben ezen szabályozási folyamatokban.

Az epilepszia folyamán az MMP-9 proforma aktivációjárt felelős proteázok között vannak feltehetően a Serin-protázok, pontosabban tPA/plasmin rendszer és a thrombin, amelyek gyors aktivációja figyelhető meg kainát által kiváltott rohamok hatására. Az MMP-9 szintézisének indukciója feltehetően közvetlenül a korai intermedier gének aktivációján (Endo *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2006) vagy közvetetten bizonyos gliasejtek által kibocsájtott gyulladási citokinek, mint a interleukin-1 b (IL-1b) vagy a tumor nekrózis factor alfa (TNF-α), által aktivált jelátviteli utakon keresztül valósul meg (Qian *et al.*, 1993; Chakraborti *et al.*, 2003; Mlodzikowska-Albrecht *et al.*, 2007). Az egyik ilyen lehetséges útvonal a citokinek által közismerten aktivált MAPK/Erk út, amely az MMP-9 szintézist is szabályozza (Nagase & Woessner, 1999; Chakraborti *et al.*, 2003; Vezzani *et al.*, 2008).

5. Az MMP-9 lehetséges homeosztatikus szerepe a sejtpusztulással nem járó epileptikus aktivitást követően

A jelen munkában bemutatott két epilepszia modellben a rohamok hatására emelkedett MMP-9 szint feltételezhetően a növekedett neuronális aktivitás következménye és kevésbé valószínű, hogy a sejtpusztulással áll összefüggésben, mivel sem az absence epilepsziás WAG/Rij patkányokban, sem a 4-AP kezelt patkányok agyában nem figyelhető meg lézió vagy kiterjedt neurondegeneráció.

A hosszantartó depolarizáció számos szignalizációs útvonalat aktivál, melyek különböző transzkripciós faktorokat (elsősorban AP-1 és CREB) szabályoznak. A génexpresszió rohamok általi változásának egyik első példája a korai gének közé tartozó c-fos (Wu *et al.*, 2009), FosB vagy c-jun (Dragunow & Robertson, 1987; Gass *et al.*, 1995) szintjének megnövekedése a rohamokat követően. A rohamok feltehetően egyidőben patológiás és protektív mechanizmusokat is beindítanak a sejtekben (Herdegen & Leah, 1998; Greene *et al.*, 2007; Holopainen, 2008),

Az MMP-k általi extracelluláris proteolízis mindkét típusú folyamatban feltehetően részt vesz. A folyamatosan magasabb pro-MMP-9 szint hatására fokozódik az extracelluláris mátrix komponensek és egyéb extracelluláris fehérjék proteolízise. A peri-neuronális szerkezet proteolitikus kontrollja egy gyors lehetőséget kínál a szinaptikus hatékonyság homeosztatikus szabályozására. Ennek megfelelően az idegi depolarizációt követő MMP-9 indukció egy elképzelhető feed-back mechanizmus lehet a sejt excitabilitásának szabályozásában. Az MMP-9 LTP (Nagy et al., 2006; Okulski et al., 2007) és retina fényadaptációs kísérletekben (Ryu *et al.*, 2008) is aktiválódik, a zselatinázok szerepe a fiziológiás szinaptikus plaszticitásban ismert.

A homeosztatikus szinaptikus plaszticitással kapcsolatos feltélelezések szerint az idegrendszer olyan plasztikus változásokat képes előidézni, melyek ellensúlyozzák a neuronális excitabilitásban bekövetkező változásokat (Turrigiano & Nelson, 2004; Papp *et al.*, 2007; Turrigiano, 2008), mint például a neuronális aktivitás jelentős fokozódását a rohamok során.

Egyik általunk használt epilepszia modell sem hozható összefüggésbe olyan aberráns plasztikus folyamatokkal, mint az abnormális szinaptogenezis, axonburjánzás vagy a dendrittüskék számának abnormális irreverzibilis csökkenése, melyek a krónikus modellekben megfigyelhetőek (Szklarczyk *et al.*, 2002; Poolos, 2008; Zahn *et al.*, 2008). Még a nem altatott állatokban 4-AP-vel kiváltott súlyosabb rohamok is csak kismértékű dendrittüske szám

csökkenéshez és a dendritek enyhe duzzadásához vezetnek (Wilczynski *et al.*, 2008), amely folyamatok inkább egy homeosztatikus szabályozás részei.

Ha az MMP-9 aktiváció nem az aberráns plaszticitásért felelős az általunk bemutatott két modellben, akkor hasonló mechanizmusokon keresztül feltehetően egyfajta protektív homeosztatikus plaszticitás része lehet, amelyről a bevezetésben részletesen is szó volt. Ezt a funkcióját valószínűleg olyan extracelluláris szubsztrátokon keresztül fejti ki, mint például az integrin (Nagase & Woessner, 1999; Gall & Lynch, 2004; Nagy *et al*., 2006), cadherinek (Rensing *et al.*, 2005) vagy β-dystroglycan (Yamada *et al*., 2001; Kaczmarek *et al*., 2002; Michaluk *et al*., 2007;). Az MMP-9 proteolízis hatással lehet a szinapszist érintő strukturális változásokra, mint például dendrittüskék formájának változása a β-disztroglikán (Michaluk *et al*., 2007) vagy ICAM-5 (Steinhusen *et al.*, 2001) molekulák hasítása által.

Az MMP-9 feltehetően befolyásolja a szinaptikus signalingot mind az NMDA (Michaluk *et al*., 2009), mind az AMPA típusú receptorok hasításán/modifikációján keresztül (Gawlak *et al*., 2009). Az enzim direkt hat az NMDA és AMPA receptorokra, melyek számának, elhelyezkedésének, doménösszetételének változásai fontos szerepet játszanak a sejtek excitabilitásának beállításában (Michaluk *et al.,* 2009; Pauly *et al*., 2008). Ezen ionotrópos glutamát receptorokat érintő változások csökkenthetik a glutamátreg szinapszisok hatékonyságát ismétlődő 4-AP kiváltott rohamok esetén (Tian *et al.*, 2007; Borbely *et al.*, 2009). Ez az aktivitás függő szinaptikus hangolás a fokozott idegi aktivitást kompenzáló homeosztatikus plaszticitás része.

Elképzelhető, hogy ezen átalakulások előfeltétele az MMP-9 mRNS dendritekbe történő aktivitás-függő transzportja, amely jelenséget a kainát modellben figyeltek meg (Konopacki *et al*., 2007). A rohamokat követő reverzibilis dendrittüske redukció csökkentheti az excitabilitást és segítheti a „felépülést" a rohamok okozta károsodások után (Vilagi *et al.*, 2009), tehát a dedrittüskék valamilyen módon „pufferelik" az excitotoxicitást (Muller *et al.*, 1993; Majewska *et al.*, 2000). Ezen morfológiai változások igen gyorsan, az LTP kialakulásának sebességével összemérhetően zajlanak (Yuste & Denk, 1995). Ezt erősíti meg az az eredmény, hogy az MMP-9 deficiens knock-out egerekben enyhébb a rohamokat követő dendrittüske szám csökkenés (Wilczynski *et al*., 2008).

Érdekes módon abszence epilepszia modellekben nehezebben válthatók ki másodlagosan generalizált rohamok kaináttal (MacLusky *et al.*, 2005) vagy az ún „kindling módszerrel" (Eskazan *et al.*, 2002; Akman *et al.*, 2008; Gurbanova *et al.*, 2008). Ez arra enged következtetni, hogy a genetikailag epilepsziás agy „védi" magát az erőteljes rohamok ellen. A megfigyelés hogy a 4-AP kezelés hatása enyhébb a kaináttal kezelt krónikusan epilepsziás patkányok

esetében szintén feltételezi bizonyos homeosztatikus plaszticitás létezését rohamokat követően (Zahn *et al*., 2008).

