UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Špela GLIŠOVIĆ

POVEČANA RAVEN SINAPTOTAGMINA IV V MOŽGANIH PODGAN NA MODELIH EKSCITOTOKSIČNIH POŠKODB, POVZROČENIH S KAINSKO IN KINOLINSKO KISLINO

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Špela GLIŠOVIĆ

POVEČANA RAVEN SINAPTOTAGMINA IV V MOŽGANIH PODGAN NA MODELIH EKSCITOTOKSIČNIH POŠKODB, POVZROČENIH S KAINSKO IN KINOLINSKO KISLINO

DOKTORSKA DISERTACIJA

SYNAPTOTAGMIN IV UP-REGULATION IN THE RAT BRAIN AFTER KAINIC ACID AND QUINOLINIC ACID EXCITOTOXIC DAMAGE

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2007

Doktorska disertacija je zaključek podiplomskega študija biologije, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani. Raziskave so bile opravljene na Inštitutu za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Tema disertacije je bila sprejeta na seji Senata Univerze z dne 13.2.2007.

Mentor doc. dr. Janko Božič in somentor doc.dr. Marko Živin sta bila imenovana na seji Senata Univerze z dne 13. 2. 2007.

Komisija za oceno in zagovor, imenovana dne 26. 3. 2007:

Predsednik	doc. dr. Peter STUŠEK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član	doc. dr. Janko BOŽIČ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član	izr. prof. dr. Marko ŽIVIN Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo
Članica	doc. dr. Jelka ZABAVNIK-PIANO Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

Datum zagovora: 6. 6. 2007

Podpisana se strinjam z objavo naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnjice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela

Špela Glišović

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

- DK 612.82:616-074(043.3)=863
- KG Sinaptotagmin IV/kainska kislina/kinolinska kislina/ekscitotoksična poškodba/možgani podgane/epileptični napadi
- AV GLIŠOVIĆ, Špela, univ. dipl. biol.
- SA BOŽIČ, Janko (mentor)/ŽIVIN, Marko (somentor)
- KZ Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2007
- IN POVEČANA RAVEN SINAPTOTAGMINA IV V MOŽGANIH PODGAN NA MODELIH EKSCITOTOKSIČNIH POŠKODB, POVZROČENIH S KAINSKO IN KINOLINSKO KISLINO
- TD Doktorska disertacija
- OP 112 str., 74 sl., 1 pril., 102 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI IZVLEČEK

Z agonisti ionotropnih receptorjev, kot sta kainska (KA) in kinolinska (KK) kislina, povzročimo depolarizacijo živčnih celic v osrednjem živčevju (Balázs in sod. 2006) ter posledično tudi ekscitotoksično poškodbo (Sperk in sod. 1983, Stone 1993). Podaljšana sinhrona aktivnost nevronov limbičnega sistema povzroči epileptične napade (Bradford 1995). Avtorii Vician in sod. (1995) ter Tocco in sod. (1996) so pokazali, da se raven mRNA sinaptotagmina IV (Syt IV) v možganih podgan poveča po s KA povzročenimi epileptičnimi napadi. Naša raziskava je opredelila povečanje ravni proteina Syt IV po ekscitotoksični poškodbi, povzročeni s KA, ter njegov morebitni funkcionalni pomen. Po s KA sproženimi epileptičnimi napadi smo v odvisnosti od časa po injekciji toksina KA pokazali povečanje ravni mRNA in proteina Syt IV v različnih področjih možganov podgane. Povečana raven Syt IV ima potek smeri aktivacije limbičnih predelov, ter se nato širi v druge predele možganov. Pokazali smo prisotnost proteina Syt IV v predelih teles nevronov in v bližnjih delih dendritov in aksonov. Po neposredni stimulaciji NMDA receptorjev z enostransko injekcijo KK v striatum smo 4h po poškodbi pokazali povečano raven mRNA Syt IV v različnih področjih možganov. Ekscitotoksično poškodbo s KK smo preprečevali s predhodnim dajanjem antagonista NMDA receptorjev (Brandt et al. 2003), MK-801, kar je preprečilo s KK povzročene napade in tudi preprečilo povečanje ravni Syt IV. Povečanje ravni Syt IV je primeren kazalec aktivacije možganskih predelov po s KK povzročenimi napadi, kar smo opredelili s primerjavo povečanja mRNA Syt IV, c-fos, c-jun in nevrotrofina BDNF v različnih možganskih predelih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd

- DC 612.82:616-074(043.3)=863
- CX Synaptotagmin IV/kainic acid/quinolinic acid/excitotoxic damage/rat brain/epileptic seizures
- AU GLIŠOVIĆ, Špela
- AA BOŽIČ Janko (supervisor)/ŽIVIN Marko (co-supervisor)
- PP Biotehnical faculty, Department of Biology, 1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotehnical faculty, Department of Biology
- PY 2007
- TI SYNAPTOTAGMIN IV UP-REGULATION IN THE RAT BRAIN AFTER KAINIC ACID AND QUINOLINIC ACID EXCITOTOXIC DAMAGE
- DT Doctoral Dissertation
- NO 112 p., 47 fig., 1 ann., 102 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB ABSTRACT

Application of ionotropic glutamate receptor agonists, kainic (KA) and quinolinic acid (QA) causes depolarization of central nervous system neurons (Balázs et al. 2006) and consequently excitotoxic damage (Sperk et al. 1983, Stone 1993). Sustained synchronous activation of limbic system neurons causes epileptic seizures (Bradford 1995). It has been shown that Synaptotagmin IV (Syt IV) mRNA is up-regulated in rat brain after KA-induced seizures (Vician et al. 1995, Tocco et al. 1996). The open question was if this also results in the up-regulation of Syt IV protein and what would be its functional significance. We followed the spatio-temporal pattern of Syt IV mRNA and protein upregulation in different brain regions after KA-induced seizures. We found that Syt IV upregulation pattern was correlated with the direction of depolarization through the hippocampus and also showed seizure activity spreading to other brain regions. Furthermore, we report the presence of this protein in dendrites and axons of neurons after KA-seizures induced *de novo* synthesis. For further study we used intrastriatal injection of QA which stimulates NMDA glutamate receptors. We report the massive Syt IV mRNA up-regulation in different brain regions at 4h after unilateral QA intrastriatial injection. As excitotoxic cascade could be suppressed by administration of NMDA antagonist (Brandt et al. 2003), MK-801, we found no Syt IV mRNA up-regulation when seizure activity was prevented by the prior systemic injection of MK-801. The significance of seizure-induced Syt IV up-regulation was confirmed by c-fos, c-jun, BDNF and Syt IV mRNAs regional distribution up-regulation comparison. Syt IV can be a potent marker for seizure-induced depolarization spreading in central nervous system.

KAZALO VSEBINE

KLJU	IČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY	WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZ	ALO SLIK	VIII
KAZ	ALO SLIK	VIII
OKR	AJŠAVE IN SIMBOLI	x
SLO	/ARČEK	XII
1 L	JVOD	1
1.1 1.1. 1.1.	SINAPTOTAGMIN IV IN EKSOCITOZA1Eksocitoza živčnih celic2Sinaptotagmin IV	1 2 5
1.2 1.2.	HIPOKAMPUS 1 Anatomija hipokampusa	7 7
1.3 1.3. 1.3. 1.3.	EKSCITOTOKSIČNA POŠKODBA1Kainatni in AMPA receptorji2NMDA receptorji3Vloga kalcijevih ionov pri poškodbah celice	12 13 14 16
1.4 1.4.	EPILEPTIČNI NAPADI IN EKSCITOTOKSIČNE POŠKODBE 1 Modeli za raziskovanje epilepsije	17 17
2 1	NAMEN DELA IN HIPOTEZE	21
2.1	NAMEN DELA	21
2.2	HIPOTEZE	22
3 I	MATERIALI IN METODE	24
3.1	Živali	24
3.2	Injiciranje KAINSKE KISLINE	24
3.3 3.3. 3.3.	 Enostranska poškodba striatuma s KINOLINSKO KISLINO in dajanje MK-801 Potek stereotaktične operacije Dajanje učinkovine MK-801 	24 25 26
3.4 3.4.	Opazovanje vedenja 1 Epileptični napadi po delovanju kainske kisline	26 26

3.4.2	Hemiepileptični napadi po delovanju kinolinske kisline	26
3.5	HIBRIDIZACIJA <i>IN SITU</i>	26
3.5.1	Oligonukleotidne nasprotnosmiselne sonde	27
3.5.2	Radioaktivno označevanje sond	28
3.5.3	Hibridizacija in situ	29
3.5.4	Ekspozicija, razvijanje in fiksiranje avtoradiografskih filmov	29
3.6	IMUNOHISTOKEMIJA in IMUNOFLUORESCENCA	30
3.6.1	Priprava, fiksacija in shranjevanje možganskih rezin	30
3.6.2	Imunohistokemijsko označevanje z biotiniliranim protitelesom	30
3.6.3	Imunofluorescenčno označevanje z AlexaFluor ₄₈₈ protitelesom	31
3.7	Analiza avtoradiogramov	31
3.8	Določanje in analiza imunoreaktivnega signala	32
4 R	EZULTATI	34
4.1	Raven MRNA Sinaptotagmina IV pri kontrolnih živalih	34
4.2	Raven PROTEINA Sinaptotagmina IV pri kontrolnih živalih	34
4.3	Ekscitotoksična poškodba s kainsko kislino	34
4.3.1	Povečana raven mRNA Sinaptotagmina IV po s kainsko kislino sproženimi epileptičnimi napa	adi
4.3.2	Imunoreaktivni signal Sinaptotagmina IV	37
4.4	Ekscitotoksična poškodba s kinolinsko kislino	47
4.4.1	Raven analiziranih mRNA po poškodbi s kinolinsko kislino in pri preprečevanju	
hemi	epileptičnih napadov	47
4.4.2	Raven mRNA Sinaptotagmina IV	47
4.4.3	Raven mRNA nevrotrofina BDNF	50
4.4.4	Raven mRNA gena zgodnjega odgovora c-jun	53
4.4.5	Kaven mKNA gena zgodnjega odgovora c-fos	56
5 R	AZPRAVA IN SKLEPI	65
5.1	RAZPRAVA	65
5.1.1	Povečana raven Sinaptotagmina IV	65
5.1.2	Povečana raven Sinaptotagmina IV po ekscitotoksični poškodbi s kainsko kislino	65
5.1.3	Vpliv kainske kisline na povečanje ravni Sinaptotagmina IV v različnih možganskih področjih	n 68
5.1.4	Prisotnost Sinaptotagmina IV v nevronih	69
5.1.5	Povečana raven Sinaptotagmina IV na ekscitotoksičnem modelu s kinolinsko kislino	69
5.1.0	V pliv delovanja kinolinske kisline na povecano raven Sinaptotagmina IV	/0
5.1./	Primerjava povecanja ravni mKNA Sinapiolagmina IV z mKNA IEG in nevrotrolina BDNF Sinaptotagmin IV in gnilentični popodi	/1 72
519	Pomen povečanja ravni Sinaptotagmina IV	75
5.1.7		
5.2	SKLEPI	79
6 P	OVZETEK (SUMMARY)	81
6.1	POVZETEK	81

6.2	SUMMARY	83
7	VIRI	85
ZAI	HVALA	95
PR	LOGA	96

KAZALO SLIK

Slika 1: Primer uravnavanega izločanja iz celice 3
Slika 2: Shematski prikaz elementov, ki sodelujejo pri zlivanju membrane mehurčka in plazmaleme 4
Slika 3: Hipokampus podgane 8
Slika 4: Shema različnih celic v hilusu dentatnega girusa 10
Slika 5: Shema tri-sinaptične poti v hipokampusu 12
Slika 6: Kainatni, AMPA in NMDA receptorji v možganih podgane 14
Slika 7: Celična signalizacija po aktivaciji NMDA receptorjev 15
Slika 8: Shematičen prikaz vpliva kainske kisline na celico in poti celične smrti 19
Slika 9: Področje injiciranja kinolinske kisline ali ustreznega pufra 25
Slika 10: Prikaz prijemališč sond za analizirane gene 28
Slika 11: Področja meritev signala Sinaptotagmin IV 33
Slika 12: Raven mRNA Sinaptotagmina IV v hipokampusu 1,5 do 24 h po s kainsko kislino sproženimi
epileptičnimi napadi 35
Slika 13: Raven mRNA Sinaptotagmina IV v amigdaloidnem jedru in predelih možganske skorje 1,5 do 24 h
po s kainsko kislino sproženimi epileptičnimi napadi 36
Slika 14: Raven mRNA Sinaptotagmina IV v drugih področjih možganov 1,5 do 24 h po s kainsko kislino
sproženimi epileptičnimi napadi 36
Slika 15: Imunoreaktivni signal Sinaptotagmina IV v hipokampusu 4 do 24 h po s kainsko kislino
povzročenimi epileptičnimi napadi 38
Slika 16: Imunoreaktivni signal Sinaptotagmina IV v ostalih analiziranih regijah možganov 4 do 24 h po s kainsko kislino povzročenimi epileptičnimi napadi 39
Slika 17: Avtoradiogrami časovnega poteka povečanja mRNA Sinaptotagmina IV v možganih podgane po s
kainsko kislino povzročenimi epileptičnimi napadi 40
Slika 18: Časovni potek imunoreaktivnega signala Sinaptotagmina IV v hipokampusu po s kainsko kislino
povzročenimi epileptičnimi napadi 41
Slika 19: Raven imunoreaktivnega signala Sinaptotagmina IV v ostalih analiziranih možganskih področjih
po s kainsko kislino povzročenimi epileptičnimi napadi 42
Slika 20: Imunoreaktivni signal Sinaptotagmina IV v regijah dentaten girus in CA1, CA3 piramidalni sloj 4 h
in 24 h po injekciji kainske kisline 43
Slika 21: Natančen prikaz imunopozitivnega signala Sinaptotagmina IV v hilusu dentatnega girusa 44
Slika 22: Imunofluorescenčen signal Sinaptotagmina IV v področjih hipokampusa 45
Slika 23: Prikaz histološkega barvanja in imunohistokemijskega signala Sinaptotagmina IV v hipokampusu
24 h po injekciji kainske kisline 46
Slika 24: Raven mRNA Sinaptotagmina IV v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov 4
ure po injekciji kinolinske kisline v desni striatum 48
Slika 25: Raven mRNA Sinaptotagmina IV v ostalih področjih leve in desne poloble možganov 4 ure po injekciji kinolinske kisline v desni striatum 49
Slika 26: Raven mRNA Sinaptotagmina IV v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov
po dajanju MK-801 v odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum 49
Slika 27: Raven mRNA Sinaptotagmina IV v ostalih področjih leve in desne poloble možganov po dajanju
MK-801 v odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum 50
Slika 28: Raven mRNA BDNF v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov 4 ure po
injekciji kinolinske kisline v desni striatum 51
Slika 29: Raven mRNA BDNF v ostalih področjih leve in desne poloble možganov 4 ure po injekciji
kinolinske kisline v desni striatum 52
Slika 30: Raven mRNA BDNF v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov po dajanju
MK-801 v odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum
52
Slika 31: Raven mRNA BDNF v ostalih področjih leve in desne poloble možganov po dajanju MK-801 v
odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum 53
Slika 32: Raven mRNA c-jun v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov 4 ure po
injekciji kinolinske kisline v desni striatum 54

Slika 33: Raven mRNA c-jun v ostalih področjih leve in desne poloble možganov 4 ure po injekciji kinolinske kisline v desni striatum 55 Slika 34: Raven mRNA c-jun v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov po dajanju MK-801 v odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum 55 Slika 35: Raven mRNA c-jun v ostalih področjih leve in desne poloble možganov po dajanju MK-801 v odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum 56 Slika 36: Raven mRNA c-fos v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov 4 ure po injekciji kinolinske kisline v desni striatum 57 Slika 37: Raven mRNA c-fos v ostalih področjih leve in desne poloble možganov 4 ure po injekciji kinolinske kisline v desni striatum 57 Slika 38: Raven mRNA c-fos v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov po dajanju MK-801 v odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum 58 Slika 39: Raven mRNA c-fos v ostalih področjih leve in desne poloble možganov po dajanju MK-801 v odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum 59 Slika 40: Avtoradiogrami mRNA Sinaptotagmina IV pri kontroli in 4 h po injekciji kinolinske kisline v desni striatum in sledečem hemiepileptičnem napadu 60 Slika 41: Avtoradiogrami mRNA BDNF pri kontroli in 4 h po injekciji kinolinske kisline v desni striatum in sledečem hemiepileptičnem napadu 61 Slika 42: Avtoradiogrami mRNA c-jun pri kontroli in 4 h po injekciji kinolinske kisline v desni striatum in sledečem hemiepileptičnem napadu 62 Slika 43: Avtoradiogrami mRNA c-fos pri kontroli in 4 h po injekciji kinolinske kisline v desni striatum in sledečem hemiepileptičnem napadu 63 Slika 44: Avtoradiogrami mRNA signala Sinaptotagmina IV, BDNF, c-fos in c-jun 4 ure po injekciji kinolinske kisline v desni striatum in sledečem hemiepileptičnem napadu 64 Slika 45: Shematičen prikaz glavnih povezav limbičnega sistema 66 Slika 46: Poenostavljen prikaz širjenja depolarizacije v nevronski mreži piramidalnih nevronov hipokampusa 69 Slika 47: Shematičen prikaz hipotetične povezave limbičnega sistema in bazalnih ganglijev po epileptičnem napadu 74

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AMG	nucleus amygdalae, amigdaloidno jedro		
AMPA _R	α-amino3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionatni ali AMPA receptorji		
BDNF	brain-derived neurotrophic factor, nevrotrofin		
BSA	Bovine Serum Albumin, goveji serumski albumin		
C2A, C2B	strukturni domeni sinaptotagminov		
Ca ²⁺	kalcijevi ioni		
CA (1,2,3)	Cornu Ammonis, piramidalni sloji v hipokampusu		
cAMP	ciklični adenozin-3',5'-monofosfat		
c-fos	gen zgodnjega odgovora		
CING	cingulatna možganska skorja		
c-jun	gen zgodnjega odgovora		
COX-2	ciklooksigenaza-2		
CRE	cAMP odgovorni element (sekvenca v promotorjih genov, ki veže CREB)		
CREB	protein, ki se veže na cAMP odgovorne elemente		
CREM	transkripcijski dejavnik, ki zaviralno deluje z vezavo na ista mesta kot		
DAD	CREB		
DAB	3,3 -diaminobenzidin		
DCV	Dense Cored Vesicles, optiono gosti mehurčki		
DEPC	dietil-pirokarbonat		
DG	gyrus dentatus, dentaten girus		
DGg	granularni sloj dentatnega girusa		
DGh	polimorfni sloj (hilus) dentatnega girusa,		
DTT	ditiotreitol		
EAAT-2	excitatory amino acid transporter, prenašalec ekscitatornih aminokislin		
EC	entorhinal cortex, entorinalna možganska skorja, del limbičnega sistema		
ER	endoplazemski retikulum		
ERK	z zunajceličnim signalom regulirana kinaza		
EPSP	ekscitatorni postsinaptični potencial		
GABA	γ -aminobutyric acid, gama-aminomaslena kislina		
GC	nucleus geniculatus, genikulatno jedro, del talamusa		
Glu	l-glutamat		
GluR	glutamatni receptorji		
H_2O_2	vodikov peroksid		
IEG	Immediate Early Genes, geni zgodnjega odgovora		
iGluR	ionotropni glutamatni receptorji		
InsP ₃ R	inozitol 1,4,5-trifosfatni receptorji		
IP3	inozitol 1,4,5-trifosfat		
IPSPs	inhibitorni postsinaptični potenciali		
iROD	individual Relative Optical Density, individualna relativna optična gostota		
KA	3-(karboksimetil)-4-prop-1-en-2-il-pirolidin-2-karboksilna kislina ali		
	kainska kislina		
KA _R	kainatni receptorji		
KK	kinglingka kisling		
	KIIIOIIIISKa KISIIIIa		
KONTR	kontrola, kontrolna skupina živali		

LDCVs	Large Dense Cored Vesicles, večji optično gosti mehurčki	
LTD	Long Term Depression	
LTP	Long Term Potentiation	
MOT	motorična možganska skorja	
MF	mossy fibers, mahasta ylakna	
Mg^{2+}	magnezijev ion	
mGluR	metabotropni glutamatni receptorii	
MK-801	(5R, 10S)-5-metil-10.11-dihidro-5H-dibenzo(a.d)ciklohepten-5.10imin-	
	maleat: dizocilpin	
mRNA	obveščevalna ribonukleinska kislina, informacijska RNA	
Na ⁺	natrijevi ioni	
NAc	nucleus accumbens, iedro akumbens	
NAcC	nucleus accumbens core, sredica iedra akumbens	
NAcS	nucleus accumbens shell, skoria jedra akumbens	
NGF	nerve growth factor, nevrotrofin	
NMDA	N-metil-D-aspartat	
NMDA _P	N-metil-D-aspartatni receptorii	
NOS	Nitric Oxide Synthase sintaza dušikovega oksida	
NO	Nitric Oxide dušikov oksid	
NSF	N-ethylmaleimide Sensitive Factor. N-etilmaleimid občutlijvi faktor	
PBS	natrii-fosfatni pufer	
PC12	linija nevroendokrinih celic	
PDS	Paroximal Depolarisation Shift paroksizmalni depolarizacijski premik	
PIR	niriformna možganska skoria	
PKA	protein-kinaza A	
PKC	protein-kinaza C	
PLC	fosfolipaza C	
PMCA	Plazma Membrane Calcium ATPaze, kalcijeva ATPaza na plazemski	
	membrani	
ROD	Relative Optical Density, relativna optična gostota	
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktivne kisikove zvrsti	
Ryr	ryanodine, rianodin	
RyR	rianodinski receptorji	
³⁵ S	radioaktivni izotop žvepla	
SDCV	Small Dense Cored Vesicles, mali optično gosti mehurčki	
SERCA	Sarko-ER Ca ²⁺ -ATPaza	
SNAP	Soluble NSF Attachment Protein, topni na NSF vezavni protein	
SNAP-25	Synaptosomal-Associated Protein of 25 kDa, na sinaptosom vezani protein	
	teže 25 kDa	
SNARE	Soluble NSF Attachment Receptor, topni na NSF vezavni receptor	
SVs	Synaptic Vesicles, sinaptični mehurčki	
Sub	subikululm, del limbičnega sistema	
STR	striatum	
VAMP	Vesicle-Associated Membrane Protein, na mehurček vezani membranski	
	protein	
TLE	Temporal Lobe Epilepsy, epilepsija senčnega režnja možganov	

SLOVARČEK

(z * označeni izrazi po Slovenskem Medicinskem e-Slovarju)

<i>ad libitum</i> * agonist*	po volji dejavnik ali farmakološka učinkovina, ki izzove biološki odziv z vezavo na celične receptorje
agregirati se*	združevati se v skupke
aktivacija*	spodbuditev kake snovi v bolj reaktivno obliko
antagonist*	eksogena, navadno farmakološka učinkovina, ki
	zavira ali prepreči delovanje kake druge, v organizmu
	aktivne spojine (v ožjem smislu učinkovina, ki z
	vezavo na receptorje izniči delovanje agonista)
alveus*	pri hipokampusu, tanka plast aksonov možganskega forniksa, ki pokriva ventrikularno površino hipokampusa
apontozo*	nipokanipusa
apoptoza	vsebine, razpad jedra in citoplazme v telesca, obdana
	z memorano, odstranitev iz tkiva in razgradnja v
	fagocitin an v istovistinin cencan s povecano
avtomatizem*	izvajanje kompleksnih dejani ki jih človek ni
avionalizem	nameraval in pri katerih se pogosto pojavi tudi
	utesniena zavest
basket cells*	košaričaste celice
bistratified cells	dvosloine celice
bulbus*	okrogla struktura, zadebelina ali razširitev (olfaktorni
	bulbus, zadebeljeni pričetek olfaktornega traktusa, v
	katerem se končujejo vlakna olfaktornega živca)
cingulate cortex	cingulatna možganska skorja, del limbičnega sistema
denervacija*	prekinitev oživčenja organa ali dela telesa
dentatus*	dentaten, uporabljeno pri poimenovanju regije znotraj
	hipokampusa (dentaten girus, DG)
denzitometer*	optična naprava za merjenje potemnitve, ki jo na
	filmu ali fotografski plošči povzročijo svetloba,
	rentgenski žarki ali žarki gama
domena*	del beljakovine z lastno terciarno zgradbo, ki je v
	velikih molekulah z gibljivimi regijami povezana z
1, '* *	drugo domeno
ektopicen*	ki ni na pravem mestu, ne nastaja na pravem mestu (ang ectopic)
edem*	nakopičenje tekočine v medceličnem prostoru
	(možganski: ki nastane zaradi čezmernega prestopa
	tekočine iz žilja v možganovino)
ekscitotoksin*	spojina, ki povzroča toksične okvare ali nekrozo nevronov v možganih zaradi močne ekscitacije (1) in

	vdora kalcijevih ionov v citoplazmo (npr. ibotenska in kajnska kislina)
ekscitataksičen*	nanačajoč se na ekscitotoksin ppr. aminokislina
eksocitoza*	izločanje iz celice pri katerem se membrana ki
eksochoza	iziocalije iz celice, pri katereni se inemoralia, ki
	obdaja sekrecijsko vakuolo, združi s plazemsko in se
	njena vsebina izlije v zunajcelicni prostor
eksogen*	(1) ki izvira v zunanjem svetu, zunaj organizma, (2) ki
	ima vzrok zunaj živčevja, lahko pa v očitnih
	spremembah drugih organskih sistemov
endocitoza*	sprejem snovi iz zunajceličnega prostora z
	ugrezanjem plazmaleme, ki mu sledita odcepitev in
	prehod vakuole (endosoma) v citoplazmo; receptorska
	endocitoza: sprejem snovi iz zunajceličnega prostora z
	ugrezaniem plazmaleme na mestu ki vsebuje
	recentorie za specifične ligande in je na citoplazemski
	strani obložena s klatrinom
endogen*	ki izvira iz notraniosti organizma ali nastane zaradi
endogen	notranjih vzrokov
antarhinal aartay	indualijili vztokov
enilongija*	kronično motnio možgonsko funkcijo za katoro so
epitepsija	kiomena moulja mozganske funkcije, za kalelo so
	znacimi ponavijajoci se napadi nezavesti ali motije
	zavesti in motnje motoricnin, senzoricnin in psinicnin
	funkcij (znak zelo različnih bolezni osrednjega
	živčevja)
epileptičen*	nanašajoč se na epilepsijo
epileptogen*	ki proži ali povzroča epilepsijo
etiologija*	vzrok bolezni
fornix*	forniks, povezek aksonov, ki povezuje hipokampus z
	mamilarnim telescem in poteka v obliki podkve okrog
	talamusa
full fuzion exocytosis	eksocitoza s popolnim zlivanjem
fuziform cells	vretenaste celice
fusion*	fuzija
fuziiski*	nanašajoč se na fuzijo zlivanje
gabaergičen*	nanašajoč se na delovanje GABA
gliosis*	glioza pompožitev astrocitov zaradi okvar v
Success	osrednjem živčevju
alutamaten*	nanačajoč se na glutamat
granular*	aranularan grant unarahliana pri paimanayaniu alaja
granular	granularen, zinat, uporaoljeno pri pomienovanju sioja
*	cenc v nipokampusu
geniculatus*	genikulaten, ki je vpognjen v obliki kolena
gyrus*	girus, vijugast predel
hemiepileptičen	epileptičen, ki se nanaša na aktivacijo polovice (ene
	možganske poloble)
hilus*	hilus, uporabljeno pri poimenovanju regije znotraj
	dentatnega girusa
hipokampalen*	nanašajoč se na hipokampus, sin. hipokampen,
	hipokampusov

imunofluorescenčen* imunohistokemijski*	nanašujoč se na imunofluorescenco
multilistokeninjski	imunohistokemični
intraperitonealen*	ki je v peritonealni votlini ali se da vanjo, injekcija
kiss and run exocytosis	eksocitoza s prehodnim zlivanjem, "kiss and run" eksocitoza
kloničen*	nanašajoč se na klonus (nehotno gibanje mišic, pri katerem si kontrakcije in relaksacije sledijo v naglem
kolaterala*	zaporedju) manjša stranska veja arterije, vene, mezgovnice, živca ali nevrona, ki ima zveze s sosednjimi vejami ali s sosednjo istovrstno strukturo
konvulzija*	tonični in klonični krči skeletnega mišičja (ang. convulsion)
limbičen*	nanašajoč se na notranji rob možganske hemisfere
mossy cell	mahasta celica
mossy fibers	mahasta vlakna
nevrodegenerativen*	nanašajoč se na degeneracijo živcev
nevropeptid*	osrednjem, perifernem in avtonomnem živčevju in ima lahko funkcijo nevrotransmitorja, kotransmitorja,
	mediatorja ali hormona (npr. oksitocin, snov P, endorfin)
nevrotransmitor*	spojina, ki se sintetizira v presinaptičnem nevronu, hrani v sinaptičnih mešičkih, se sprosti ob vzburjenju živčnega končiča, z difuzijo prek sinapse doseže postsinaptično membrano, kjer po vezavi na receptor stimulira ali inhibira postsinaptično galigo
nevrotrofin*	bazične beljakovine z manjšo molekulsko maso, ki omogočajo preživetje in diferenciacijo pevronov
nucleus accumbens	jedro akumbens, del limbičnega sistema, leži ventralno glede na možgansko področje striatum (core, sredica jedra akumbensa; shell, skorja jedra
	akumbens)
nucleus amygdalae	amigdaloidno jedro (oblike podobne mandiju)*, del limbičnega sistema
nucleus geniculatus*	genikulatno jedro, del talamusa
nucleus habenulae*	habenula, povezuje talamus s pinealno žlezo
nucleus ruber	rdeče jedro
oliactorius*	olfaktoricen, vonalen
ovitorin cens	jajcaste cence paroksizmalni, depolarizacijski, premik (paroksizem:
paroximal depolarisation sint	zbruh abnormnih valov v sicer normalnem osnovnem
	ritmu EEG)
peanut cells	arašidaste celice
piknotičen*	nanašujoč se na piknozo (odmiranje celice, pri
-	katerem se jedro zgosti v močno obarvano kepico
	kromatina)

piriform cortex*	piriformna možganska skorja, (piriformen, ki je hruškaste oblike)
scaffolding proteins	ogrodni proteini
sinaptičen*	nanašujoč se na sinapso
sinaptična plastičnost*	sposobnost spreminjanja funkcionalne učinkovitosti
	sinaps ali njihovega števila v odvisnosti od aktivnosti
	živčevja, rastnih dejavnikov, hormonov,
	farmakoloških učinkovin idr.
sferično	okroglo (ang. spherical)
striatum*	kavdatno jedro in putamen kot funkcionalna celota
stellate cells	zvezdaste celice
stereotaktičen*	nanašujoč se na stereotaksijo (operacijska metoda
	natančnega lociranja bolezenskega procesa ali
	možganskih struktur z upoštevanjem
	tridimenzionalnih koordinat, največkrat uporabljena v
	kirurgiji možganov)
stimulacija*	spodbujanje, spodbuditev, izzivanje reakcije
stratum*	stratum, plast, lamina
subcutaneus*	subcutaneus, subkutan
subiculum	subikulum, del limbičnega sistema (izhodna regija
	hipokampusa)
temporalen*	nanašajoč se na sence, sin. senčen
thalamus*	talamus, siva možganovina jajčaste oblike v
· · · ·	zadajšnjem delu diencefalona s številnimi jedri
tonicen*	ki ga oznacuje trajna napetost
varikozen*	nanasujoc se na varikozo
vesiale	mehurčak (prod zliveniom z membrano colico):
vesicie	menurcek (preu zirvanjem z menurano cence), mečiček (ko je že delne odprt ob zlivanju z
	membrano)
temporal lobe enilepsy	enilensija senčnega režnja možganov
zgihek*	gib navadno hiter
201001	

1 UVOD

Sinaptotagmini so proteini, ki vežejo kalcijeve ione, so udeleženi pri transportu membran v celici ter verjetno sodelujejo pri uravnavanem izločanju snovi iz celice (Ferguson in sod. 1999, Wang in sod. 2001, Fukuda in sod. 2003). Pri sesalcih so do nedavnega opisali 16 genskih zapisov za sinaptotagmine (Ahras in sod. 2006), katerih funkcije so različne in še stvar raziskav. Prvi odkriti sinaptotagmin, sinaptotagmin I (Syt I), je transmembranski protein na sinaptičnem mehurčku in naj bi deloval kot senzor za kalcijeve ione (Ca^{2+}) ter omogočal izločanje snovi iz celice. Pri uravnavanju izločanja snovi iz celice je pomembno, da se sestavine, ki so shranjene v mehurčkih, ob ustreznem signalu izločijo v zunajcelični prostor. Različne vrste proteinov, ki pri tem sodelujejo, verjetno vplivajo na kinetiko izločanja snovi iz celice, kar je pomembno za specifičen odgovor celice na zunanje dražljaje (Langley in Grant 1997). Sinaptotagmin IV (Syt IV) je bil odkrit kot četrta vrsta sinaptotagminov (Hilbush in Morgan 1994, ki sta ga najprej poimenovala sinaptotagmin 3). Opredelili so ga kot gen zgodnjega odgovora po depolarizaciji nevroendokrinih celic (Vician in sod. 1995). Za gene zgodnjega odgovora (IEG, Immediate Early Genes) je značilno da se prepisujejo brez potrebe po predhodni sintezi proteinov (Shan in sod. 1997, Zagulska-Szymczak in sod. 2001), kar so dokazali tudi za Syt IV, saj se je njegova mRNA prepisovala tudi ob prisotnosti inhibitorjev sinteze proteinov (Vician in sod. 1995). Veliko IEG je regulatorjev transkripcije, vendar za Syt IV tega še niso dokazali.

Iz literature je že znano, da se ob s kainsko kislino povzročenih ekscitotoksičnih procesih poveča raven mRNA Syt IV v hipokampusu in piriformni možganski skorji (Vician in sod. 1995, Tocco in sod. 1996). Ekscitotoksičnost je patološki proces, pri katerem pride do odmiranja živčnih celic. Poškodbe so navadno sprožene zaradi pretirane aktivacije receptorjev za ekscitatorne živčne prenašalce, kar vodi v povečan vdor kationov v celico (Beal in sod. 1988). Kemična stimulacija omenjenih receptorjev se uporablja pri živalskih modelih za epileptične napade. Znan živalski model epilepsije senčnega režnja možganov je model s kainsko kislino (Sperk in sod. 1983). Do epileptičnih napadov lahko pride tudi zaradi povečanja ravni endogene kinolinske kisline (Lapin 1981). Povečana raven Syt IV po ekscitotoksični poškodbi lahko pomeni vpletenost tega proteina v omenjene procese.