A zselatinázoknak a generalizált abszence epilepsziában betöltött szerepének további tanulmányozása céljából Kovács és munkatársai laboratóriumunkkal kollaborációban további érdekes eredményre jutott az SWD-k és az MMP-9 aktivitása között. Két különböző MMP inhibítor hatását vizsgálták az SWD-k számára vonatkozóan. A tetraciklin családba tartozó Doxiciklin, az MMP-9 nem-szelektív inhibítoraként hat az agyban (Onat *et al.*, 2007b) és koncentrációjától függően megnövelte az SWD-k számát és hosszát 1 illetve 4 órán keresztül. Egy másik, széles spektrumú MMP inhibítor a GM6001 (N-[2(R)-2-(hydroxamido carbonylmethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophane methylamide) hasonló hatással volt. Ezek az eredmények ismét megerősítik, hogy az MMP-9 indukciója az epilepsziás agyban része lehet a rohamokat ellensúlyozó homeosztatikus szinaptikus plaszticitási folyamatoknak (Lee *et al.*, 2009; Kovacs *et al.*, 2011a).

Hogyan vezet a megváltozott idegi aktivitás a fent említett homeosztatikus változásokhoz? Hogyan fordítódik le az idegi aktivitás olyan szignállá amelyet a szinapszisok értelmezni tudnak? Az első szóbajött „aktivitás" szignál a BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), mely a kortikális piramissejtekből aktivitás-függő módon szabadul fel és elsősorban csökkenti mEPSC-k amplitúdóját az excitatórikus szinapsokban (Kovacs *et al.*, 2011b). Számos kísérletben a BDNF növelheti is az mEPSC-k amplitúdóját (Rutherford *et al.*, 1998), tehát valószínű, hogy a BDNF krónikus hatása több faktor függvénye (BDNF mennyisége, sejttípus, agyterület, az agy fejlettségi állapota, stb.). A közelmúltban több tanulmány is megmutatta, hogy az elsősorban gliális eredetű TNF-α gyorsan növeli a mEPSCk amplitúdóját és az AMPA receptorok számát a sejtfelszínen (Beattie *et al.*, 2002; Copi *et al.*, 2005). Az egész hálózatokra kiterjedő homeosztatikus változások befolyásolják a TNF-α és/vagy BDNF szinteket, melyek ezek után felelősek a sejtfelszíni AMPA receptorok számáért.

KONKLÚZIÓ

.

Az MMP-9 egy olyan zink-függő endopeptidáz, amely a sejtek közötti térben számos extracelluláris molekulát, adhéziós molekulát és növekedési faktort módosít. Szinaptikus lokalizációjának köszönhetően az MMP-9 az utóbbi időben jelentős figyelmet kapott a szinaptikus plaszticitással kapcsolatban, főleg annak fényében, hogy a zselatinázok indukciója úgy tűnik, hogy függ az idegi aktivitástól.

A sejtek fokozott tüzelésének hatására rövid idő elteltével az MMP-9 szintje emelkedik a mátrixban, az aktív forma aránya megnövekszik. Az enzimek változásokat okoznak az ECM szerkezetében, amely úgy módosítja a szinapszist, hogy az vagy facilitálja, vagy éppen csökkenti a szinaptikus hatékonyságot, így befolyásolva a funkcionális idegi plaszticitást. Az MMP-9 tanulásban, tehát a fiziológiás szinaptikus plaszticitásban játszott szerepéről már régóta esik szó.

Számos kísérlet szolgáltat evidenciát arra nézve, hogy az MMP-9 aktivitás változásai jelentősek a glutamát-rendszer diszfunkciója esetén is. Az MMP-9 enzim szintjének és aktivitásának növekedését figyelték meg a kainát vagy pilocarpin kezelést követő *status epilepticus* hatására. Ezekben a modellekben az MMP-9 szerepet játszik a sejtpusztulásban, az extracelluláris mátrix átépülésében, a dendrittüskék formájának, számának módosításában, az ún. aberráns szinaptikus plaszticitás folyamataiban. Ezen folyamatok mind részét képezik az epileptogenezisnek nevezett jelenségnek, amely krónikus rohamok kialakulásáért felelős mind a kainát modellben, mind a humán temporális-lebeny epilepszia esetében.

Azonban közdutott, hogy gyakran akár súlyos sérülést, egyszeri rohamot követően nem fejlődik ki krónikus epilepszia, tehát az esetek akár nagyobb részében az iniciatív fázist nem követi epileptogenezis. Elképzelhető, hogy ilyenkor az agy képes „helyrehozni" a sérülést, „ellensúlyozni" a hiperexcitabilitást bizonyos homeosztatikus plaszticitási folyamatok segítségével anélkül, hogy az hosszútávú károsodást okozna. Az epileptogenezis feltehetően a homeosztatikus és aberráns (vagy regeneratív) plaszticitás között fennálló egyensúly megbomlásának következménye.

Akut epilepsziás esetekben az MMP-9 szintjeinek lehetséges változása és annak szerepe eddig kevésbé vizsgált. Egyenlőre tisztázatlan, hogy a végül a rohamok ellen sikeresen „védekező" sejtek szintetizálják-e a zselatinázokat és ha igen, annak milyen szerepe lehet a rohamokat követő folyamatokban. A spontán visszatérő rohamokhoz nem vezető és kiterjedt sejtpusztulással nem járó akut 4-AP modellben mind a proforma szintézisét, mind annak aktivációját megfigyeltük a rohamok után. Gyors MMP-9 aktiváció figyelhető mega rohamok

fókuszának környékén, a parietális cortexben illetve a hippocampusban, mind ipsi-, mind contralaterálisan. Ez a növekedés az aktív formában feltehetően a már meglévő pro-MMP-9 készletből történik, proteolitikus aktivációval. A rohamok által kiváltott protein szintézis hatása csak bizonyos késéssel, 6 illetve 24 órával a kezelés után figyelhető meg minden vizsgált agyterületen.

Arra is kíváncsiak voltunk, hogy az MMP-9 hogyan reagál a genetikus eredetű epilepsziák esetében, mivel az MMP-9 aktivitás-mintázatának vizsgálata a „rohamokhoz szokott" agyban szintén értékes információkat adhat arra vonatkozóan, hogy az enzim milyen szerepet játszik a rohamokat kompenzálni igyekvő homeosztatikus folyamatokban. A genetikailag epilepsziás WAG/Rij patkányokban bemutattuk, hogy az MMP-9 szintek szignifikánsan magasabbak a felnőtt állatban a rohamgenezisért felelős területeken és azt, hogy a napi enzimaktivitás korrelál az SWD genezis napi ritmusával. Laboratóriumunk egy másik munkájából az is kiderült, hogy az MMP-9 gátlása az SWD-k számának növekedését okozza. A folyamatosan emelkedett MMP-9 szint feltehetően egy olyan proteolitikus „készenlétet" jelent, amely gyors megoldásként szolgálhat a szinaptikus hatékonyság állítására ECM komponensek és a peri-neuronális struktúra proteolízisén keresztül. Ez az ún „szinaptikus hangolás" a neurális excitabilitás kontrolljának, a homeosztatikus szinaptikus plaszticitásnak a része.

Az MMP-9 pontos hatásmechanizmusai ebben a folyamatban még nem teljesen ismertek, de néhány lehetséges célmolekuláról már esett szó. Eredményeink fényében feltételezzük, hogy az MMP-9 kettős szerepet tölthet be a különböző epilepsziás folyamatokban a rohamok eredetének, helyének, erősségének függvényében. A krónikus rohamok kialakulásához vezető, epileptogenezissel járó kórképekben a sejtpusztulás és az aberráns szinaptikus plaszticitási folyamatok fontos szereplője. Elképzelhető azonban, hogy az akut, gyengébb rohamokkal és kisebb degenerációval járó epilepsziás állapot, valamint a genetikus absence epilepszia esetében a receptorok módosításán és a dendrittüskék reverzibilis eliminációján keresztül ellensúlyozni igyekszik a fokozott idegi aktivitást.

Az MMP inhibítorok alkalmazása sokat emlegetett lehetőség az epilepszia kezelésében, az epileptogenezisben játszott szerepe alapján. Eredményeink rámutatnak, hogy a széles spektrumú inhibítorok alkalmazása akár káros hatással is lehet bizonyos esetekben, amennyiben az MMP-9 homeosztatikus szerepe bebizonyosodik. Természetesen további kutatások szükségesek az MMP-9 pontos szerepének tisztázására e két bemutatott modellben, de az általunk alkalmazott paradigmák mindenképpen hasznosak lehetnek a megnövekedett MMP-9 aktivitás homeosztatikus szerepének vizsgálatára a központi idegrendszerben.

ÖSSZEFOGLALÓ

Az MMP-9 egy olyan zink-függő endopeptidáz, amely a sejtek közötti térben számos extracelluláris molekulát, adhéziós molekulát és növekedési faktort módosít, indukciója függ az idegi aktivtástól. Szinaptikus lokalizációjának köszönhetően az MMP-9 az utóbbi időben jelentős figyelmet kapott a szinaptikus plaszticitással kapcsolatban, feltehetően fontos szerepet tölt be a tanulás folyamataiban. Az MMP-9 enzim szintjének és aktivitásának növekedését figyelték meg a kainát kezelést követő *status epilepticus* hatására is: szerepet játszik a sejtpusztulásban, az extracelluláris mátrix átépülésében, az ún. aberráns szinaptikus plaszticitás folyamataiban – a krónikus epilepszia kialakulásához vezető epileptogenezisben. Akut epilepsziás esetekben illetve genetikai modellekben az MMP-9 szintjeinek lehetséges változása és annak szerepe eddig kevésbé vizsgált. Olyan epilepszia modellekben vizsgáltuk a zselatinázok aktivációját, melyek nem járnak kiterjedt degenerációval, így a zselatináz indukció sejtpusztuláshoz és aberráns plaszticitáshoz köthető hatásait kizárhatjuk. Egy kémiailag indukált akut modellt és egy genetikailag epilepsziás krónikus modellt, a WAG/Rij patkánytörzset használtunk vizsgálatainkhoz. A spontán visszatérő rohamokhoz nem vezető és kiterjedt sejtpusztulással nem járó akut 4-AP modellben mind a proforma szintézisét, mind annak aktivációját megfigyeltük a rohamok után. A genetikailag epilepsziás WAG/Rij patkányokban bemutattuk, hogy az MMP-9 szintek szignifikánsan magasabbak a felnőtt állatban a rohamgenezisért felelős területeken és azt, hogy a napi enzimaktivitás korrelál az SWD genezis napi ritmusával. Eredményeink fényében feltételezzük, hogy az MMP-9 kettős szerepet tölthet be a különböző epilepsziás folyamatokban a rohamok eredetének, helyének, erősségének függvényében: az epileptogenezissel járó kórképekben a sejtpusztulás és az aberráns szinaptikus plaszticitási folyamatok fontos szereplője, a gyengébb rohamokkal és kisebb degenerációval járó epilepsziás állapotok esetében a receptorok módosításán és a dendrittüskék reverzibilis eliminációján keresztül ellensúlyozni igyekszik a fokozott idegi aktivitást a szinapszisban, feltehetően az ún. homosztatikus plaszticitás részeként. Az MMP-9 pontos hatásmechanizmusai ebben a folyamatban még nem teljesen ismertek, de eredményeink új aspektusból világíthatják meg az MMP-9 szerepét a fiziológiás és aberráns plaszticitási folyamatokban, különös tekintettel az epilepsziában betöltött funkcióikra.

SUMMARY

Matrix metalloproteases (MMPs) degrade or modify extracellular matrix or membrane-bound proteins in the brain. MMP-2 and MMP-9 are activated by treatments that result in a sustained neuronal depolarization and are thought to contribute to neuronal death and structural remodeling. At the synapse, MMP actions on extracellular proteins contribute to changes in synaptic efficacy during learning paradigms. They are also activated during epileptic seizures, and MMP-9 has been associated with the establishment of aberrant synaptic connections after neuronal death induced by kainate treatment. It remains unclear whether MMPs are activated by epileptic activities that do not induce cell death. Here we examine this point in two animal models of epilepsy that do not involve extensive cell damage. We detected an elevation of MMP-9 enzymatic activity in cortical regions of secondary generalization after focal seizures induced by 4-aminopyridine (4-AP) application in rats. Pro-MMP-9 levels were also higher in Wistar Glaxo Rijswijk (WAG/Rij) rats, a genetic model of generalized absence epilepsy, than they were in Sprague–Dawley rats, and this elevation was correlated with diurnally occurring spike-wave-discharges in WAG/Rij rats. The increased enzymatic activity of MMP-9 in these two different epilepsy models is associated with synchronized neuronal activity that does not induce widespread cell death. In these epilepsy models MMP-9 induction may therefore be associated with functions such as homeostatic synaptic plasticity rather than neuronal death. Further studies are needed to specify the functions of elevated MMP-9 enzymatic activity in these two models, but they should be valuable in studies on homeostatic functions of MMP-9 activity in the epileptic brain.

REFERENCIÁK LISTÁJA

.

Abbott LF & Nelson SB. (2000). Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat Neurosci* **3 Suppl,** 1178-1183.

Acsady L, Kamondi A, Sik A, Freund T & Buzsaki G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci* **18,** 3386-3403.

Akman O, Karson A, Aker RG, Ates N & Onat FY. (2008). Hippocampal kindling in rats with absence epilepsy resembles amygdaloid kindling. *Epilepsy Res* **81,** 211-219.

Akool el S, Kleinert H, Hamada FM, Abdelwahab MH, Forstermann U, Pfeilschifter J & Eberhardt W. (2003). Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol* **23,** 4901-4916.

Anthony DC, Miller KM, Fearn S, Townsend MJ, Opdenakker G, Wells GM, Clements JM, Chandler S, Gearing AJ & Perry VH. (1998). Matrix metalloproteinase expression in an experimentally-induced DTH model of multiple sclerosis in the rat CNS. *J Neuroimmunol* **87,** 62-72.

Aroniadou-Anderjaska V, Qashu F & Braga MF. (2007). Mechanisms regulating GABAergic inhibitory transmission in the basolateral amygdala: implications for epilepsy and anxiety disorders. *Amino Acids* **32,** 305-315.

Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME & Lo EH. (2001). Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* **21,** 7724-7732.

Avoli M, Psarropoulou C, Tancredi V & Fueta Y. (1993). On the synchronous activity induced by 4-aminopyridine in the CA3 subfield of juvenile rat hippocampus. *J Neurophysiol* **70,** 1018-1029.

Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ & Tokes ZA. (1996). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci* **16,** 7910-7919.

Balu DT & Lucki I. (2009). Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev* **33,** 232-252.

Baracskay P, Szepesi Z, Orban G, Juhasz G & Czurko A. (2008). Generalization of seizures parallels the formation of "dark" neurons in the hippocampus and pontine reticular formation after focal-cortical application of 4-aminopyridine (4-AP) in the rat. *Brain Res* **1228,** 217-228.

Barna B, Szasz A, Vilagi I & Szente M. (2000). Anticonvulsive effect of AMPA receptor antagonist GYKI 52466 on 4-aminopyridine-induced cortical ictal activity in rat. *Brain Res Bull* **51,** 241-248.

Barna B, Szente M & Szasz A. (1999). The anticonvulsive effect of non-NMDA antagonist GYKI 52466 on 3-aminopyridine-induced primary and secondary cortical ictal activity in rat. *Acta Biol Hung* **50,** 257-267.

Barrett TJ & Spelsberg TC. (1998). Steroid receptors at the nexus of transcriptional regulation. *J Cell Biochem Suppl* **30-31,** 185-193.

Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS & Malenka RC. (2002). Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science* **295,** 2282-2285.

Ben-Ari Y. (2001). Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia* **42 Suppl 3,** 5-7.

Ben-Ari Y, Crepel V & Represa A. (2008). Seizures beget seizures in temporal lobe epilepsies: the boomerang effects of newly formed aberrant kainatergic synapses. *Epilepsy Curr* **8,** 68-72.

Ben-Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G & Naquet R. (1981). Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* **6,** 1361-1391.

Benbow U & Brinckerhoff CE. (1997). The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol* **15,** 519-526.

Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E, Nanobashvili A, Kokaia M & Lindvall O. (1997). Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94,** 10432-10437.

Bernard-Trifilo JA, Kramar EA, Torp R, Lin CY, Pineda EA, Lynch G & Gall CM. (2005). Integrin signaling cascades are operational in adult hippocampal synapses and modulate NMDA receptor physiology. *J Neurochem* **93,** 834-849.