1.1 SINAPTOTAGMIN IV IN EKSOCITOZA

Nevroni med sabo komunicirajo z izločanjem molekul iz sinaptičnih mehurčkov ali večjih sekretornih zrnc v procesu, ki ga imenujemo eksocitoza. Ob eksocitozi se molekule skozi fuzijsko poro na plazmalemi izločijo v zunajcelični prostor (An in Zanisek 2004). Nastanek te pore je energetsko potraten proces, saj se morata lipidna sloja mehurčka in plazmaleme povezati. Celice imajo razvite razne mehanizme, ki omogočajo različno kinetiko odpiranja mehurčkov (Langley in Grant 1997). Sinaptotagmini so transmembranski proteini na mehurčkih in imajo večjo citoplazemsko domeno z dvema ponovitvama, ki sta homologni C2 regulatorni regiji različnih proteinkinaz C (PKC) in fosfolipaz A2. Proteini s C2 domenami imajo sposobnost vezave Ca²⁺ in fosfolipidov, tako so sinaptotagmini primerni kandidati za uravnavanje kinetike izločanja snovi iz celice.

1.1.1 Eksocitoza živčnih celic

Poznamo dva glavna tipa eksocitoze: (1) od Ca²⁺ odvisna eksocitoza, ki je uravnavana eksocitoza in (2) od Ca^{2+} neodvisna eksocitoza ali konstitutivna eksocitoza. Izločanje signalnih molekul, živčnih prenašalcev, je uravnavan proces. Klasični živčni prenašalci ali nevrotransmitorji (na primer: acetilholin, ATP, glutamat, glicin, gama-aminomaslena kislina (GABA, γ-aminobutyric acid)), nastajajo v presinaptičnem končiču, preko transporterjev se privzemajo v sinaptične mehurčke (SVs, Synaptic Vesicles) in se nato ob vzburjenju živčnega končiča sprostijo v zunajcelični prostor. Z difuzijo prek sinapse dosežejo postsinaptično membrano, kjer po vezavi na receptor stimulirajo (po vezavi na receptor povzročijo depolarizacijo membrane) ali inhibirajo (po vezavi na receptor povzročijo hiperpolarizacijo membrane) postsinaptično celico. Nevropeptidi (na primer: snov P, dinorfin, enkefalin) pa nastajajo v telesu nevrona ter se nato z optično gostimi mehurčki (LDCVs, Large Dense Cored Vesicles) prenesejo na mesto izločanja. Nevropeptidi imajo lahko funkcijo nevrotransmitorja, kotransmitorja, mediatorja ali hormona. Procesa konstitutivno izločanje in uravnavana eksocitoza naj bi potekala ločeno (Burgoyne in Morgan 2002). Kljub temu obstajajo dokazi za vmesne stopnje med tema dvema tipoma izločanja, saj so pri podgani dokazali prisotnost sekretornih mehurčkov, ki so vmesna stopnja med sekretornimi zrnci (mednje spadajo LDCVs) in SVs (Bauerfeind in sod. 1995).

1.1.1.1 Od Ca²⁺ odvisna eksocitoza, tip uravnavanega izločanja

Za uravnavano izločanje mehurčkov je pomembno približanje in od ATP-odvisno sidranje mehurčka na plazmalemo ter po dražljaju (dvig koncentracije Ca^{2+}) zlivanje membrane mehurčka s plazmalemo. Konzervativne sestavine kompleksa za zlivanje membrane mehurčka s plazmalemo so: (1) SNARE proteini (Soluble N-ethylmaleimide Sensitive Factor Attachment Receptor proteins, topni na N-etilmaleimid občutljivi faktor (NSF) vezavni receptorji): tSNARE na plazmalemi in vSNARE na mehurčku; sintaksin, SNAP-25 (Synaptosomal-Associated Protein of 25 kDa, na sinaptosom vezani protein teže 25 kDa) in VAMP (Vesicle-Associated Membrane Protein, na mehurček vezani membranski protein) oz. sinaptobrevin; (2) ATPaza NSF, SNAP (Soluble NSF Attachment Protein, topni na NSF vezavni protein); (3) Rab3 GTPaze; (4) sinaptotagmini (Brunger 2001, Li in Chin 2003). Na membrani mehurčka najdemo torej proteine, ki imajo domene za vezavo na fosfolipide (domene C2), saj morata biti obe membrani povezani, preden pride do izločanja. Za Syt I je značilno, da preko domen C2 (C2A in C2B) veže fosfolipide in Ca^{2+} ter v odvisnosti od Ca^{2+} dela homo- ali hetero-dimere, ki se nadalje povezujejo s sintaksinom 1 in SNAP-25 (Sudhof in sod. 1993, Chapman in sod. 1995, Sudhof in Rizo 1996, Schiavo in sod. 1998, Desai in sod. 2000). Glede na tip sinapse in tip informacije, ki se prenaša med različnimi nevroni, naj bi obstajale različne variante uravnavanega izločanja (Edwards 1998). Poznamo dva glavna tipa uravnavane eksocitoze: (1) prehodna, t.i. "kiss and run" eksocitoza in (2) eksocitoza s popolnim zlitjem membran ("full fusion" eksocitoza). Pri prvem tipu ne gre za popolno zlivanje mehurčka s plazmalemo in mešiček se po izločanju ne reciklira preko endocitoze, posredovane s klatrinom, kot se zgodi pri eksocitozi s popolnim zlitjem (An in Zanisek 2004) (slika 1).



Slika 1: Primer uravnavanega izločanja iz celice (prilagojeno po An in Zanisek 2004, str. 523) (An example of regulated exocytosis)

a) primer eksocitoze s popolnim zlivanjem membran ("full fusion"), kjer se membrana mehurčka popolnoma zlije s plazmalemo in postanejo komponente mehurčka za določen čas komponente plazmaleme. Ta del se navadno preko endocitoze, posredovane s klatrinom, reciklira preko endosomov, od katerega se odcepljajo novi mehurčki; b-c) primer eksocitoze, ko ne pride do zlivanja membrane mehurčka s plazmalemo (prehodna ali "kiss and run" eksocitoza), pri čemer: b) neprepustna in c) lipidno prepustna fuzijska pora. Pri tem tipu eksocitoze nastaja med mehurčkom in plazmalemo prehodna pora, ki ima lahko različno strukturo in čas odpiranja. Proces regeneracije membrane mehurčka še ni povsem raziskan.

1.1.1.2 Tipi mehurčkov

Poznamo dva osnovna tipa mehurčkov, sinaptični mehurčki (SVs) in večji optično-gosti mehurčki (LDCVs). Med tema dvema tipoma mehurčkov obstajajo razlike, tako v načinu nastajanja in velikosti, kot v sestavi proteinov na membrani in položajem v celici (Burgoyne in Morgan 2002).

Sinaptični mehurčki (SVs, Synaptic Vesicles)

Sinaptični mehurčki (SVs) so veliki 20-40 nm in vsebujejo klasične živčne prenašalce. Nahajajo se v več skupinah (grozdih) ob "aktivnem mestu" sinapse in kot odgovor na veliko koncentracijo Ca²⁺ izločajo svojo vsebino v časovnem okvirju milisekunde (Edwards 1998). Tako hitro izločanje živčnih prenašalcev omogoča položaj SVs, ki nastajajo z lokalnim recikliranjem plazmaleme na živčnem končiču ter se hitro praznijo in polnijo. Obstaja več skupin SVs, katerih položaj ob membrani celice je različen: (a) skupina mehurčkov, ki rabi kot zaloga, iz katere se nadomeščajo ostale skupine mehurčkov, (b) mehurčki, iz katerih se izločajo živčni prenašalci (te mehurčke poimenujemo mešički) in (c) mehurčki, ki so že pozicionirani na membrani in pripravljeni na izločanje ob ustreznem zunajceličnem signalu (Thomson 2000). Verjetno se membranski deli za te mehurčke s konstitutivnim transportom prenesejo od Golgijevega aparata do plazmaleme, nato še z endocitozo do endosomov, pri čemer z odcepljanjem od

endosomov nastajajo novi SVs. Membranski deli SVs vsebujejo prenašalne proteine, ki imajo nalogo privzema živčnih prenašalcev iz citosola. Ko so SVs polni, se vrnejo do plazmaleme, kjer ob ustreznem dražljaju (dvig koncentracije Ca²⁺) izločijo živčne prenašalce in se nato lahko ponovno uporabijo (Alberts in sod. 2000).



Slika 2: Shematski prikaz elementov, ki sodelujejo pri zlivanju membrane mehurčka in plazmaleme (prilagojeno po http://www.nature.com/neuro/journal/v5/n9/fig_tab/nn0902-823_F1.html) (Schematic presentation of the vesicle membrane and the plasma membrane fusion elements)

Slika shematično prikazuje glavne elemente molekularne mreže, ki sodeluje pri zlivanju membrane mehurčka in plazmaleme. Prikazane so interakcije med sinaptobrevinom in sinaptotagminom (oranžna puščica označuje transmembranski predel sinaptotagmina, ki je vgrajen v membrani mehurčka) na membrani mehurčka ter SNAP-25 in sintaksinom na plazmalemi. Z interakcijo omenjenih proteinov se omogoči približanje membrane mehurčka in plazmaleme, kar vodi v zlivanje. Sinaptotagmin je prikazan kot dimer. Ko se zveča koncentracija Ca²⁺, delajo C2 domene sinaptotagmina komplekse z anionskimi fosfolipidi v plazmalemi. Interakcije C2B domene sinaptotagmina in C-konca SNAP-25 poveže sinaptotagmin v molekularno mrežo zlivanja membran. Preko vezave v plazmalemo lahko C2 domene s povezavo s SNARE povežejo obe membrani skupaj in katalizirajo od Ca²⁺odvisno zlivanje.

Večji optično- gosti mehurčki (LDCVs, Large Dense Cored Vesicles)

Optično gosti mehurčki (DCVs, Dense Cored Vesicles) so vrsta sekretornih zrnc, ki jih najdemo v različnih tipih celic (poleg nevronov še v npr. endokrinih, eksokrinih celicah, krvnih celicah, celicah endotelija, melanocitah) (Burgoyne in Morgan 2002). Večji optično gosti mehurčki (LDCVs) so veliki od 80 do 200 (tudi 300) nm. Z elektronsko mikroskopijo so ugotovili, da v optično gostem jedru vsebujejo zrnca in kot odgovor na majhne koncentracije Ca^{2+} izločajo svojo vsebino v časovnem okvirju, ki je daljši od 50 milisekund (Edwards 1998). Glede na tip celice in vsebino mehurčka, so LDCVs lahko različni, za določitev/opredelitev je pomemben tudi fenotip zrnc (Melodesi in sod. 2004).

1.1.2 Sinaptotagmin IV

Sinaptotagmini naj bi imeli pomembno funkcijo pri uravnavanju izločanja snovi iz celice (Schiavo in sod. 1998, Machado in sod. 2004, Fukuda 2006) (slika 2). Funkcija Syt IV še vedno ni povsem znana. Pri sesalcih so pokazali prisotnost mRNA Syt IV v možganih in hipofizi (Vician in sod. 1995). V možganski skorji miši so pokazali prisotnost proteina Syt IV v somatodendritičnih predelih, aksonih in dendritih piramidalnih celic (Ibata in sod. 2002).

Raven mRNA Syt IV v nevronih z ontogenetskim razvojem upada (Berton in sod. 1997), prav tako z ontogenetskim razvojem upada raven proteina (Berton in sod. 2000, Ibata in sod. 2002). Po Ibati in sod. (2000) se protein Syt IV pri odraslih živalih nahaja predvsem v Golgiju (cis in trans) in v končičih rastočih živčnih vlaken. Raven proteina Syt IV se poleg po depolarizaciji celice poveča po stimulaciji nevroendokrinih celic s forskolinom, ki vpliva na dvig cikličnega adenozin-3',5'-monofosfata (cAMP) v celici (Vician in sod. 1995, Thomas in sod. 1999, Ferguson in sod. 1999, Fukuda in sod. 2003, Fukuda in Yammamoto 2004). Po depolarizaciji celice se poleg povečanja ravni Syt IV tudi poveča izločanje snovi iz celice, medtem ko se po forskolinu poveča le raven Syt IV (Ferguson in sod. 1999). Po s kainsko kislino povzročenimi epileptičnimi napadi, se raven mRNA Syt IV poveča v hipokampusu in piriformni možganski skorji (Vician in sod. 1996). Povečano raven mRNA Syt IV so ugotovili tudi v možganski regiji striatum pri podganah po dajanju kokaina (Denovan-Wright in sod. 1998) ter na denervirani strani striatuma po stimulaciji dopaminskih receptorjev D1 (Glavan in sod. 2000, Glavan in Živin 2005).

Glede pojavnosti proteina Syt IV na subcelični ravni ter glede njegove funkcije v celici, prihaja med objavljenimi podatki različnih laboratorijev do nesoglasij. Rezultati nekaterih avtorjev (Ferguson in sod. 1999, Ferguson in sod. 2000, Ting in sod. 2006) kažejo na to, da se protein Syt IV nahaja na istih mehurčkih kot Syt I, in sicer na SVs. Po drugi strani Berton in sod. (1997), Ibata in sod. (2000), Wang in sod. (2003) in Fukuda in sod. (2003) poročajo, da sta ti dve vrsti sinaptotagminov prisotni v različnih populacijah mehurčkov. Slednji avtorji tudi dokazujejo, da je Syt IV, nasprotno od Syt I (ki se nahaja predvsem na membrani SVs), prisoten na LDCVs oziroma, da se mehurčki, na katerih se pojavlja ali Syt I ali Syt IV razlikujejo glede na vsebino in velikost. Prav tako še ni povsem razrešeno, ali je protein Syt IV, prisoten predvsem presinaptično (Thomas in sod. 1999, Wang in sod. 2001), postsinaptično (Adolfsen in sod. 2004, Yoshihara in sod. 2006) ali oboje (Ibata in

sod. 2002). Na nevroendokrinih celicah (linija PC12) so pokazali, da se po stimulaciji z NGF (Nerve Growth Factor, nevrotrofin) raven Syt IV sicer ne spremeni (ne nastaja *de novo*), pride pa do lokalnega prenosa proteina. Predvsem gre za prenos proteina Syt IV iz Golgija in nezrelih DCVs (kjer je sicer najbolj pogost) v zrele DCVs in na celično periferijo (Fukuda in sod. 2003). Porazdelitev Syt IV v celici je morebiti povezana s tipom, fiziološkim stanjem in samo zrelostjo celice (Machado in sod. 2004).

Fukuda in sod. (2004) predlagajo štiri korake transporta proteina Syt IV v s forskolinom stimuliranih celicah. Najprej (korak 1) se novo nastali protein iz endoplazemskega retikuluma (ER) hitro prenese v Golgijev aparat (preko domene, ki ga le-tja usmeri, Fukuda in sod. 2001). Nato se (korak 2) majhen del populacije Syt IV po mikrotubularnem citoskeletu preko konstitutivnega transporta prenese iz Golgijevega aparata na celično periferijo, večina proteina pa se nahaja na mehurčkih, ki se ne prenesejo v zrele DCVs in se verjetno ne zlivajo s plazmalemo v odvisnosti od Ca²⁺. Ne ve se še, ali so to nezreli LDCVs ali kak drug tip sekretornih zrnc. Mehurčki s Syt IV (korak 3) dozorijo ali pa se Syt IV prenese v zrele LDCVs. V zadnjem koraku (korak 4) naj bi imel Syt IV vlogo pri izločanju hormonov ali reciklaži receptorjev (Ibata in sod. 2002), verjetno deluje kot senzor za Ca²⁺(Fukuda in Yammamoto 2004).

Večina avtorjev se strinja, da ima Syt IV pomembno vlogo pri uravnavanju izločanja snovi iz celice. Vendar sta tudi pri tem še vedno v veljavi dve glavni nasprotujoči si hipotezi: (a) prva hipoteza pravi, da Syt IV preko povezave s Syt I (s tem vpliva na sposobnost penetracije C2 domen Syt I v lipidni dvosloj membrane) zavre izločanje živčnih prenašalcev (Littleton in sod. 1999, Ferguson in sod. 1999, Thomas in sod. 1999); (b) druga hipoteza pa pravi, da Syt IV omogoča izločanje molekul iz mešička (Wang in sod. 2001, Fukuda in sod. 2003, Zhang in sod. 2004, Yoshihara in sod. 2006, Ting in sod. 2006). Na eni od C2 domen proteina Syt IV (na C2A domeni) je konzervativna zamenjava aminokisline aspartat za serin, zato ima ta domena Syt IV značilnost, da ne veže anionskih lipidov v odvisnosti od Ca^{2+} (kar je sicer značilno za C2 domene Syt I). Thomas in sod. (1999) trdijo, da Syt IV kljub temu lahko dela homo- in hetero-oligomere z drugimi proteini. Glede na rezultate nekaterih avtorjev (Thomas in sod. 1999, Littleton in sod. 1999, Machado in sod. 2004) naj bi Syt IV preko povezave s Syt I v heterooligomere, ki imajo zmanjšano sposobnost vezave fosfolipidov, deloval kot zaviralec izločanja snovi iz nevronov. Po drugi strani pa so na sesalčjih nevronih dokazali, da Syt IV omogoča eksocitozo iz SVs (Ting in sod. 2006). V primeru, da Syt I ni prisoten na sinapsi, naj bi Syt IV omogočal zlivanje mehurčka s plazmalemo (sicer z manjšo učinkovitostjo kot Svt I) (Machado in sod. 2004). Wang in sod. (2001 in 2003) poročajo, da Syt IV uravnava zlivanje pore DCVs in plazmaleme pri nevroendokrinih (linija PC12) celicah. Mehurčki, na katerih je prisoten Syt IV, naj bi delali s plazmalemo manj stabilno poro zlivanja. Predlagajo tudi, da je ta protein pomemben dejavnik, ki v celici deluje kot stikalo med dogodkoma popolnega ("full fusion") in prehodnega ("kiss and run") zlivanja mehurčkov s plazmalemo. Tako naj bi Syt I favoriziral dogodek s popolnim zlivanjem ("full fusion" eksocitoza), Syt IV pa s prehodnim zlivanjem ("kiss and run" eksocitoza) (Wang in sod. 2001, Wang in sod. 2003). Fukuda in sod. (2003) so postavili alternativno hipotezo, da Syt IV rabi kot stikalo med neuravnavanim in uravnavanim izločanjem iz sekretornih zrnc. Po podatkih teh avtorjev je namreč Syt IV prisoten predvsem na nezrelih mehurčkih in se šele po določenem zunajceličnem signalu sortira v zrele DCVs in na periferijo celice (Fukuda in Yammamoto 2004). Fukuda in sod. (2003) tudi trdijo, da se po stimulaciji s Ca^{2+}

mešički s Syt IV zlivajo z membrano celice ter da Syt IV verjetno pozitivno uravnava izločanje snovi iz celice (druga, (b), hipoteza o vlogi Syt IV pri izločanju snovi iz celice). Ibata in sod. (2000) so poročali, da sta izražanji Syt I in Syt IV različno uravnavani in hkrati predlagali, da ima Syt IV funkcijo na rastni coni nevronov ob razvoju sinaps.

Morebitna vloga Syt IV v možganih je lahko povezana tudi z delovanjem astrocitov, saj so Zhang Q in sod. (2004) pokazali, da je ta protein nujen za izločanje glutamata iz astrocitov ter da njegovo izražanje poveča verjetnost za prehodno ("kiss and run") eksocitozo (Zhang in sod. 2004). Vsekakor ne gre izključiti morebitne podobne funkcije Syt IV v nevronih.

Na ravni organizma obstaja le malo podatkov o morebitni funkciji Syt IV. Raziskave pri vinski mušici kažejo na to, da imajo embriji mutant za ta protein (Syt IV-/-) defektno presinaptično diferenciacijo, poleg tega so na živčnih terminalih, kjer Syt IV ni bil prisoten opazili manjšo stopnjo varikoznih struktur (Yoshihara in sod. 2006). Z opazovanjem negativnih mutant miši za Syt IV pa so ugotovili, da ima ta protein vlogo pri morfoloških in fizioloških spremembah sinaps in razvoju spomina, ki je vezan na hipokampus (Feruguson in sod. 2000, Ferguson in sod. 2004). Hipokampus je ena od regij, ki je soudeležena pri nastanku epileptičnih napadov in kjer pride po epileptičnih napadih do nevrodegenerativnih procesov.

1.2 HIPOKAMPUS

Hipokampus je struktura v senčnem delu možganov in del limbičnega sistema. Limbični sistem je sestavljen iz več struktur: predeli možganske skorje (cingulatna (cingulate), entorinalna (entorhinal)), amigdaloidno jedro (nucleus amygdalae), jedro akumbens (nucleus accumbens), forniks (fornix), predeli talamusa, hipotalamus in mamilarno telo (mammilary body) (Mayer in Quenzer 2005, Kandel in sod. 2000, slika 45). Prvi, ki je uporabil ime "*hippocampus*" za opis te možganske strukture, je bil anatom Giulio Cesare Avanzi (1564). Vladimir Bekhterev je leta 1900 prepoznal vlogo hipokampusa ob opazovanju bolnikov z motnjami spomina, kasneje pa so pričeli pripisovati hipokampusu tudi vlogo pri čustvovanju. Psihologi in nevrologi se strinjajo, da ima hipokampus vlogo pri oblikovanju različnih tipov spomina (Kandel in sod. 2000).

1.2.1 Anatomija hipokampusa

Hipokampus je del stare možganske skorje. Poimenovanje hipokampusa je različno. S tem terminom lahko označujemo le *hippocampus proper* (Cornu Ammonis, CA sloji), termin hipokampus lahko označuje CA sloje in dentaten girus (gyrus dentatus), včasih pa prištevajo zraven še regijo subikulum. Ramón y Cajal (1893) je razdelil hipokampus na dve področji: dentaten girus in Amonov rog. Amonov rog je nadaljnje razdelil na zgornji (*regio superior*) in spodnji (*regio inferior*) rog (Kadish 2002).

Uporabljali bomo razdelitev po Lorente de Nó, po kateri je hipokampus sestavljen iz: (1) dentaten girus (DG, sestavljen iz granularnega sloja (DGg) in polimorfnega sloja (hilus (DGh)) in (2) tri CA podregije (CA1, CA2 ter CA3) (Kadish 2002). Hilus lahko nadalje razdelimo po Amaral (1978) na štiri podregije (slika 3): regija 1 predstavlja prehodno

območje med piramidalnim slojem in polimorfnim slojem (regija 4); regija 2 je na robu med molekularnim slojem in DGg, regija 3 je ob DGg kot razširitev področja *stratum radiatum* in regija 4, ki ji rečemo tudi polimorfni sloj ter je vsidrana med obema rogovoma DGg (Amaral 1978). Natančna lega ostalih slojev (*stratum oriens,* molekularni sloj (*stratum moleculare*), *stratum radiatum, stratum lanculosum moleculare*), ki ležijo znotraj hipokampusa, je ponazorjena v sliki 3.



Slika 3: Hipokampus podgane

(prilagojeno po www.instruct1.cit.cornell.edu, www.uni-leipzig.de/~vetana/Hippocampus.html in po Amaral 1978 str. 855)

(The rat hippocampus)

4A:3D z vrha pogled na hipokampus v možganih podgane (www.instruct1.cit.cornell.edu); **4B**:prikaz štirih slojev (1, 2, 3 in 4) hilus regije dentatnega girusa (DGg, granularni sloj dentatnega girusa) (Amaral 1978, str. 855); **4C**: Prerez čez hipokampus: Granularne celice dentatnega girusa so obarvane modro; piramidalne celice CA3 sloja so obarvane rdeče (CA3), piramidalne celice CA1 sloja so viola (CA1); internevroni so obarvani rumeno, zeleno in rdeče, z rdečimi krožci so označene krvne žile; nakazane so osnovne povezave nevronov (glej tekst). Legenda: Str. Gr. označuje *stratum granulare*, granularni sloj dentatnega girusa; Hilus označuje polimorfni sloj dentatnega girusa; Str. pyr. označuje *stratum pyramidale*, piramidalni sloj CA regij; Str Lac/mol označuje *stratum lanculosum moleculare*: tarčno cono dendritov granularnih celic in apikalnih dendritov piramidalnih celic CA1 sloja, Str. oriens označuje *stratum oriens*, izhodni sloj CA1 regije, Str. lucidum označuje *stratum lucidum*, področje povezav mahastih vlaken s CA3 slojem hipokampusa (www.uni-leipzig.de/~vetana/Hippocampus/legende.html)

1.2.1.1 Živčne celice v hipokampusu

Ekscitatorna živčna prenašalca v hipokampusu sta predvsem glutamat in acetilholin, inhibitorna pa je GABA. Večina nevronov v hipokampusu predstavljajo granularne in piramidalne celice, ki izločajo glutamat (Scorza in sod. 2003, PNB297 2006), internevroni pa so povečini GABA-ergični, se pravi inhibitorni (PNB297 2006). Za določitev tipa celice obstaja več meril (morfologija celice; izražanje molekul, ki so vključene v celično signalizacijo; tarče povezav in značilnosti sinapse), vendar med različnimi avtorji še vedno prihaja do nesoglasij (Somogyi in Klausberger 2005).

9

Dentaten girus (DG):

(a) Granularne celice DG so majhni nevroni (10 μ m), z okroglimi telesi, ki so organizirana v granularni sloj hipokampusa (DGg). Dendriti teh celic se raztezajo v molekularni sloj, kjer sprejemajo sinaptične povezave iz različnih možganskih regij. Granularne celice so opisane kot monopolarni nevroni (dendrit iz apikalnega dela). Aksoni teh celic se imenujejo mahasta vlakna (mossy fibers) in potekajo od bazalnega dela telesa celic, preko polimorfne cone (DGh) v *stratum lucidum* CA3 piramidalnih celic (slika 3) (PNB297 2006, Kadish 2002)

(b) V hilusu dentatnega girusa (DGh) poznamo različne tipe živčnih celic (slika 4):

(1) sloj 1 (slika 3) je prehodno območje med piramidalnim slojem in polimorfno cono, tako da imajo tudi celice v tem sloju prehodne značilnosti: piramidalne celice na primer izgubljajo svojo polarnost in postajajo proti polimorfnemu sloju vedno bolj zvezdaste (stellate cells). V tem sloju tako najdemo piramidalne celice, piramidalno-zvezdaste celice, piramidalno-košaričaste (pyramidal basket cells) celice in velike trnaste (spiny) zvezdaste celice; (2) sloj 2 (slika 3) vsebuje velike trnaste zvezdaste celice, multipolarne nevrone, arašidaste (peanut cells) celice, male zvezdaste celice ter unipolarne internevrone; (3) za sloj 3 (slika 3) so značilne celice, ki so podobne piramidalnim celicam, vendar imajo ektopičen položaj, njihova živčna vlakna pa se navadno ognejo sloju 4 DGh; (4) za sloj 4 (slika 3) so značilne mahaste celice (mossy cells). V tem sloju najdemo še: unipolarne internevrone, male multipolarne celice, vretenaste (fusiform cells) celice, jajčaste (oviform cells) celice ter na meji med granularno in polimorfno cono: dentatne-košaričaste celice, kroglaste (spheroid cells) celice ter piramidalno-košaričaste in zvezdaste celice. Slednje se navadno povezujejo preko DGg sloja z molekularnim slojem hipokampusa (Amaral 1978).

Cornu Ammonis, sloji CA (CA):

(a) Piramidalni nevroni "pravega hipokampusa" sestavljajo sloje CA1, CA2 in CA3. To so multipolarni nevroni z apikalnim in bazalnim dendritom. Apikalni dendriti CA piramidalnih celic potekajo pod piramidalnim slojem čez *stratum radiatum* in *stratum lacunosum-moleculare* (v CA3 še *stratum lucidum*), kjer sprejemajo različne informacije (slika 3). Bazalni dendriti potekajo nad piramidalnim slojem v *stratum oriens*. Aksoni CA3 celic se razdelijo na dva dela: eden se povezuje z regijami zunaj hipokampusa, drugi (t.i. Schafferjeva kolaterala) pa se povezuje s CA1 piramidalnim slojem celic (Kadish 2002). CA1 nevroni se povezujejo predvsem s subikulumom, delno pa tudi z entorinalno in prefrontalno možgansko skorjo. V CA1 sloju hipokampusa so že identificirali tri različne tipe piramidalnih nevronov: (a) piramidalne celice v kompaktnem delu piramidalnega sloja (v bližini področja *stratum radiatum*) so nizko imunopozitivne na kalbindin, (b) piramidalne celice v bližini *stratum oriens* so večje od (a) celic in so na kalbindin imunonegativne in (c) piramidalne celice v področju *stratum radiatum* ali na meji s *stratum lanculosum-moleculare*, ki se povezujejo z olfaktoričnim bulbusom ter se tako po povezavah ločijo od (a) in (b) piramidalnih celic (Somogyi in Klausberger 2005).

(b) Internevroni CA regij so populacija živčnih celic, med katerimi je bilo opisanih že vsaj 16 različnih tipov. Tip internevrona določajo: razvejitev nitja; tarče povezav; imunopozitivnost na določene označevalce [na primer: prisotnost določenih receptorjev (5-HT3, CCK, CB1, glutamatnih transporterjev), parvalbumina, kalretinina, somatostatina, nevropeptida Y in drugo) ter strukturiranost sinaps (določitev mogoča le z elektronsko mikroskopijo)]. Nekateri od internevronov, ki so prisotni v CA1 regiji hipokampusa so: akso-aksonske celice, košaričaste celice (več tipov), dvoslojne celice (bistratified cells), celice povezane s Schafferjevimi kolateralami, hipokampo-septalne celice, specifične celice tipa II, III in drugi. Značilnost povezav internevroni-nevroni hipokampusa je, da sprejema ena piramidalna celica informacijo od vsaj 10 internevronskih celic ter da ena internevronska celica se lahko povezuje z več piramidalnimi celicami. Tako je informacija, ki se širi v smeri internevon-nevron prostorsko in časovno uravnavana (Somogyi in Klausberger 2005, Mann in sod. 2005).



Slika 4: Shema različnih celic v hilusu dentatnega girusa

(prilagojeno po Amaral 1978, str. 889) (Schematic presentation of different cell types in dentate gyrus hilar region of the hippocampus)

Celice so označene s puščicami: svetlo modra puščica označuje granularne celice v granularnem sloju DG (DGg); celice v hilusu DG (DGh) so označene: temno modra puščica označuje zvezdaste celice; rdeča puščica označuje mahaste celice; oranžna puščica označuje dentatne košaričaste celice; rjava puščica označuje internevron; svetlo zelena puščica označuje vretenaste celice; temno zelena puščica označuje jajčasto celico; viola puščica označuje piramidalno, piramidalno-košaričaste in piramidalno-zvezdaste celice; rumena puščica označuje kroglasto celico. S svetlo modrim trikotnikom je nakazana pot mahastih vlaken (mf) granularnih celic DG.

1.2.1.2 Pretok informacije hipokampusa

Hipokampus sprejema čutilne informacije iz možganske skorje ter iz forniksa. Forniks nosi informacijo iz talamusa, septuma, hipotalamusa in drugih možganskih jeder. Entorinalna možganska skorja naj bi bila integracijska regija za obdelavo več čutilnih informacij. Oblikovali sta se dve hipotezi o prenosu informacij znotraj hipokampusa:

(a) t.i. tri-sinaptična pot (slika 5) in (b) eno-sinaptična pot. Po hipotezi tri-sinaptične poti naj bi informacija potekala sekvenčno iz entorinalne možganske skorje najprej v granularne celice DG, od tod v CA3 piramidalni sloj in nazadnje iz CA3 v CA1 piramidalni sloj (Amaral in Witter 2003). V 90ih so nekateri avtorji predlagali tudi možnost eno-sinaptične poti: iz entorinalne možganske skorje naj bi se informacija širila v vse tri omenjene regije (DGg, CA3 in CA1), kar pomeni, da se regije hipokampusa lahko vzdražijo simultano in ne le zaporedno (po t.i. "tri-sinaptični poti"). (Yeckel in Berger 1990). CA1 piramidalni sloj hipokampusa prejema poleg iz CA3 in entorinalne možganske skorje še informacijo iz amigdaloidnega jedra ter preko lokalnih kolateral celic, ki ležijo v CA1 sloju (Somogyi in Klausberger 2005).

1. Perforantna pot

To je pot, po kateri dobi hipokampus največ informacij (slika 5). Aksoni te poti imajo začetek v slojih II in III entorinalne možganske skorje (EC), delno tudi v slojih IV in V. Celice v sloju II EC se povezujejo predvsem v DGg (slika 5). Študije so pokazale, da gre za topografsko ureditev povezav (iz lateralne EC v dorzalni DGg, iz medialne EC pa v ventralni DGg) (Ruth in sod. 1982, Witter in Amaral 1991, Dolorfo in Amaral 1998, Kandel in sod. 2000).

2. Pot mahastih vlaken (MF, Mossy Fibers)

Tako poimenujemo nitje granularnih celic DG (slika 5). Te celice se preko značilnih nemieliziranih aksonov (mahasto nitje) povezujejo s CA3 in DGh (vsako mahasto vlakno ima okoli 7 kolateral v polimorfni coni) (Kadish 2002). S posamezno celico v CA3 piramidalni regiji se lahko povezuje več granularnih celic DG. Posebnost te poti naj bi bila, da sinapse med mahastimi vlakni in CA3 vsebujejo več mest za izločanje glutamata (www.bris.ac.uk/.../info/pathway/hippocampal.htm). Mahasta vlakna so glutamatergična, vendar so pokazali imunoreaktivnost teh vlaken tudi na GABA in opiatne peptide (dinorfin, enkefalin). Granularne celice imajo vse pogoje, da proizvajajo tako ekscitatorni glutamat kot inhibitorno GABA, čeprav naj bi se izražanje GABA z ontogenetskim razvojem zmanjšalo. "Dvojni obraz" granularnih celic DG je pomemben za razumevanje patoloških sprememb ob epileptičnih napadih, ko se fiziologija celic spremeni in lahko opazimo značilnosti, ki so sicer značilne za živčne celice ob ontogenetskem razvoju živčevja (Gutiérrez 2003).

3. Pot Schafferejvih kolateral

To so povezave CA3 piramidalnega sloja s CA1 regijo hipokampusa, ki so bodisi ipsi- bodisi kontra-lateralne (Kandel in sod. 2000). Ker to nitje povezuje obe možganski polobli, mu pravimo tudi komisurno nitje. Povezave CA3 nevronov se končujejo v področjih *stratum radiatum* in *stratum oriens* CA1 regije (slika 5). Pot Schafferjevih kolateral (slika 5) je ena najbolj poznanih poti znotraj hipokampusa, saj je na teh povezavah bilo opravljenih veliko študij na temo od N-metil-D-aspartatnih receptorjev odvisnega LTP in LTD (Long Term Depression) (PNB297 2006).

4. Pot iz CA1 v subikulum

Glavna izhodna pot iz hipokampusa povezuje CA1 sloj in subikulum z EC (slika 5) (Kandel in sod. 2000). Povezava med CA1 in subikulumom ima značilnost, da se oddaljene celice CA1 piramidalnega sloja povezujejo z bližnjimi deli subikuluma. Nevroni v oddaljenem predelu CA1/bližnjem subikulumu se nato povezujejo z lateralno EC,

medtem ko se bližnji nevroni CA1/oddaljeni subikulum povezujejo z medialno EC (Kadish 2002, www.bris.ac.uk/.../info/pathway/hippocampal.htm).