Bilousova TV, Rusakov DA, Ethell DW & Ethell IM. (2006). Matrix metalloproteinase-7 disrupts dendritic spines in hippocampal neurons through NMDA receptor activation. *J Neurochem* **97,** 44-56.

Blumenfeld H, Klein JP, Schridde U, Vestal M, Rice T, Khera DS, Bashyal C, Giblin K, Paul-Laughinghouse C, Wang F, Phadke A, Mission J, Agarwal RK, Englot DJ, Motelow J, Nersesyan H, Waxman SG & Levin AR. (2008). Early treatment suppresses the development of spike-wave epilepsy in a rat model. *Epilepsia* **49,** 400-409.

Bodey B, Bodey B, Jr., Groger AM, Siegel SE & Kaiser HE. (2001). Invasion and metastasis: the expression and significance of matrix metalloproteinases in carcinomas of the lung. *In Vivo* **15,** 175-180.

Borbely S, Dobo E, Czege D, Molnar E, Bakos M, Szucs B, Vincze A, Vilagi I & Mihaly A. (2009). Modification of ionotropic glutamate receptor-mediated processes in the rat hippocampus following repeated, brief seizures. *Neuroscience* **159,** 358-368.

Bozdagi O, Nagy V, Kwei KT & Huntley GW. (2007). In vivo roles for matrix metalloproteinase-9 in mature hippocampal synaptic physiology and plasticity. *J Neurophysiol* **98,** 334-344.

Bramham CR. (2008). Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Curr Opin Neurobiol* **18,** 524-531.

Brew K, Dinakarpandian D & Nagase H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* **1477,** 267-283.

Brinckerhoff CE & Matrisian LM. (2002). Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3,** 207-214.

Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP & Cheresh DA. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* **85,** 683-693.

Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, Rikhter TY & Coulter DA. (1998). Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med* **4,** 1166-1172.

Burrage PS, Huntington JT, Sporn MB & Brinckerhoff CE. (2007). Regulation of matrix metalloproteinase gene expression by a retinoid X receptor-specific ligand. *Arthritis Rheum* **56,** 892-904.

Buzsaki G, Masliah E, Chen LS, Horvath Z, Terry R & Gage FH. (1991). Hippocampal grafts into the intact brain induce epileptic patterns. *Brain Res* **554,** 30-37.

Candelario-Jalil E, Yang Y & Rosenberg GA. (2009). Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience* **158,** 983-994.

Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaitre V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiro S, Lupu F & Collen D. (1997). Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet* **17,** 439-444.

Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A & Chakraborti T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* **253,** 269-285.

Chavis P & Westbrook G. (2001). Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature* **411,** 317-321.

Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL & Edwards DR. (2008). The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* **40,** 1362-1378.

Coenen AM, Drinkenburg WH, Inoue M & van Luijtelaar EL. (1992). Genetic models of absence epilepsy, with emphasis on the WAG/Rij strain of rats. *Epilepsy Res* **12,** 75-86.

Coenen AM, Drinkenburg WH, Peeters BW, Vossen JM & van Luijtelaar EL. (1991). Absence epilepsy and the level of vigilance in rats of the WAG/Rij strain. *Neurosci Biobehav Rev* **15,** 259-263.

Coenen AM & Van Luijtelaar EL. (2003). Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet* **33,** 635-655.

Cohen I, Navarro V, Le Duigou C & Miles R. (2003). Mesial temporal lobe epilepsy: a pathological replay of developmental mechanisms? *Biol Cell* **95,** 329-333.

Copi A, Jungling K & Gottmann K. (2005). Activity- and BDNF-induced plasticity of miniature synaptic currents in ES cell-derived neurons integrated in a neocortical network. *J Neurophysiol* **94,** 4538-4543.

Creemers E, Cleutjens J, Smits J, Heymans S, Moons L, Collen D, Daemen M & Carmeliet P. (2000). Disruption of the plasminogen gene in mice abolishes wound healing after myocardial infarction. *Am J Pathol* **156,** 1865-1873.

Cuzner ML, Gveric D, Strand C, Loughlin AJ, Paemen L, Opdenakker G & Newcombe J. (1996). The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. *J Neuropathol Exp Neurol* **55,** 1194-1204.

Csordas A, Mazlo M & Gallyas F. (2003). Recovery versus death of "dark" (compacted) neurons in non-impaired parenchymal environment: light and electron microscopic observations. *Acta Neuropathol* **106,** 37-49.

Danober L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M & Marescaux C. (1998). Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol* **55,** 27-57.

Declerck AC & Wauquier A. (1991). Influence of antiepileptic drugs on sleep patterns. *Epilepsy Res Suppl* **2,** 153-163.

Delorenzo RJ, Sun DA & Deshpande LS. (2005). Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintainance of epilepsy. *Pharmacol Ther* **105,** 229-266.

Dragunow M & Robertson HA. (1987). Generalized seizures induce c-fos protein(s) in mammalian neurons. *Neurosci Lett* **82,** 157-161.

Drinkenburg WH, Coenen AM, Vossen JM & Van Luijtelaar EL. (1991). Spike-wave discharges and sleep-wake states in rats with absence epilepsy. *Epilepsy Res* **9,** 218-224.

Dzwonek J, Rylski M & Kaczmarek L. (2004). Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Lett* **567,** 129-135.

Egeblad M & Werb Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2,** 161-174.

Endo A, Nagai N, Urano T, Takada Y, Hashimoto K & Takada A. (1999). Proteolysis of neuronal cell adhesion molecule by the tissue plasminogen activator-plasmin system after kainate injection in the mouse hippocampus. *Neurosci Res* **33,** 1-8.

Epsztein J, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y & Crepel V. (2005). Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats. *J Neurosci* **25,** 8229-8239.

Eskazan E, Onat FY, Aker R & Oner G. (2002). Resistance to propagation of amygdaloid kindling seizures in rats with genetic absence epilepsy. *Epilepsia* **43,** 1115-1119.

Ethell IM & Ethell DW. (2007). Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *J Neurosci Res* **85,** 2813-2823.

Eun JP, Choi HY & Kwak YG. (2004). Proteomic analysis of human cerebral cortex in epileptic patients. *Exp Mol Med* **36,** 185-191.

Fanjul-Fernández M FA, Cabrera S, López-Otín C. (2010). Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* **2010 Jan;1803(1):3-19.**

Fujikawa DG. (2005). Prolonged seizures and cellular injury: understanding the connection. *Epilepsy Behav* **7 Suppl 3,** S3-11.

Gall CM & Lynch G. (2004). Integrins, synaptic plasticity and epileptogenesis. *Adv Exp Med Biol* **548,** 12-33.

Gallyas F, Hsu M & Buzsaki G. (1993). Four modified silver methods for thick sections of formaldehyde-fixed mammalian central nervous tissue: 'dark' neurons, perikarya of all neurons, microglial cells and capillaries. *J Neurosci Methods* **50,** 159-164.

Gallyas F, Kiglics V, Baracskay P, Juhasz G & Czurko A. (2008). The mode of death of epilepsy-induced "dark" neurons is neither necrosis nor apoptosis: an electron-microscopic study. *Brain Res* **1239,** 207-215.

Gass P, Katsura K, Zuschratter W, Siesjo B & Kiessling M. (1995). Hypoglycemia-elicited immediate early gene expression in neurons and glia of the hippocampus: novel patterns of FOS, JUN, and KROX expression following excitotoxic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* **15,** 989-1001.

Gawlak M, Gorkiewicz T, Gorlewicz A, Konopacki FA, Kaczmarek L & Wilczynski GM. (2009). High resolution in situ zymography reveals matrix metalloproteinase activity at glutamatergic synapses. *Neuroscience* **158,** 167-176.

Golomb D, Wang XJ & Rinzel J. (1996). Propagation of spindle waves in a thalamic slice model. *J Neurophysiol* **75,** 750-769.

Gomis-Ruth FX. (2009). Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem* **284,** 15353-15357.

Greene ND, Bamidele A, Choy M, de Castro SC, Wait R, Leung KY, Begum S, Gadian DG, Scott RC & Lythgoe MF. (2007). Proteome changes associated with hippocampal MRI abnormalities in the lithium pilocarpine-induced model of convulsive status epilepticus. *Proteomics* **7,** 1336-1344.