Slika 5: Shema tri-sinaptične poti v hipokampusu (prilagojeno po Kandel in sod. 2000, str. 1257) (The three mayor afferent pathways in the hippocampus)

Na sliki so v poenostavljeni shemi prikazane glavne tri povezave znotraj hipokampusa. Puščice nakazujejo pot informacije. Perforantna pot nakazuje povezave živčnih vlaken iz entorinalne možganske skorje (smer puščice) z granularnimi celicami dentatnega girusa (Dentate region) – ekscitatorne povezave. Granularne celice se povezujejo preko mahastih vlaken po t.i. poti mahastih vlaken (MF, *mossy fibers*, smer puščice) s CA3 piramidalnim slojem (CA3). Piramidalne celice CA3 sloja se povezujejo s piramidalnimi celicami CA1 regije (CA1) preko t.i. Schafferjevih kolateral (smer puščice). Nakazana je tudi izhodna pot iz hipokampusa (iz CA1 sloja).

1.3 EKSCITOTOKSIČNA POŠKODBA

Zaradi pretiranega vzdraženja receptorjev ekscitatornih aminokislin pride v celici do poškodb, ki lahko vodijo v odmiranja nevronov. Ta patološki proces poimenujemo ekscitotoksičnost. Hipoteze o ekscitotoksičnosti so nastale na podlagi opazovanj: (1) nevrotoksične aktivnosti, povezane z agonisti receptorjev ekscitatornih aminokislin, (2) regije v možganih, kjer najprej nastajajo ekscitotoksične poškodbe vsebujejo veliko receptorjev za ekscitatorne aminokisline, (3) poškodbe, kjer je bilo delovanje ekscitotoksinov prizanesljivo do aksonov (axon sparing) glede na postsinaptične tarče (Beal in sod. 1988, Shan in sod. 1997, Balázs in sod. 2006). L-glutamat je ekscitatoren živčni prenašalec in modulator v osrednjem živčevju (Zagulska-Szymczak in sod. 2001). Ko se glutamat izloči, deluje na različne receptorje. Receptorje za ekscitatorne aminokisline so najprej delili na tiste, ki raje vežejo aspartat [N-metil-D-aspartatni

nsko kislino.

receptorji (NMDA_R)] in tiste, ki so primarno aktivirani preko glutamata [AMPA ali α -amino3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionatni receptorji (AMPA_R) in kainatni receptorji (KA_R)]. Danes poznamo dve večji skupini glutamatnih receptorjev: (1) ionotropni glutamatni receptorji [iGluR: NMDA_R, AMPA_R, KA_R in delta receptorji (GluR\delta1 in GluR\delta2)]; (2) metabotropni glutamatni receptorji [mGluR] (Balázs in sod. 2006) Skupna značilnost iGluR je depolarizacija membranskega potenciala celice. Zaradi odpiranja iGluR in/ali preko z G-proteinom sklopljenimi signalnimi potmi po aktivaciji mGluR se po vezavi glutamata na omenjene receptorje prožijo različni znotrajcelični procesi.

Ekscitotoksin je po definiciji aminokislina ali njej sorodna spojina, ki je ekscitatorna ter proži značilno nevronsko poškodbo (Schwarcz in sod. 2002). Ekscitotoksini kainska kislina (KA), kinolinska kislina (KK), iboteinska kislina in domoična kislina, delujejo preko glutamatnih receptorjev, kjer preko pretirane stimulacije omenjenih receptorjev povzročijo depolarizacijo nevronov in znotrajcelično nabiranje kalcijevih ionov. Povečana aktivacija teh receptorjev lahko povzroči poškodbe preko dveh mehanizmov: (1) ozmotska poškodba celice zaradi povečanega vdora natrijevih ionov v celico (preko ionotropnih receptorjev) ter posledično rušenje normalne fiziološke koncentracije klorovih ionov in vode; (2) poškodbe celice zaradi povečanja koncentracije Ca²⁺ znotraj celice (Beal in sod. 1988, Shan in sod. 1997, Balázs in sod. 2006).

1.3.1 Kainatni in AMPA receptorji

Hitri ekscitacijski sinaptični prenos je pogosto uravnavan preko odpiranja AMPA_R in/ali KA_R (Bredt in Nicolli 2003). Ionski kanali KA_R prepuščajo Na⁺ bolj kot Ca²⁺. Za ta tip iGluR je značilno, da niso prisotni le na dendritih in telesu nevronov, temveč tudi na aksonih in so soudeleženi pri regulaciji sproščanja glutamata in GABA. V primerjavi z AMPA_R imajo počasnejšo kinetiko. Naslednja pomembna lastnost KA_R je sposobnost hitre desenzitizacije, kar je odvisno od sestave podenot receptorja (Balázs in sod. 2006). V možganih podgane so KA_R v večji gostoti prisotni v hipokampusu, predvsem na koncu poti mahastega nitja, v področju *stratum lucidum* CA3 regije (slika 6). Po aktivaciji KA_R vdrejo v celico kationi, prišlo pa naj bi tudi do povečanega izločanja glutamata. Povečano izločanje glutamata zaradi aktivacije KA_R naj bi bil od cAMP odvisen proces. To sproži celični odgovor, ki vključuje delovanje protein kinaze A (PKA) in nadaljnjo fosforilacijo proteinov, med katerimi so tudi AMPA_R (Kullman in sod. 2001, Rodríguez-Moreno 2004). Druga signalna pot preko katere naj bi delovali KA_R, pa je povezana s sklapljanjem z G-proteinom in aktivacijo fosfolipaze C (PLC) (Lerma in sod. 2001, Lerma 2006).

Farmakološko je še vedno težko ločevati med KA_R in AMPA_R, čeprav je na tržišču že veliko agonistov za ta dva tipa iGluR (Balázs in sod. 2006). AMPA_R kodirajo geni za štiri podenote: GluR1-4 (tudi kot GluRA-D ali α 1- α 4). Podenote se različno desenzitizirajo in se tudi različno izražajo v ontogenetskem razvoju. Posebej je zanimiva GluR2 podenota, katera vpliva na manjšo prepustnost receptorja za Ca²⁺ in jo zato tudi povezujejo z ekscitotoksičnostjo. Po epileptičnih napadih je namreč ta podenota manj izražena v CA1 in CA3 regijah hipokampusa, ni pa zmanjšanja v izražanju te podenote v granularni regiji DG (Gomes in sod. 2003). AMPA_R poleg Ca²⁺ prepuščajo tudi Zn²⁺, kar je pomembno dejstvo, saj akumulacija Zn²⁺ depolarizira mitohondrije in vodi v nastajanje prostih radikalov. V

možganih so AMPA_R v večji gostoti prisotni v področju *stratum radiatum* ob CA1 regiji in v DGg hipokampusa, ter v možganski skorji, septumu in molekularnem sloju malih možganov. Prisotni so na sinapsah, ter znotraj celice (na membranah ER). AMPA_R naj bi imeli tudi metabotropno funkcijo preko indirektne ali/in direktne regulacije G-proteinov (Balázs in sod. 2006).



Slika 6: Kainatni, AMPA in NMDA receptorji v možganih podgane (prilagojeno po Balázs in sod. 2006, str. 41, 64 in 96 ter Schmitz in sod. 2001 str. 11003) (Kainate, quisqulate and N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain)

Slike prikazujejo: (A) avtoradiogram [³H]-označenih mest vezave kainatnih receptorjev na vodoravni rezini možganov podgane (velika vsebnost v regijah hipokampus, striatum, možganska skorja in talamus, Balázs in sod. 2006, str 64); (B) prikaz gostote mest vezave kainatnih receptorjev v hipokampusu (gostota mest vezave je prikazana z visoko-proti-nizki gostoti z barvami redeče-rumeno-zeleno-modro; mesta goste vezave torej v hilusu dentatnega girusa in *stratum lucidum* CA3 regije, Schmitz in sod. 2001, str 11003); (C) signal *in situ* hibridizacije NMDA receptorjev na vodoravni rezini možganov podgane (NR1 podenota, Balázs in sod. 2006, str 96); (D) avtoradiogram [³H]-označenih mest vezave AMPA receptorjev na vodoravni rezini možganov podgane, regiji z veliko vsebnostjo teh receptorjev sta možganska skorja in hipokampus (Balázs in sod. 2006, str 41).

1.3.2 NMDA receptorji

NMDA_R so iGluR, sestavljeni iz štirih domen: (1) ionski kanal, ki je bolj prepusten za Ca²⁺ kot Na⁺, (2) NMDA prepoznavna domena z veliko sposobnostjo vezave glutamata, (3) domena za prepoznavanje glicina ter (4) domena za prepoznavanje poliaminov (Yoneda in sod. 2001). Za samo aktivacijo NMDA_R mora Mg²⁺ ion, ki blokira kalcijev kanal, zapustiti ionski kanal, kar se lahko zgodi kot posledica delne depolarizacije membrane zaradi aktivacije drugega receptorja ali ekscitatornega sinaptičnega vhoda (Bradford 1995, Wyneken in sod. 2001).



Slika 7: Celična signalizacija po aktivaciji NMDA receptorjev (prilagojeno po Hardingham in Bading 2003, str. 83) (Cell signalization after by synaptic NMDA-receptor-dependent Ca²⁺ influx)

Prikaz aktivacije CREB po vdoru Ca²⁺ v celico po aktivaciji NMDA receptorjev; okrajšave: CaM kinase IV (od Ca²⁺ kalmodulin odvisna kinaza IV), CREB (protein, ki veže CRE), CRE (cAMP odgovorni element), CBP (protein, ki veže CREB), ERK (z zunajcelični signalom regulirana kinaza), RSK (ribosomska S6 kinaza).

Ta tip receptorjev je zelo prepusten za Ca²⁺ in vpliva na nastanek dolgotrajnih tokov, ki omogočajo seštevanje odgovorov na dražljaje tudi do desetine milisekund. Po aktivaciji NMDA_R se v celici sprožijo signalne poti preko ERK (z zunajcelični signalom regulirana kinaza) in od kalmodulina odvisnih kinaz (slika 7), ki vodijo v prepisovanje genov zgodnjega odgovora. Kronična aktivacija teh receptorjev lahko sproži mehanizme celične smrti, npr. pri epileptičnih poškodbah, Alzheimerjevi bolezni in Huntingtonovi bolezni. Tudi blokada teh receptorjev je škodljiva in povzroči odmiranje nevronov v določenih možganskih predelih, na primer v granularnih celicah DGg. Pri patološki aktivaciji NMDA_R naj bi zaradi čezmernega vdiranja Ca^{2+} v celico in spremembe stanja mitohondrijev prišlo do nastanka prostih radikalov, ROS (Reactive Oxygen Species, reaktivne kisikove zvrsti), rušenja mitohondrijske dihalne verige in izgube vitalne energije celice (s tem tudi zmanjšanje sposobnosti celice, da bi popravljala poškodbe). Zanimivo je, da je vdor Ca^{2+} v celico preko NMDA_R bolj toksičen kot vdor Ca^{2+} preko drugih poti. Ker so NMDA_R preko C terminalnega dela povezani s citoplazemskimi proteini pod membrano celice, deluje Ca²⁺, ki vdre čez NMDA kanal, na molekularno okolje, ki je drugačno kot v drugih predelih celice. Mogoče je, da so v ekscitotoksičnem procesu po aktivaciji NMDA_R vključene tudi druge molekule in receptorji. $NMDA_R$ se na primer preko PSD95 povezujejo z drugimi glutamatnimi receptorji in NOS (Nitric Oxide Synthase, sintaza dušikovega oksida), katera dela dušikov oksid (NO, nitric oxide), ki je pomemben kot sporočevalec med celicami (Hardingham in Bading 2003).

NMDA_R najdemo predvsem v CA1 regiji v hipokampusu (slika 6), ter v striatumu, možganski skorji in še nekaterih drugih možganskih področjih. Delovanje NMDA_R je v hipokampusu regionalno različno, kar je verjetno povezano s sestavo teh receptorjev glede na podenote. Molekularno biološki mehanizmi proženja selektivnih znotrajceličnih procesov po aktivaciji različno sestavljenih (glede na podenote) NMDA_R v hipokampusu še niso povsem jasni. Tudi sistemska injekcija NMDA namreč sproži v možganih najprej odgovor hipokampusa. Možno je, da NMDA deluje v hipokampusu v manjših odmerkih kot v drugih možganskih regijah in/ali hitro prodre v hipokampus (Yoneda in sod. 2001).

1.3.3 Vloga kalcijevih ionov pri poškodbah celice

Električna aktivnost je osnovni vitalni proces živčnih celic. Uravnavanje ionske homeostaze je ključnega pomena, saj prevelika ali premajhna aktivnost nevronom škodi (Hardingham in Bading 2003). K poškodovanju nevronov prispevajo procesi, kot so delovanje proteaz, sinteza difuznih plinov, nastajanje prostih radikalov in seveda povečan vdor Ca^{2+} v celico (Shan in sod. 1997). Tako je vsaj ena od oblik ekscitotoksičnosti odvisna od znotrajceličnega kopičenja Ca^{2+} (Michaelis 1998). Nevroni za svoje delovanje uporabljajo zunaj- in znotraj-celični vir kalcija. Notranji vir kalcija v nevronu predstavlja ER, ki se širi po celotni celici kot kontinuirani membranski sistem tudi v dendrite in aksone. Na nekaterih predelih se ER deli tako zbližajo s plazmalemo, da govorimo o površinskih cisternah. V nekaterih nevronih (npr. granularne celice dentatnega girusa) se te cisterne oblikujejo kot multiple strukture in jih poimenujemo cisterni organeli. ER vsebuje inositol 1,4,5-trifosfatne (InsP₃R) in rianodinske (Ry_R) receptorje, ki omogočajo ER aktivno vlogo (kot vir ali ponor Ca²⁺) pri uravnavanju prenosa informacije nevrona (Berridge 1998). Prehod Ca²⁺ v citoplazmi je uravnavan preko mitohondrijev, ki privzemajo te ione in jih nato vračajo v ER (preko Sarko-ER Ca²⁺-ATPaze, SERCA). Nevrodegeneracija je tako odvisna od funkcionalnega stanja mitohondrijev. Kalcijevi ioni, ki prehajajo na primer NMDA_R, se privzemajo v mitohondrije in prožijo depolarizacijo tega celičnega organela. Privzem kalcija v mitohondrije je tudi glavni vzrok za ekscitotoksično celično smrt, saj se preko povečanega privzema Ca²⁺ v mitohondrije sproži nastanek ROS, ki poškodujejo mitohondrijsko dihalno verigo (to pa sproži nadaljnjo depolarizacijo mitohondrijev) ter sposobnost polarizacije membrane (Hardingham in Bading 2003). V primeru, da pride do izpraznitve zalog Ca²⁺ v ER, postanejo mitohondriji nasičeni s Ca²⁺, kar sproži v celici mehanizme, ki vodijo v prepisovanje stresnih signalov. Celični odgovor na zvečano koncentracijo Ca²⁺ v citoplazmi zajema tako prepisovanje genov zgodnjega odgovora, sintezo proteinov, ki vežejo Ca²⁺ v ER (celica teži k temu, da bi obnovila ravnovesje med mitohondriji in ER), ter genov, ki vodijo v apoptozo ali celično smrt. Paradoks, ki je povezan s tem ionom v celici, je torej, da lahko uravnava celično življenje in smrt (Berridge in sod. 1998).

1.4 EPILEPTIČNI NAPADI IN EKSCITOTOKSIČNE POŠKODBE

Prva poročila o epilepsiji prihajajo iz starodavne Indije in Babilonskih tablic. Epilepsijo, kot posledico bolezni možganov, je opisal Hipokrat (5. st. BC, Grčija). Po ustanovitvi bolnišnice za zdravljenje tovrstnih bolezenskih stanj v Londonu (1857), je Hughlings Jackson (1873) epileptični napad opredelil kot rezultat nenadnih elektro-kemičnih motenj v možganih in je tudi predlagal, da so napadi odvisni od mesta, kjer se dogajajo le-te spremembe (Kandel in sod. 2000, www.who.int/mediacentre/factshets/fs168/en). Eno prvih študij epileptičnih poškodb je opravil Ikuko Koyema (1972), ki je opisal pomen zunajceličnega glutamata pri nastanku tovrstnih poškodb. Istega leta so Nico Van Gelder in sodelavci v Montrelau opisali povezavo med trajanjem, jakostjo in številom epileptičnih napadov ter glutamatom, aspartatom in GABA v tkivih epileptičnih živali. Razmerje med glutamatom in GABA naj bi se povečalo v prid glutamatu. Ob razvoju epileptičnega napada se glutamat simultano sprošča iz sinaptičnih in nesinaptičnih virov, verjetno iz glutamatergičnih in ne-glutamatergičnih nevronov in astrocitov (Bradfort 1995). Astrociti tudi sicer vplivajo na presnovo glutamata in na aktivnost nevronov, kar dobro opisuje model t.i. tri-partitne sinapse, kjer astrocit aktivno sodeluje ob sinapsi dveh nevronskih celic (Haydon in Carmiqnoto 2006). Pri večini oblik epilepsije in pri epileptičnih napadih naj bi se poškodbe in fiziološke spremembe dogajale v entorinalni možganski skorji in hipokampusu. Z odstranjevanjem hipokampusa so uspešno zdravili bolnike, ki jim druga zdravila niso pomagala, zato velja splošno prepričanje, da je ta možganska regija ključna pri razvoju epilepsije. Seveda je hipokampus povezan tudi z drugimi predeli možganov. V zadnjem času dajejo znanstveniki poudarek povezavam hipokampusa preko subikuluma z limbičnim sistemom in substantio nigro reticulato (Bradford 1995). Po epileptičnih napadih je namreč poleg v predelih hipokampusa značilno propadanje nevronov še v amigdaloidnem jedru, entorinalni skorji, talamusu in substantii nigri reticulati (Schwarcz in sod. Chapter127)

V hipokampusu se ob epileptičnem napadu sinhronično poveča aktivnost več nevronov. Ko se sinhronizirano aktivira več piramidalnih celic, pride do velikih vzdražnostnih potencialov (EPSP) lokalne populacije nevronov, t.i. paroksizmalnega depolarizacijskega premika (PDS, paroximal depolarisation shift). Pri tem fenomenu verjetno sodelujejo NMDA_R, katerih aktivnost je odvisna od ionskega okolja in so zato idealni kandidati za proženje verižnih EPSP, ki vodijo v sinhrone PDS (Bradford 1995). Zaradi čezmerne aktivacije živčne mreže pride do rušenja ravnovesja v celicah, kar vodi v ekscitotoksičnost. Po epileptičnih napadih se tudi spremenijo elektrofiziološke značilnosti granularnih celic DG (Brandt in sod. 2003), čeprav te celice po epileptičnih poškodbah ne propadajo in naj bi omejevale širjenje poškodbe v hipokampusu (Bausch in McNamara 2000). Na spremembe v hipokampusu ob/po epileptičnih poškodbah vpliva več dejavnikov. Verjetno gre za interakcije tako na ravni inter/nevronske mreže kot/in za prispevek astrocitov.

1.4.1 Modeli za raziskovanje epilepsije

Živalski modeli za raziskovanje epilepsije so lahko različni in morajo ustrezati določenim merilom (ILAE Commision Report): EEG aktivnost, etiologija ob epileptičnem napadu, kratkoročne in dolgoročne vedenjske spremembe, patološki procesi po epileptičnem napadu, farmakološko uravnavanje mora imeti podobne mehanizme, kot je že znano pri ljudeh, pomembna je tudi starost živali (Sarkisian 2001). Nevrotransmitorji, ki so povezani

z epilepsijo, so: GABA, glutamat, aspartat in endogeni opioidni peptidi (De Sarro in sod. 2005). Modela epilepsije senčnega režnja (TLE, Temporal Lobe Epilepsy, epilepsija senčnega režnja možganov), ki ustrezata predpisanim merilom, sta model sistemske injekcije pilokarpina ali kainske kisline (Bausch in McNamara 2000, Sarkisian 2001, Pitkänen in sod. 2006). Do epileptičnih napadov pride tudi zaradi povečanja ravni endogene kinolinske kisline (Lapin 1981).

1.4.1.1 EKSCITOTOKSIČNA POŠKODBA S KAINSKO KISLINO

Kainska kislina (3-(karboksimetil)-4-prop-1-en-2-il-pirolidin-2-karboksilna kislina), ki jo pridobivajo iz rdeče alge *Digenea sp.* iz tropskih morij oziroma njena ionska oblika kainat, je analog glutamata. Kainska kislina prehaja krvno-možgansko pregrado ter kot agonist KA_R in AMPA_R deluje na razne regije, kjer so ti receptorji prisotni (Riba-Bosch in Perez-Clausell 2004, Zagulska-Szymczak in sod. 2001). Sistemska injekcija kainske kisline povzroči pri odrasli podgani povečano sinaptično aktivnost, ki se izrazi kot toničnoklonični krči (Wyneken in sod. 2001, Pitkänan in sod. 2006) in limbične poškodbe, ki imajo za posledico morfološke spremembe in selektivno odmiranje nevronov (Sperk in sod. 1983, Tocco in sod. 1996, Goodenough in sod. 1997, Grooms in sod. 2000, Ben-Ari in Cossart 2000, Behan in Stone 2000, Zagulska-Szymczak in sod. 2001, Lee in sod. 2002). Vedenje podgan po s kainsko kislino sproženimi epileptičnimi napadi se lahko opiše na podlagi merske lestvice: stopnja (1): obrazni avtomatizmi; stopnja (2): kimanje z glavo in avtomatizmi, t.i. "wet dog shakes" (žival stresa kožuh, WDS); stopnja (3): lordotična (zgrbljena) poza živali in krči prednjih udov; stopnja (4): dvigovanje na zadnje ude in krči udov; stopnja (5): ista vedenja kot pod (3) in (4) ter izguba ravnotežja. Vedenja pod (3), (4) in (5) so značilna za motorične napade ali konvulzivne napade (Racine 1972).

Hipokampus je ena od občutljivih regij možganov, kjer lahko opazujemo delovanje kainske kisline. Zgodnje patološke spremembe (1-24 ur) so vezane predvsem na nevrone. Opazna je kondenzacija in piknotičnost jeder ter vakuolizacija nevropila (Sperk in sod. 1983). V nevronih se zaradi delovanja kainske kisline ruši ionsko ravnovesje, prihaja do izčrpanja zalog energije celic ter anoksičnih poškodb. Strukturne spremembe (edem, nekroza, povečanje volumna oligodendrocitov, reaktivni astrociti na mestu propadanja nevronov, več fagocitov) se pojavijo po 24 urah (Sperk in sod. 1983). Po epileptičnem napadu, povzročenem s kainsko kislino, se poveča izražanje IEG (Wyneken in sod. 2001). Nekateri IEG se povečano izražajo po celotnem hipokampusu, drugi le v določenih regijah (DG in/ali CA), lahko pa v času po injiciranju kainske kisline opazimo tudi pod-regijske spremembe v izražanju posameznega gena (Kiessling in Gass 1993, Kaminska in sod. 1994a in 1994b, Zagulska-Szymczak in sod. 2001). Nevrotoksičen učinek delovanja kainske kisline se po 24 urah izrazi tudi kot reaktivna glioza, ko se astrociti in mikroglia celice razraščajo v poškodovanih regijah možganov. Pri tem se iz glia celic sproščajo različne snovi in verjetno je dvig endogene kinolinske kisline v tednih po delovanju kainske kisline posledica odgovora glia celic, ki aktivno delujejo na mestih poškodb, povzročenih s kainsko kislino. Kinolinska kislina nato deluje na NMDA_R, povzroča depolarizacijo nevronov in verjetno še preko drugih mehanizmov vpliva na širjenje poškodb zaradi epileptogene aktivnosti možganskih regij (Behan in Stone 2000). Veliko živali čez več tednov po prvem, s kainsko kislino izzvanem, napadu razvije tudi spontane epileptične napade (Bausch in McNamara 2000, Pitkänen in sod. 2006), kar je verjetno poledica kompleksnega odgovora živčevja na prve sprožene epileptične napade in sprememb v povezavah nevronov, sestavi receptorjev in drugo.



Slika 8: Shematičen prikaz vpliva kainske kisline na celico in poti celične smrti (prilagojeno po Wang in sod. 2004, str. 2) (Scheme of neuronal cell death pathways induced by kainic acid)

Kainska kislina se veže na kainatne in AMPA (AMPA_R/KA_R) receptorje na plazmalemi celice in sproži vdor Ca^{2+} v celico, aktivacijo od Ca^{2+} odvisnih encimov in nastanek ROS. To vodi v rušenje fiziološkega membranskega potenciala mitohondrijev in odpiranje por na membrani tega organela, sproščanje mitohondrijskih faktorjev [cytochrome-c, AIF, Apoptotic-Induced Factor; cytochrome-c se veže na Apaf-1 in caspase-9 (kaspazo 9) in aktivira se pot caspase-3 (kaspaza 3)]; sledi kondenzacija in fragmentacija DNA ter apoptoza. Zelo zvečana koncentracija Ca^{2+} lahko tudi neposredno vodi v poškodbe mitohondrija, upad ATP in zvečanje ROS, kar vpliva na oksidacijo proteinov, lipidov in DNA ter vodi v nekrotično celično smrt.

1.4.1.2 EKSCITOTOKSIČNA POŠKODBA S KINOLINSKO KISLINO

Kinolinska kislina je endogeni metabolit triptofana in del kinureninske poti (Heyes 1992, Behan in Stone 2000, Tavares in sod. 2005). Kot del vnetnega odgovora nastaja v monocitih, makrofagih in aktivnih mikroglia celicah v osrednjem živčevju (Heyes 1992, Heyes in sod. 1996, Stone 1993, Behan in Stone 2000). Kinolinska kislina deluje kot selektivni agonist NMDA_R, ter lahko preko aktivacije omenjenih receptorjev povzroči ekscitotoksične poškodbe v nevronih (Stone 1993, Behan in Stone 2000). Aktivacija NMDA_R vpliva na zvečanje znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} , ATP izčrpanje in posledični ekscitotoksični proces (Schwarcz in sod. 1984). Delno je poškodba po delovanju kinolinske kisline povezana tudi z neposrednim delovanjem kinolinske kisline na glutamatni sistem, saj s svojo vezavo na receptorje zmanjša vezavo glutamata na MDA_{R} v hipokampusu (Lisy in Stastny 2002), poveča izločanje glutamata iz celic ter zavira privzem glutamata v astrocite (Tavares in sod. 2002). Kinolinska kislina torej lahko deluje kot nevrotoksin in prispeva k razvoju konvulzij pri epileptičnih napadih (Tavares in sod. 2005). Enostranska injekcija kinolinske kisline v striatum ima za posledico striatni in hipokampalen edem na poškodovani strani možganov, prožijo se tudi hemiepileptični napadi (Martinčič 2004). Marranes in Wauquier (1988) sta po enostranski injekciji kinolinske kisline v striatum podgane opisala vedenje t.i. "episodic barrel rotation", kar pomeni, da se podgane poleg kloničnih krčev kotalijo vzdolž osi telesa. To vedenje naj bi ustrezalo epileptičnemu vedenju, čeprav še vedno ni znano, zaradi česa se omenjeno vedenje sproži. Po enostranski injekciji kinolinske kisline v striatum izrazijo živali klonično gibanje glave stran od mesta injekcije ter tudi kontralateralno kroženje. Kasneje se živali s celotnim telesom zvijajo vzdolž osi telesa, tako da se dorzalno obračajo proti mestu injekcije kinolinske kisline. Levi sprednji ud je navadno iztegnjen kavdalno, desni sprednji ud pa rostralno in živali se kotalijo s celotnim telesom vzdolž osi telesa (Marranes in Wauquier 1988).

Po injekciji kinolinske kisline v striatum podgane, se poveča raven mRNA IEG (c-fos, c-jun, jun-B, zif/268) in nevrotrofinov (Shan in sod. 1997, Canals in sod. 1998). Povezava med podaljšanem izražanja IEG in ekscitotoksično poškodbo se lahko dokazuje z dajanjem nekompetitivnega antagonista NMDA_R, MK-801 (dizocilpin), ki prepreči vdor Ca^{2+} v celico oz. drugo fazo ekscitotoksične poškodbe (Brandt in sod. 2003). Na več različnih ekscitotoksičnih modelih so že pokazali nevro-zaščitni učinek MK-801 (Rice in DeLorenzo 1998), vendar zaščita nevronov vedno ne prepreči razvoja epilepsije oz. spontanih napadov (Brandt in sod. 2003). Veliko študij poroča o tem, da je toksično delovanje kinolinske kisline vezano predvsem na aktivacijo NMDA_R (Stone 1993). Po drugi strani pa z MK-801 niso uspeli popolno preprečiti nastanka prostih radikalov po delovanju kinolinske kisline, kar lahko pomeni, da del ekscitotoksičnosti zaradi kinolinske kisline nastane neodvisno od aktivacije NMDA_R in so poškodbe zaradi delovanja kinolinske kisline vezane na oksidativni stres (Behan in Stone 2000, Ganzella in sod. 2006). Znano je, da injekcija kinolinske kisline v striatum povzroči peroksidacijo lipidov v striatumu, hipokampusu in možganski skorji že 2 uri po injekciji kinolinske kisline (Ganzella in sod. 2006). Ganzella in sod. (2006) poročajo, da prosti radikali sami po sebi povzročijo povečano izločanje glutamata in hkrati zavirajo privzem glutamata, kar je mogoče ena od ekscitotoksičnih poti, ki se sproži po delovanju kinolinske kisline in je, ko se aktivira, neodvisna od delovanja NMDA_R (Ganzella in sod. 2006). Vsekakor bi bilo zanimivo raziskati mehanizme, ki so preko delovanja kinolinske kisline in MK-801 vključeni v proženje in preprečevanje epileptičnih napadov.
2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

2.1 NAMEN DELA

Namen dela je proučiti ali se raven sinaptotagmina IV (Syt IV) v možganih podgan poveča ob ekscitotoksičnih poškodbah, povzročenih s kainsko in kinolinsko kislino, ki sta agonista ionotropnih glutamatnih receptorjev (iGluR). Z agonisti iGluR povzročimo depolarizacijo nevronov (Balázs in sod. 2006) in posledično tudi ekscitotoksično poškodbo (Sperk in sod. 1983, Stone 1993, Walker in Carlock 1993, Rocamora in sod. 1994). Zaradi povečane sinhrone aktivacije nevronov v limbičnih predelih možganov se razvijejo epileptični napadi, ki jih spremlja povečanje koncentracije glutamata v zunajceličnem prostoru v omenjenih predelih (Bradford 1995). Zhang in sod. (2004) so že pokazali udeleženost Syt IV pri izločanju glutamata iz astrocitov, o njegovi vlogi v nevronih pa se še razpravlja. Syt IV je bil odkrit kot gen zgodnjega odgovora (IEG) in se povečano izraža po depolarizaciji živčnih celic (Vician in sod. 1995). Iz literature se ve, da se raven Svt IV z ontogenetskim razvojem zmanjšuje (Berton in sod. 1997 in 2000, Ibata in sod. 2000 in 2002), zato smo za raziskave endogenega proteina uporabili živalske modele, pri katerih sprožimo sinhrono aktivacijo nevronov različnih možganskih v področjih, nevrodegeneracijo in aktivacijo procesov, kateri so sicer značilni ob ontogenetskem razvoju živčevja (Gutiérrez 2003). Iz literature je že znano, da se po epileptičnih napadih, povzročenih s kainsko kislino, poveča raven mRNA Syt IV v hipokampusu in piriformni možganski skorji (Vician in sod. 1995, Tocco in sod. 1996). V naši raziskavi smo želeli natančneje opredeliti mesta povečanja ravni mRNA Syt IV po s kainsko kislino povzročenimi epileptičnimi napadi ter ugotoviti, ali se odgovorna mRNA prepisuje v protein.

V nadaljevanju so nas zanimale morebitne regionalne razlike v ravni proteina Syt IV v možganih podgane po injekciji kainske kisline. Natančneje smo analizirali raven Syt IV v možganski regiji hipokampus, ki naj bi bila tudi ena prvih možganskih področij, ki se aktivirajo po epileptičnem napadu (Sperk in sod. 1983, Zagulska-Szymczak in sod. 2001). Vloga proteina Syt IV pri uravnavanju izločanja snovi iz celice je še stvar raziskav in ni še jasno, ali je ta protein udeležen v negativno (Littleton in sod. 1999, Ferguson in sod. 1999, Thomas in sod. 1999) ali pozitivno (Fukuda in sod. 2003 in 2004, Zhang in sod. 2004, Yoshihara in sod. 2006) uravnavanje izločanja snovi iz celice. V tekoči raziskavi smo želeli opredeliti vlogo Syt IV pri zaščitnih ali/in degenerativnih procesih v možganih po epileptičnih napadih glede na njegov položaj v celici (v telesu nevrona, v dendritih, v predelih sinapse). Živali, ki jim sistemsko injiciramo uporabljen odmerek kainske kisline, namreč razvijejo epileptične napade (Sperk in sod. 1983), kar lahko vrednotimo po pet-stopenjski merski lestvici (Racine 1972). V raziskavi smo uporabili živali, ki so izrazile epileptične napade stopnje 3-5 po omenjeni lestvici. Za nadaljnjo opredelitev vpletenosti Svt IV v procese ob/po epileptičnih napadih pa smo izbrali model injiciranja kinolinske kisline v striatum možganov podgane. Ta model smo izbrali tudi zato, ker ekscitotoksin injiciramo le v eno stran možganov in nam lahko nepoškodovana stran možganov rabi za kontrolo. Model je tudi primeren za raziskave preprečevanja ekscitotoksičnih poškodb, saj lahko direktno aktivacijo NMDA receptorjev, na katere deluje kinolinska kislina, preprečujemo s predhodnim dajanjem antagonista NMDA receptorjev. Poškodbe in nelagodje živali smo v opisanih poskusih omejili na minimum.

Po enostranski injekciji kinolinske kisline v striatum podgane sta Marranes in Wauquier (1988) opisala vedenje podgan, t.i. "episodic barrel rotations", ki naj bi ustrezalo vedenju. Zaradi enostranske poškodbe epileptičnemu možganov govorimo 0 hemiepileptičnih napadih. Še vedno ni raziskano, zakaj se na tem modelu razvije omenjeno vedenje. Možno je, da se preko depolarizacije nevronov striatuma po delovanju toksina ekscitotoksični procesi širijo v hipokampus in limbične predele. Prav tako je mogoče, da toksin difundira iz striatuma do možganskih prekatov, ob katerih leži hipokampus. Želeli smo opredeliti, ali se raven Syt IV poleg v striatumu, kamor smo injicirali kinolinsko kislino, poveča tudi v hipokampusu in morebiti drugih limbičnih področjih. Na slednjem modelu smo z antagonistom istih receptorjev, na katere deluje kinolinska kislina, preprečevali nastanek hemiepileptičnega vedenja. Iz literature je že znano, da naj bi bila povečana raven mRNA Syt IV po ekscitotoksični poškodbi podobna povečanju genov zgodnjega odgovora in spremembam v izražanju rastnih faktorjev (Tocco in sod. 1996). Tako smo želeli s primerjavo izražanja mRNA Syt IV, mRNA genov zgodnjega odgovora (c-fos in c-jun) in mRNA nevrotrofina BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor, nevrotrofin) opredeliti potencial Syt IV kot označevalca aktivacije možganskih predelov ob s kinolinsko kislino povzročenimi hemiepileptičnimi napadi. Za analizo povečanja ravni mRNA omenjenih genov, smo izbrali čas 4 ure po enostranski poškodbi striatuma s kinolinsko kislino, saj ta čas ustreza iz literature že poročanemu povečanju ravni mRNA c-fos, c-jun in BDNF (Walker in Carlock 1993, Purkiss in sod. 1993, Rocamora in sod. 1994) ter tudi povečanju ravni mRNA Syt IV na modelu eksitotoksične poškodbe s kainsko kislino.