Gu P, Li Y, Shang Y, Hou Y & Zhao S. (2010). Proliferation changes in dentate gyrus of hippocampus during the first week following kainic acid-induced seizures. *Yakugaku Zasshi* **130,** 1751-1754.

Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC & Lipton SA. (2002). S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* **297,** 1186-1190.

Guey J, Bureau M, Dravet C & Roger J. (1969). A study of the rhythm of petit mal absences in children in relation to prevailing situations. The use of EEG telemetry during psychological examinations, school exercises and periods of inactivity. *Epilepsia* **10,** 441-451.

Gurbanova AA, Aker RG, Sirvanci S, Demiralp T & Onat FY. (2008). Intra-amygdaloid injection of kainic acid in rats with genetic absence epilepsy: the relationship of typical absence epilepsy and temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **28,** 7828-7836.

Gursoy-Ozdemir Y, Qiu J, Matsuoka N, Bolay H, Bermpohl D, Jin H, Wang X, Rosenberg GA, Lo EH & Moskowitz MA. (2004). Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9. *J Clin Invest* **113,** 1447-1455.

Hahn-Dantona E, Ruiz JF, Bornstein P & Strickland DK. (2001). The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem* **276,** 15498-15503.

Heemskerk FM, Schrama LH, Ghijsen WE, De Graan PN, Lopes da Silva FH & Gispen WH. (1991). Presynaptic mechanism of action of 4-aminopyridine: changes in intracellular free Ca2+ concentration and its relationship to B-50 (GAP-43) phosphorylation. *J Neurochem* **56,** 1827-1835.

Herdegen T & Leah JD. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* **28,** 370-490.

Herman ST. (2002). Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis. *Neurology* **59,** S21-26.

Holopainen IE. (2008). Seizures in the developing brain: cellular and molecular mechanisms of neuronal damage, neurogenesis and cellular reorganization. *Neurochem Int* **52,** 935-947.

Holtmaat A, De Paola V, Wilbrecht L & Knott GW. (2008). Imaging of experience-dependent structural plasticity in the mouse neocortex in vivo. *Behav Brain Res* **192,** 20-25.

Holtmaat A, Wilbrecht L, Knott GW, Welker E & Svoboda K. (2006). Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature* **441,** 979-983.

Houser CR. (1990). Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* **535,** 195-204.

Huang Y, Lu MQ, Li H, Xu C, Yi SH & Chen GH. (2006). Occurrence of cGMP/nitric oxide-sensitive store-operated calcium entry in fibroblasts and its effect on matrix metalloproteinase secretion. *World J Gastroenterol* **12,** 5483-5489.

Hwang IY, Sun ES, An JH, Im H, Lee SH, Lee JY, Han PL, Koh JY & Kim YH. (2011). Zinc-triggered induction of tissue plasminogen activator by brain-derived neurotrophic factor and metalloproteinases. *J Neurochem* **118,** 855-863.

Imai K, Shikata H & Okada Y. (1995). Degradation of vitronectin by matrix metalloproteinases-1, -2, -3, -7 and -9. *FEBS Lett* **369,** 249-251.

Inspector M, Aharon-Perez J, Glass-Marmor L & Miller A. (2005). Matrix metalloproteinase-9, its tissue inhibitor(TIMP)-1 and CRP in Alzheimer's disease. *Eur Neurol* **53,** 155-157.

Isaac JT, Ashby MC & McBain CJ. (2007). The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron* **54,** 859-871.

Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, Aoki T & Seiki M. (2001). Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J* **20,** 4782-4793.

Jackson BC, Nebert DW & Vasiliou V. (2010). Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Hum Genomics* **4,** 194-201.

Jaworski J, Biedermann IW, Lapinska J, Szklarczyk A, Figiel I, Konopka D, Nowicka D, Filipkowski RK, Hetman M, Kowalczyk A & Kaczmarek L. (1999). Neuronal excitation-driven and AP-1-dependent activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 gene expression in rodent hippocampus. *J Biol Chem* **274,** 28106-28112.

Jourquin J, Tremblay E, Decanis N, Charton G, Hanessian S, Chollet AM, Le Diguardher T, Khrestchatisky M & Rivera S. (2003). Neuronal activity-dependent increase of net matrix metalloproteinase activity is associated with MMP-9 neurotoxicity after kainate. *Eur J Neurosci* **18,** 1507-1517.

Kaczmarek L, Lapinska-Dzwonek J & Szymczak S. (2002). Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *EMBO J* **21,** 6643-6648.

Konopacki FA, Rylski M, Wilczek E, Amborska R, Detka D, Kaczmarek L & Wilczynski GM. (2007). Synaptic localization of seizure-induced matrix metalloproteinase-9 mRNA. *Neuroscience* **150,** 31-39.

Kotra LP, Zhang L, Fridman R, Orlando R & Mobashery S. (2002). N-Glycosylation pattern of the zymogenic form of human matrix metalloproteinase-9. *Bioorg Chem* **30,** 356-370.

Kovacs A, Mihaly A, Komaromi A, Gyengesi E, Szente M, Weiczner R, Krisztin-Peva B, Szabo G & Telegdy G. (2003). Seizure, neurotransmitter release, and gene expression are closely related in the striatum of 4-aminopyridine-treated rats. *Epilepsy Res* **55,** 117-129.

Kovacs Z, Czurko A, Kekesi KA & Juhasz G. (2011a). The effect of intraperitoneally administered dimethyl sulfoxide on absence-like epileptic activity of freely moving WAG/Rij rats. *J Neurosci Methods* **197,** 133-136.

Kovacs Z, Kekesi KA, Baracskay P, Juhasz G & Czurko A. (2011b). Doxycycline could aggravate the absence-like epileptic seizures of WAG/Rij rats via matrix metalloproteinase inhibition. *Neurochem Int* **59,** 563-566.

Kuruba R, Hattiangady B & Shetty AK. (2009). Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* **14 Suppl 1,** 65-73.

Lee H, Park JW, Kim SP, Lo EH & Lee SR. (2009). Doxycycline inhibits matrix metalloproteinase-9 and laminin degradation after transient global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* **34,** 189-198.

Li F, Chong ZZ & Maiese K. (2004a). Navigating novel mechanisms of cellular plasticity with the NAD+ precursor and nutrient nicotinamide. *Front Biosci* **9,** 2500-2520.

Li MX, Jia M, Yang LX, Jiang H, Lanuza MA, Gonzalez CM & Nelson PG. (2004b). The role of the theta isoform of protein kinase C (PKC) in activity-dependent synapse elimination: evidence from the PKC theta knock-out mouse in vivo and in vitro. *J Neurosci* **24,** 3762-3769.

Lin YW, Min MY, Chiu TH & Yang HW. (2003). Enhancement of associative long-term potentiation by activation of beta-adrenergic receptors at CA1 synapses in rat hippocampal slices. *J Neurosci* **23,** 4173-4181.

Lissin DV, Gomperts SN, Carroll RC, Christine CW, Kalman D, Kitamura M, Hardy S, Nicoll RA, Malenka RC & von Zastrow M. (1998). Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95,** 7097-7102.

MacLusky NJ, Luine VN, Hajszan T & Leranth C. (2005). The 17alpha and 17beta isomers of estradiol both induce rapid spine synapse formation in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *Endocrinology* **146,** 287-293.

Magloczky Z & Freund TF. (1993). Selective neuronal death in the contralateral hippocampus following unilateral kainate injections into the CA3 subfield. *Neuroscience* **56,** 317-335.

Majewska A, Tashiro A & Yuste R. (2000). Regulation of spine calcium dynamics by rapid spine motility. *J Neurosci* **20,** 8262-8268.

Malenka RC & Bear MF. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44,** 5-21.

Malhotra J, Velpandian T & Gupta YK. (1997). A simple device for recording seizure activity in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **19,** 47-51.

Manabe S, Gu Z & Lipton SA. (2005). Activation of matrix metalloproteinase-9 via neuronal nitric oxide synthase contributes to NMDA-induced retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46,** 4747-4753.