2.2 HIPOTEZE

Naša glavna hipoteza je bila, da se raven Syt IV v možganih podgan poveča po depolarizaciji celice in ekscitotoksični poškodbi, povzročeni ali s kainsko ali s kinolinsko kislino. Povečano raven Syt IV smo natančneje analizirali v možganski regiji hipokampus, ki je ena prvih regij, v kateri pride do poškodb ob epileptogeni aktivnosti možganov.

1. hipoteza: Predpostavljamo, da se po povečanju izražanja mRNA sinaptotagmina IV v hipokampusu po dajanju kainske kisline poveča tudi izražanje njegovega proteina.

Po povečanju ravni mRNA proteina, je pomembno, da se le-ta prepiše v funkcionalni protein. Samo povečanje mRNA še ne vodi nujno v povečano sintezo odgovornega literature proteina (Yoneda in sod. 2001), saj poznamo iz več tipov posttranslacijskih mehanizmov, ki vplivajo na izražanje proteinov. Tako smo za prvo hipotezo postavili predpostavko, s katero smo želeli opredeliti ali se po povečanju ravni mRNA, ki so jo poročali že drugi avtorji (Vician in sod. 1995, Tocco in sod. 1996) in smo jo pokazali v tekoči raziskavi, poveča tudi raven odgovornega proteina.

2. hipoteza: Predvidevamo, da po povečanju sinteze proteina sinaptotagmin IV v telesih nevronov hipokampusa, le-ta potuje v končiče v področje sinaps.

Glede na objave drugih avtorjev je Syt IV prisoten na transportnih mehurčkih, zato smo po povečanju ravni signala Syt IV ob jedru v telesih nevronov, pričakovali signal za ta protein tudi v drugih predelih živčnih celic. Za analizo potovanja proteina smo si izbrali možgansko regijo hipokampus. Po povečanju ravni proteina v telesu nevronov smo pričakovali v času spremenljivo pojavnost signala Syt IV, in sicer potovanje iz telesa nevronov v končiče na področje sinaps. Glede na to, da drugi avtorji poročajo, da je ta protein prisoten na LDCVs (Berton in sod. 1997, Ibata in sod. 2000, Wang in sod. 2003) in/ali SVs (Ferguson in sod. 1999, Ting in sod. 2006), smo signal Syt IV poleg v telesu nevronov pričakovali še v aksonih in dendritih ter na področju sinaps.

3. hipoteza: Po enostranski ekscitotoksični poškodbi striatuma s kinolinsko kislino pričakujemo povečanje mRNA sinaptotagmina IV v hipokampusu na poškodovani strani možganov ter v drugih nelimbičnih področjih.

V predhodnih hipotezah smo razvili predpostavko, da je povečana raven Syt IV po ekscitotoksični poškodbi posledica čezmerne aktivacije živčnih celic. Širitev epileptogene aktivnosti iz limbičnih v nelimbična področja so že opisali v literaturi (Pitkänen in sod. 2006). Model enostranske poškodbe striatuma, ki sicer ni del limbičnega sistema, s kinolinsko kislino naj bi ustrezal nekaterim pogojem za proženje epileptičnih napadov (Marranes in Wauquier 1988). Poleg v poškodovani možganski strukturi striatum, smo želeli pokazati povečanje ravni mRNA Syt IV še v hipokampusu in dokazati, da se ob hemiepileptičnih napadih po injekciji kinolinske kisline v desni striatum aktivira možganska regija hipokampus na isti strani. Ker smo v glavnem namenu študije želeli pokazati, da se raven Syt IV poveča po aktivaciji živčnih celic, smo po hemiepileptičnih napadih pričakovali povečano raven mRNA za omenjeni protein tako v limbičnih kot v nelimbičnih predelih možganov.

4. hipoteza: Predvidevamo, da bomo povečanje izražanja mRNA sinaptotagmina IV preprečili s predhodnim dajanjem MK-801, ki tudi vedenjsko prepreči hemiepileptični napad po kinolinski kislini.

Da je povečana raven Syt IV po enostranski poškodbi striatuma s kinolinsko kislino (agonist NMDA receptorjev) posledica hemiepileptičnega napada, smo dokazovali s predhodnim dajanjem MK-801 (antagonist NMDA receptorjev), s katerim lahko v ustreznem odmerku preprečimo epileptične napade (Bengzon in sod. 1997, Lee in sod. 2002, Pitkänen in sod. 2006). Z predhodnim dajanjem MK-801 lahko preprečimo povečan vdor kalcijevih ionov v celico in toksične procese, ki so povezani s preveliko koncentracijo teh ionov v celici. Predvidevali smo torej, da nam bomo z ustreznimi odmerki MK-801, ki ne bodo popolno preprečili hemiepileptičnega napada zaradi enostranske injekcije kinolinske kisline v striatum, uspelo analizirati povečano raven mRNA Syt IV v poškodovani strani možganov. Ob popolni preprečitvi hemiepileptičnega napada pa smo pričakovali nespremenjeno raven mRNA Syt IV v obeh možganskih poloblah možganov.

5. hipoteza: Predpostavljamo, da je izražanje mRNA sinaptotagmina IV primeren kazalec za pojav hemiepileptičnih napadov povzročenih s kinolinsko kislino.

Po enostranski poškodbi striatuma s kinolinsko kislino smo opazovali hemiepileptične napade, za katere smo predpostavili, da se aktivirajo limbični predeli možganov. Povečanje ravni mRNA Syt IV smo primerjali s povečanjem ravni genov zgodnjega odgovora (c-fos in c-jun) ter nevrotrofina BDNF ter sklepali na primernost tega povečanja kot kazalca za pojav hemiepileptičnih napadov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ŽIVALI

Doktorska naloga je bila opravljena z dovoljenjem, ki ga je izdala Veterinarska uprava Republike Slovenije (številka dovoljenja 323-349/2003-3).

Poskusi so bili narejeni na laboratorijskih podganah vrste *Rattus norvegicus* linije Wistar. Uporabili smo odrasle samce, ki so ob začetku poskusa s kainsko kislino (KA) tehtali 300 do 350 g, ob začetku poskusa s kinolinsko kislino (KK) pa 200 do 220 g. Živali so bivale v nadzorovanih razmerah, v klimatiziranem hlevu (22-24°C), z 12 urnim dnevno-nočnim ciklom (pri luči od 7⁰⁰ do 19⁰⁰). Na voljo so imele standardne brikete za podgane in vodo *ad libitum*. Poškodbe in nelagodje živali smo omejili na minimum.

3.2 INJICIRANJE KAINSKE KISLINE

Raztopino KA (2-Carboxy-3-carboxymethyl-4-isopropenylpyrrolidine hydrate, Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA) smo pripravili tik pred izvajanjem vedenjske raziskave. Zaradi večje natančnosti injiciranja je bil volumen raztopine KA 2 ml/kg telesne teže. Skupini podgan, ki je rabila za kontrolo raziskave, smo subkutano vbrizgali fiziološko raztopino (n = 6); ostalim skupinam živali smo subkutano vbrizgali KA, raztopljeno v 0,9 % fiziološki raztopini. Odmerek injiciranja je bil 10 mg/kg telesne teže.

Skupine živali so bile ob začetku raziskave sestavljene iz 6 do 8 podganjih samcev. Za tako število poskusnih živali smo se odločili na podlagi predhodnih izkušenj. Po injiciranju KA smo živali vedenjsko opazovali naslednjih 60 minut in več ter v nadaljnje raziskave vključili živali, ki so razvile 3-5 stopnjo epileptičnega napada po Racine lestvici (Racine 1972). Za analizo povečanja ravni mRNA sinaptotagmina IV smo uporabili živali, ki smo jih žrtvovali 1,5 ure (n = 3), 4 ure (n = 3), 8 ur (n = 3), 12 ur (n = 3) in 24 ur (n = 3) po injekciji KA. Živali, ki so dobile KA in so razvile reprezentativne epileptične napade, so bile v poskusu, ki mu je sledila analiza z imunohistokemijo in imunofluorescenco žrtvovane 1,5 ure (n = 3), 4 ure (n = 4), 8 ur (n = 4) in 24 (n = 4) ur po injekciji KA.

3.3 ENOSTRANSKA POŠKODBA STRIATUMA S KINOLINSKO KISLINO IN DAJANJE MK-801

Raztopino KK smo pripravili po naslednjem postopku: 10 mg KK (Quinolinic acid, RBI, Natick, MA, USA) smo raztopili v 0,5 ml natrijevega-fosfatnega pufra (0,1 M, pH = 7,4). Raziskava je bila sestavljena iz več skupin živali, skupno število uporabljenih živali je bilo 37 in so bile vse žrtvovane 4 ure po posegih.

Eni skupini (n = 8) smo s pomočjo stereotaktične naprave injicirali KK v desni striatum. Drugi skupini živali (n = 11) smo po predhodnem dajanju MK-801(dizocilpin ali (5R, 10S)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo(a,d)ciklohepten-5,10imin-maleat) v odmerku

1 mg/kg telesne teže (n = 4), 2 mg/kg telesne teže (n = 4) in 5 mg/kg telesne teže (n = 3) injicirali KK v desni striatum. Tretji skupini (n = 3) smo po injekciji fiziološke raztopine s stereotaktično napravo v desni striatum injicirali natrijev-fosfatni pufer (0,1 M, pH = 7,4). Četrta skupina (n = 10) je bila sestavljena iz živali, ki so dobile injekcijo MK-801 (n = 4 v odmerku 1 mg/kg telesne teže, n = 3 v odmerku 2 mg/kg telesne teže in n = 3 v odmerku 5 mg/kg telesne teže) in smo jim nato s stereotaktično napravo v desni striatum injicirali natrijev-fosfatni pufer (0.1 M, pH = 7,4). Kontrolni skupini (n = 5) smo injicirali fiziološko raztopino. Poškodbe in nelagodje živali smo omejili na minimum.

3.3.1 Potek stereotaktične operacije

Živali smo anestezirali z intraperitonealno vbrizgano mešanico Rompun (Bayer, Leverkusen, Germany) 8 mg/kg telesne teže in Ketanest (Parke Davies, Wien, Austria) 60 mg/kg telesne teže. Glavo podgane smo s pomočjo netravmatskih zatičev za zunanja sluhovoda ter držala, ki smo ga namestili za zgornjimi sekalci, vpeli v okvir stereotaktičnega aparata. S skalpelom smo prerezali skalp vzdolž sagitalnega lobanjskega šiva in očistili kost. Živalim smo s pomočjo stereotaktičnega aparata (TrentWells, South Gate, Kanada) v desni striatum na koordinatah po anatomskem atlasu (Paxinos in Watson 1998): anteriorno 0,5 mm, lateralno 3,0 mm, ventralno 5,0 mm (slika 9) injicirali 2 µl (240 nmol) KK s hitrostjo 1 µl/min. KK smo vbrizgali z nerjavečo kanilo (premer 0,25 mm), ki je bila pritrjena na držalo stereotaktičnega aparata in povezana s plastičnim katetrom s Halmiltonovo brizgalko (volumen brizgalko 10 µl), pritrieno na sistem za enakomerno in počasno injiciranje (Harvard Apparatus, microdrive pump, South Natick, MA). Po končanem injiciranju smo pustili kanilo še eno minuto na mestu, jo izvlekli in sneli živali iz okvira stereotaktičnega aparata. Zašili smo prerezani skalp in podgane namestili v pripravljene kletke za opazovanje vedenjskih poskusov. Podgane smo ob zbujanju in naslednjih 45 minut opazovali, ter zabeležili število hemiepileptičnih napadov ter ostala vedenja. Živali so bile žrtvovane 4 ure po injiciranju KK.



Slika 9: Področje injiciranja kinolinske kisline ali ustreznega pufra (prilagojeno po Paxinos in Watson 1998) (Place of stereotaxic injection of quinolinic acid or corresponding buffer)

Mesto injiciranja kinolinske kisline ali natrij-fosfatnega pufra (0.1 M, pH = 7,4) je označeno z *

3.3.2 Dajanje učinkovine MK-801

Živali so dobile MK-801 subkutano v odmerkih: 1, 2 in 5 mg/kg telesne teže. Odmerek MK-801 smo določali glede na preprečevanje hemiepileptičnih napadov ob zbujanju podgan po stereotaktičnem injiciranju KK v striatum.

3.4 OPAZOVANJE VEDENJA

Vedenje živali je bilo opazovano v sobi za poskuse, pri kontrolirani temperaturi in vlagi. Podgane so bile po ena nameščene v kletke kjer smo opazovali (hemi)epileptične napade.

3.4.1 Epileptični napadi po delovanju kainske kisline

Po injiciranju KA smo opazovali vedenja, ki jih je Racine (1972) opredelil v petstopenjski lestvici: (1) obrazni avtomatizmi, (2) kimanje z glavo in avtomatizmi, t.i. "wet dog shakes" (žival stresa kožuh, WDS), (3) lordotična (zgrbljena) poza živali in krči prednjih udov, (4) dvigovanje na zadnja uda in krči prednjih udov, (5) ista vedenja kot pod (3) in (4) ter izguba ravnotežja. Vedenja pod (3), (4) in (5) so značilna za motorične napade ali konvulzivne napade (Racine 1972). V nadaljnjih raziskavah smo uporabili podgane, ki so razvile stopnjo napada 3–5.

3.4.2 Hemiepileptični napadi po delovanju kinolinske kisline

Pri podganah, ki smo jim s stereotaktičnim injiciranjem KK sprožili hemiepileptične napade, in podganah, ki smo jim s subkutano injekcijo MK-801 preprečevali s KK povzročene hemiepileptične napade, smo opazovali vedenja: povečana motorična aktivnost (podgane se gibajo v odprtem polju), klonični zgibki glave stran od mesta injiciranja KK, krči levega sprednjega uda ter kotaljenje vzdolž osi telesa. Kot reprezentativni hemiepileptični napad nam je rabilo kotaljenje vzdolž osi telesa ("episodic barrel rotations", EBR).

3.5 HIBRIDIZACIJA IN SITU

Živali smo ob koncu poskusa uspavali s CO₂, jih obglavili in hitro izolirali možgane. Možgane smo zamrznili na suhem ledu, jih zavili v parafilm in jih do priprave rezin hranili pri -80°C. 10 µm debele koronarne rezine v področju striatuma (področje med 2,0 mm in 0,2 mm oddaljenosti od bregme, Paxinos in Watson 2005) in hipokampusa (področje med -2,5 mm in -5,5 mm oddaljenosti od bregme, Paxinos in Watson 2005) smo narezali s kriomikrotomom pri -20°C. Možganske rezine smo s kriostatovega noža pobirali s sterilnimi objektnimi stekelci. Objektna stekelca so bila pripravljena tako, da smo jih predhodno namočili v 0,01% raztopino poli-1-lizina (Sigma, St. Louis, MO, ZDA) in posušili na zraku. Možganske rezine smo 5 minut fiksirali v 4% sterilnem depolimeriziranem paraformaldehidu (Sigma, St. Louis, MO, ZDA) in spirali trikrat po eno minuto v sterilni raztopini natrij-fosfatnega pufra. Nato smo jih 5 minut dehidrirali v 70% etanolu in jih do uporabe hranili v hladni sobi (+4°C) v 95% etanolu.

3.5.1 Oligonukleotidne nasprotnosmiselne sonde

Zaporedje baz za 45-merne oligonukleotidne DNA sonde za določanje mRNA je bilo določeno z uporabo spletne baze o nukleotidnih zaporedjih "National Center for Biotechnology Information" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Določeno zaporedje, ki smo ga uporabili za sondo, smo preverili v bazi podatkov (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) in zagotovili, da ne obstajajo druga vezavna mesta, kot je želeno vezavno mesto za določeno sondo. Sonde so bile nato kemično sintetizirane in prečiščene v laboratoriju MWG-Biotech AG, Nemčija. Uporabili smo naslednje sonde:

- sinaptotagmin IV: 5'-CAG AGG GAG ACC AGA AGT TCA CCC CGT CCA GAA GAC TTC TTA GCA-3', komplementarna zaporedju baz 1082-1126 mRNA podganjega sinaptotagmina IV (genska banka "National Center for Biotechnology Information");
- <u>c-fos</u>: 5'- CCT TTA CAC AGG ATG TCC ATA TTA GGA CAT CTG CGT CAG GTT TCC-3' komplementarna zaporedju baz 135-179 mRNA podganjemu genu zgodnjega odgovora c-fos (genska banka "National Center for Biotechnology Information");
- <u>c-jun</u>: 5'- AAA GAT GGA A AC GAC CTT CT A CGA CGA TGC CCT CAA CGC C TC GTT -3' komplementarna zaporedju baz 361-405 podganjemu genu zgodnjega odgovora c-jun (genska banka "National Center for Biotechnology Information");
- BDNF, brain derived neurotrophic factor: 5' TAT GCC CCT GCA GCC TTC CTT CGT GTA ACC CAT GGG ATT ACA CTT – 3', komplementarna zaporedju baz 914-958 mRNA podganjemu nevrotrofinu BDNF (genska banka "National Center for Biotechnology Information").

Oznake zapisov nukleotidnih zaporedij ("GenBank accession numbers") za posamezne gene v genski banki "National Center for Biotechnology Information" so bile naslednje: sinaptotagmin IV L38247, c-fos DQ089699, c-jun X17163 in BDNF BC087634.

Specifičnost sond za vezavna mesta je bila preverjena tako, da se je na sosednjih rezinah uporabilo hibridizacijski pufer, v katerem je bil poleg označene sonde še stokratni presežek nukleotidnega zaporedja neoznačene sonde. Neoznačene sonde so tekmovale za vezavna mesta z označenimi in tako preprečile vezavo označenih (Glavan 2003).



Slika 10: Prikaz prijemališč sond za analizirane gene (prilagojeno po http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat)

Na sliki so prikazana mesta prijemališč sond, ki smo jih uporabili za analizo ravni mRNA Syt IV (a), c-jun (b) c-fos (c) in BDNF (d) pri podgani. Prijemališča uporabljenih sond so prikazana na podlagi analize s programom Blat, po http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat.

3.5.2 Radioaktivno označevanje sond

DNA sonde smo označili s pripenjanjem radioaktivno označenih adenozinskih nukleotidov na 3'- konec oligonukleotidne sonde. Reakcijske zmesi v Eppendorfovih centrifugirkah so vsebovale: 5,3 µl vode z 0.01% dietilpirokarbonatom (DEPC; Sigma, St. Louis, MO, ZDA), 2 µl (10 ng) oligonukleotidne sonde, 1,5 µl deoksiadenozin-5'(α -tio)-trifosfata, [³⁵S], specifične aktivnosti 100-1500 Ci/mmol (10-15 µCi/µl) (NEN; Life Science Products Inc., Boston, ZDA), 2,5 µl pufra (0,2 M EDTA (pH 8), 0,5 M Na₂HPO₄ (pH 6,8); po navodilih Promega, Madison, WI, ZDA) ter 1 µl terminalne deoksinukleotidiltransferaze (15 U/µl) (Promega, Madison, WI, ZDA). Reakcijsko zmes smo inkubirali eno uro v stresalni vodni kopeli pri 36°C. Po končani inkubaciji smo reakcijo zaustavili z dodatkom 37,5 µl vode z DEPC.

3.5.2.1 Priprava kolon sefadeksa G-50 in čiščenje raztopine radioaktivno označenih sond

Kolone sefadeksa G-50 smo pripravili v sterilnih 1 ml brizgalkah, katerih izhod smo zamašili s stekleno volno in jih napolnili s sefadeksom (Sigma, St. Louis, MO, ZDA), namočenim v TENS. TENS smo pripravili iz 0,1 M NaCl, 20 mM TRIS, 5 mM EDTA (etilen-2-amino-4-ocetna kislina) in 0,1% natrijev-lauril-sulfata, ki so bili raztopljeni v vodi z DEPC. Kolone smo umerili s trikratnim centrifugiranjem (2 min pri 2000 RPM). Pred vsakim centrifugiranjem smo na kolone nanesli 52 μ l TENS. Nevgrajeni deoksiadenozin 5'(α -tio) trifosfat, [³⁵S] smo iz reakcijske zmesi odstranili tako, da smo zmes nanesli na kolono sefadeksa G-50 in centrifugirali v namizni centrifugi 2 min pri 2000 RPM. Eluatu smo dodali 2 μ l 1 M ditiotreitola (DTT; Sigma, St. Louis, MO, ZDA) in iz njega odvzeli 2 μ l vzorca za meritev aktivnosti v števcu na tekoče scintilatorje. Navadna izmerjena aktivnost je bila od 100 do 300 x 10³ d.p.m./ μ l (specifična aktivnost posameznih radioaktivno označenih oligonukleotidnih sond je znašala 450 do 680 μ Ci/ μ g).

3.5.3 Hibridizacija in situ

Uporabljali smo postopek hibridizacije *in situ*, ki je bil razvit v laboratoriju dr. D. J. S. Sirinathsinghija (Sirinathsinghiji in sod. 1990) in temelji na uporabi sintetičnih, radioaktivno označenih 45-mernih oligonukleotidih DNA sond za določanje mRNA.

Da bi preprečili kontaminacijo z ribonukleazami, smo vodi, s katero smo pripravljali raztopine, dodali DEPC do končne koncentracije 0,01%, nakar smo raztopino avtoklavirali. Prav tako smo avtoklavirali vso laboratorijsko plastiko in toplotno obdelali steklovino, ki smo jo uporabljali pri postopku hibridizacije *in situ*. Uporabljali smo kemikalije, v katerih po zagotovilu proizvajalcev niso bile prisotne ribonukleaze ali deoksiribonukleaze in ves čas postopka uporabljali sterilne gumijaste rokavice.

Radioaktivno označene sonde smo razredčili s hibridizacijsko raztopino do koncentracije 5000 d.p.m./µl. Hibridizacijski pufer je vseboval: 50% formamid (Sigma, St. Louis, MO, ZDA), 4x SSC (1x SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M natrijev citrat), 10% dekstran sulfat (Sigma, St. Louis, MO, ZDA), 5x Denhardtovo raztopino (Sigma, St. Louis, MO, ZDA), 200 µg/µl ssDNA (DNA sperme losusa), 100 µg/ml poliadenilne kisline (Sigma, St. Louis, MO, ZDA), 120 µg/ml heparina (Sigma, St. Louis, MO, ZDA), 2,5 mM natrijevega fosfata in 1 mM natrijevega pirofosfata. Pred inkubacijo smo hibridizacijskemu pufru dodali še DTT (40 mM).

Hibridizacijski pufer z označenimi sondami smo pipetirali na možganske rezine na objektnih stekelcih (100 μ l pufra na stekelce) in jih prekrili s trakovi parafilma, ki so po velikosti ustrezali velikosti stekelca. Nato smo objektnike zložili v za zrak neprepustne plastične posode s kosmi staničevine, prepojenimi z vodo z DEPC, ki so preprečevali izsušitev in jih čez noč inkubirali pri 42°C. Specifičnost smo zagotovili tako, da smo analizo izražanja posameznega gena, se pravi hibridizacijo posamezne sonde, opravili vzporedno, v postopku na vseh preučevanih možganskih rezinah.

Po končani inkubaciji smo s spiranjem možganskih rezin odstranili nespecifično vezane označene sonde na ostale dele tkiva tako, da smo objektnike potopili v raztopino za izpiranje (1x SSC in 1% natrijev-tiosulfata), kjer smo jim odstranili parafilm in jih pustili v njej 30 minut pri sobni temperaturi. Objektnike smo nato prenesli v svežo izpiralno raztopino v vodni kopeli (55°C), kjer smo ob počasnem stresanju spirali objektnike še eno uro. Sledilo je kratkotrajno zaporedno pomakanje v raztopini 1x SSC ter dehidracija v 70% in 95% etanolu. Objektnike z rezinami smo nato posušili na zraku.

3.5.4 Ekspozicija, razvijanje in fiksiranje avtoradiografskih filmov

Posušene objektnike smo zložili v filmske kasete in preko njih položili avtoradiografski film. Da bi se izognili različnim razmeram ekspozicije, ki lahko vplivajo na osvetljenost filmov, smo rezine, hibridizirane z istovrstno sondo, zložili v skupne filmske kasete. Ekspozicija pri sobni temperaturi je trajala 2-3 tedne, odvisno od pričakovane moči signala. Filme (Scientific Imaging Film X-OmatTM AR; Kodak, Rochester, NY, ZDA) smo po končani ekspoziciji vzeli iz kaset v temnici ob varni luči (filter Kodak, z oznako 1A) in

jih razvijali 5 minut v raztopini razvijalca (Kodak GBX developer/replenisher; Sigma, St. Louis, MO, ZDA), sprali pod tekočo vodo in fiksirali 5 minut v raztopini fiksirja (Kodak Rapid fixer; Sigma, St. Louis, MO, ZDA). Filme smo po fiksaciji spirali 15 minut v tekoči vodi in jih nato posušili na zraku.

3.6 IMUNOHISTOKEMIJA IN IMUNOFLUORESCENCA

Živali so bile žrtvovane v globoki anesteziji (intraperitonealno vbrizganje mešanice: Rompun (Bayer, Leverkusen, Germany; 8 mg/kg telesne teže) in Ketanest (Parke Davies, Wien, Austria; 60 mg/kg telesne teže)) s transkardialno perfuzijo, najprej s hladno (4°C) fiziološko raztopino s heparinom, nato s hladnim 4% paraformaldehidom v 0,1 M natrij-fosfatnem pufru (PBS, pH 7,2-7,4). Možgani so bili odstranjeni in prestavljeni čez noč v postfiksacijski medij (20% saharoza v 4% paraformaldehidu) in nato v raztopino PBS z 20% saharoze, kjer smo jih shranjevali pri 4°C.

3.6.1 Priprava, fiksacija in shranjevanje možganskih rezin

Koronalne možganske rezine (15 μ m) smo pri sobni temperaturi pripravili s pomočjo zamrzovanja s suhim ledom na drsnem nožu. Prosto plavajoče rezine smo shranili pri -20°C v raztopini krioprotektant (300 g saharoze, 300 g etilen glikola in 10 g PVP-40 v 500 ml 0,1 M natrijfosfatnega pufra).

3.6.2 Imunohistokemijsko označevanje z biotiniliranim protitelesom

Postopek smo izvajali z ABC kompletom glede na predpisana navodila navedenega kompleta (ABC elite standard kit, Vector, Laboratories, Burlingame, CA, USA). Možganske rezine smo najprej 30 minut inkubirali v kalij-fosfatnem pufru (KPBS; 50mM; pH 7.2), ki je vseboval 4,0% normalnega seruma koze (NS) in 1,0% govejega serumskega albumina (BSA, Bovine Serum Albumin). Sledila je 12 do 16-urna inkubacija (4°C) z zajčjim poliklonskim protitelesom proti Syt IV (narejeno na Syt IV-C2A domeno, darilo od Mitsunori Fokuda, RIKEN Wako Institute, Japan, Ibata in sod. 2000) raztopljenim 1:500 v KPBS z 1,0% NS in 1,0% BSA. Naslednjim spiranjem v KPBS z 0.25% Triton X-100 in 0,25% BSA je sledila 60-minutna inkubacija rezin z biotiniliranim sekundarnim proteitelesom (Vector Lavoratories, Inc. Burlingame, CA, USA). Temu koraku je sledilo spiranje v KPBS in nato 60-minutna inkubacija z avidin-biotin-peroksidaznim kompleksom (Vector, Laboratories, Burlingame, CA, USA). Po spiranju rezin, najprej v KPBS, nato v acetat-imidazolnem pufru (0.2 M imidazol in 1 M natrijev acetat, pH = 7.2), smo imunoreaktivni produkt naredili vidni z DAB reakcijo (uporabili smo 3,3'-diaminobenzidin, DAB, Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI, USA). Ob koncu postopka smo rezine s čopičem namestili na silanizirana stekla (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), dehidrirali in pokrili z DePeX (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany).

Negativne imunohistokemične kontrole so bile pripravljene po istem postopku, le da smo izpustili korak inkubacije s primarnim protitelesom.

3.6.3 Imunofluorescenčno označevanje z AlexaFluor₄₈₈ protitelesom

Immunofluorescenčno označevanje je potekalo po naslednjem postopku: možganske rezine smo najprej 30 minut inkubirali v KPBS, ki je vseboval 4,0% NS in 1,0% BSA. Sledila je 12 do 16-urna inkubacija (4°C) z zajčjim poliklonskim protitelesom proti Syt IV narejeno na Syt IV-C2A domeno (darilo od Mitsunori Fokuda, RIKEN Wako Institute, Japan, Ibata in sod. 2000) raztopljenim 1:500 v KPBS z 1.0% NS in 1.0% BSA. Po naslednjih spiranjih v KPBS z 0,25% Triton X-100 in 0,25% BSA, smo rezine inkubirali v temi naslednjih 60 minut s streptavidin konjugiranim fluoroforom AlexaFluor 488 (raztopljen 1:250). Temu koraku je sledilo spiranje v KPBS. Ob koncu postopka smo rezine namestili na silanizirana stekla (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) in pokrili z Vectashield z DAPI (Vector Lavoratories, Inc. Burlingame, CA, USA).

Negativne imunofluorescenčne kontrole so bile pripravljene po istem postopku, le da smo izpustili korak inkubacije s primarnim protitelesom.

3.7 ANALIZA AVTORADIOGRAMOV

Avtoradiograme smo analizirali z napravo za analizo slike MCID (M4 Image analyser, Imaging Research Inc., Kanada), upoštevajoč denzitometrična načela vrednotenja slike (Evaluating image analysis systems, 1995). Avtoradiograme smo polagali na negatoskop (Northern light, Kanada), ki jih je presvetljeval z difuzno neonsko svetlobo. Posamezne možganske rezine smo zajeli s CCD kamero. Program je ob zajemu video signal digitaliziral v osem-bitno črno-belo digitalno sliko, kateri je lahko priredil barvno paleto 256 barv. Tako je vsaka barva predstavljala določeno raven sivine. Področja, ki so na filmu vsebovala zelo nizko stopnjo počrnitve (področja s šibkim signalom, t.j. nizka stopnja hibridizacije) in so prepuščala največ svetlobe, so na tako sestavljeni sliki ("psevdobarvna" slika) obarvana temno modro in rožnato. Področja najmočnejše počrnitve na filmu, ki so prepuščala najmanj svetlobe (področja z močnim signalom, t.j. visoka stopnja hibridizacije), pa so obarvana rdeče do črno.

Program je pri zajemanju slik opravil popravo nehomogenosti ozadja svetlobnega vira (t.i. "flat field correction"). Meritve ravni mRNA smo naredili tako, da smo na zajeti sliki rezine določene živali (kar kasneje prestavlja število meritev) obkrožali regijo možganov, v kateri smo želeli izmeriti optično gostoto. Program je znotraj očrtanega področja za posamezno slikovno točko izmeril in izračunal "individual relative optical density" ali iROD:

Program je znotraj očrtanega področja nato izračunal povprečje individualnih relativnih optičnih gostot = ROD ("relative optical density"):

Področja, ki smo jih analizirali (po Paxinos in Watson 1998) so (slika 10): sredica jedra akumbens (NAcC), skorja jedra akumbens (NAcS), striatum (STR), talamus (THAL), ventralni palidum (VPal), geniukulatna jedra (GC), amigdaloidno jedro (AMG), predele možganske skorje (entorinalno (EC), pirirformno (PIR), cingulatno (CING) in motorično (MOT)), znotraj možganske regije hipokampus smo analizirali podregije: granularni sloj dentatnega girusa (DGg), polimorfni sloj dentatnega girusa (hilus, DGh), CA1 piramidalni sloj (CA1) in CA3 piramidalni sloj (CA3).

Dobljene vrednosti smo uredili v MS Excel in analizirali s pomočjo programov MS Excel, MS Access in SPSS. Raven analiziranih mRNA smo v slikah predstavili kot povprečno ROD \pm SD (standardni odklon). Učinek s KA sproženih epileptičnih napadov na raven mRNA Syt IV smo statistično analizirali z analizo variance (ANOVA) in z LSD (least-significant difference) post hoc testom (p \leq 0,05). Vpliv enostranske poškodbe striatuma s KK na raven analiziranih mRNA smo primerjalno med levo in desno možgansko poloblo statistično analizirali z enostranskim t-testom (p \leq 0,05).

3.8 DOLOČANJE IN ANALIZA IMUNOREAKTIVNEGA SIGNALA

Imunoreaktivni signal preparatov, označenih z DAB-jem, smo določili s svetlobnim mikroskopom (Olympus IX81), ki je imel pritrjeno digitalno kamero (Nikon DXM 1200). Posnetke imunoreaktivnega signala smo zajemali na področju hipokampusa pri povečavah 5x, 10x, 20x in 40x. Posamezne celice v področju hilusa dentatnega girusa smo določali s pomočjo povečave 40x in spreminjanjem globinske ostrine. Zaradi ozadja imunohistokemičnega barvanja, smo jakost svetlobe prilagodili na novo pri vsakem stekelcu.

Imunoreaktivni signal fluorescentnega označevanja smo določili z mikroskopoma Olympus IX81 in Nicon Eclipse 200. Za analizo imunofluorescenčnega signala smo uporabili filtra U-MWU2 (za DAPI) in U-MWIB3 (za AlexaFluor488). Posnetke smo zajemali pri povečavah 40x in 60x. Del posnetkov smo naredili s pomočjo ApoTome (Zeiss).

Imunopozitiven signal smo analizirali s pomočjo negatoskopa in CCD kamere. Posnetke smo analizirali z napravo za analizo slike MCID, upoštevajoč denzitometrična načela vrednotenja slike kot pri analizi avtoradiogramov. Vsako od analiziranih regij smo ročno označili in pomerili optično gostoto znotraj označenega področja na treh rezinah. Od izmerjenih vrednosti smo odšteli vrednost optične gostote na predelu stekelca, kjer ni bilo možganske rezine (krovno stekelce in DePeX). S tem smo omogočili primerjavo meritev med različnimi stekelci. Z anatomskim atlasom možganov podgane Paxinos in Watson (1998) smo določili in analizirali anatomska področja (slika 10): jedro akumbens (NAc),

striatum (STR), amigdaloidno jedro (AMG), predele možganske skorje (entorinalno (EC), pirirformno (PIR)), znotraj možganske regije hipokampus smo analizirali podregije: granularni sloj dentatnega girusa (DGg), polimorfni sloj dentatnega girusa (hilus, DGh), CA1 piramidalni sloj (CA1) in CA3 piramidalni sloj (CA3).