Marescaux C, Vergnes M & Depaulis A. (1992). Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg--a review. *J Neural Transm Suppl* **35,** 37-69.

McCawley LJ & Matrisian LM. (2001). Tumor progression: defining the soil round the tumor seed. *Curr Biol* **11,** R25-27.

McFarlane S. (2003). Metalloproteases: carving out a role in axon guidance. *Neuron* **37,** 559-562.

McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I & Overall CM. (2002). Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* **100,** 1160-1167.

Medina-Ceja L, Morales-Villagran A & Tapia R. (2000). Action of 4-aminopyridine on extracellular amino acids in hippocampus and entorhinal cortex: a dual microdialysis and electroencehalographic study in awake rats. *Brain Res Bull* **53,** 255-262.

Meeren H, van Luijtelaar G, Lopes da Silva F & Coenen A. (2005). Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Arch Neurol* **62,** 371-376.

Meeren HK, Pijn JP, Van Luijtelaar EL, Coenen AM & Lopes da Silva FH. (2002). Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci* **22,** 1480-1495.

Meighan PC, Meighan SE, Davis CJ, Wright JW & Harding JW. (2007). Effects of matrix metalloproteinase inhibition on short- and long-term plasticity of schaffer collateral/CA1 synapses. *J Neurochem* **102,** 2085-2096.

Meighan SE, Meighan PC, Choudhury P, Davis CJ, Olson ML, Zornes PA, Wright JW & Harding JW. (2006). Effects of extracellular matrix-degrading proteases matrix metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity. *J Neurochem* **96,** 1227-1241.

Merlo D, Cifelli P, Cicconi S, Tancredi V & Avoli M. (2004). 4-Aminopyridine-induced epileptogenesis depends on activation of mitogen-activated protein kinase ERK. *J Neurochem* **89,** 654-659.

Michaluk P & Kaczmarek L. (2007). Matrix metalloproteinase-9 in glutamate-dependent adult brain function and dysfunction. *Cell Death Differ* **14,** 1255-1258.

Michaluk P, Kolodziej L, Mioduszewska B, Wilczynski GM, Dzwonek J, Jaworski J, Gorecki DC, Ottersen OP & Kaczmarek L. (2007). Beta-dystroglycan as a target for MMP-9, in response to enhanced neuronal activity. *J Biol Chem* **282,** 16036-16041.

Michaluk P, Mikasova L, Groc L, Frischknecht R, Choquet D & Kaczmarek L. (2009). Matrix metalloproteinase-9 controls NMDA receptor surface diffusion through integrin beta1 signaling. *J Neurosci* **29,** 6007-6012.

Midzianovskaia IS, Kuznetsova GD, Coenen AM, Spiridonov AM & van Luijtelaar EL. (2001). Electrophysiological and pharmacological characteristics of two types of spike-wave discharges in WAG/Rij rats. *Brain Res* **911,** 62-70.

Mihaly A, Szente M, Dubravcsik Z, Boda B, Kiraly E, Nagy T & Domonkos A. (1997). Parvalbumin- and calbindin-containing neurons express c-fos protein in primary and secondary (mirror) epileptic foci of the rat neocortex. *Brain Res* **761,** 135-145.

Misonou H, Mohapatra DP, Park EW, Leung V, Zhen D, Misonou K, Anderson AE & Trimmer JS. (2004). Regulation of ion channel localization and phosphorylation by neuronal activity. *Nat Neurosci* **7,** 711-718.

Mizoguchi H, Nakade J, Tachibana M, Ibi D, Someya E, Koike H, Kamei H, Nabeshima T, Itohara S, Takuma K, Sawada M, Sato J & Yamada K. (2011). Matrix Metalloproteinase-9 Contributes to Kindled Seizure Development in Pentylenetetrazole-Treated Mice by Converting Pro-BDNF to Mature BDNF in the Hippocampus. *J Neurosci* **31,** 12963-12971.

Mlodzikowska-Albrecht J, Steinborn B & Zarowski M. (2007). Cytokines, epilepsy and epileptic drugs--is there a mutual influence? *Pharmacol Rep* **59,** 129-138.

Morales-Villagran A, Lopez-Perez S, Medina-Ceja L & Tapia R. (1999). Cortical catecholamine changes and seizures induced by 4-aminopyridine in awake rats, studied with a dual microdialysis-electrical recording technique. *Neurosci Lett* **275,** 133-136.

Morales-Villagran A & Tapia R. (1996). Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochem Int* **28,** 35-40.

Moyer JR, Jr., Thompson LT & Disterhoft JF. (1996). Trace eyeblink conditioning increases CA1 excitability in a transient and learning-specific manner. *J Neurosci* **16,** 5536-5546.

Muller M, Gahwiler BH, Rietschin L & Thompson SM. (1993). Reversible loss of dendritic spines and altered excitability after chronic epilepsy in hippocampal slice cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90,** 257-261.

Murphy G & Nagase H. (2008). Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nat Clin Pract Rheumatol* **4,** 128-135.

Nagase H & Woessner JF, Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274,** 21491-21494.

Nagy V, Bozdagi O, Matynia A, Balcerzyk M, Okulski P, Dzwonek J, Costa RM, Silva AJ, Kaczmarek L & Huntley GW. (2006). Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J Neurosci* **26,** 1923-1934.

Niedermeyer E. (1996). Primary (idiopathic) generalized epilepsy and underlying mechanisms. *Clin Electroencephalogr* **27,** 1-21.

Nishikawa K & MacIver MB. (2000). Membrane and synaptic actions of halothane on rat hippocampal pyramidal neurons and inhibitory interneurons. *J Neurosci* **20,** 5915-5923.

Ogita K, Okuda H, Watanabe M, Nagashima R, Sugiyama C & Yoneda Y. (2005). In vivo treatment with the K+ channel blocker 4-aminopyridine protects against kainate-induced neuronal cell death through activation of NMDA receptors in murine hippocampus. *Neuropharmacology* **48,** 810-821.

Okulski P, Jay TM, Jaworski J, Duniec K, Dzwonek J, Konopacki FA, Wilczynski GM, Sanchez-Capelo A, Mallet J & Kaczmarek L. (2007). TIMP-1 abolishes MMP-9-dependent long-lasting long-term potentiation in the prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* **62,** 359-362.

Olson MW, Bernardo MM, Pietila M, Gervasi DC, Toth M, Kotra LP, Massova I, Mobashery S & Fridman R. (2000). Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9. Differential rates for activation by stromelysin 1. *J Biol Chem* **275,** 2661-2668.

Onat A, Hergenc G, Uyarel H, Yazici M, Tuncer M, Dogan Y, Can G & Rasche K. (2007a). Obstructive sleep apnea syndrome is associated with metabolic syndrome rather than insulin resistance. *Sleep Breath* **11,** 23-30.

Onat FY, Aker RG, Gurbanova AA, Ates N & van Luijtelaar G. (2007b). The effect of generalized absence seizures on the progression of kindling in the rat. *Epilepsia* **48 Suppl 5,** 150-156.

Oray S, Majewska A & Sur M. (2004). Dendritic spine dynamics are regulated by monocular deprivation and extracellular matrix degradation. *Neuron* **44,** 1021-1030.

Overall CM. (2002). Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol* **22,** 51-86.

Page-McCaw A, Ewald AJ & Werb Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8,** 221-233.

Papp AM, Nyilas R, Szepesi Z, Lorincz ML, Takacs E, Abraham I, Szilagyi N, Toth J, Medveczky P, Szilagyi L & Juhasz G. (2007). Visible light induces matrix metalloproteinase-9 expression in rat eye. *J Neurochem* **103,** 2224-2233.

Parks WC. (1999). Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair Regen* **7,** 423-432.

Parks WC, Wilson CL & Lopez-Boado YS. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **4,** 617-629.

Patrylo PR & Dudek FE. (1998). Physiological unmasking of new glutamatergic pathways in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-induced epileptic rats. *J Neurophysiol* **79,** 418-429.

Pena F & Tapia R. (1999). Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *J Neurochem* **72,** 2006-2014.

Pena F & Tapia R. (2000). Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience* **101,** 547-561.

Perez-Otano I & Ehlers MD. (2005). Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* **28,** 229-238.