Dobljene vrednosti smo uredili v MS Excel in analizirali s pomočjo MS Excel, MS Access in SPSS programov. Rezultate smo v slikah izrazili kot povprečno vrednost \pm SD. Učinek s KA sproženih epileptičnih napadov na raven Syt IV smo statistično analizirali z analizo variance (ANOVA) in z LSD post hoc testom (p \leq 0,05).



Slika 11: Področja meritev signala Sinaptotagmin IV (prilagojeno po Paxinos in Watson 1998) (Schematic presentation of brain regions where Synaptotagmin IV signal was measured)

Meritve smo opravili v regijah: hipokampusa (DGg, DGh, CA1 in CA3), možganske skorje [piriformne (PIR), entorinalne (EC), cinglulatne (CING), motorične (MOT)], jedro akumbens (NAc) [sredica (NAcC), skorja (NAcS)], striatum (STR), amigdaloidno jedro (AMG), genikulatna jedra (GC) in talamusna jedra (THAL).

4 REZULTATI

V poskusih s kainsko kislino (KA) smo uporabili 78 podganjih samcev, od teh je 30 podgan razvilo epileptični napad stopnje 3-5 po Racine lestvici (1972). Raven proteina Syt IV se je povečala pri vseh živalih, ki so imele s KA sprožen epileptični napad 3-5 stopnje po Racine lestvici (1972). V poskusih s kinolinsko kislino (KK) smo uporabili 37 podganjih samcev. Hemiepileptični napad (kotaljenje vzdolž osi telesa, EBR) smo opazili pri vseh podganah (n = 8), ki smo jim v desni striatum injicirali KK v zgoraj navedenem odmerku ter pri treh od štirih podganah, ki so pred injiciranjem KK v striatum dobile injekcijo MK-801 v odmerku 1 mg/kg telesne teže. Pri ostalih skupinah podgan v poskusih s kinolinsko kislino EBR niso bili prisotni. Pri 6 živalih smo z injekcijo MK-801 uspešno preprečili hemiepileptične napade. Raven mRNA Syt IV se je povečala pri vseh živalih, ki so imele za naše vzorčenje popolni hemi- ali epileptični napad, ni pa se povečala pri živalih, katerim smo hemiepileptični napad preprečili.

4.1 RAVEN MRNA SINAPTOTAGMINA IV PRI KONTROLNIH ŽIVALIH

Bazalno raven ROD Syt IV (ki predstavlja raven mRNA, v nadaljevanju uporabljeno kot raven mRNA signala) smo izmerili v dentatnem girusu (DG) in piramidalnih slojih (CA) hipokampusa, piriformni in entorinalni možganski skorji, amigdaloidnem jedru, habenuli, malih možganih in *substantii nigri compacti*.

4.2 RAVEN PROTEINA SINAPTOTAGMINA IV PRI KONTROLNIH ŽIVALIH

Imunoreaktivni signal Syt IV (ki predstavlja raven proteina) je pri kontrolnih živalih prisoten v posameznih celicah subikuluma, amigdaloidnega jedra, rdečega jedra (*nucleus ruber*), substantie nigre compacte, ventralnega tegmentalnega predela (*ventral tagmental area*), talamusa in v predelih možganske skorje. V hipokampusu je bila imunoreaktivnost Syt IV prisotna v telesih posameznih celic polimorfnega sloja dentatnega girusa (hilus, DGh). Imunopozitivne celice verjetno pripadajo zvezdastim (stellate) in vretenastim (fuziform) celicam DGh (slika 21). V času 1,5 ure po s KA sproženimi epileptičnimi napadi, se imunoreaktivni signal ni značilno razlikoval od kontrole.

4.3 EKSCITOTOKSIČNA POŠKODBA S KAINSKO KISLINO

Približno eno uro po injekciji KA so živali razvile epileptične napade 3-5 stopnje po Racine lestvici (glej opis v Materiali in metode).

4.3.1 Povečana raven mRNA Sinaptotagmina IV po s kainsko kislino sproženimi epileptičnimi napadi

Subkutana injekcija KA je glede na kontrolne živali, ki so dobile injekcijo fiziološke raztopine, v možganih podgane povzročila statistično značilno (ANOVA, LSD test, $p \le 0,05$) povečano raven mRNA Syt IV v predelih hipokampusa (DGh, CA1 in CA3) (slika 12). V hipokampusu se je v podregiji DGg raven mRNA Syt IV značilno (ANOVA, LSD test, $p \le 0,05$) povišala v 1,5 ure, 4 ur in 8 ur po KA injekciji, 12 ur in 24 ur po injiciranju KA pa v DGg nismo zaznali značilnih razlik v ravni mRNA Syt IV glede na kontrolne živali (sliki 12 in 17). Raven mRNA Syt IV po s KA povzročenimi epileptičnimi napadi se je značilno povečala tudi v amigdaloidnemu jedru, entorinalni, piriformni, motorični ter cingulatni možganski skorji (slika 13) ter v jedru akumbens, striatumu, ventralnem palidumu in talamusu (slika 14).

Raven mRNA se je v 1,5-8 ur po injekciji KA v primerjavi s kontrolo povečala v piriformni, entorinalni možganski skorji, amigdaloidnem jedru, hipokampusu, cingulatni in motorični možganski skorji, jedru akumbens in striatumu (slike12-14 in slika 17). V 12 ur po KA injekciji raven mRNA Syt IV v talamusu (slika 14), DGg (slika 12), jedru akumbens ter striatumu (slika 14) ni bila več statistično zančilno različna od kontrole. Raven mRNA Syt IV je bila v primerjavi s kontrolo povečana še 24 ur po KA v piriformni možganski skorji (slika 13), CA1 in CA3 sloju hipokampusa (slika 12).



Slika 12: Raven mRNA Sinaptotagmina IV v hipokampusu 1,5 do 24 h po s kainsko kislino sproženimi epileptičnimi napadi

(Levels of Synaptotagmin IV mRNA hybridization signal in hippocampus of rats 1.5-24 h after KA-induced seizures)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 3) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike glede na kontrolno skupino (ANOVA, LSD test, p \leq 0,05). Legenda: DGg, granularni sloj dentatnega girusa; DGh, hilus (polimorfni sloj) dentatnega girusa; CA1, CA1 piramidalni sloj; CA3, CA3 piramidalni sloj hipokampusa. Rezultati so prikazani kot skupine glede na čas po injekciji kainske kisline (KA): 0 kot kontrolna skupina; ostale skupine so živali, ki so bile žrtvovane 1,5 h, 4 h, 8 h, 12 h in 24 h po KA.



Slika 13: Raven mRNA Sinaptotagmina IV v amigdaloidnem jedru in predelih možganske skorje 1,5 do 24 h po s kainsko kislino sproženimi epileptičnimi napadi

(Levels of Synaptotagmin IV mRNA hybridization signal in nucleus amygdalae and cortices of rats 1.5-24 h after KA-induced seizures)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 3) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike glede na kontrolno skupino (ANOVA, LSD test, p \leq 0,05). Legenda: PIR, piriformna možganska skorja; EC, entorinalna možganska skorja; AMG, amigdaloidno jedro; MOT, motorična možganska skorja; CING, cingulatna možganska skorja. Rezultati so prikazani kot skupine glede na čas po injekciji kainske kisline (KA): 0 kot kontrolna skupina; ostale skupine so živali, ki so bile žrtvovane 1,5 h, 4 h, 8 h, 12 h in 24 h po KA.



Slika 14: Raven mRNA Sinaptotagmina IV v drugih področjih možganov 1,5 do 24 h po s kainsko kislino sproženimi epileptičnimi napadi

(Levels of Synaptotagmin IV mRNA hybridization signal in other brain regions of rats 1.5-24 h after KAinduced seizures)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 3) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike glede na kontrolno skupino (ANOVA, LSD test, p \leq 0,05). Legenda:NAcC, sredica jedra akumbens; NAcS, skorja jedra akumbens; STR, striatum; THAL, talamus; VPal ventralni palidum. Rezultati so prikazani kot skupine glede na čas po injekciji kainske kisline (KA): 0 kot kontrolna skupina; ostale skupine so živali, ki so bile žrtvovane 1,5 h, 4 h, 8 h, 12 h in 24 h po KA.

4.3.2 Imunoreaktivni signal Sinaptotagmina IV

Sistemska injekcija KA je glede na kontrolne živali, ki so dobile injekcijo fiziološke raztopine, povzročila povečano raven proteina Syt IV v slojih hipokampusa (DGg, DGh, CA1 in CA3; slike 15, 18 in 20-21), amigdaloidnem jedru, entorinalni in piriformni možganski skorji ter jedru akumbens in striatumu (slike 13-14 in 16).

(a) hipokampus

<u>V granularnem sloju DG (DGg)</u> smo v primerjavi s kontrolnimi živalmi v 4 urah po injekciji KA opazili značilno (LSD test, $p \le 0.05$) povečanje imunoreaktivnega signala Syt IV (slika 15), vendar ta signal v 24 ur po KA ni bil več značilno različen od signala pri kontrolnih živalih (slika 15). V času 4 ure po KA, je bil signal Syt IV prisoten v somatodendritičnem delu celic sloja DGg (slike 20-22).

<u>V hilusu DG</u> (DGh) smo v 4 urah po KA opazili imunoreaktivni signal Syt IV le v posameznih celicah na meji med DGg in DGh (verjetno dentatne-košaričaste in/ali piramidalne-košaričaste celice, za natančno določitev potrebne dodatne metode označevanja in elektronska mikroskopija), v 8 ur po KA pa smo opazili značilno povečanje (LSD test, $p \le 0,05$) imunoreaktivnega signala (slika 15) Syt IV ter pestrejšo zastopanost imunopozitivnih celic: dentatno-košaričaste, vretenaste, kroglaste, piramidalno-košaričaste, zvezdaste, piramidalno-zvezdaste in piramidalne celice (po Amaral 1978). V 24 ur po KA je bil signal Syt IV še vedno statistično zančilno povečan (LSD test, $p \le 0,05$) glede na kontrolo (slike 15 in 18, 20-21).

<u>V CA3 regiji hipokampusa</u> 4 ure po KA nismo opazili povečanja imunoreaktivnega signala Syt IV, v 8 ur po KA smo opazili v tem predelu značilno povečano raven signala (LSD test, $p \le 0,05$), vendar je signal v 24 urah po KA upadel in ni bil več statistično zančilno različen od kontrole. S histološkim barvilom (metilensko modrilo, Methylen blue, Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA) smo pobarvali CA3 piramidalne nevrone (slika 23) pri živalih, ki so bile žrtvovane 24 ur po KA injekciji in nismo zaznali propadanja celic v tej regiji (slika 18).

V <u>CA1</u> regiji 4 ure po KA nismo opazili povečanja imunoreaktivnega signala Syt IV. Signal smo v 8 ur po KA opazili v nekaj piramidalnih celicah (slika 15), nato pa se je raven imunoreaktivnega signala Syt IV (24 ur po KA) značilno (LSD test, $p \le 0.05$) povečala (sliki 15 in 20) glede na kontrolo.



Slika 15: Imunoreaktivni signal Sinaptotagmina IV v hipokampusu 4 do 24 h po s kainsko kislino povzročenimi epileptičnimi napadi

(Levels of Synaptotagmin IV immunoreactivity in hippocampus of rats 4-24 h after KA-induced seizures)

Rezultati so izraženi kot povprečne vrednosti meritev (n = 3) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike glede na kontrolno skupino (ANOVA, LSD test, p \leq 0,05). Legenda: CA1, CA1 piramidalni sloj; CA3, CA3 piramidalni sloj, DGG, granularni sloj dentatnega girusa; DGG, hilarni sloj dentatnega girusa hipokampusa. Rezultati so prikazani kot skupine glede na čas po injekciji kainske kisline (KA): 0 kot kontrolna skupina; ostale skupine so živali, ki so bile žrtvovane 4 h, 8 h in 24 h po KA.

(b) Ostala možganska področja

Povečano imunoreaktivnost smo poleg v hipokampusu opazili tudi v piriformni in entorinalni možganski skorji ter amigdaloidnem jedru, jedru akumbens, striatumu ter cingulatni in primarni motorični možganski skorji (sliki 16 in 19). Poleg v omenjenih področjih smo opazili povečano imunoreaktivnost tudi v genikulatnem jedru, habenuli in *substantii nigri reticulati*.

V piriformni in entorinalni možganski skorji ter amigdaloidnem jedru je bil signal glede na kontrolne živali povečan v 8 ur po KA. V jedru akumbens je bil imunoreaktivni signal Syt IV v primerjavi s kontrolo značilno povečan v 4 ure po KA, v striatumu pa v 8 ur po KA (slika 16).



Slika 16: Imunoreaktivni signal Sinaptotagmina IV v ostalih analiziranih regijah možganov 4 do 24 h po s kainsko kislino povzročenimi epileptičnimi napadi

(Levels of Synaptotagmin IV immunoreactivity in other analyzed brain regions of rats 4-24 h after KAinduced seizures)

Rezultati so izraženi kot povprečne vrednosti meritev (n = 9) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike glede na kontrolno skupino (ANOVA, LSD test, p \leq 0,05). Legenda: AMG, amigdaloidno jedro; EC, entorinalna možganska skorja; PIR, piriformna možganska skorja, STR, striatum; NAc, jedro akumbens. Rezultati so prikazani kot skupine glede na čas po injekciji kainske kisline (KA): 0 kot kontrolna skupina; ostale skupine so živali, ki so bile žrtvovane 4 h, 8 h in 24 h po KA.

(c) Subcelična analiza imunoreaktivnosti Sinaptotagmina IV

V dentatnem girusu smo v 4 ure po KA potrdili prisotnost imunoreaktivnega signala Syt IV v telesih granularnih celic (sliki 20 in 22). V 8 ur po KA smo opazili imunofluorescenčen signal za Syt IV v granularnih strukturah ob perinuklearni regiji celice ter v bližnjih delih dendrita CA3 nevronov, kar smo določili glede na z DAPI-jem obarvana jedra celic (slika 22). V 24 ur po KA smo opazili imunoreaktivni signal v nitju celic na meji med DGg in DGh (sliki 20 in 22) ter nitje ob notranji strani obeh rogov DGg. Imunofluorescenčen signal Syt IV smo zaznali tudi v nitju CA1 nevronov, ki ustreza povezavi teh celic s *stratum laculosum/moleculare* in s *stratum oriens* (sliki 20 in 22). Verjetno gre za apikalne aksone piramidalnih celic CA1, ki projicirajo čez *strata radiata* v *stratum lacunosum-moleculare*, ter bazalne dendrite. Vsekakor ne moremo izključiti morebitnih imunopozitivnih internevronov v CA1 regiji (verjetno je signal Syt IV prisoten poleg v piramidalnih nevronih še vsaj v košaričastih internevronih).



Slika 17: Avtoradiogrami ravni mRNA Sinaptotagmina IV v možganih podgane po s kainsko kislino povzročenimi epileptičnimi napadi

(Autoradiograms of Synaptotagmin IV mRNA hybridization signal in rat brain after KA-induced seizures)

Prikazane so psevdobarvne slike reprezentativnih možganskih rezin na področju 2,0 mm od bregme (prvi stolpec), 0,2 mm od bregme (drugi stoplec), -2,5 mm od bregme (tretji stolpec) in -5,5 mm od bregme (četrti stolpce) (po Paxinos in Watson 1989). Vrstice prestavljajo časovni potek po injekciji kainske kisline: 0 h (kontrolna skupina, injekcija fiziološke raztopine), 1,5 h (1,5 h po injekciji KA), 4 h (4 h po injekciji KA), 8 h (8 h po injekciji KA), 12 h (12 h po injekciji KA) in 24 h (24 h po injekciji KA). Na skrajni levi strani je prikazana paleta barv (področja s šibkim signalom, t.j. nizko stopnjo hibridizacije, so obarvana temno modro in rožnato, področja z močnim signalom, t.j. visoko stopnjo hibridizacije, pa so obarvana rdeče do črno), na podlagi katere smo vrednotili optično gostoto, ki je prikazana v slikah 12-14.





(The time-course of Synaptotagmin IV protein upregulation in the hippocampus after KA-induced seizures)

Slika kaže časovni potek imunoreaktivnega signala v hipokampusu (0 h, 4 h, 8 h in 24 h so časi po injekciji kainske kisline) po podregijah: DGg (granularni sloj dentatnega girusa), DGh (hilus dentatnega girusa), CA1 in CA3 (piramidalna sloja). Puščica nakazujejo nizko raven imunoreaktivnega signala pri kontrolni skupini (0 h vse, DGg 8 h in 24 h, DGh 4 h, CA1 4 h, CA3 4 h in 24 h) in povišano raven (DGg 4 h, DGh 8 h in 24 h, CA1 8 h in 24 h ter CA3 8 h).



Slika 19: Raven imunoreaktivnega signala Sinaptotagmina IV v ostalih analiziranih možganskih področjih po s kainsko kislino povzročenimi epileptičnimi napadi (SvtIV protein upregulation in other analyzed brain regions at different time points after KA induced

(SytIV protein upregulation in other analyzed brain regions at different time points after KA-induced seizures)

Na desni strani slike (0 h) so posnetki možganskih področij pri kontrolni skupini živali, na levi pa posnetki možganskih področij 4 h ali 8 h po injekciji kainske kisline, pri katerih smo opazili največjo raven imunoreaktivnega signala sinaptotagmina IV v označenih (puščice, napis) področjih možganov podgane. Legenda: PirC, piriformna možganska skorja, EC, entorinalna možganska skorja, AMG, amigdaloidno jedro, STR, striatum.



Slika 20: Imunoreaktivni signal Sinaptotagmina IV v regijah dentaten girus in CA1, CA3 piramidalni sloj 4 h in 24 h po injekciji kainske kisline

(Immunoreactive signal Synaptotagmin IV in dentate gyrus and CA1, CA3 regions at 4 h and 24 h after KA injection)

V zgornjem levem kotu je prikaz časa po injekciji KA (4 h, 8 h, 24 h). Dentatni girus je razdeljen na dve regiji: granularni sloj (DGg) in polimorfni sloj (hilus, DGh). Puščice nakazujejo imunoreaktivni signal Syt IV v posameznih področjih hipokampusa (DGg, DGh, CA1, CA3, str.or. (*stratum oriens*), str.rad (*stratum radiatum*). 4 h po KA je imunopozitivni signal Syt IV prisoten v predelu teles nevronov, verjetno granularnih celic DGg (puščica); v DGh ni imunopozitivnih celic (puščica). 24 h po KA je imunopozitiven signal prisoten predvsem v DGh (puščice nakazujejo različne tipe celic v tem sloju, verjetno košaričaste celice na meji z DGg, piramidalne, zvezdasto-piramidalne in zvezdaste celice, mahaste celice v DGh. 24 h po KA v DGg nismo zaznali imunopozitivnih celic (puščica). V CA1 piramidalnem sloju so 24 h po KA imunopozitivne celice (puščice) verjetno piramidalni nevroni, imunopozitiven signal je prisoten tudi v proksimalnih delih dendritov, ki projicirajo v *stratum radiatum* (str.rad) in aksonov/dendritov, ki projicirajo v stratum oriens (str.or). V CA3 piramidalnem sloju smo 8 h po KA opazili imunoreaktivni signal Syt IV v telesih nevronov, verjetno piramidalnih celicah (puščica). Na desni strani spodaj je pri vsaki sliki označeno merilo v velikosti 20 µm.



Slika 21: Natančen prikaz imunopozitivnega signala Sinaptotagmina IV v hilusu dentatnega girusa (Immunopositive signal Synaptotagmin IV in hilus of dentate gyrus)

Na sliki so prikazane imunopozitivne celice v polimorfnem sloju (hilus, DGh) dentatnega girusa. (A) prikaz imunopozitivnih celic 8 h po injekciji kainske kisline, (B) 24 h po injekciji kainske kisline.Na (A) in (B) sliki so označene celice, ki verjetno pripadajo tipu celice: svetlo modra puščica označuje dentatno-košaričasto celico na meji z granularnim slojem dentatnega girusa (DGg); viola puščica označuje okroglasta celico; rdeča puščica označuje piramidalno ali zvezdasto-piramidalno celico; rumena puščica označuje vretenasto celico; oranžna puščica označuje zvezdasto celico.



Slika 22: Imunofluorescenčen signal Sinaptotagmina IV v področjih hipokampusa (Immunofluorescent signal Synaptotagmin IV in rat hippocampus)

V zgornjem levem kotu je prikazan čas žrtvovanja živali po injekciji KA (4 h, 8 h, 24 h). Dentaten girus je razdeljen na dve regiji: granularni sloj (DGg) in polimorfni sloj (hilus, DGh). Puščice nakazujejo imunofluorescenčen signal Syt IV v posameznih področjih hipokampusa (DGg, DGh, CA1 (Str.Pyr je *startum pyramidale*), CA3, Str.Or. (*stratum oriens*), Str.Rad (*stratum radiatum*). 4 h po KA je imunopozitivni signal Syt IV prisoten v predelu teles nevronov, verjetno granularnih celic DGg; v DGh ni imunopozitivnih celic. 24 h po KA je imunopozitiven signal v CA1 piramidalnem sloju (slike na desni strani) prisoten v telesih nevronov ali internevronov in dendritih, ki se raztezajo v *stratum radiatum* (puščice) ter v dendritih in/ali aksonih, ki se raztezajo v *stratum oriens*. Slika levo spodaj prikazuje rekonstrukcijo dvojno označenega predela CA3 regije hipokampusa 8 h po injekciji kainske kisline: modro so označena jedra v telesu nevronov (DAPI barvilo), zeleno so označene strukture, ki so imunopozitivne na Sinaptotagmin IV; verjetno gre za mehurčke, ki nastajajo v telesu nevrona in nato potujejo v bližnje dele aksona/dendrita (glej puščice).



Slika 23: Prikaz histološkega barvanja in imunohistokemijskega signala Sinaptotagmina IV v hipokampusu 24 h po injekciji kainske kisline

(Methylene blue and imuunopozitive signal in rat hippocampus 24 h after KA injection)

Na sliki zgoraj (A) je prikaz histološkega barvanja z metilenskim modrilom v regiji hipokampus (-3,0 mm od bregme, Paxinos in Watson 1998), spodnja slika (B) pa prikazuje imunoreaktivni signal Sinaptotagmin IV v možganski regiji hipokampus. Puščice označujejo CA3 piramidalni sloj, v katerem je na spodnji sliki (B) opazen šibek signal za sinaptotagmin IV.

4.4 EKSCITOTOKSIČNA POŠKODBA S KINOLINSKO KISLINO

Podgane so približno 30-45 minut po injekciji KK v desni striatum (ko so se zbujale iz anastezije) najprej izrazile klonično gibanje glave stran od mesta injekcije. Nekatere živali so tudi krožile stran od mesta injekcije. Kasneje (približno 1,5 ure po injekciji) so se živali s celotnim telesom zvijale vzdolž osi telesa, tako da so se dorzalno obračale proti mestu injekcije KK. Levi sprednji ud je bil navadno iztegnjena kavdalno, desni sprednji ud pa rostralno in živali so se kotalile s celotnim telesom vzdolž osi telesa. Tako vedenje se je pojavljalo v časovnih presledkih, vmes so podgane mirno sedele na dnu kletke. EBR so se navadno začeli z žvečenjem, kloničnimi zgibki glave ter krči prednjih udov.

Pri živalih, ki smo jim v striatum injicirali pufer, v katerem smo topili kinolinsko kislino, se hemiepileptični napadi niso pojavili. Prav tako se hemiepileptični napadi niso pojavili pri živalih, ki so pred stereotaktičnim injiciranjem KK dobile MK-801 (dizocilpin) v odmerkih 2 ali 5 mg/kg telesne teže. Živali, ki so dobile MK-801 v odmerku 1 mg/kg telesne teže in nato stereotaktično injekcijo KK, so tudi razvile hemiepileptične napade.

4.4.1 Raven analiziranih mRNA po poškodbi s kinolinsko kislino in pri preprečevanju hemiepileptičnih napadov

Raven mRNA genov c-fos, c-jun, BDNF in Syt IV se je glede na kontrolono stran možganov (leva polobla) 4 ure po enostranski injekciji KK v striatum povečala v hipokampusu (DGg, DGh, CA1 in CA3), jedru akumbens, entorinalni, piriformni in cingulatni možganski skorji ter v amigdaloidnem jedru v desni (poškodovani) možganski polobli (slika 44). Pri predhodnem dajanju MK-801 v odmerku 1 mg/kg telesne teže, ki ni popolno preprečil razvoj hemiepileptičnih napadov, se je raven mRNA proučevanih genov 4 ure po injekciji KK povečala v hipokampusu (DGg, DGh, CA3) v desni možganski polobli (slike 24, 28, 32, 36, 40-44). Pri predhodnem dajanju MK-801 v odmerkih 2 ali 5 mg/kg telesne teže se raven mRNA proučevanih genov 4 ure po injekciji KK ni razlikovala med poloblama možganov.

4.4.2 Raven mRNA Sinaptotagmina IV

Rezultati vpliva injekcije KK v desni striatum podgane na raven mRNA Syt IV 4 ure po injekciji so prikazani na slikah 24-27 in 40, 44.

Pri kontrolnih skupinah je signal mRNA Syt IV prisoten v hipokampusu, piriformni in entorinalni možganski skorji ter amigdaloidnemu jedru. Signal mRNA Syt IV smo opazili še v jedru akumbens, striatumu, talamusu, genikulatnih jedrih, motorični in cingulatni možganski skorji, habenuli, malih možganih in v regiji *substantia nigra compacta* (slika 40).

Živali imajo 4 ure po enostranski injekciji KK v striatum v primerjavi z levo (nepoškodovano) možgansko poloblo značilno (t-test, $p \le 0,05$) povečano raven mRNA Syt IV v hipokampusu (DGg, DGh, CA3 in CA1), entorinalni, piriformni možganski skorji

in amigdaloidnem jedru v desni (poškodovani) polobli možganov (slike 24, 40 in 44). V ostalih analiziranih področjih je raven mRNA Syt IV glede na levo poloblo značilno povečana v cingulatni in motorični možganski skorji, sredici jedra akumbens in striatumu v desni polobli (slike 25, 40 in 44).



Slika 24: Raven mRNA Sinaptotagmina IV v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov 4 ure po injekciji kinolinske kisline v desni striatum

(Levels of Synaptotagmin IV mRNA hybridization signal in some limbic regions of left and right hemisphere of rat brain after KK lesion of right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 6) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (enosmerni t-test, p \leq 0,05). Legenda: desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; DGg, granularni sloj dentatnega girusa; DGh, hilus (polimorfni sloj) dentatnega girusa; CA1, CA1 piramidalni sloj; CA3, CA3 piramidalni sloj hipokampusa; PIR, piriformna možganska skorja; EC, entorinalna možganska skorja; AMG, amigdaloidno jedro.

Pri skupini živali, ki je dobila MK-801 v odmerku 1 mg/kg telesne teže pred stereotaktično poškodbo desnega striatuma s KK, kar ni preprečilo hemiepileptičnega napada, je v primerjavi z levo možgansko poloblo opazno značilno povečanje (enosmerni t-test, $p \le 0.05$) ravni mRNA Syt IV v hipokampusu (DGg, DGh, CA1 in CA3), piriformni in entorinalni možganski skorji ter amigdaloidnem jedru v desni možganski polobli (sliki 26 in 40).



Slika 25: Raven mRNA Sinaptotagmina IV v ostalih področjih leve in desne poloble možganov 4 ure po injekciji kinolinske kisline v desni striatum

(Levels of Synaptotagmin IV mRNA hybridization signal in other analyzed brain regions of left and right hemisphere of rat brain after KK lesion of right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 6) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (enosmerni t-test, p \leq 0,05). Legenda: desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; NAcC, sredica jedra akumbens; NAcS, skorja jedra akumbens; STR, striatum, THAL, talamus, GC, genikulatno jedro, MOT, motorična možganska skorja, CING, cingulatna možganska skorja.



Slika 26: Raven mRNA Sinaptotagmina IV v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov po dajanju MK-801 v odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum

(Levels of Synaptotagmin IV mRNA hybridization signal in some limbic regions of rat brain left and right hemisphere after MK-801 pretreatment that failed to prevent hemiepileptic behavior caused by quinolinic acid lesioned right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 3) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (enosmerni t-test, p \leq 0,05). Legenda: desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; DGg, granularni sloj dentatnega girusa; DGh, hilus (polimorfni sloj) dentatnega girusa; CA1, CA1 piramidalni sloj; CA3, CA3 piramidalni sloj hipokampusa; PIR, piriformna možganska skorja; EC, entorinalna možganska skorja; AMG, amigdaloidno jedro.

V ostalih analiziranih področjih možganov je pri tej skupini živali v primerjavi z levo možgansko poloblo raven mRNA Syt IV v desni možganski polobli značilno (enosmerni t-test, $p \le 0.05$) povečana v cingulatni možganski skorji in striatumu (sliki 27 in 40).



Slika 27: Raven mRNA Sinaptotagmina IV v ostalih področjih leve in desne poloble možganov po dajanju MK-801 v odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum

(Levels of Synaptotagmin IV mRNA hybridization signal in other analyzed brain regions of rat brain left and right hemisphere after MK-801 pretreatment that failed to prevent hemiepileptic behavior caused by quinolinic acid lesioned right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 3) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (enosmerni t-test, p \leq 0,05). Legenda: desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; NAcC, sredica jedra akumbens NAcS, skorja jedra akumbens; STR, striatum; THAL, talamus, GC, genikulatno jedro, MOT, motorična možganska skorja, CING, cingulatna možganska skorja.

Pri skupinah živali, ki so dobile MK-801 v večjih odmerkih in niso razvile hemiepileptičnih napadov, se raven mRNA Syt IV med levo in desno poloblo možganov ni statistično razlikovala v nobeni analizirani regiji možganov (slika 40). Učinek same injekcije MK-801 ni povzročila opaznih sprememb v ravni mRNA Syt IV v nobenem od analiziranih možganskih področij pri nobenem od apliciranih odmerkov.

4.4.3 Raven mRNA nevrotrofina BDNF

Rezultati vpliva enostranske injekcije KK v desni striatum podgane na raven mRNA BDNF 4 ure po injekciji so prikazani na slikah 28-31 ter sliki 41 in 44.

Signal mRNA BDNF je v našem primeru na meji meritev pri vseh skupinah živali, razen pri skupini, ki je bila žrtvovana 4 ure po tem, ko smo ji v desni striatum injicirali KK in skupini, ki nam ji s predhodnim dajanjem MK-801 v odmerku 1 mg/kg telesne teže ni uspelo popolno preprečiti hemiepileptičnih napadov (slika 41).

Živali imajo 4 ure po injekciji KK v desni striatum v primerjavi z levo možganski poloblo značilno (enosmerni t-test, $p \le 0.05$) povečano raven mRNA BDNF v hipokampusu (DGg,

DGh, CA1 in CA3), piriformni, entorinalni možganski skorji in amigdaloidnemu jedru v desni polobli možganov (slike 28, 41 in 44).



Slika 28: Raven mRNA BDNF v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov 4 ure po injekciji kinolinske kisline v desni striatum

(Levels of BDNF mRNA hybridization signal in some limbic regions of left and right hemisphere of rat brain after KK lesion of right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 6) relativne optične gostote (ROD) s ± SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (enosmerni t-test, $p \le 0,05$). Legenda: desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; DGg, granularni sloj dentatnega girusa; DGh, hilus (polimorfni sloj) dentatnega girusa; CA1, CA1 piramidalni sloj; CA3, CA3 piramidalni sloj hipokampusa; PIR, piriformna možganska skorja; EC, entorinalna možganska skorja; AMG, amigdaloidno jedro

Pri živalih, ki smo jim v desni striatum injicirali KK, smo glede na levo poloblo možganov pokazali tudi značilno povečanje ravni mRNA BDNF v cingulatni možganski skorji ter v sredici jedra akumbens v desni polobli (slike 29, 41 ter 44). Dajanje učinkovine MK-801 v odmerku 1mg/kg telesne teže pred injekcijo KK, kar ni popolno preprečilo razvoja hemiepileptičnega napada, ima za posledico značilno (enosmerni t-test, $p \le 0,05$) povečanje signala mRNA BDNF v DGg, DGh in CA3 sloju hipokampusa v desni polobli možganov v primerjavi z levo poloblo (sliki 30 in 41).



Slika 29: Raven mRNA BDNF v ostalih področjih leve in desne poloble možganov 4 ure po injekciji kinolinske kisline v desni striatum

(Levels of BDNF mRNA hybridization signal in other analyzed brain regions of left and right hemisphere of rat brain after KK lesion of right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 6) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (enosmerni t-test, p \leq 0,05). Legenda: desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; NAcC, sredica jedra akumbens; NAcS, skorja jedra akumbens; STR, striatum; THAL, talamus, GC, genikulatno jedro, MOT, motorična možganska skorja, CING, cingulatna možganska skorja.



Slika 30: Raven mRNA BDNF v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov po dajanju MK-801 v odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum

(Levels of BDNF mRNA hybridization signal in some limbic regions of rat brain left and right hemisphere after MK-801 pretreatment that failed to prevent hemiepileptic behavior caused by quinolinic acid lesioned right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 3) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (enosmerni t-test, p \leq 0,05). Legenda: desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; DGg, granularni sloj dentatnega girusa; DGh, hilus (polimorfni sloj) dentatnega girusa; CA1, CA1 piramidalni sloj; CA3, CA3 piramidalni sloj hipokampusa; PIR, piriformna možganska skorja; EC, entorinalna možganska skorja; AMG, amigdaloidno jedro.

Pri tej skupini živali (MK-801 v odmerku 1 mg/kg telesne teže pred poškodbo s KK) v ostalih analiziranih možganskih regijah med levo in desno poloblo možganov nismo opazili značilnih razlik v ravni mRNA BDNF (sliki 31 in 41).

Injekcija MK-801 ni povzročila opaznih sprememb v ravni mRNA BDNF v nobenem od analiziranih možganskih področij pri nobenem apliciranem odmerku.



Slika 31: Raven mRNA BDNF v ostalih področjih leve in desne poloble možganov po dajanju MK-801 v odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum (Levels of BDNF mRNA hybridization signal in other analyzed brain regions of left and right hemisphere of rat brain after MK-801 pretreatment that failed to prevent hemiepileptic behavior caused by quinolinic acid lesioned right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 4) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (enosmerni t-test, p \leq 0,05). Legenda: desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; NAcC, sredica jedra akumbens; NAcS, skorja jedra akumbens, STR, striatum, THAL, talamus, GC, genikulatno jedro, MOT, motorična možganska skorja, CING, cingulatna možganska skorja.

4.4.4 Raven mRNA gena zgodnjega odgovora c-jun

Rezultati vpliva injekcije KK v desni striatum podgane na raven mRNA c-jun 4 ure po injekciji, so prikazani na slikah 32-35 ter 42 in 44.

Živali imajo po injekciji KK v desni striatum v primerjavi z levo poloblo možganov 4 ure po injekciji značilno (enosmerni t-test, $p \le 0,05$) povečano raven mRNA c-jun v hipokampusu (DGh, DGg, CA1 in CA3), pirformni in entorinalni možganski skorji ter amigdaloidnemu jedru (slike 32, 42 in 44) v desni polobli možganov.



Slika 32: Raven mRNA c-jun v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov 4 ure po injekciji kinolinske kisline v desni striatum

(Levels of c-jun mRNA hybridization signal in some limbic regions of left and right hemisphere of rat brain after KK lesion of right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 6) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (enosmerni t-test, p \leq 0,05). Legenda: desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; DGg, granularni sloj dentatnega girusa; DGh, hilus (polimorfni sloj) dentatnega girusa; CA1, CA1 piramidalni sloj; CA3, CA3 piramidalni sloj hipokampusa; PIR, piriformna možganska skorja; EC, entorinalna možganska skorja; AMG, amigdaloidno jedro.

Pri živalih smo 4 ure po injekciji KK pokazali tudi značilno (enosmerni t-test, $p \le 0,05$) povečanje ravni mRNA c-jun v sredici jedra akumbens, cingulatni in motorični možganski skorji, striatumu ter v talamusu v desni polobli (sliki 32 in 40) glede na levo.

Dajanje učinkovine MK-801 v odmerku 1 mg/kg telesne teže pred enostransko injekcijo KK, kar ni popolno preprečilo hemiepileptičnega napada, ima za posledico značilno (enosmerni t-test, $p \le 0,05$) povečanje signala mRNA c-jun v DGg, DGh in CA1 regiji hipokampusa, piriformni in entorinalni možganski skorji v desni polobli možganov v primerjavi z levo poloblo (sliki 32 in 40). Signal je v desni možganski polobli v primerjavi z levo poloblo značilno ($p \le 0,05$) povečan tudi v striatumu ter v talamusu (sliki 33 in 40).



Slika 33: Raven mRNA c-jun v ostalih področjih leve in desne poloble možganov 4 ure po injekciji kinolinske kisline v desni striatum

(Levels of c-jun mRNA hybridization signal in other analyzed brain regions of left and right hemisphere of rat brain after KK lesion of right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 6) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (t-test, p \leq 0,05). **Legenda:** desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; NAcC, sredica jedra akumbens; NAcS, skorja jedra akumbens; STR, striatum; THAL, talamus, GC, genikulatno jedro, MOT, motorična možganska skorja, CING, cingulatna možganska skorja.



Slika 34: Raven mRNA c-jun v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov po dajanju MK-801 v odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum

(Levels of c-jun mRNA hybridization signal in some limbic regions of left and right hemisphere of rat brain after MK-801 pretreatment that failed to prevent hemiepileptic behavior caused by quinolinic acid lesioned right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 3) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (enosmerni t-test, p \leq 0,05). Legenda: desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; DGg, granularni sloj dentatnega girusa; DGh, hilus (polimorfni sloj) dentatnega girusa; CA1, CA1 piramidalni sloj; CA3, CA3 piramidalni sloj hipokampusa; PIR, piriformna možganska skorja; EC, entorinalna možganska skorja; AMG, amigdaloidno jedro.



Slika 35: Raven mRNA c-jun v ostalih področjih leve in desne poloble možganov po dajanju MK-801 v odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum (Levels of c-jun mRNA hybridization signal in other analyzed brain regions of left and right hemisphere of rat brain after MK-801 pretreatment that failed to prevent hemiepileptic behavior caused by quinolinic acid lesioned right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 3) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (enosmerni t-test, p \leq 0,05). Legenda: desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; NAcC, sredica jedra akumbens; NAcS, skorja jedra akumbens; STR, striatum; THAL, talamus, GC, genikulatno jedro, MOT, motorična možganska skorja, CING, cingulatna možganska skorja.

Pri skupinah živali, ki so dobile MK-801 v večjih odmerkih in niso razvile hemiepileptičnih napadov, se raven mRNA c-jun med levo in desno poloblo možganov ni značilno razlikoval v nobeni analizirani regiji možganov (slika 42).

4.4.5 Raven mRNA gena zgodnjega odgovora c-fos

Rezultati vpliva injekcije KK v desni striatum na raven mRNA c-fos 4 ure po poškodbi, so prikazani na slikah 36-39, 43 in 44.

Signal mRNA c-fos je v našem primeru na meji meritev pri vseh skupinah živali, razen pri skupini, ki smo ji v desni striatum injicirali KK in skupini, kjer nam s predhodnim dajanjem MK-801 v odmerku 1 mg/kg telesne teže, ni uspelo preprečiti hemiepileptičnih napadov po injiciranju KK (slika 43).

Živali imajo v primerjavi z levo poloblo možganov 4 ure po enostranski injekciji KK v striatum značilno (enosmerni t-test, $p \le 0,05$) povečano raven mRNA c-fos v hipokampusu (DGg, DGh, CA1 in CA3), piriformni in entorinalni možganski skorji ter amigdaloidnem jedru v desni polobli možganov (slike 36, 43 in 44).

Značilno (enosmerni t-test, $p \le 0.05$) povečanje ravni mRNA c-fos smo v primerjavi z levo možgansko poloblo pokazali tudi v sredici jedra akumbens, motorični in cingulatni
možganski skorji ter v striatumu desne poloble možganov (slike 37, 43 in 44) 4 ure po injekciji Kk v striatum.



Slika 36: Raven mRNA c-fos v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov 4 ure po injekciji kinolinske kisline v desni striatum

(Levels of c-fos mRNA hybridization signal in some limbic regions of left and right hemisphere of rat brain after KK lesion of right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 6) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (enosmerni t-test, p \leq 0,05). Legenda: desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; DGg, granularni sloj dentatnega girusa; DGh, hilus (polimorfni sloj) dentatnega girusa; CA1, CA1 piramidalni sloj; CA3, CA3 piramidalni sloj hipokampusa; PIR, piriformna možganska skorja; EC, entorinalna možganska skorja; AMG, amigdaloidno jedro.





(Levels of c-fos mRNA hybridization signal in other analyzed brain regions of left and right hemisphere of rat brain after KK lesion of right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 6) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (enosmerni t-test, p \leq 0,05). Legenda: desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; NAcC, sredica jedra akumbens; NAcS, skorja jedra akumbens; STR, striatum, THAL, talamus, GC, genikulatno jedro, MOT, motorična možganska skorja, CING, cingulatna možganska skorja.

Dajanje učinkovine MK-801 v odmerku 1 mg/kg telesne teže pred injekcijo KK, kar ni popolno preprečilo hemiepileptičnega napada, ima za posledico značilno (enosmerni t-test, $p \le 0,05$) povečanje signala mRNA c-fos v DGg, DGh in CA3 slojih hipokampusa, piriformni in entorinalni možganski skorji ter v amigdaloidnemu jedru (sliki 38 in 43), cingulatni možganski skorji, jedru akumbens in striatumu (sliki 39 in 43) v desni polobli v primerjavi z levo.



Slika 38: Raven mRNA c-fos v nekaterih limbičnih področjih leve in desne poloble možganov po dajanju MK-801 v odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum

(Levels of c-fos mRNA hybridization signal in some limbic regions of left and right hemisphere of rat brain after MK-801 pretreatment that failed to prevent hemiepileptic behavior caused by quinolinic acid lesioned right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 3) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (enosmerni t-test, p \leq 0,05). Legenda: desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; DGg, granularni sloj dentatnega girusa; DGh, hilus (polimorfni sloj) dentatnega girusa; CA1, CA1 piramidalni sloj; CA3, CA3 piramidalni sloj hipokampusa; PIR, piriformna možganska skorja; EC, entorinalna možganska skorja; AMG, amigdaloidno jedro.



Slika 39: Raven mRNA c-fos v ostalih področjih leve in desne poloble možganov po dajanju MK-801 v odmerku, ki ni preprečil hemiepileptičnega napada po injekciji kinolinske kisline v desni striatum (Levels of c-fos mRNA hybridization signal in other analyzed brain regions of left and right hemisphere of rat brain after MK-801 pretreatment that failed to prevent hemiepileptic behavior caused by quinolinic acid lesioned right striatum)

Prikazane so povprečne vrednosti meritev (n = 3) relativne optične gostote (ROD) s \pm SD, z * so označene statistično značilne razlike med desno in levo možgansko poloblo (enosmerni t-test, p \leq 0,05). Legenda: desna = desna (poškodovana)polobla možganov, leva = leva (nepoškodovana) polobla možganov; NAcC, sredica jedra akumbens; NAcS, skorja jedra akumbens; STR, striatum, THAL, talamus, GC, genikulatno jedro, MOT, motorična možganska skorja, CING, cingulatna možganska skorja.

Pri skupinah živali, ki so dobile MK-801 v večjih odmerkih in niso razvile hemiepileptičnih napadov, se raven mRNA c-fos med levo in desno poloblo možganov ni razlikovala v nobeni analizirani regiji možganov (slika 43). Učinek same injekcije MK-801 ni povzročil opaznih sprememb v izražanju mRNA c-fos v nobenem od analiziranih možganskih področij.



Slika 40: Avtoradiogrami mRNA Sinaptotagmina IV pri kontroli in 4 h po injekciji kinolinske kisline v desni striatum in sledečem hemiepileptičnem napadu

(Autoradiograms of mRNA Synaptotagmin IV hybridization signal in control and 4 h after quinolinic acid injection and hemiepileptic seizures)

Prikazane so psevdobarvne slike reprezentativnih možganskih rezin na področju 2,0 mm od bregme (prvi stolpec), 0,2 mm od bregme (drugi stolpec), -2,5 mm od bregme (tretji stolpec) in -5,5 mm od bregme (četrti stolpec). Vrstice predstavljajo: prva vrstica (KONTR) kontrolno skupino živali (fiziološka raztopina); druga vrstica (KK) skupino živali, ki smo ji v desni striatum (na sliki levi) injicirali kinolinsko kislino; tretja vrstica (MK1/KK) skupino živali, ki smo ji pred injiciranjem kinolinske kisline v desni striatum (na sliki levi) dali učinkovino MK-801 v odmerku 1 mg/kg telesne teže, kar ni preprečilo hemiepileptičnega napada, četrta vrstica (MK2/KK) skupino živali, ki smo ji pred injiciranjem kinolinske kisline v desni striatum (na sliki levi) dali učinkovino MK-801 v odmerku 2 mg/kg telesne teže, kar je preprečilo hemiepileptični napad, peta vrstica (MK2) skupino živali, ki smo ji injicirali MK-801 v odmerku 2 mg/kg, šesta vrstica (SHEMA) prikazuje področja meritev. Na skrajni levi strani je prikazana paleta barv (področja s šibkim signalom, t.j. nizko stopnjo hibridizacije, so obarvana temno modro in rožnato, področja z močnim signalom, t.j. visoko stopnjo hibridizacije, pa so obarvana rdeče do črno), na podlagi katere smo vrednotili optično gostoto, ki je prikazana v slikah 24-27.



Slika 41: Avtoradiogrami mRNA BDNF pri kontroli in 4 h po injekciji kinolinske kisline v desni striatum in sledečem hemiepileptičnem napadu

(Autoradiograms of mRNA BDNF hybridization signal in control and 4 h after quinolinic acid injection and hemiepileptic seizures)

Prikazane so psevdobarvne slike reprezentativnih možganskih rezin na področju 2,0 mm od bregme (prvi stolpec), 0,2 mm od bregme (drugi stolpec), -2,5 mm od bregme (tretji stolpec) in -5,5 mm od bregme (četrti stolpec). Vrstice predstavljajo: prva vrstica (KONTR) kontrolno skupino živali (fiziološka raztopina); druga vrstica (KK) skupino živali, ki smo ji v desni striatum (na sliki levi) injicirali kinolinsko kislino; tretja vrstica (MK1/KK) skupino živali, ki smo ji pred injiciranjem kinolinske kisline v desni striatum (na sliki levi) dali učinkovino MK-801 v odmerku 1 mg/kg telesne teže, kar ni preprečilo hemiepileptičnega napada, četrta vrstica (MK2/KK) skupino živali, ki smo ji pred injiciranjem kinolinske kisline v desni striatum (na sliki levi) dali učinkovino MK-801 v odmerku 2 mg/kg telesne teže, kar je preprečilo hemiepileptični napad, peta vrstica (MK2) skupino živali, ki smo ji injicirali MK-801 v odmerku 2 mg/kg, šesta vrstica (SHEMA) prikazuje področja meritev. Na skrajni levi strani je prikazana paleta barv (področja s šibkim signalom, t.j. nizko stopnjo hibridizacije, so obarvana temno modro in rožnato, področja z močnim signalom, t.j. visoko stopnjo hibridizacije, pa so obarvana rdeče do črno), na podlagi katere smo vrednotili optično gostoto, ki je prikazana v slikah 28-31.



Slika 42: Avtoradiogrami mRNA c-jun pri kontroli in 4 h po injekciji kinolinske kisline v desni striatum in sledečem hemiepileptičnem napadu

(Autoradiograms of mRNA c-jun hybridization signal in control and 4 h after quinolinic acid injection and hemiepileptic seizures)

Prikazane so psevdobarvne slike reprezentativnih možganskih rezin na področju 2,0 mm od bregme (prvi stolpec), 0,2 mm od bregme (drugi stolpec), -2,5 mm od bregme (tretji stolpec) in -5,5 mm od bregme (četrti stolpec). Vrstice predstavljajo: prva vrstica (KONTR) kontrolno skupino živali (fiziološka raztopina); druga vrstica (KK) skupino živali, ki smo ji v desni striatum (na sliki levi) injicirali kinolinsko kislino; tretja vrstica (MK1/KK) skupino živali, ki smo ji pred injiciranjem kinolinske kisline v desni striatum (na sliki levi) dali učinkovino MK-801 v odmerku 1 mg/kg telesne teže, kar ni preprečilo hemiepileptičnega napada, četrta vrstica (MK2/KK) skupino živali, ki smo ji pred injiciranjem kinolinske kisline v desni striatum (na sliki levi) dali učinkovino MK-801 v odmerku 2 mg/kg telesne teže, kar je preprečilo hemiepileptični napad, peta vrstica (MK2) skupino živali, ki smo ji injicirali MK-801 v odmerku 2 mg/kg, šesta vrstica (SHEMA) prikazuje področja meritev. Na skrajni levi strani je prikazana paleta barv (področja s šibkim signalom, t.j. nizko stopnjo hibridizacije, so obarvana temno modro in rožnato, področja z močnim signalom, t.j. visoko stopnjo hibridizacije, pa so obarvana rdeče do črno), na podlagi katere smo vrednotili optično gostoto, ki je prikazana v slikah 32-35.



Slika 43: Avtoradiogrami mRNA c-fos pri kontroli in 4 h po injekciji kinolinske kisline v desni striatum in sledečem hemiepileptičnem napadu

(Autoradiograms of mRNA c-fos hybridization signal in control and 4 h after quinolinic acid injection and hemiepileptic seizures)

Prikazane so psevdobarvne slike reprezentativnih možganskih rezin na področju 2,0 mm od bregme (prvi stolpec), 0,2 mm od bregme (drugi stolpec), -2,5 mm od bregme (tretji stolpec) in -5,5 mm od bregme (četrti stolpec). Vrstice predstavljajo: prva vrstica (KONTR) kontrolno skupino živali (fiziološka raztopina); druga vrstica (KK) skupino živali, ki smo ji v desni striatum (na sliki levi) injicirali kinolinsko kislino; tretja vrstica (MK1/KK) skupino živali, ki smo ji pred injiciranjem kinolinske kisline v desni striatum (na sliki levi) dali učinkovino MK-801 v odmerku 1 mg/kg telesne teže, kar ni preprečilo hemiepileptičnega napada, četrta vrstica (MK2/KK) skupino živali, ki smo ji pred injiciranjem kinolinske kisline v desni striatum (na sliki levi) dali učinkovino MK-801 v odmerku 2 mg/kg telesne teže, kar je preprečilo hemiepileptični napad, peta vrstica (MK2) skupino živali, ki smo ji injicirali MK-801 v odmerku 2 mg/kg, šesta vrstica (SHEMA) prikazuje področja meritev. Na skrajni levi strani je prikazana paleta barv (področja s šibkim signalom, t.j. nizko stopnjo hibridizacije, so obarvana temno modro in rožnato, področja z močnim signalom, t.j. visoko stopnjo hibridizacije, pa so obarvana rdeče do črno), na podlagi katere smo vrednotili optično gostoto, ki je prikazana v slikah 36-39.



Slika 44: Avtoradiogrami mRNA signala Sinaptotagmina IV, BDNF, c-fos in c-jun 4 ure po injekciji kinolinske kisline v desni striatum in sledečem hemiepileptičnem napadu

(Autoradiograms of Synaptotagmin IV, BDNF, c-fos and c-jun mRNA hybridization signal after quinolinic acid injection into right striatum and hemiepileptic seizure)

Prikazane so psevdobarvne slike reprezentativnih možganskih rezin na področju 2,0 mm od bregme (prva vrstica), 0,2 mm od bregme (druga vrstica), -2,5 mm od bregme (tretja vrstica) in -5,5 mm od bregme (četrta vrstica). Stolpci predstavljajo: prvi stolpcc povečano raven sinaptotagmina IV (Syt IV) v desni možganski polobli (na sliki levo), drugi stolpcc povečano raven BDNF v desni možganski polobli (na sliki levo), tretji stolpcc povečano raven BDNF v desni možganski polobli (na sliki levo), tretji stolpcc povečano raven c-fos v desni možganski polobli (na sliki levo) in četrti stolpcc povečano raven c-jun v desni možganski polobli (na sliki levo) po injiciranju kinolinske kisline v desni striatum. Na skrajni levi strani je prikazana paleta barv (področja s šibkim signalom, t.j. nizko stopnjo hibridizacije, so obarvana temno modro in rožnato, področja z močnim signalom, t.j. visoko stopnjo hibridizacije pa so obarvana rdeče do črno), na podlagi katere smo vrednotili optično gostoto, ki je prikazana v slikah 24-25, 28-29, 32-33, 36-37.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V tekoči raziskavi smo opredelili povečanje ravni mRNA in odgovornega proteina sinaptotagmin IV (Syt IV) na ekscitotoksičnem modelu s kainsko kislino ter povečanje ravni mRNA Syt IV na ekscitotoksičnem modelu s kinolinsko kislino.

5.1.1 Povečana raven Sinaptotagmina IV

Analizirali smo povečanje ravni mRNA in proteina Syt IV znotraj prvih 24 ur po injekciji kainske kisline in sproženimi epileptičnimi napadi. Pokazali smo, da se raven mRNA Syt IV poleg v hipokampusu in piriformni možganski skorji, kot so že poročali Tocco in sod. (1996) in Vician in sod. (1995), poveča še v drugih možganskih predelih. Nekatera od področjih, kjer povečanje ravni Syt IV po s kainsko kislino povzročenimi epileptičnimi napadi še ni bilo poročano, so: entorinalna možganska skorja, amigdaloidno jedro, jedro akumbens in striatum. Po povečanju mRNA Syt IV smo v hipokampusu, drugih limbičnih in v nelimbičnih predelih možganov pokazali tudi povečano raven proteina Syt IV. Prisotnost proteina Syt IV smo pokazali v telesu nevronov in v bližnjih delih aksonov in dendritov. Nadaljevanje raziskave o vpletenosti Syt IV ob aktivaciji možganskih področij po epileptičnem napadu smo izpeljali z ekscitotoksičnim modelom s kinolinsko kislino. Po hemiepileptičnih napadih zaradi enostranske injekcije kinolinske kisline v možgane podgan, se je raven mRNA Syt IV 4 ure po injekciji kinolinske kisline povečala v nelimbičnih in limbičnih predelih na poškodovani strani možganov, kar je časovno in prostorsko sovpadalo s povečanjem mRNA IEG (analizirali smo IEG c-fos in c-jun) in nevrotrofina BDNF. Po preprečenem hemiepileptičnem napadu, zaradi predhodnega dajanja učinkovine MK-801 (disocilpin, antagonist NMDA_R, katerih agonist je kinolinska kislina), se raven mRNA Syt IV v raziskanih možganskih področjih ni povečala.

5.1.2 Povečana raven Sinaptotagmina IV po ekscitotoksični poškodbi s kainsko kislino

Povečanje mRNA Syt IV smo pri podganah, ki so po dajanju kainske kisline razvile epileptične napade (stopnja 3-5 po Racine merski lestvici) pokazali v možganskih regijah: hipokampus, predeli možganske skorje, amigdaloidno jedro, jedro akumbens, striatum, talamus in ventralni palidum. Naši rezultati kažejo na to, da se raven mRNA Syt IV značilno poviša že 1,5 ure po dajanju kainske kisline (oziroma 30 minut po sproženih epileptičnih napadih; slike 12-14 in 17). V primerjavi s povečanjem ravni mRNA Syt IV po s kainsko kislino sproženimi epileptičnimi napadi v hipokampusu smo pokazali časovni zamik v povišanju ravni mRNA Syt IV v nekaterih možganskih regijah, npr. v amigdaloidnem jedru in talamusu (slike 13, 14 in 17), kjer smo glede na kontrolo izmerili statistično značilno povečanje signala v kasnejših časovnih točkah kot v drugih analiziranih področjih. To pripisujemo aktivaciji možganski skorji, zaradi delovanja kainske kisline (slika 45).

Po povečanju ravni mRNA Syt IV je pomembno, da se odgovorna mRNA prepiše v funkcionalen protein. Za regionalno analizo pojavnosti proteina Syt IV v hipokampusu in povečane ravni tega proteina po delovanju kainske kisline, smo uporabili tehniko imunohistokemijo. Pri kontrolnih živalih smo pokazali nizko raven proteina Syt IV (sliki 18 (0 h) in 19 (0 h)). To je v skladu s študijami na nevroendokrinih celicah in s podatkom, da je raven Syt IV pri odraslih živalih nizka (Berton in sod. 2000, Ibata in sod. 2000 in 2002). Po dajanju kainske kisline smo pokazali statistično značilno povečano raven proteina Syt IV v področjih hipokampusa, predelih možganske skorje, amigdaloidnem jedru, striatumu in jedru akumbens (slike 15, 16, 18 in 19), kar ustreza že pokazanemu povečanju ravni mRNA Syt IV. S tem smo potrdili prvo postavljeno hipotezo.



Slika 45: Shematičen prikaz glavnih povezav limbičnega sistema (prilagojeno po Kandel in sod. 2000, str. 988)

(Schematic presentation of major limbic connections)

Na sliki so prikazane glavne povezave limbičnega sistema, ki jih je predlagal James Papez in kasneje razširil Paul McLean. Prikazane so povezave med cingulatnim girusom, hipokampusom, subikulumom, entorinalno možgansko skorjo in amigdaloidnim jedrom ter povezava hipokampusa z mamilarnim telesom preko forniksa. Nakazane so tudi obojesmerne povezave med hipokampusom in asociativno možgansko skorjo.

5.1.2.1 Povečana raven Sinaptotagmina IV v granularnem sloju dentatnega girusa

Povečano raven proteina Syt IV smo najprej opazili v granularnem sloju DG (4 ur po dajanju kainske kisline, slike 15, 18 in 20, 22). Verjetno gre za granularne celice, saj smo imunoreaktivni signal pokazali v več gosto porazdeljenih kroglastih celicah, ki se nahajajo v granularnem sloju dentatnega girusa. Vsekakor ne moremo izključiti prisotnosti proteina Syt IV v internevronih in glia celicah tega predela hipokampusa, saj za podrobno analizo nismo uporabljali specifičnih označevalcev. V granularnem sloju DG je povečana raven proteina Syt IV hitro upadla in v kasnejših časih po delovanju kainske kisline (v 8-24 ur) v tej regiji v primerjavi s kontrolo nismo zaznali povečane ravni omenjenega proteina. To

tudi ustreza povečanja ravni mRNA Syt IV v 1,5-8 ur po dajanju kainske kisline (sliki 12 in 17) in mRNA signalu, ki v 12-24 ur po dajanju kainske kisline ni bil več značilno različen od kontrole (sliki 12 in 17) v tem predelu hipokampusa. Povečana raven mRNA Syt IV pripisujemo odgovoru granularnih celic na depolarizacijo celice zaradi delovanja kainske kisline. Sledi prepis mRNA v odgovorni protein, zato smo z imunohistokemijo v času 4 ure po dajanju kainske kisline opazili povečano raven proteina v omenjenem področju. Protein Syt IV je kratkoživ, saj je razpolovni čas z depolarizacijo induciranega Svt IV v nevroendokrinih celicah približno dve uri (Ferguson in sod. 1999). Sklepamo torej, da je povečana raven proteina Syt IV v granularnem sloju DG posledica depolarizacije celic po delovanju kainske kisline, upad pa pripisujemo njegovi kratkoživosti ali pa potovanju de novo narejenega proteina v nevrite. Opredelitev slednjega z uporabljenimi metodami žal ni bila mogoča, saj je v polimorfnem sloju hilusa poleg nitja granularnih celic prisotno več različnih živčnih celic (glej Uvod, 1.2.1.1; Amaral 1978). Tako nam ni uspelo razločiti ali je imunoreaktivni signal prisoten v aksonih granularnih nevronov (mahasta vlakna), aksonih in dendritih nevronov polimorfnega sloja ali oboje. Imunoreaktivni signal Syt IV je namreč intenziven v polimorfnem sloju dentatnega girusa v 8-24 ur po dajanju kainske kisline, kar bom natančneje opisala v nadaljevanju.

5.1.2.2 Povečana raven Sinaptotagmina IV v hilusu dentatnega girusa, CA1 in CA3 piramidalnem sloju

V kasnejših časih (v 8-24 ur) po dajnaju kainske kisline (slike 15 in 18, 20) se je po povečanju mRNA raven proteina Syt IV povečala v regijah, ki so občutljive na nevrodegenerativne učinke kainske kisline: hilus DG in CA1, CA3 piramidalna sloja. V hilusu DG se je raven proteina Svt IV povečala v 8 ur po dajanju kainske kisline in je bila v 24 ur še vedno povečana. Regijo hilus smo natančneje analizirali in ugotovili, da se raven proteina Syt IV v času po dajanju kainske kisline poveča v različnih živčnih celicah (slika 21). Za natančno določitev tipa celic, v katerih se poveča raven Syt IV, bi bilo potrebno uporabiti druge metode (označevalci za različne internevrone, določitev morfologije živčnih vlaken (elektronska mikroskopija) in drugo). Povečanje ravni proteina v hilusu DG pripisujemo povečani aktivnosti tega področja hipokampusa. Znano je, da je to eno od področij, ki propada po epileptičnih napadih (Pitkänen in sod. 2006). Celice v hilusu odgovorijo na depolarizacijo s povečano sintezo mRNA Syt IV, ki se prepisuje v protein. Syt IV se v teh celicah podaljšano povečano izraža verjetno zaradi podaljšane aktivacije omenjenih celic ali pa zaradi njihovih drugačnih fizioloških značilnostih (v primerjavi z granularnimi celicami). Verjetno gre za aktivacijo popravljalnih in/ali degenerativnih procesov po prvih sproženih epileptičnih napadih.

Naslednji analizirani področji hipokampusa sta CA1 in CA3 piramidalna sloja. Pri kontrolnih živalih smo v CA slojih zaznali le šibek difuzen imunoreaktivni signal Syt IV in sklepamo, da je pri teh živalih v CA regijah raven Syt IV nizka. Po dajanju kainske kisline se je raven proteina Syt IV povečala v 8 urah, kar je opazno tudi v 24 urah po dajanju kainske kisline. Podaljšana povečana raven Syt IV v CA1 in CA3 regijah je verjetno posledica podaljšane depolarizacije piramidalnih nevronov zaradi sinhronizirane aktivnosti nevronske mreže kolateral glutamatergičnih aksonov, ki povezujejo piramidalne celice (Ben-Ari in Cossart 2000). Podaljšana vzdraženost CA regij je lahko posledica zmanjšanega delovanja GABA (inter)nevronov, saj je znano, da se po delovanju kainske

68

kisline razmerje med glutamatom in GABA ruši v prid glutamata. V CA3 regiji smo, v primerjavi s povečanjem imunoreaktivnega signala v 8 urah, opazili upad signala v 24 urah po dajanju kainske kisline. Pokazali smo, da celice v CA3 sloju hipokampusa, kjer je imunoreaktivni signal Syt IV v 24 urah po dajanju kainske kisline upadel, še niso propadle (slika 23), tako da ne moremo trditi, da je signal Syt IV upadel zaradi propadlih celic. Možno je sicer, da so te celice v 24 urah pričele propadati, tako bi lahko upad signala Syt IV vseeno lahko povezali s propadom nevronov, vendar tega ne moremo dokazovati na podlagi opisanih rezultatov (potrebovali bi vsaj še časovno točko 36 ur po dajanju kainske kisline). V uvodu sem opisala zgodnje patološke spremembe (1 do 24 ur po dajanju kainske kisline), ki so vezane predvsem na nevrone (kondenzacija in piknotičnost jeder ter vakuolizacija nevropila, Sperk in sod. 1983). Verjetno gre za sposobnost določenih celic, da obnovijo fiziološko stanje, medtem ko nekatere celice te sposobnosti nimajo oziroma se kontinuirano depolarizirajo zaradi delovanja drugih celic in zaradi difuzije ekscitatornih aminokislin na njihove sinapse. Procesi, zaradi katerih preide do zmanjšanja ravni proteina Syt IV, še niso raziskani. Možno je tudi, da smo opazili upad ravni Syt IV zaradi njegove kratkoživosti (Ferguson in sod. 1999).

5.1.3 Vpliv kainske kisline na povečanje ravni Sinaptotagmina IV v različnih možganskih področjih

Po injekciji kainske kisline so podgane razvile epileptične napade, ki so posledica delovanja tega toksina v možganih podgane (Sperk in sod. 1983). Po dajanju kainske kisline in posledičnem epileptičnem napadu smo v različnih časih po injekciji pokazali regijsko povečano izražanje proteina Syt IV v nevronih hipokampusa podgane (sliki 18 in 20). Na PC12 celicah so Vician in sod. (1995) pokazali, da se Svt IV povečano izraža po depolarizaciji celice, ki se v hipokampusu širi iz granularnega sloja DG preko mahastega nitja v CA3 piramidalni sloj in nato po Schafferjevih kolateralah v CA1 piramidalni sloj (glej Uvod, slika 5). Povečanje imunoreaktivnega signala Syt IV v našem poskusu ustreza že pokazani indukciji mRNA tega proteina ter verjetno nakazuje smer aktivacije podregij hipokampusa. Znano je, da se ne glede na mesto proženja, epileptična aktivnost najprej prične v limbičnih predelih možganske skorje in/ali hipokampusu (Sperk s sod 1983, Van der Pool in sod. 1996, Joseph in sod. 2006). To pripisujejo gostim povezavam med nevroni v omenjenih možganskih strukturah (Van der Pool in sod. 1996). Raven Syt IV je verjetno podaljšano povišana v hipokampusu in limbični možganski skorji zaradi podaljšane aktivnosti goste nevronske mreže. V predelih limbične možganske skorje in hipokampusu se po epileptičnih napadih sinhrono aktivira več skupin nevronov (Bradford 1995, slika 46). Verjetno je povišana raven Syt IV rezultat depolarizacije živčnih celic in tudi nevronske mreže. To tudi ustreza že opisani aktivaciji drugih možganskih predelov po proženju motoričnih napadov (3 in višje stopnje po Racine lestvici), ki sledijo limbičnim napadom po dajanju kainske kisline (Pitkänen in sod. 2006).



Slika 46: Poenostavljen prikaz širjenja depolarizacije v nevronski mreži piramidalnih nevronov hipokampusa

(prilagojeno po Bradford 1995, str. 506)

(Simplified presentation of spreading depolarization of hippocampal pyramidal neuron network)

Po Bradford (1995) se vzdraženje lahko prične pri dveh naključno izbranih nevronih. Lahko gre za monosinaptično povezavo (celica 1 do 2) ali polisinaptično (celica 1 do 5). Navadno vzdraženje preneha po prvi sinapsi, vendar se ob zmanjšanem delovanju GABA lahko širi preko več sinaps. V času nekaj milisekund se tako lahko depolarizira večja skupina nevronov in sinhrono proži akcijske potenciale.

5.1.4 Prisotnost Sinaptotagmina IV v nevronih

Z imunofluorescenco smo pokazali prisotnost proteina Syt IV v okolici jedra nevronov ter v bližnjih delih aksonov in dendritov. Signal je verjetno prisoten v Golgijevem aparatu in drugih celičnih organelih (znano iz literature, Ibata in sod. 2000). Na slikah 20-22 je razvidno, da je v 24 urah po dajanju kainske kisline imunoreaktivni signal Syt IV prisoten v aksonih/dendritih CA1 piramidalnih celic. Ti dendriti potekajo (a) apikalno čez stratum radiatum v stratum lanculosum/moleculare in (b) bazalno v stratum oriens. Naši rezultati kažejo na to, da protein Syt IV po povečani sintezi potuje iz mesta telesa nevrona v predele aksona in dendritov. V drugi hipotezi smo predvidevali, da po povečanju sinteze proteina Syt IV v telesih nevronov hipokampusa, le-ta potuje v končiče v področje sinaps. V tej raziskavi smo dokazali, da se po dajanju kainske kisline poveča sinteza proteina Syt IV v telesih nevronov hipokampusa ter da le-ta potuje v dele aksonov in dendritov. Tako smo z imunofluorescenčno metodo delno potrdili drugo hipotezo, saj signala Syt IV nismo našli v končičih nevronov na področju sinaps. Druge hipoteze torej ne moremo ne ovreči ne potrditi. Verjetno bi ga lahko z drugimi metodami (elektronska mikroskopija, dvojno označevanje z označevalci za končiče nevronov) našli tudi v končičih nevronov, kar je predmet nadaljnjih raziskav.