Philpot BD, Weisberg MP, Ramos MS, Sawtell NB, Tang YP, Tsien JZ & Bear MF. (2001). Effect of transgenic overexpression of NR2B on NMDA receptor function and synaptic plasticity in visual cortex. *Neuropharmacology* **41,** 762-770.

Pisu MG, Mostallino MC, Dore R, Mura ML, Maciocco E, Russo E, De Sarro G & Serra M. (2008). Neuroactive steroids and GABAA receptor plasticity in the brain of the WAG/Rij rat, a model of absence epilepsy. *J Neurochem* **106,** 2502-2514.

Pitkanen A, Nissinen J, Nairismagi J, Lukasiuk K, Grohn OH, Miettinen R & Kauppinen R. (2002). Progression of neuronal damage after status epilepticus and during spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Prog Brain Res* **135,** 67-83.

Planas AM, Sole S & Justicia C. (2001). Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* **8,** 834-846.

Polack PO, Guillemain I, Hu E, Deransart C, Depaulis A & Charpier S. (2007). Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike-and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *J Neurosci* **27,** 6590-6599.

Pollard H, Charriaut-Marlangue C, Cantagrel S, Represa A, Robain O, Moreau J & Ben-Ari Y. (1994). Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience* **63,** 7-18.

Poolos NP. (2008). Seeing the forest and the trees: dendritic injury after status epilepticus. *Epilepsy Curr* **8,** 77-79.

Prudova A, auf dem Keller U, Butler GS & Overall CM. (2010). Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* **9,** 894-911.

Pumain R, Louvel J, Gastard M, Kurcewicz I & Vergnes M. (1992). Responses to N-methyl-D-aspartate are enhanced in rats with petit mal-like seizures. *J Neural Transm Suppl* **35,** 97-108.

Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER & Kuhl D. (1993). Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* **361,** 453-457.

Ra HJ & Parks WC. (2007). Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* **26,** 587-596.

Racine RJ. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **32,** 281-294.

Rensing N, Ouyang Y, Yang XF, Yamada KA, Rothman SM & Wong M. (2005). In vivo imaging of dendritic spines during electrographic seizures. *Ann Neurol* **58,** 888-898.

Represa A, Tremblay E & Ben-Ari Y. (1990). Sprouting of mossy fibers in the hippocampus of epileptic human and rat. *Adv Exp Med Biol* **268,** 419-424.

Rivera S, Ogier C, Jourquin J, Timsit S, Szklarczyk AW, Miller K, Gearing AJ, Kaczmarek L & Khrestchatisky M. (2002). Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur J Neurosci* **15,** 19-32.

Rivera S, Tremblay E, Timsit S, Canals O, Ben-Ari Y & Khrestchatisky M. (1997). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) is differentially induced in neurons and astrocytes after seizures: evidence for developmental, immediate early gene, and lesion response. *J Neurosci* **17,** 4223-4235.

Rosenberg GA. (2002a). Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in multiple sclerosis. *Neuroscientist* **8,** 586-595.

Rosenberg GA. (2002b). Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* **39,** 279-291.

Rosenberg GA, Dencoff JE, Correa N, Jr., Reiners M & Ford CC. (1996). Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood-brain barrier injury. *Neurology* **46,** 1626-1632.

Rosenberg GA & Mun-Bryce S. (2004). Matrix metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Ernst Schering Res Found Workshop***,** 1-16.

Rutherford LC, Nelson SB & Turrigiano GG. (1998). BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses. *Neuron* **21,** 521-530.

Ryu MJ, Lee C, Kim J, Shin HS & Yu MH. (2008). Proteomic analysis of stargazer mutant mouse neuronal proteins involved in absence seizure. *J Neurochem* **104,** 1260-1270.

Sarkisian MR. (2001). Overview of the Current Animal Models for Human Seizure and Epileptic Disorders. *Epilepsy Behav* **2,** 201-216.

Sater RA & Nadler JV. (1988). On the relation between seizures and brain lesions after intracerebroventricular kainic acid. *Neurosci Lett* **84,** 73-78.

Scharfman HE, Goodman JH & Sollas AL. (2000). Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci* **20,** 6144-6158.

Scott BW, Wojtowicz JM & Burnham WM. (2000). Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures. *Exp Neurol* **165,** 231-236.

Shah MM, Anderson AE, Leung V, Lin X & Johnston D. (2004). Seizure-induced plasticity of h channels in entorhinal cortical layer III pyramidal neurons. *Neuron* **44,** 495-508.

Shan J, Baguinon M, Zheng L & Krishnamoorthi R. (2003). Expression, refolding, and activation of the catalytic domain of human blood coagulation factor XII. *Protein Expr Purif* **27,** 143-149.

Slezia A, Kekesi AK, Szikra T, Papp AM, Nagy K, Szente M, Magloczky Z, Freund TF & Juhasz G. (2004). Uridine release during aminopyridine-induced epilepsy. *Neurobiol Dis* **16,** 490-499.

Sloviter RS. (1994). The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* **35,** 640-654.

Sperk G. (1994). Kainic acid seizures in the rat. *Prog Neurobiol* **42,** 1-32.

Spyker DA, Lynch C, Shabanowitz J & Sinn JA. (1980). Poisoning with 4-aminopyridine: report of three cases. *Clin Toxicol* **16,** 487-497.

Steinhusen U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K & Huber O. (2001). Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J Biol Chem* **276,** 4972-4980.

Stellwagen D & Malenka RC. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. *Nature* **440,** 1054-1059.

Steriade M, McCormick DA & Sejnowski TJ. (1993). Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* **262,** 679-685.

Sternlicht MD & Werb Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17,** 463-516.

Stetler-Stevenson WG & Seo DW. (2005). TIMP-2: an endogenous inhibitor of angiogenesis. *Trends Mol Med* **11,** 97-103.

Steward O & Schuman EM. (2003). Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron* **40,** 347-359.

Sugita S, Saito F, Tang J, Satz J, Campbell K & Sudhof TC. (2001). A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain. *J Cell Biol* **154,** 435-445.

Sun CY, Hu Y, Wang HF, He WJ, Wang YD & Wu T. (2006). Brain-derived neurotrophic factor inducing angiogenesis through modulation of matrix-degrading proteases. *Chin Med J (Engl)* **119,** 589-595.

Sutula T, Cavazos J & Golarai G. (1992). Alteration of long-lasting structural and functional effects of kainic acid in the hippocampus by brief treatment with phenobarbital. *J Neurosci* **12,** 4173-4187.

Sutula T, He XX, Cavazos J & Scott G. (1988). Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* **239,** 1147-1150.

Szente M & Baranyi A. (1987). Mechanism of aminopyridine-induced ictal seizure activity in the cat neocortex. *Brain Res* **413,** 368-373.

Szente M & Pongracz F. (1981). Comparative study of aminopyridine-induced seizure activities in primary and mirror foci of cat's cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **52,** 353-367.

Szklarczyk A, Lapinska J, Rylski M, McKay RD & Kaczmarek L. (2002). Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J Neurosci* **22,** 920-930.

Taishi P, Sanchez C, Wang Y, Fang J, Harding JW & Krueger JM. (2001). Conditions that affect sleep alter the expression of molecules associated with synaptic plasticity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281,** R839-845.

Tallant C, Marrero A & Gomis-Ruth FX. (2010). Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta* **1803,** 20-28.

Tan HK, Heywood D, Ralph GS, Bienemann A, Baker AH & Uney JB. (2003). Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 inhibits excitotoxic cell death in neurons. *Mol Cell Neurosci* **22,** 98-106.

Thesleff S. (1980). Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* **5,** 1413-1419.

Thiagarajan TC, Lindskog M, Malgaroli A & Tsien RW. (2007). LTP and adaptation to inactivity: overlapping mechanisms and implications for metaplasticity. *Neuropharmacology* **52,** 156-175.

Thompson LT, Moyer JR, Jr. & Disterhoft JF. (1996). Transient changes in excitability of rabbit CA3 neurons with a time course appropriate to support memory consolidation. *J Neurophysiol* **76,** 1836-1849.

Tian FF, Zeng C, Guo TH, Chen Y, Chen JM, Ma YF, Fang J, Cai XF, Li FR, Wang XH, Huang WJ, Fu JJ & Dang J. (2009). Mossy fiber sprouting, hippocampal damage and spontaneous recurrent seizures in pentylenetetrazole kindling rat model. *Acta Neurol Belg* **109,** 298-304.

Tian L, Stefanidakis M, Ning L, Van Lint P, Nyman-Huttunen H, Libert C, Itohara S, Mishina M, Rauvala H & Gahmberg CG. (2007). Activation of NMDA receptors promotes dendritic spine development through MMP-mediated ICAM-5 cleavage. *J Cell Biol* **178,** 687-700.

Touret M, Parrot S, Denoroy L, Belin MF & Didier-Bazes M. (2007). Glutamatergic alterations in the cortex of genetic absence epilepsy rats. *BMC Neurosci* **8,** 69.

Tsakiridou E, Bertollini L, de Curtis M, Avanzini G & Pape HC. (1995). Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *J Neurosci* **15,** 3110-3117.

Turrigiano GG. (2008). The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* **135,** 422-435.

Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC & Nelson SB. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* **391,** 892-896.

Turrigiano GG & Nelson SB. (1998). Thinking globally, acting locally: AMPA receptor turnover and synaptic strength. *Neuron* **21,** 933-935.

Turrigiano GG & Nelson SB. (2000). Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **10,** 358-364.

Turrigiano GG & Nelson SB. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* **5,** 97-107.

Vaillant C, Didier-Bazes M, Hutter A, Belin MF & Thomasset N. (1999). Spatiotemporal expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum. *J Neurosci* **19,** 4994-5004.

Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA & Opdenakker G. (2002). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37,** 375-536.

Van Luijtelaar EL & Coenen AM. (1988). Circadian rhythmicity in absence epilepsy in rats. *Epilepsy Res* **2,** 331-336.

van Luijtelaar G, Wiaderna D, Elants C & Scheenen W. (2000). Opposite effects of T- and L-type Ca(2+) channels blockers in generalized absence epilepsy. *Eur J Pharmacol* **406,** 381-389.

Van Wart HE B-HH. (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **Jul;87(14):5578-82.**

Vezzani A, Balosso S & Ravizza T. (2008). The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain Behav Immun* **22,** 797-803.

Vezzani A, Conti M, De Luigi A, Ravizza T, Moneta D, Marchesi F & De Simoni MG. (1999). Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J Neurosci* **19,** 5054-5065.

Vezzani A & Granata T. (2005). Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* **46,** 1724-1743.

Vilagi I, Dobo E, Borbely S, Czege D, Molnar E & Mihaly A. (2009). Repeated 4-aminopyridine induced seizures diminish the efficacy of glutamatergic transmission in the neocortex. *Exp Neurol* **219,** 136-145.

Vilalta A, Sahuquillo J, Rosell A, Poca MA, Riveiro M & Montaner J. (2008). Moderate and severe traumatic brain injury induce early overexpression of systemic and brain gelatinases. *Intensive Care Med* **34,** 1384-1392.

Vincenti MP & Brinckerhoff CE. (2007). Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *J Cell Physiol* **213,** 355-364.

Vu TH & Werb Z. (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* **14,** 2123-2133.

Walker MC, Perry H, Scaravilli F, Patsalos PN, Shorvon SD & Jefferys JG. (1999). Halothane as a neuroprotectant during constant stimulation of the perforant path. *Epilepsia* **40,** 359-364.

Watanabe K & Hattori S. (2002). Real-time dual zymographic analysis of matrix metalloproteinases using fluorescein-isothiocyante-labeled gelatin and Texas-red-labeled casein. *Anal Biochem* **307,** 390-392.

Weeks JG, Halme J & Woessner JF, Jr. (1976). Extraction of collagenase from the involuting rat uterus. *Biochim Biophys Acta* **445,** 205-214.

Wetherington J, Serrano G & Dingledine R. (2008). Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron* **58,** 168-178.

Wierenga CJ, Ibata K & Turrigiano GG. (2005). Postsynaptic expression of homeostatic plasticity at neocortical synapses. *J Neurosci* **25,** 2895-2905.

Wilczynski GM, Konopacki FA, Wilczek E, Lasiecka Z, Gorlewicz A, Michaluk P, Wawrzyniak M, Malinowska M, Okulski P, Kolodziej LR, Konopka W, Duniec K, Mioduszewska B, Nikolaev E, Walczak A, Owczarek D, Gorecki DC, Zuschratter W, Ottersen OP & Kaczmarek L. (2008). Important role of matrix metalloproteinase 9 in epileptogenesis. *J Cell Biol* **180,** 1021-1035.

Woessner JF, Jr. (1999). Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci* **878,** 388-403.

Wright JW, Masino AJ, Reichert JR, Turner GD, Meighan SE, Meighan PC & Harding JW. (2003). Ethanol-induced impairment of spatial memory and brain matrix metalloproteinases. *Brain Res* **963,** 252-261.

Wu CY, Hsieh HL, Sun CC & Yang CM. (2009). IL-1beta induces MMP-9 expression via a Ca2+-dependent CaMKII/JNK/c-JUN cascade in rat brain astrocytes. *Glia* **57,** 1775-1789.

Xu Z, Chen RQ, Gu QH, Yan JZ, Wang SH, Liu SY & Lu W. (2009). Metaplastic regulation of long-term potentiation/long-term depression threshold by activity-dependent changes of NR2A/NR2B ratio. *J Neurosci* **29,** 8764-8773.

Yamada H, Saito F, Fukuta-Ohi H, Zhong D, Hase A, Arai K, Okuyama A, Maekawa R, Shimizu T & Matsumura K. (2001). Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Hum Mol Genet* **10,** 1563-1569.

Yang Y & Zhou Q. (2009). Spine modifications associated with long-term potentiation. *Neuroscientist* **15,** 464-476.

Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R & Edwards DR. (1998). Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci* **21,** 75-80.

Yu Q & Stamenkovic I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* **14,** 163-176.

Yuste R & Denk W. (1995). Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* **375,** 682-684.

Zagulska-Szymczak S, Filipkowski RK & Kaczmarek L. (2001). Kainate-induced genes in the hippocampus: lessons from expression patterns. *Neurochem Int* **38,** 485-501.

Zahn RK, Tolner EA, Derst C, Gruber C, Veh RW & Heinemann U. (2008). Reduced ictogenic potential of 4-aminopyridine in the perirhinal and entorhinal cortex of kainate-treated chronic epileptic rats. *Neurobiol Dis* **29,** 186-200.

Zhang JW, Deb S & Gottschall PE. (1998). Regional and differential expression of gelatinases in rat brain after systemic kainic acid or bicuculline administration. *Eur J Neurosci* **10,** 3358-3368.

Zhang JW, Deb S & Gottschall PE. (2000). Regional and age-related expression of gelatinases in the brains of young and old rats after treatment with kainic acid. *Neurosci Lett* **295,** 9-12.

Zhang X, Cheng M & Chintala SK. (2004). Kainic acid-mediated upregulation of matrix metalloproteinase-9 promotes retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45,** 2374-2383.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a következő személyeknek szakmai segítségükért és baráti támogatásukért:

Dr. Juhász Gábornak, kutatócsoportunk vezetőjének és témavezetőmnek, aki jelentősen hozzájárult, hogy ez a kutatási téma létrejöhessen. Szakmai tudásával és jótanácsaival sokat segített munkámban .

Dr. Czurkó Andrásnak, aki a publikációm megírásánál kölcsönözte szakmai tudását és áldozta idejét.

Szepesi Zsuzsanna kutatócsóportunk korábbi tagjának, aki az anatómiai validálásban és az in situ zimográfia elkészítésében segített.

Nyilas Ritának, kutatócsóportunk korábbi tagjának, aki bevezetett az MMP-k világába

Dr. Kékesi Adrienna Katalinnak, a dolgozat és a publikációk szövegének javításáért és támogatásáért az évek során

Baracsay Péter az elektrofiziológiai munkákban nyújtott segítségéért

valamint kutatócsoportunk jelenlegi és korábbi tagjainak akik végig támogattak és akiknek köszönhetően kellemes légkörben és inspiráló tudományos környezetben tölthettem doktorandusz éveimet.