5.1.5 Povečana raven Sinaptotagmina IV na ekscitotoksičnem modelu s kinolinsko kislino

Drugi model, kjer smo želeli opredeliti povečano raven mRNA Syt IV po epileptičnih napadih, je model s kinolinsko kislino. Na tržišču obstajajo različne učinkovine, ki delujejo ali antagonistično ali agonistično na iGluR, vendar veliko antagonistov in agonistov za ne-NMDA tip iGluR deluje na kainatne in AMPA receptorje (Smoldres in sod. 2002, Balázs in sod. 2006). V naši raziskavi smo želeli sprožiti epileptični napad preko aktivacije iGluR in preprečiti omenjeno vedenje s predhodnim dajanjem anatagonista za isti podtip

iGluR. Iz literature je znano, da je uporabljeni antagonist NMDA tipa iGluR, dizocilpin ali MK-801, uspešen pri preprečevanju kemično proženih epileptičnih napadov (Bengzon in sod. 1997, Lee in sod. 2002). Tako smo izbrali ekscitotoksin kinolinsko kislino, ki je agonist NMDA tipa iGluR, za preprečevanje delovanja kinolinske kisline pa smo uporabili učinkovino MK-801, ki je antagonist NMDA tipa iGluR. Uporabili smo enostransko injekcijo kinolinske kisline v možgane podgan, tako smo lahko nepoškodovano stran možganov uporabili za kontrolo in analizo aktivacije možganskih predelov. Želeli smo ugotoviti, ali pride do spremembe ravni Syt IV v hipokampusu po injekciji toksina v možgansko regijo striatum. Ve se, da se zaradi povečanja ravni endogene kinolinske kisline razvijejo epileptični napadi (Lapin in sod. 1981, Schwarcz in sod. 2002, Tavares in sod. 2005). Z injekcijo kinolinske kisline v možganske prekate ali hipokampus so drugi avtorji uspešno prožili epileptične napade (Tavares in sod. 2005). Model enostranske injekcije kinolinske kisline v striatum nam je omogočil opredelitev vpliva injekcije kinolinske kisline v oddaljeno možgansko strukturo na povečanje ravni Syt IV v hipokampusu in drugih limbičnih predelih. Tako smo želeli opredeliti morebitno vlogo Syt IV kot kazalca aktivacije možganskih regij ob epileptičnih/hemiepileptičnih napadih.

V tretji hipotezi smo predpostavili, da se bo po enostranski ekscitotoksični poškodbi striatuma s kinolinsko kislino povečala raven mRNA Syt IV v hipokampusu na poškodovani strani možganov ter v drugih možganskih področjih. Časovno točko žrtvovanja živali smo izbrali glede na poročila o povečanem izražanju mRNA IEG in nevrotrofina BDNF po delovanju kinolinske kisline (Walker in Carlock 1993, Purkiss s od. 1993, Rocamora in sod. 1994, Hollen in sod. 1997) in zato, ker se je raven mRNA Syt IV na modelu s kainsko kislino povečala po 4 urah (tudi po poročanju drugih avtorjev: Vician in sod. 1995, Tocco in sod. 1996). Raven mRNA Syt IV se po enostranski poškodbi striatuma s kinolinsko kislino po 4 urah značilno poveča v striatumu, hipokampusu, amigdaloidnem jedru, predelih možganske skorje ter jedru akumbens (slike 24, 25 in 40, 44). S temi rezultati potrjujemo tretjo postavljeno hipotezo.

5.1.6 Vpliv delovanja kinolinske kisline na povečano raven Sinaptotagmina IV

Kinolinska kislina je agonist NMDA_R, ki so v aktivni obliki dobro prepustni za Ca²⁺. Po delovanju kinolinske kisline na celico, se tako preko NMDA_R aktivirajo znotrajcelične poti, ki vodijo v fosforilacijo CREB (Hardingham in Bading 2003, slika 7). Uravnavanje izražanja Syt IV morda poteka preko CREB aktivacije, saj promotor gena za Syt IV vsebuje CRE elemente (Ferguson in sod. 1999, Glavan 2003). Hollen in sod. (1997) so pokazali, da se po delovanju kinolinske kisline poveča raven c-fos, le-ta se nato preko AP-1 kompleksa veže na promotorski zapis nevrotrofinov. Povečana raven Syt IV v omenjenih možganskih predelih po delovanju kinolinske kisline je verjetno vsaj deloma posledica ćezmerne aktivacije NMDA_R, ki so prisotni v teh regijah. To tudi dokazujemo s predhodnim dajanjem antagonista omenjenih receptorjev, MK-801, s katerim preprečimo vdor Ca²⁺ v celico in toksične procese, ki so povezani s preveliko koncentracijo teh ionov znotraj celice.

V četrti hipotezi smo nadalje predvidevali, da bomo povečanje izražanja mRNA Syt IV zaradi delovanja kinolinske kisline preprečili s predhodnim dajanjem MK-801 v odmerku, ki tudi vedenjsko prepreči hemiepileptični napad po enostranski poškodbi možganov s

kinolinsko kislino. Tako smo izbrali take odmerke MK-801, ki so preprečili hemiepileptični napad in odmerke, ki napada niso preprečili. Primerjali smo raven mRNA Syt IV pri podganah, ki so razvile hemiepileptične napade po predhodnem dajanju MK-801 in stereotaktičnem injiciranju KK v desni striatum in pri podganah, ki so pred stereotaktično operacijo dobile tak odmerek MK-801, da niso razvile hemiepileptičnih napadov. Dokazali smo, da ob predhodnem dajanju MK-801 v ustreznem odmerku, ki prepreči hemiepileptični napad zaradi delovanja kinolinske kisline, ne pride do povečanja izražanja mRNA Syt IV in s tem potrdili četrto postavljeno hipotezo.

5.1.7 Primerjava povečanja ravni mRNA Sinaptotagmina IV z mRNA IEG in nevrotrofina BDNF

Glede na to, da je Syt IV IEG (Vician in sod. 1995), smo povečanje ravni mRNA Syt IV primerjali s povečanjem ravni mRNA IEG c-fos in c-jun. C-fos kodira transkripcijski faktor, ki se povezuje z Jun proteinom in dela transkripcijski aktivatorski protein-1 (AP-1). AP-1 se veže na DNA in omogoča pozitivno in negativno regulacijo izražanja različnih genov. Naši rezultati kažejo podoben časovni potek povečanja mRNA c-fos in c-jun v področju hipokampusa, amigdaloidnega jedra, striatuma in predelov možganske skorje. Glede na povečanje ravni mRNA Syt IV smo pokazali v času in prostoru podobno povečanje mRNA analiziranih IEG v področjih hipokampusa, amigdaloidnega jedra, entorinalne, piriformne, cingulatne in motorične možganske skorje, striatuma in jedra akumbens. Verjetno lahko to povečanje pripišemo povečani aktivnosti nevronov. Poškodba se iz striatuma verjetno širi preko hipokampusa v limbične predele. Razlog za aktivacijo hipokampusa in verjetno sledeče limbične epileptične napade še vedno ni znan. Možno je, da se hipokampus aktivira preko neposrednega delovanja kinolinske kisline (difuzija preko prekatov ob katerih ležita tako striatum kot hipokampus), saj je iz literature že znano, da ima hipokampus visoko gostoto NMDA_R ter da se v tej možganski regiji kljub injekciji toksina v predele, ki ne ležijo ob hipokampusu, hitro sprožijo ekscitotoksični procesi (Balázs in sod. 2006).

Raven mRNA BDNF se v 4 urah po delovanju kinolinske kisline značilno poveča v hipokampusu, ne pa v striatumu poškodovane poloble možganov (slike 28, 29 in 41). S tem smo potrdili, da s stereotaktičnim injiciranjem kinolinske kisline v striatum ne vplivamo le na nevrone striatuma, ampak tudi na druge možganske regije, predvsem bi poudarila limbični sistem in aktivacijo področij, ki vplivajo na limbične epileptične napade. Analiza posameznih področij znotraj hipokampusa je pokazala, da je mRNA BDNF v 4 urah po poškodbi s kinolinsko kislino najbolj povečana v granularnem sloju DG, kjer se najbolj poveča tudi raven mRNA Syt IV in c-fos. Predvidevamo, da so analizirani geni pokazatelji povečane aktivnosti celic ob hemiepileptičnem napadu. Sama interakcija med nevrotrofini in nevrotransmitorji je pomembna pri vzpostavljanju povezav med celicami in pri nevrodegenerativnih procesih (Checa in sod. 2000). Tako je za boljše razumevanje pomembno, da se raziščejo povezave med izražanjem nevrotrofinov in molekulami, ki vplivajo na izločanje snovi iz celice. Nevrotrofin BDNF se namreč izloča iz nevronov preko uravnavanega izločanja iz mehurčkov.

Povečanje mRNA različnih IEG je po ekscitotoksičnih poškodbah lahko pokazatelj odgovora nevronov na stres, ali pa pomeni, da so se v nevronih sprožili procesi, ki vodijo v

programirano celično smrt (Honkaniemi in Sharp 1999, Becker in sod. 1999). Po poškodbi striatuma s kinolinsko kislino se, po poročanju drugih avtorjev, pojavljata dva vala povečanja ravni IEG: prvi, ki je hiter in prehodnega značaja in verjetno kaže odgovor nevronov na aktivacijo NMDA_R; drugi val povečanja pa se prične 4 ure po poškodbi in traja dlje kot 24 ur po poškodbi ter je še stvar raziskav (Purkiss in sod. 1993, Hollen in sod. 1997). Pokazali so, da povečanje izražanja c-fos in c-jun časovno in prostorsko sovpada s poškodbami nevronov ter da lahko z blokado učinkov Fos in Jun v nekaterih sistemih preprečimo apoptozo. Po drugi strani pa se c-fos povečano izraža, preden nevroni propadajo in tudi preden se poveča izražanje BDNF (Dong in sod. 2006). Vsekakor še ni raziskano, ali je povečanje IEG na modelih za epilepsijo neposredno povezano s propadanjem celic ali je to le fiziološki odgovor celic na depolarizacijo in/ali aktivacijo glutamatnih receptorjev (Zagulska-Szymczak in sod. 2001) ali pa pomeni aktivacijo mehanizmov, ki omogočajo celici preživetje (Dong s sod. 2006).

IEG kot transkripcijski faktorji vplivajo na izražanje drugih genov, npr. nevrotrofinov, kar lahko vodi v brstenje aksonov. Ali ima Syt IV tudi vlogo transkripcijskega faktorja, še ni bilo raziskano. Ve se, da promotor gena za Syt IV vsebuje CRE elemente (Ferguson in sod. 1999, Glavan 2003), tako da lahko za zdaj le sklepamo, da poteka uravnavanje izražanja Syt IV z udeležbo transkripcijskega dejavnika CREB. Za primerjavo povečanja izražanja mRNA Syt IV po poškodbi smo izbrali nevrotrofin BDNF. BDNF se izraža predvsem v možganski regiji hipokampus in ima pomembno vlogo pri razvoju, diferenciaciji in odmiranju nevronov v centralnem in perifernem živčevju. Izražanje mRNA BDNF se poveča glede na različne spremembe v delovanju nevronov in predvidevajo, da ima ta nevrotrofin pomembno vlogo pri zagotavljanju preživetja nevronov (Perez-Navarro in sod. 2000, Zagulska-Szymczak in sod. 2001). Izražanje BDNF naj bi bilo povezano z aktivnostjo celic (Dong in sod. 2006). Nadaljnje raziskave izražanja BDNF in Syt IV bodo morda pripomogle k boljšemu razumevanju udeleženosti Syt IV pri procesih ob razvoju živčevja, saj se ve, da je ta protein udeležen pri uravnavanju procesov na rastni coni nevronov (Ibata in sod. 2002, Yoshihara in sod. 2005).

5.1.8 Sinaptotagmin IV in epileptični napadi

Epileptičen napad je lahko posledica aktivacije glutamatnih receptorjev (Bradford 1995). Po dajanju kainske kisline, se aktivirajo KA_R, vendar je sledeče epileptično vedenje lahko tudi posledica posrednega delovanja kainske kisline na aktivacijo drugih glutamatnih receptorjev, na primer NMDA_R, ki se aktivirajo zaradi depolarizacije celice (po vdoru kationov čez kanale KA_R in AMPA_R se sprosti Mg²⁺, ki funkcionalno blokira NMDA kanal). Sledi vdor Ca²⁺ čez NMDA_R kanale, kar vpliva na različne procese v celici. Več dni po delovanju kainske kisline se v možganih podgane tudi poveča endogena raven kinolinske kisline (Behan in Stone 2000), kar lahko prispeva k zakasnjeni povečani aktivaciji NMDA_R. Po dajanju kainske kisline in depolarizaciji nevronov se torej v celici sprožijo različni procesi. Ker je posledica delovanja kainske kisline aktivirajo različni tipi glutamatnih receptorjev na post- in pre-sinaptičnih celicah, kar ima za posledico kompleksen odgovor nevronske mreže.

Smolders in sod. (2002) so raziskovali neposredno udeleženost KA_R pri proženju epileptičnih napadov. Uporabili so živalski model s pilokarpinom, ki izključuje neposredno aktivacijo KA_R pri proženju epileptičnih napadov. Njihovi rezultati kažejo na to, da z blokado nekaterih tipov KA_R lahko uspešno zavremo nastanek epileptičnih napadov

aktivacijo KA_R pri proženju epileptičnih napadov. Njihovi rezultati kažejo na to, da z blokado nekaterih tipov KA_R lahko uspešno zavremo nastanek epileptičnih napadov proženih s pilokarpinom. Tudi pri poskusih z električnim proženjem epileptičnih napadov, je ta antagonist v odvisnosti od odmerka zavrl nastanek epileptičnega vedenja (Smolders in sod. 2002). Lahko torej sklepamo, da je raven Syt IV na modelu s kainsko kislino povečana zaradi aktivacije KA_R in sledečega epileptičnega napada. Omenjeni receptorji so v veliki gostoti prisotni predvsem v hipokampusu, ki naj bi bil tudi področje primarnega delovanja kainske kisline (Sperk s sod. 1983, Zaguska-Szymezak in sod. 2001). Po Bradford (1995) se epileptogena aktivacija celic širi iz hipokampusa in limbičnih področij v druga možganska področja. Naši rezultati so pokazali, da se raven imunoreaktivnega signala Syt IV po delovanju kainske kisline poveča tudi v drugih možganskih predelih, kar je v skladu s hipotetično povezavo med limbičnimi področji in motoričnimi jedri, ki se aktivirajo med epileptičnimi napadi (Bradford 1995, slika 46, Pitkänen in sod. 2006).

Ker smo opazili povečano raven proteina Syt IV v granularnih in piramidalnih celicah, gre verjetno za prispevke tako pri procesih morfoloških in fizioloških sprememb sinapse kot pri nevrodegenerativnih procesih. Geni, ki se po epileptičnem napadu izražajo v granularnih celicah DG, naj bi bili vpleteni v mehanizme zaščite pred poškodbo in v aktivacijo celičnih programov, ki vodijo v brstenje aksonov ter sinaptično plastičnost (Zagulska-Szymczak in sod. 2001). V določenih predelih hipokampusa, kot je CA3 regija, pa hiperaktivnost nevronske mreže sama po sebi proži propadanje celic. Znano je namreč, da CA3 regija v hipokampusu propada, tudi če injiciramo kainsko kislino v oddaljene regije v možganih. Poleg tega ponavljajoča se stimulacija CA3 piramidalnih celic vodi v selektivno propadanje teh nevronov, kar kaže na to, da je povečanje sinaptičnega vhoda v CA3 za nevrone toksično (Ben-Ari in Cossart 2000). V hipokampusu so KA_R izraženi predvsem na sinapsah mahastega nitja (glej Uvod, slika 6). Po delovanju kainske kisline, se sprožijo procesi, ki vodijo v brstenje mahastega nitja, opisali pa so tudi brstenje drugih predelov hipokampusa, npr. CA1 piramidalnega sloja (Pitkänen in sod. 2006). Verjetno gre za "poškodbo, ki favorizira poškodbo", saj poškodbe nastajajo zaradi hiperaktivnosti nevronov, kar proži nastajanje novih sinaps mahastega nitja, to pa vpliva na nastanek novih poškodb (Ben-Ari in Cossart 2000). Znano je, da epileptogena aktivnost proži procese, ki so sicer prisotni ob razvoju živčevja (Brandt in sod. 2003). Glede na to, da smo pokazali povečano raven Svt IV, katerega izražanje z ontogenetskim razvojem upade (Berton in sod. 2000, Ibata in sod. 2000), bi lahko sklepali na njegovo vlogo pri obnavljanju oziroma nastanku novih sinaps. Te sinapse so na omenjenem modelu lahko "usodne" in vodijo v nastajanje patološke nevronske mreže, ki vpliva na razvoj kasnejših poškodb in epilepsije kot bolezni.



Slika 47: Shematičen prikaz hipotetične povezave limbičnega sistema in bazalnih ganglijev po epileptičnem napadu

(prilagojeno po Bradford H. F. 1995, str. 495)

(Schematic presentation of hypothetical connection of limbic system to basal ganglia after epileptic seizure)

Po Bradford (1995) naj bi imel glutamat ključno vlogo pri nastanku epileptičnih napadov. Avtor predlaga širjenje epileptogene aktivnosti iz entorinalne skorje preko perforantne poti v granularni sloj celic dentatnega girusa v hipokampusu, od tod po t.i. trisinaptični poti (glej Uvod, slika 5) do subikuluma in nato v limbični del striatuma (jedro akumbens). Od tod naj bi se aktivacija širila v *substantio nigro reticulato* (SNr) in dalje v hrbtenjačo.

Povečano raven proteina Syt IV po delovanju kainske kisline lahko torej povezujemo z depolarizacijo celice in aktivacijo KA_R ter posledičnimi epileptičnimi napadi. S tem smo delno dokazali, da je Syt IV dober označevalec aktivacije možganskih regij ob epileptičnih napadih, kar smo razvili ob dokazovanju pete postavljene hipoteze na modelu s kinolinsko kislino.

V peti hipotezi smo predpostavili, da je izražanje mRNA Syt IV primeren kazalec za pojav hemiepileptičnih napadov, povzročenih s kinolinsko kislino. Povečana raven mRNA Syt IV je verjetno povezana z nastankom epileptičnih napadov, saj živali, ki smo jim vedenjsko preprečili hemiepileptične napade, niso imele povečane ravni mRNA Syt IV v katerikoli analizirani možganski regiji (slika 40). Živali, ki so pred poškodbo striatuma s kinolinsko kislino dobile MK-801 v odmerku, ki ni popolno preprečil hemiepileptičnega napada, so imele povečano raven mRNA Syt IV v vseh analiziranih področjih hipokampusa in limbični možganski skorji (sliki 24 in 25). To kaže na aktivacijo limbičnih predelov. Povečano raven BDNF smo pri tej skupini živali opazili le v hipokampusu (sliki 28 in 29), povečanje ravni c-jun pa v limbičnih predelih z izjemo amigdaloidnega jedra in cingulatne možganske skorje (sliki 32 in 33). Povečanje ravni c-fos ima v primerjavi z analiziranimi geni s Syt IV najbolj podobno regionalno pojavnost (sliki 36 in 37). To je v skladu z že poročanim povečanjem ravni mRNA Syt IV na ekscitotoksičnem modelu s kainsko kislino, ki naj bi ustrezalo časovnemu in regionalnemu poteku povečanja ravni c-fos (Tocco in sod. 1996). Glede na naše rezultate lahko potrdimo peto hipotezo, saj povečanje ravni Syt IV ustreza aktivaciji možganskih področij ob epileptičnem napadu.

75

Po s kainsko kislino sproženimi epileptičnimi napadi se simultano poveča koncentracija glutamata v medceličnem prostoru (Bradford 1995). Kasneje (po nekaj tednih trajajoči t.i. "silent" fazi) se prožijo spontani epileptični napadi. Iz literature je znano, da se v limbičnih možganskih področjih med prvim sproženim napadom in kasnejšimi spontanimi napadi dogajajo spremembe, ki vodijo v reorganizacijo nevronske mreže, spremenjeno odzivnost receptorjev na endogene živčne prenašalce ter morebiti tudi spremembe v funkcijah celic (Pitkänen in sod. 2006). Pri tem bi poudarila predvsem spremembe, ki so povezane z delovanjem granularnih celic dentatnega girusa. Te celice pri odraslih podganah izločajo glutamat, vendar obstajajo dokazi, da ob epileptogeni aktivnosti granularne celice dentatnega girusa izražajo GAD in GABA (to je sicer značilno za te celice v zgodnjih fazah ontogenetskega razvoja) (Gutiérrez 2003). Poleg tega obstajajo dokazi, da so povezave granularnih celic, ki nastajajo po epileptičnem napadu de novo, funkcionalno uspešne, vendar se raztezajo predvsem v molekularni sloj dentatnega girusa in tako niso nujno na pravem mestu (Ben-Ari in Cossart 2000, Nadler 2003). Glede na to, da se več dni po injekciji kainske kisline in sledečimi epileptičnimi napadi v hipokampusu podgane poveča raven endogene kinolinske kisline (Guo in Kuang 1994, Behan in Stone 2000), bi lahko sklepali, da je to eden od razlogov, ki vodi v sledeče spontane epileptične napade.

Kinolinska kislina poleg depolarizacije celice zaradi aktivacije NMDA_R vpliva tudi na privzemanje glutamata v mehurčke (Tavares in sod. 2000). Zaradi povečane koncentracije glutamata v medceličnem prostoru se verjetno spremeni sestava različnih tipov glutamatnih receptorjev na postsinaptičnih predelih. Opisano je tudi od NMDA_R neodvisno delovanje kinolinske kisline in posledične poškodbe celic zaradi oksidativnega stresa (Behan in Stone 2000, Ganzella in sod. 2006). Dolgoročne spremembe po prvem kemično sproženem epileptičnem napadu torej vključujejo podaljšano prepisovanje nekaterih IEG, delovanje transkripcijskih faktorjev, podaljšano aktivacijo rastnih faktorjev, spremembe v sestavi glutamatnih receptorjev, gliozo in aktivacijo različnih proteinskih kinaz (Scorza in sod. 2003). Za nadaljnje raziskave bi bilo potrebno opredeliti raven Syt IV pri podganah, ki po prvih epileptične napade. Za raziskavo vloge Syt IV pri oblikovanju epileptogenih povezav v možganih, pa bi bilo potrebno tudi analizirati raven omenjenega proteina v t.i. "silent" fazi med prvimi kemično sproženimi epileptičnimi napadi.

5.1.9 Pomen povečanja ravni Sinaptotagmina IV

Povečanje ravni Syt IV kot odgovor na ekscitotoksično poškodbo še ni dobro raziskan. Ve se, da se Syt IV povečano izraža po depolarizaciji celice, o njegovi vlogi pa se še vedno razpravlja. Glede prisotnosti proteina Syt IV na subcelični ravni, prav tako tudi glede njegove funkcije v celici, prihaja med objavljenimi podatki različnih laboratorijev do nesoglasij (glej Uvod, 1.1.2). Naši rezultati kažejo na to, da je protein Syt IV v celici prisoten na organelih v telesu in bližnjih delih aksonov/dendritov nevronov. Glede na položaj imunoreaktivnega signala predvidevamo, da je Syt IV prisoten predvsem na sekretornih zrncih, ki sodelujejo pri transportu snovi znotraj celice.

Po delovanju kainske kisline se v nevronih prožijo mehanizmi, ki vodijo v spremembe v sestavi in gostoti transporterjev in receptorjev na plazmalemi ter notranjih celičnih organelov. Povečata se recikliranje in gostota KA_R in AMPA_R (Wyneken in sod. 2001). Po delovanju kainske kisline se poveča tudi izražanje nekaterih regulatorjev glutamatnega transporta (EAAT-2, excitatory amino acid transporter); M1 podtipa muskarinskih receptorjev, VGCC (voltage-gated Ca²⁺ channels) (Zaguska-Szymezak in sod. 2000); InsP₃R in RyR (Mori in sod. 2005). Spremeni se tudi izražanje kalcijevih kanalov na plazmalemi (Garcia in sod. 1997). Svt IV morda sodeluje pri transportu omenjenih molekul znotraj celice, kar pomeni, da uravnava recikliranje in vgrajevanje receptorskih podenot v membrano celice in membrane organelov. Pri tem bi izpostavila predvsem notranje organele ER in mitohondrije, ki so aktivno udeleženi pri ekscitotoksičnih procesih. Kot sem že nakazala v uvodu (glej Uvod, 1.3.3), je uravnavanje koncentracije Ca^{2+} v celici ključnega pomena pri širjenju ekscitotoksičnih procesov med nevroni. Mitohondriji namreč akumulirajo Ca^{2+} (npr. med toksičnim delovanjem glutamata), izhajanje Ca^{2+} iz mitohondrijev pa povzroča podaljšani učinek zvečane koncentracije tega iona v celici tudi po tem, ko glutamat odstranimo (White in Reynolds 1996). Zaradi rušenja fiziološkega stanja mitohondrijev, pride do poškodb dihalne verige in oksidativnega stresa. Pri teh toksičnih procesih nastajajo ROS (reaktivne kisikove zvrsti). Zaradi difuzije NO (dušikov oksid kot prosti radikal) skozi membrano celice se toksični proces širi med celicami (White in Reynolds 1996). V primeru, da ima celica sposobnost restavrirati potencial na mitohondrijski membrani, ima verjetno več možnosti za preživetje, prav tako pa se lahko zavre širjenje ekscitotoksičnega procesa med celicami. V popravljalne procese sta mogoče vključena tudi transport in reciklaža receptorjev na mitohondrijski membrani, pri čemer bi lahko Syt IV igral pomembno vlogo.

Verjetno so posebej omembe vredni tudi $AMPA_R$, katerih sestava se po epileptičnih napadih spremeni (pomen priisotnosti GluR2 podenote in prepustnosti za kalcijeve ione) (Grooms in sod. 2000), prav tako se pospeši recikliranje omenjenih receptorjev (Gomes in sod. 2003).

Vloga Syt IV je lahko povezana tudi s transportom večjih nevroaktivnih molekul znotraj celice in uravnavanju izločanja teh molekul. Po delovanju kainske kisline se namreč spremeni tudi izražanje in izločanje nevrotrofinov in nevropeptidov. Fukuda in Yammamoto (2004) sta poročala, da je ta protein prisoten predvsem na nezrelih LDCVs ali drugih DCVs. Samo dozorevanje LDCVs je kompleksno, gre namreč za več korakov. Iz trans-Glogijevega aparata se v LDCVs sortirajo proteini, kar je regulirano preko ionskih pogojev, receptorskega usmerjanja in agregacije proteinov (vsebina je lahko različna med celicami in tudi znotraj iste celice). Za LDCVs so potrebne sfingomielin-holesterol bogate membranske domene in v veliko primerih mora biti dobro vzpostavljena interakcija med vsebino LDCVs in njegovo membrano. Zlivanje nezrelih mehurčkov omogoči izločanje proteinov, ki se niso pravilno sortirali in zmanjša površino organela (pri tem gre za povečanje segregacije mase vsebine ter hkrati reciklažo nespecifičnih membranskih delov in neagregiranih delov vsebine preko obloženih mehurčkov). Po avtorjih Fukuda in Yamamoto (2004), naj bi imel Syt IV vlogo pri dozorevanju LDCVs. Možno je torej, da smo opazili povečanje ravni Syt IV zaradi večje potrebe po (dozorevanju) LDCVs, kar bi bil odgovor celice na ekscitotoksično poškodbo in povečano sintezo nevroaktivnih snovi, ki se nato prenesejo po živčni celici do mesta delovanja. LDCVs tako kot SVs sestavljajo rezervno skupino, ki omogoči lokalno dostavo mehurčkov za potrebe izločanja vsebine.

Ker oba tipa mehurčkov (SVs in LDCVs) izločata svojo vsebino na podoben način in se njune komponente na podoben način reciklirajo, je normalno pričakovati, da pri tem sodelujejo podobno zgrajeni proteinski kompleksi. Povečana raven Syt IV tako lahko predstavlja odgovor celice na povečano sintezo in potrebe transporta različnih proteinov po ekscitotoksični poškodbi. Burgoyne in Morgan (2002) predlagata, da se lahko tudi nezreli LDCVs izločajo. Tako bi lahko, ne glede na to, da Fukuda in Yamamoto (2004) poročata o prisotnosti Syt IV predvsem na nezrelih LDCVs, le-ta vplival na izločanje molekul iz omenjenih mehurčkov.

Ker se Syt IV povečano izraža po depolarizaciji celice, ima morda vlogo v spreminjanju biokemijskih značilnosti mehurčkov in kinetike zlivanja membrane mehurčka s plazmalemo (ali kako drugo membrano). Wang in sod. (2001) namreč predlagajo, da ima Syt IV regulatorno vlogo pri strukturi fuzijske pore ob izločanju iz LDCVs. Po Wang in sod. (2001), sta tako Syt IV kot Syt I sicer prisotna na LDCVs, vendar so to različne populacije mehurčkov, ki se tudi razlikujejo v svoji velikosti. Pokazali so, da povečano izražanje Syt I podaljša čas odpiranja fuzijske pore, ki je stabilna, medtem ko povečano izražanje Syt IV vpliva na skrajšanje tega časa in nastanek nestabilne pore. Različni mehurčki izločajo svojo vsebino z različno kinetiko, tako naj bi različne vrste sinaptotagminov vplivale na lokalno regulacijo kinetike izločanja iz mehurčkov. Wang in sod. (2001) tako (z zmanjšanjem stabilnosti fuzijske pore) tudi razloži rezultat Litlettona (1999), ko povečano izražanje Svt IV pri vinski mušici zmanjša izločanje nevrotransmitorjev. Po Wang in sod. 2003, mutacija C2B domene Syt IV zavira "kiss and run" eksocitozo. C2A domena naj bi po vezavi Ca²⁺ favorizirala "full fuzion", C2B pa "kiss and run". Tako naj bi bila po Wang in sod. (2003) Syt I in IV pomembna celična regulatorja verjetnosti ali se bo dogajala "full fuzion" eksocitoza (velika pora) ali "kiss and run" (majhna pora). V tem primeru bi Syt IV vplival na zmanjšanje izločanja večjih molekul, ki se po navadi izločajo iz LDCVs, iz nevronov, saj bi zaradi manjše pore le-te zastajale v mehurčku. Kljub temu, da Syt IV omogoča zlivanje membrane mehurčka s plazmalemo, bi lahko torej deloval kot negativni regulator sproščanja snovi iz celice.

V primeru, da Syt IV sodeluje pri izločanju iz SVs, pa bi povečanje frekvence "kiss and run" eksocitoze omogočilo uhajanje nevrotransmitorjev (npr. glutamata) v sinaptično špranjo. To bi vplivalo na slabšanje stanja nevronske mreže in podaljšano depolarizacijo (v primeru, da gre za izločanja glutamata), ki vodi v poškodbe. Počasno izločanje nevrotransmitorjev (zaradi majhne pore) bi vplivalo na zvečano koncentracijo nevrotransmitorja v sinaptični špranji, kar bi lahko vodilo v desenzitizacijo postsinaptičnih receptorjev (Wang in sod. 2003). Ting in sod. (2006) so namreč nedavno poročali, da je Syt IV po povečani sintezi po depolarizaciji celice prisoten na SVs. V primeru, da je Syt IV prisoten na SVs, bi njegov prispevek k uravnavanju izločanja iz celice potekal: (1) de novo narejeni Syt IV bi se doprinesel do končičev, (2) se hitro vgradil v sinaptične mehurčke ter (3) omogočil drugačen tip izločanja. To bi verjetno lahko potekalo v časovnem oknu 1 do nekaj ur po sintezi proteina. Znano je namreč, da se npr. Syt I iz trans-Golgijevega aparata hitro prenese do endosomov, od katerih se nato odcepljajo SVs. Anterogradni transport proteinov, ki sodelujejo pri izločanju nevrotransmitorjev, se v osrednjem živčevju dogaja 5-15 mm/h in ker so hipokampalni aksoni povečini dolgi okrog 10 mm, bi se to lahko zgodilo v roku 1 ure. Po transportu v endosome se proteini sortirajo v zrele SVs, kar se zgodi v roku 10 minut do 3 ur (Ferguson 1999). Syt IV bi v tem primeru preko pozitivnega uravnavanja "kiss and run" eksocitoze, lahko vplival na podaljšan čas "kiss and run" eksocitoze že približno 4 ur po *de novo* sintezi.

Morebitna vloga Syt IV je povezana tudi z glia celicami, saj so Zhang in sodelavci (2004) pokazali, da je ta protein udeležen pri sproščanju glutamata iz astrocitov. V tekoči raziskavi nismo analizirali glia celic, saj jih z morfološkim opazovanjem nismo opredelili. Vsekakor ne moremo izključiti prisotnosti imunoreaktivnega signala Syt IV v izrastkih glie in s tem tudi ne moremo ovreči prispevkov delovanja astrocitov ob omenjenih procesih.

Poleg vloge pri uravnavanem izločanju snovi iz celice pa ima Syt IV morda tudi vlogo pri endocitotskih procesih. Vlogo Syt IV pri endocitotskih procesih so do zdaj bolj malo raziskovali. Glede na to, da ima C2B domena sinaptotagminov sposobnost interakcije z AP-2 kompleksom, bi lahko Syt IV sodeloval tudi pri privzemanju zunajceličnih snovi z endocitozo (Ibata in sod. 2000). Vlogo Syt IV pri reciklaži SVs in/ali LDCVs (tudi pri dozorevanju LDCVs) ter recikliranju predelov plazmaleme (spremembe v sestavi receptorjev na pre/postsinaptični membrani kot odgovor na delovanje eksictotoksina) in/ali privzemu zunajceličnih snovi še raziskujemo.

5.2 SKLEPI

V svoji raziskavi smo opredelili povečanje ravni mRNA in proteina Syt IV v predelih možganov odraslih podganjih samcev (linija Wistar) po injekciji kainske kisline in sproženih epileptičnih napadih. Po povečanju mRNA smo v hipokampusu in drugih možganskih področjih pokazali tudi povečano raven proteina Syt IV in s tem potrdili prvo postavljeno hipotezo. Povečano raven proteina Syt IV po dajanju kainske ksiline lahko povezujemo z depolarizacijo celice (Vician in sod. 1995) in epileptičnimi napadi zaradi aktivacije KA_R (Smoldres in sod. 2002).

V drugi hipotezi smo predvidevali, da po povečanju sinteze proteina Syt IV v telesih nevronov hipokampusa, le-ta potuje v končiče v področje sinaps. V raziskavi nismo pokazali signala Syt IV v končičih nevronov na področju sinaps. Dokazali smo, da se po dajanju kainske kisline poveča sinteza proteina Syt IV v telesih nevronov hipokampusa ter da le-ta potuje v dele aksonov in dendritov. S tem smo torej delno potrdili drugo postavljeno hipotezo. Za nadaljnje raziskave bi bilo potrebno uporabiti metodologije elektronske mikroskopije in/ali dvojnega označevanja nitja, kjer je predvideno prisoten protein Syt IV ter drugih označevalcev (določitev predela končičev/sinapse).

V tretji hipotezi smo predpostavili, da se bo po enostranski ekscitotoksični poškodbi striatuma s kinolinsko kislino povečala raven mRNA Syt IV v hipokampusu ter v drugih področjih na poškodovani strani možganov. Časovno točko žrtvovanja živali smo izbrali glede na poročila o povečanem izražanju mRNA IEG in nevrotrofina BDNF (Walker in Carlock 1993, Purkiss s od. 1993, Rocamora in sod. 1994, Hollen in sod. 1997). Raven mRNA Syt IV se v 4 urah po enostranski poškodbi striatuma s kinolinsko kislino značilno poveča v hipokampusu in v limbičnih predelih možganov ter v striatumu in motorični možganski skorji. S temi rezultati potrjujemo tretjo postavljeno hipotezo.

V četrti hipotezi smo predvidevali, da bomo povečanje izražanja mRNA Syt IV preprečili s predhodnim dajanjem dizocilpina (MK-801) v odmerku, ki tudi vedenjsko prepreči hemiepileptični napad po poškodbi s kinolinsko kislino. Iz literature je znano, da s predhodnim dajanjem MK-801 v ustreznih odmerkih lahko preprečimo epileptične napade (Bengzon in sod. 1997, Lee in sod. 2002). Tako smo izbrali take odmerke MK-801, ki so preprečili hemiepileptični napad in odmerke, ki napada niso preprečili. Primerjali smo raven mRNA Syt IV pri podganah, ki so razvile hemiepileptične napade po predhodnem dajanju MK-801 in stereotaktično operacijo dobile tak odmerek MK-801, da niso razvile hemiepileptičnih napadov. Dokazali smo, da ob predhodnem dajanju MK-801 v ustreznem odmerku, ki prepreči hemiepileptični napad, ne pride do povečanja izražanja mRNA Syt IV in s tem potrdili četrto postavljeno hipotezo.

Z zadnjo postavljeno hipotezo smo želeli opredeliti, ali lahko povečana raven Syt IV rabi kot označevalec za aktivacijo možganskih regij ob hemiepileptičnih napadih. To smo nakazali s povečanjem ravni mRNA in proteina Syt IV po dajanju kainske ksiline in sledečimi epileptičnimi napadi stopnje 3-5 po Racine merski lestvici. Povečano raven Syt IV smo po delovanju kainske kisline namreč opisali v limbičnih področjih, striatumu in motorični možganski skorji. Za natančnejšo analizo primernosti Syt IV kot označevalca

aktivacije možganskih regij ob/po epileptičnih napadih, smo uporabili model s kinolinsko kislino. S predhodnim dajanjem MK-801 na modelu ekscitotoksične poškodbe s kinolinsko kislino, preprečimo vdor Ca²⁺ v celico in toksične procese, ki so povezani s preveliko koncentracijo teh ionov znotraj celice. V ustreznem odmerku tudi lahko preprečimo s kinolinsko kislino povzročene hemiepileptične napade. Potrdili smo tretjo hipotezo, to je, da je povečanje ravni Syt IV povezano z vedenjem hemiepileptičnega napada. Da je Syt IV dober označevalec aktivacije možganskih področij ob hemiepileptičnih napadih potrjujemo z rezultati, ki kažejo povišano raven mRNA Syt IV v hipokampusu in drugih limbičnih predelih ob preprečevanju hemiepileptičnih napadov z MK-801 v odmerku, ki hemiepileptičnega vedenja ni preprečil. Povišano raven Syt IV smo primerjali z IEG c-fos in c-jun ter s povišanjem ravni nevrotrofina BDNF. Z dobljenimi rezultati potrjujemo peto hipotezo, saj se je raven Syt IV po hemiepileptičnih napadih kljub dajanju MK-801 povišala v vseh analiziranih predelih hipokampusa, limbičnih predelih možganske skorje in v amigdaloidnem jedru na poškodovani strani možganov.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Sinaptotagmini so proteini, ki vežejo kalcijeve ione, so udeleženi pri transportu membran v celici ter verjetno sodelujejo pri uravnavanem izločanju snovi iz nevronov in nevroendokrinih celic (Marqueze in sod. 2000, Fukuda in sod. 2004). Sinaptotagmin IV (Syt IV) je bil odkrit kot gen zgodnjega odgovora po depolarizaciji nevroendokrinih celic (Vician in sod. 1995). Avtorji Vician in sod. (1995) ter Tocco in sod. (1996) so že ugotovili povečano raven mRNA Syt IV v hipokampusu in piriformni možganski skorji po s kainsko kislino (KA) povzročenimi epileptičnimi napadi.

Z agonisti ionotropnih glutamatnih receptorjev povzročimo depolarizacijo nevronov (Balázs in sod. 2006) in posledično tudi ekscitotoksično poškodbo (Sperk in sod. 1983, Stone 1993, Walker in Carlock 1993, Rocamora in sod. 1994). Zaradi povečane sinhrone aktivacije nevronov v limbičnih predelih možganov se razvijejo epileptični napadi (Bradford 1995). Uporabili smo dva živalska modela za raziskave ekscitotoksične poškodbe: sistemska injekcija KA, ki ustreza živalskemu modelu za epilepsijo senčnega režnja (Pitkänen in sod. 2006); ter enostranska injekcija kinolinske kisline (KK) v striatum, ki povzroči (hemi)epileptične napade (Marranes in Wauquier 1988).

V prvi hipotezi smo predvidevali, da bomo po povečanju mRNA Syt IV pokazali tudi povečano raven odgovornega proteina. V različnih možganskih področjih smo analizirali povečanje ravni mRNA in proteina Syt IV po s KA povzročenimi epileptičnimi napadi. Povečano raven proteina Syt IV, kar je pomembno za nadaljnje funkcionalne študije, smo najprej opazili v sloju granularnih celic DG. Kasneje se je povečala tudi raven proteina Syt IV v predelih CA regij hipokampusa. S temi rezultati potrjujemo prvo postavljeno hipotezo.

Vloga Syt IV pri uravnavanju izločanja snovi iz mehurčkov je še stvar debat. Ni namreč še povsem znano ali ta protein deluje kot negativni ali pozitivni regulator eksocitoze. Tako smo z drugo hipotezo predvidevali, da se bo *de novo* nastali protein prenesel iz mesta telesa nevronov v sinaptične predele. Ugotovili smo, da je imunoreaktivni signal Syt IV po povečanju v telesu nevronov, prisoten v bližnjih delih aksona in dendritov. V predelih končičev nam signala Syt IV ni uspelo analizirati. Tako ne moremo ne potrditi ne ovreči druge hipoteze. Za nadaljnje študije bi bilo potrebno uporabiti ali druge metode ali dvojno označevanje živčnih končičev.

Za nadaljnje raziskave vpletenosti Syt IV pri epileptičnih napadih smo uporabili KK, ki neposredno stimulira NMDA glutamatne receptorje. V tretji hipotezi smo predpostavili, da bomo po enostranski poškodbi striatuma s KK pokazali povečano raven mRNA Syt IV v različnih predelih možganov, predvsem v hipokampusu poškodovane poloble. Pokazali smo, da se 4 h po poškodbi s KK raven mRNA Syt IV poveča v hipokampusu, predelih možganske skorje, jedru akumbens, amigdaloidnemu jedru, striatumu in talamusu, ter s tem potrdili tretjo hipotezo.

Da bi ugotovili, ali se po delovanju KK poveča raven Syt IV zaradi aktivacije NMDA receptorjev, smo pred enostransko injekcijo KK sistemsko injicirali podganam učinkovino MK-801, ki je anatagonist omenjenih receptorjev. MK-801 prepreči drugo fazo ekscitotoksične poškodbe (Brandt in sod. 2003), zato smo predvidevali, da nam bo z omenjeno učinkovino uspelo preprečiti epileptično vedenje podgan ter tudi povečanje ravni Syt IV. Pokazali smo, da MK-801 v odmerku 1 mg/kg telesne teže ne prepreči (hemi)epileptičnega vedenja in tudi ne povečanja ravni mRNA Syt IV. Večji odmerki MK-801 pa so uspešno preprečile razvoj (hemi)epileptičnega vedenja in tudi povečanje ravni Syt IV. S tem smo potrdili četrto hipotezo.

Pomen povečanja ravni Syt IV zaradi epileptogene aktivnosti, smo analizirali s primerjavo povečanja ravni mRNA c-fos, c-jun, BDNF in Syt IV v različnih predelih možganov. V poskusu s KA smo natančno analizirali povečanje ravni Syt IV v hipokampusu. Depolarizacija se v hipokampusu širi iz DG preko mahastih vlaken v CA3 regijo in nato preko Schafferejvih kolateral v CA1 predel hipokampusa. Naši rezultati kažejo, da povečana raven Syt IV v času in prostoru ustreza širitvi depolarizacije v hipokampusu. Ostale možganske regije, ki se poleg hipokampusa aktivirajo po delovanju KA so jedro akumbens, možganska skorja in amigdaloidno jedro (Sperk in sod. 1983). Pri odraslih podganah povzroči sistemska injekcija KA limibčne napade s pričetkom epileptogene aktivnosti v sprednjih možganih. Paroksizmalna aktivnost se iz prvotne možganske regije navadno širi v ostale limbične predele, nato sledi aktivacija nelimbičnih področij, predeli možganske skorje in bazalni gangliji (Pitkänen in sod. 2006). V nadaljevanju smo pokazali povečano raven Svt IV v različnih limbičnih predelih po z enostransko injekcijo KK v striatum podgane povzročeno epileptično aktivnostjo. To povečanje je ustrezalo povečanju mRNA IEG (c-fos in c-jun) ter nevrotrofina BDNF. S temi rezultati lahko potrdimo zadnjo postavljeno hipotezo.

6.2 SUMMARY

Synaptotagmins are transmembrane proteins involved in the regulation of Ca2+-dependent membrane trafficking and in the vesicle fusion with plasma membrane in neurons and endocrine cells (Marqueze et al. 2000, Fukuda et al. 2004). Synaptotagmin IV (Syt IV) was discovered to be an immediate early gene induced by depolarization in neuroendocrine cells (Vician et al. 1995). The up-regulation of Syt IV mRNA was shown in the hippocampus and piriform cortex after kainic acid (KA) induced seizures (Vician et al. 1996).

By application of ionotropic glutamate receptor agonists we induce depolarization of central nervous system neurons (Balázs et al. 2006) and consequently excitotoxic damage (Sperk et al. 1983, Stone 1993, Walker and Carlock 1993, Rocamora et al. 1994). Sustained synchronous activation of limbic system neurons causes epileptic seizures (Bradford 1995). We used two animal models for excitotoxic damage research, the animal model of temporal lobe epilepsy by KA injection (Pitkänen et al. 2006) and the animal model of unilateral intrastriatal injection of quinolinic acid (QA), which causes episodic barrel rotations that have been suggested as epileptic convulsions (Marranes and Wauquier 1988).

In the first hypothesis we therefore proposed, that after Syt IV mRNA up-regulation in different brain regions we could also detect Syt IV protein up-regulation. Here we describe the spatio-temporal up-regulation of Syt IV mRNA and protein after KA-induced seizures in different brain regions. KA differently up-regulated Syt IV mRNA and protein depending on the time after seizure, furthermore, protein up-regulation displayed a similar pattern of its KA-induced mRNA that was also reported by Tocco et al. (1996). Syt IV protein up-regulation, which is important for further functional studies, first occurred in the strata granulare of DG, followed by the up-regulation in the neurons of hilus and then cells of the stratum piramydale of CA regions. This results support our first hypothesis.

The precise role of Syt IV in secretory vesicle exocytosis is still matter of controversy, so it is not clear if Syt IV functions as a positive or negative regulator of exocytosis. Further on we proposed that after *de novo* synthesis of protein Syt IV, we could detect it in dendrites, axons and synaptic terminals at later time points after KA injection. We did not detect any Syt IV imunoreactivity in the synaptic terminals of Syt IV positive neurons, but we report Syt IV positive axons and dendrites in proximal parts. We can not confirm nor reject the second hypothesis. For further investigations other methods and double labelling should be used.

For further study of Syt IV involvement in epileptic seizures we used QA, which directly stimulates NMDA glutamate receptors. In third hypothesis we proposed that after unilateral QA intrastriatal injection we will detect Syt IV mRNA up-regulation in different brain regions, especially in the hippocampus in the damaged brain hemisphere. Indeed, we report the massive Syt IV mRNA up-regulation 4 h after unilateral QA intrastriatial injection in the hippocampus, corticies, nucleus accumbens, nucleus amygdalae, striatum and thalamic nuclei. We therefore confirmed the third hypothesis.

To define if QA-induced seizure Syt IV up-regulation is caused by NMDA receptor activation, we used the prior intrastriatal QA injection NMDA receptor antagonist, MK-801, systemic injection. As excitotoxic cascade could be suppressed by administration of NMDA antagonist (Brandt et al. 2003), MK-801, we proposed that animals will not develop seizure activity and we will not detect Syt IV mRNA up-regulation. We report, that 1 mg/kg body weight doses of MK-801 application prior to the unilateral QA intrastriatial injection does not fully prevent seizures and also does not fully prevent Syt IV mRNA up-regulation. What is more, in higher doses MK-801 serves as a potent seizure activity inhibitor and we also did not detect Syt IV mRNA up-regulation. Therefore we can confirm the fourth hypothesis.

The significance of seizure-induced Syt IV up-regulation was tested by c-fos, c-jun, BDNF and Syt IV mRNAs regional distribution up-regulation comparison. In experiments with KA-induced seizures we precisely analysed seizure-induced Syt IV protein up-regulation in brain region hippocampus. The depolarization in hippocampus spreads from DG to the CA3 region via mossy fibers and then to CA1 region via Schaffer's collaterals. Our experiment showed that the spatial-temporal pattern of KA-induced up-regulation of Syt IV protein accompines the direction of the KA-induced depolarization propagation through the hippocampus. Other main brain regions beside the hippocampus that become hyper-activated by KA are also nucleus accumbens, cortex and nucleus amygdalae (Sperk et al. 1983). In adult rats, high doses of KA cause limbic seizures with origin in the forebrain. Paroxymal activity usually spreads from the original structure to other limbic regions and then follows an activation of structures beyond the limbic system, neocortex and basal ganglia (Pitkänen et al. 2006). We also report the Syt IV up-regulation in different limbic regions after unilateral QA intrastriatal injection induced seizures that could be compared with IEG (c-jun and c-fos) and neurotrophic factor BDNF upregulation. We confirm that Syt IV is a potent marker for seizure-induced depolarization spreading in central nervous system.

7 VIRI

An S., Zanisek D. 2004. Regulation of exocytosis in neurons and neuroendokrine cells. Current Opinion in Neurobiology, 14: 530-552.

Adolfsen B., Saraswati S., Yoshihara M., Littleton J.T. 2004. Synaptotagmins are trafficked to distinct subcellular domains including postsynaptic compartment. The Journal of Cell Biology, 166, 2:249-260.

Ahras M., Otto G.P., Tooze S.A. 2006. Synaptotagmin IV is necessary for the maturation of secretory granules in PC12 cells. The Journal of Cell Biology, 173, 2: 241-251.

Alberts B., Johnson B.D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. 2000. Molecular Biology of the Cell. 4th Edition. New York and London: Garland Publishing: 752 str.

Amaral D.G. 1978. A Golgi study of cell types in the hillar region of the hippocampus in the rat. Journal of Comparative Neurobiology, 182: 851-914.

Amaral D.G., Witter M.P. 2003. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. Neuroscience, 31, 3: 571-591.

Amaral D.G. 2006. Structure and function of the hippocampal formation: memory from the seahorse. 5th Forum of European Neuroscience. Special Lecture, Vienna, 12. 07.2006. FENS Forum Abstract, Federation of European Neuroscience Societies: 656 str.

Balazs R., Bridges R.J., Cotman C.W. 2006. Excitatory amino acid transmission in health and disease. Oxford University Press. New York: 368 str.

Bauerfeind R., Jelinek R., Hellwig A., Huttner W.B. 1995. Neurosecretory vesicles can be hybrids of synaptic vesicles and secretory granules. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 92: 7342-7346.

Bausch S.B., McNamara J.O. 2000. Synaptic connections from multiple subfields contribute to granule cell hyperexcitability in hippocampal slice cultures. Journal of Neurophysiology, 84: 2918-2932

Bausch S.B., McNamara J.O. 2004. Contributions of mossy fiber and CA1 pyramidal cell sprouting to dentate granule cell hyperexcitability in kainic acid-treated hippocampal slice cultures. Journal of Neurophysiology, 92, 6: 3582-3595.

Beal M.F., Kowall N.W., Swartz K.J., Ferrante R.J., Martin J.B. 1988. Systemic approaches to modifying quinolinic acid striatal lesions in rats. The Journal of Neuroscience, 8, 10: 3901-3908.

Becker A.J., Gillardon F., Blümcke I., Langendörfer D., Beck H., Wiestler O.D. 1999. Differential regulation of apoptosis-related genes in resistant and vulnerable subfields of the rat epileptic hippocampus. Molecular Brain Research, 67: 172-176.

Behan W.M., Stone T.W. 2000. Role of kynurenines in the neurotoxic actions of kainic acid. British Journal of Pharmacology, 129, 8: 1764-1770.

Ben-Ari Y., Cossart R. 2000. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. TINS, 23: 580-587.

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. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 94: 10432-10437.

Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P. 1998. Calcium – a life and death signal. Nature, 395: 645-648.

Berridge M.J. 1998. Neuronal calcium signaling. Neuron, 21: 13-26.

Berton F., Iborra C., Boudier J.A., Seagar M.J., Marqueze B. 1997. Developmental regulation of synaptotagmin I, II, III, and IV mRNAs in the rat CNS. Journal of Neuroscience, 17, 4: 1206-1216.

Berton F., Cornet V., Iborra C., Garrido J., Dargent B., Fukuda M., Seagar M., Marqueze B. 2000. Synaptotagmin I and IV define distinct populations of neuronal transport vesicles. European journal of Neuroscience, 12, 4: 1294-1302.

Bradford H.F. 1995. Glutamate, GABA and epilepsy. Progress in Neurobiology, 47: 477-511.

Brandt C., Potschka H., Löscher W., Ebert U. 2003. N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy. Neuroscience, 118: 727-740.

Bredt D.S., Nicolli R.A. 2003. AMPA receptor trafficking at excitatory synapse. Neuron, 40: 361-379.

Brunger A.T. 2001. Structure of proteins involved in synaptic vesicle fusion in neurons. Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular structure, 30: 157-171.

Burgoyne R.D., Morgan A. 2002. Secretory granule exocytosis. Physiology Review, 83: 581-632.

Canals J.M., Marco S., Checa N., Michels A., Perez-Navarro E., Arenas E., Alberch J. 1998. Differential regulation of the expression of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 after excitotoxicity in a rat model of Huntington's disease. Neurobiology of disease, 5: 357-364.

Chapman D.E. 1995. Calcium signaling. Cell, 80: 259-268.

Checa N., Canals J.N., Alberch J. 2000. Developmental regulation of BDNF and NT-3 expression by quinolinic acid in the striatum and its main concentrations. Experimental Neurology, 165, 1: 118-124.

Denovan-Wright E.M., Newton R.A., Armstrong J.N., Babity J.M., Robertson H.A. 1998. Acute administration of cocaine, but not amphetamine, increases the level of synaptotagmin IV mRNA in the dorsal striatum of rat. Brain research. Molecular brain research, 55, 2: 350-354.

Desai R.C., Vyas B., Earles C.A., Littleton J.T., Kowalchyck J.A., Martin T.F., Chapman E.R. 2000. The C2B domain of synaptotagmin is a Ca(2+)-sensing module essential for exocytosis. The journal of cell biology, 150, 5: 1125-1134.

De Sarro G., Gitto R., Russo E., Ibbadu G.F., Barreca L.M., De Luca L., Chimirri A. 2005. AMPA receptor anatgonists as potential anticonvulsant drugs. Current Topics in Medical Chemistry, 5: 31-42.

Dolorfo C.L., Amaral D.G. 1998. Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. The Journal of comparative neurology, 398, 1: 25-48.

Dong M., Wu Y., Fan Y., Xu M., Zhang J. 2006. C-fos modulates brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in mouse hippocampal CA3 and dentate gyrus neurons. Neuroscience Letters, 400: 177-180.

Edwards R.H. 1998. Neurotransmitter release: Variations on a theme. Current Biology, 8: 883-885.

Ferguson G.D., Thomas D.M., Elferink L.A., Herschman H.R. 1999. Synthesis, degradation and subellular localization of synaptotagmin IV, a neuronal immediate early gene product. Journal of Neurochemistry, 1821-1831.

Ferguson G.D., Anagnostaras S.G., Silva A.J., Herschman H.R. 2000. Deficits in memory and motor performance in synaptotagmin IV mutant mice. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 97: 5598-5603.

Ferguson G.D., Herschman H.R., Storm D.R. 2004. Reduced anxiety and depression-like behavior in synaptotagmin IV (-/-) mice. Neuropharmacology, 47: 604-11.

Fukuda M., Ibata K., Mikoshiba K. 2001. A unique spacer domain of synaptotagmin IV is essential for Golgi localization. Journal of Neurochemistry, 77: 730-40.

Fukuda M., Kanno E., Ogata Y., Saegusa C., Kim T., Loh Y.P., Yamamoto A. 2003. Nerve growth factor-dependent sorting of synaptotagmin IV protein to mature dense-core vesicles that undergo calcium-dependent exocytosis in PC12 cells. Journal of Biological Chemistry, 278: 3220-3226.

Fukuda M., Yamamoto A. 2004. Effect of forskolin on synaptotagmin IV protein trafficking in PC12 cells. Journal of Biochemistry, 136: 245-253.

Fukuda M. 2006. The role of synaptotagmin and synaptotagmin-like protein (Slp) in regulated exocytosis. Molecular mechanisms of exocytosis, 1-16.

Ganzella M., Jardim F.M., Boeck C.R., Vendite D. 2006. Time course of oxidative events in the hippocampus following intracerebroventricular infusion of quinolinic acid in mice. Neuroscience Research, 55: 397-402.

Garcia M.L., Murray K.D., Garcia V.B., Stehler E.E., Isackson P.J. 1997. Seizure-induced alterations of plasma membrane calcium ATPase isoforms 1, 2 and 3 mRNA and protein in rat hippocampus. Molecular Brain Research, 45: 230-238.

Glavan G., Zorec R., Babič K., Sket D., Živin M. 2000. Dopaminergic regulation of synaptotagmin I and IV mRNAs in hemiparkinsonian rats. Neuroreport, 11(18): 4043-4047.

Glavan G. 2003. Dopaminergično uravnavanje izražanja mRNK sinaptotagminov v striatumu podgan z enostransko poškodbo nigrostriatne poti, Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Glavan G., Živin M. 2005. Differential expression of striatal synaptotagmin mRNA isoforms in hemiparkisonian rats. Neuroscience, 135: 545-554.

Gomes A.R., Correia S.S., Carvalho A.R., Durate C.B. 2003. Regulation of AMPA receptor activity, synaptic targeting and recycling: Role in synaptic plasticity. Neurochemical Research, 28, 10: 1459-1473.

Goodenough S., Davidson M., Chen W., Beckmann A., Pujic Z., Otsuki M., Matsumoto I., Wilce P. 1997. Immediate early gene expression and delayed cell death in limbic areas of the rat brain after kainic acid treatment and recovery in the cold. Experimental Neurology, 145: 451-561.

Grooms S.Y., Opitz T., Bennett M.V.L., Zukin R.S. 2000. Status epilepticus decreases glutamate receptor 2 mRNA and protein expression in hippocampal pyramidal cells before neuronal death. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 97, 2: 3631-3636.

Guo Q., Kuang P.G. 1995. Hippocampal quinolinic acid concentrations in epileptogenesis in rats. Acta Pharmacologica Sinica, 16, 5: 438-440.

Gutiérrez R. 2003. The GABAergic phenotype of the »glutamatergic« granule cells of the dentate gyrus. Progress in Neurobiology, 71: 337-358.

Hardingham G.E., Bading H. 2003. The Yin and Yang of NMDA receptor signaling. TRENDS in Neurosciences, 26, 2: 81-89.

Haydon P.G., Carmiqnoto G. 2006. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. Physiological Reviews, 86: 1009-1031.

Heyes M.P. 1992. Quinolinic acid in culture media used for in vitro neurotoxicology studies. Neuroscience Letters, 145, 2: 234-235.

Heyes M.P., Achim C.L., Wiley C.A., Major E.O., Saito K., Markey S.P. 1996. Human microglia convert l-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid. Biochemical Journal, 320: 595-597.

Hilbush B.S., Morgan J.I. 1994. A third synaptotagmin gene, Syt3, in the mouse. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 91: 8195-8199.

Hollen K.M., Nakabeppu Y., Davies S.W. 1997. Changes in expression of delta FosB and the Fos family proteins following NMDA receptor activation in the rat striatum. Brain research, Molecular Brain Research, 47, 1-2: 31-43.

Honkaniemi J., Sharp F.R. 1999. Prolonged expression of zinc finger immediate-early gene mRNAs and decreased protein synthesis following kainic acid induced seizures. European Journal of Neuroscience, 11, 1: 10-17.

Ibata K., Fukuda M., Hamada T., Kabayama H., Mikoshiba K. 2000. Synaptotagmin IV is present at the Golgi and distal parts of neuritis. Journal of Neurochemistry, 74: 518-26.

Ibata K., Hashikawa T., Tsuboi T., Terakawa S., Liang F., Mizutani A., Fukuda M., Mikoshiba K. 2002. Non-polarized distribution of synaptotagmin IV in neurons: evidence that synaptotagmin IV is not a synaptic vesicle protein. Neuroscience Research, 43: 401-6.

Jones R.S.G., Woodhall G.L. 2005. Background synaptic activity in rat entorhinal cortical neurons: differential control of transmitter release by presynaptic receptors. Journal of Physiology, 562, 1: 107-120.

Joseph S.A., Lynd-Balta E., O'Banion M.K., Rappold P.M., Daschner J., Allen A., Padowski J. 2006. Enhanced cyclooxygenase-2 expression in olfactory-limbic forebrain following kainate-induced seizures. Neuroscience, 140: 1051-1065.

Kaminska B., Lukasiuk K, Kaczmarek L. 1994. Seizures-evoked activation of transcription factors. Acta Neurobiologiae Experimentalis, 54: 65-72.

Kaminska B., Filipowski R.K., Zurokowska G., Lason W., Przewlocki R., Kaczmarek L. 1994. Dynamic changes in the composition of the AP-1 transcription factor DNA-binding activity in rat brain following kainite-induced seizures and cell death. European Journal of Neuroscience, 6: 1558-1566.

Kandel E.R., Siegelbaum S.A., Schwartz J.H., Jessell T.M. 2000. Principles of neural science. 4th ed. New York, McGraw-Hill, 1414 str.

Kadish I. 2002. Plasticity in the entorhinal-hippocampal pathway, influence of gene mutations and hormones. Doctoral dissertation, University of Kuopio

Kiessling M., Gass P. 1993. Immediate early gene expression in experimental epilepsy. Brain Pathology, 3, 4: 381-393.

Kullman D.M. 2001. Presynaptic kainate receptors in the hippocampus: slowly emerging from obscurity. Neuron, 32: 561-564.

Langley K., Grant N.J. 1997. Are exocytosis mechanisms neurotransmitter specific? Neurochemistry international, 31: 739-757.

Lapin I. P. 1981. Kynurenines and seizures. Epilepsia, 22, 3: 257-265.

Lee J.-K., Choi S.-S., Lee H.-K., Han K.-J., Han E.-J., Suh H.-W. 2002. Effects of MK-801 and CNOX on various neurotoxic responses induced by kainic acid in mice. Molecules and Cells, 14: 339-347

Lerma J., Paternain A.V., Rodriguez-Moreno A., Lopez-Garcia J. 2001. Molecular physiology of kainate receptors. Physiological Reviews 81, 3: 971-998.

Lerma J. 2006. Kainate receptor physiology. Current Opinion in Pharmacology, 6: 89-97.

Li L., Chin L.-S. 2003. The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. Cellular and Molecular Life Sciences, 60: 942-960.

Lisy V., Stastny F. 2002. Nitric oxide synthase inhibition and glutamate binding in quinolinatelesioned rat hippocampus. Physiological research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca, 51, 3: 299-307.

Littleton J.T., Serano T.L., Rubin G.M., Ganetzky B., Chapman E.R. 1999. Synaptic function modulated by changes in the ratio of synaptotagmin I and IV. Letters to Nature, 400: 757-760.

Man H.Y., Ju W., Ahmadian G., Wang Y.T. 2000. Intracellular trafficking of AMPA receptors in synaptic plasticity. Cellular and Molecular Life Sciences, 57: 1526-1543.

Mann E.O., Radcliffe C.A., Paulsen O. 2005. Hippocampal gamma-frequency oscillations: from interneurons to pyramidal cells, and back. Journal of Physiology, 562, 1: 55-63.

Machado H.B., Liu W., Vician L., Herschamn H.R. 2004. Synaptotagmin overexpression inhibits depolarization-induced exocytosis in PC12 cells. Journal of Neuroscience Research, 76:334-342

Marranes R., Wauquier A. 1988. Episodic Barrel Rotations induced by intrastriatal injection of quinolinic acid in rats. Inhibition by anticonvulsants. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 31: 153-162.

Martinčič D. 2004.Preprečevanje ekscitotoksične poškodbe striatuma poskusne podgane z isradipinom. Diplomska naloga, Univerza v ljubljani, Medicinska fakulteta

Mayer J. S., Quenzer L. F. 2005. Psychopharmacology; Drugs, The brain and Behavior. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts U.S.A: 556 str.

Melodesi J., Chieregatti E., Malosio M.L. 2004. Requirements for the identification of densecore granules. TRENDS in Cell Biology, 14, 1: 13-19.

Michaelis E.K. 1998. Molecular Biology of Glutamate Receptors in the Central Nervous System and their role in Excitotoxicity, Oxidative Stress and Aging. Progress in Neurobiology, 54: 369-415.

Mori F., Okada M., Tomiyama M., Kaneko S., Wakabayashi K. 2005. Effects of ryanodine receptor activation on neurotransmitter release and neuronal cell death following kainic acid-induced status epilepticus. Epilepsy research, 65: 59-70.

Nadler J.V. 2003. The recurrent model mossy fiber pathway of the epileptic brain. Neurochemical Research, 28: 1649-1658.

Paxinos G., Watson C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sidney: Academic Press

Paxinos G., Watson C. 2005. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sidney: Academic Press

Perez-Navarro E., Canudas A.M., Akerund P., Alberch J., Arenas E. 2000. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin -4/5 prevent the death of striatal

projection neurons in a rodent model of Hungtington's disease. Journal of Neurochemistry, 75, 5: 2190-2199.

Pitkänen A., Schwartzkroin P.A., Moshe S.L. 2006. Models of Seizures and epilepsy. Elsevier Academic Press, San Diego, California U. S. A. 712 str.

Purkiss R.J., Legg M.D., Hunt S.P., Davies S.W. 1993. Immediate early gene expression in rat forebrain following striatal infusion of quinolinic acid. European Journal of Neuroscience, 5, 12: 1653-1662.

Racine R.J. 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II Motor seizures. Electroencephalography and Clinical Neurophysiology, 32: 281-294.

Riba-Bosch A., Perez-Clausell J. 2004. Response to kainic acid injections. Changes in staining for Zinc, Fos, cell death and glial response in the rat forebrain. Neuroscience, 125: 803-818.

Rice A.C., DeLorenzo R.J. 1998. NMDA receptor activation during status epilepticus is requred for the development of epilepsy. Brain Research, 782: 240-247.

Rocamora N., Massieu L., Boddeke H.W., Palacios J.M., Mengod G. 1994. Differential regulation of the expression of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in adult rat brain after intrahippocampal injection of quinolinic acid. Brain Research, Molecular Brain Research 26, 1: 89-98.

Rodríguez-Moreno A. 2003. Kainate receptors. Their function in the regulation of GABAergic synaptic transmission in the hippocampus. Revista de neurologia, 36, 9: 852-859.

Ruth R.E., Collier T.J., Routtenberg A. 1982. Topography between the entorhinal cortex and the dentate septotemporal axis in rats: I. Medial and intermediate entorhinal projecting cells. The Journal of comparative neurology, 209, 1: 69-78.

Sarkisian M.R. 2001. Overview of the current animal models for human seizure and epileptic disorders. Epilepsy and Behavior, 2: 201-216.

Schiavo G. Osborne S.L., Sgouros J.G. 1998. Synaptotagmins: More isoforms than functions? Biochemical and Biophysical research Communications, 248: 1-8.

Schmitz D. Mellor J., Frerking M., Nicoll R.A. 2001. Presynaptic kainate receptors at hippocampal mossy fiber synapse. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 81: 11003-11008.

Schwarcz R., Foster A.C., French E.D., Whetsell W.O.Jr., Kohler C. 1984. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. Life sciences, 35, 1: 19-32.

Schwarcz R., Foster A.C., French E.D., Whetsell W.O., Köhler J., Köhler C. 2002. II. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. Life Sciences, 35: 19-32.

Schwarcz R., Scharfman H.E., Bertram E.H. Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress, Chapter 127. Temporal Lobe Epilepsy: Renewed emphasis on extrahippocampal areas

Scorza C.A., Garrido Y.C., Arida R.M., Amado D., Cavalheiro E.A., Naffah-Mazzacoratti M.G. 2003. Levels of the synaptic protein X11 alpha/mint1 are increased in hippocampus of rats with epilepsy. Epilepsy research, 57, 1: 49-57.

Shan Y., Carlock L.R., Walker P.D. 1997. NMDA receptor overstimulation triggers a prolonged wave of Immediate Early Gene expression: relationship to excitotoxicity. Experimental Neurology, 144: 406-415.

Sirinathsinghji D.J.S., Morris B.J., Wisden W., Northrop A., Hunt S.P., Dunnet S.B. 1990. Gene expression in striatal grafts – I. Cellular localization of neurotransmitter mRNK's. Neuroscience, 34: 675-86.

Smoldres I., Bortolotto Z.A., Clarke V.R.J., Warre R., Khan G.M., O'Neill M.J., Ornstein P.L., Bleakman D., Ogden A.M., Weiss B., Stables J.P., Ebinger G., Collingridge G.L., Lodge D., Michotte Y. 2002. Antagonists of GLU_{K5}-containing kainite receptors prevent pilocarpine-induced limbic seizures. Nature Neuroscience, 5, 8: 796-803.

Somogyi P., Klausberger T. 2005. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. Journal of Physiology, 562.1: 9-26.

Sperk G., Lassmann H., Baran H., Kish S. J., Seitelberger F., Hornykiewicz O. 1983. Kainic acid induced seizures: Neurochemical and Histopathological changes. Neuroscience, 10, 4: 1301-1315.

Stone T.W. 1993. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. Pharmacological reviews, 45, 3: 309-379.

Sudfof T.C., De Camilli P., Niemann H., Jahn R. 1993. Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins. Cell, 75, 1: 1-4.

Sudhof T.C., Rizo J. 1996. Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. Neuron, 17, 3: 379-388.

Tavares R.G., Tasca C.I., Santos C.E., Wajner M., Souza D.O., Dutra-Filho C.S. 2000. Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain. Neuroreport, 11, 2: 249-253.

Tavares R.G., Tasca C.I., Santos C.E., Alves L.B., Porciuncula L.O., Emanuelli T., Souza D.O. 2002. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. Neurochemistry international, 40, 7: 621-627.

Tavares R.G., Schmidt A.P., Abud J., Tasca C.I., Souza D.O. 2005. In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. Neurochemical Research, 30, 4: 439-444.

Ting J.T., Kelley B.G., Sullivan J.M. 2006. Synaptotagmin does not alter excitatory fast synaptic transmission or fusion pore kinetics in mammalian CNS neurons. The journal of Neuroscience, 26, 2: 372-380.

Thomas D.M., Ferguson G.D., Herschman H.R., Elferink L.A. 1999. Functional and biochemical analysis of the C2 domains of synaptotagmin IV. Molecular Biology of the Cell, 10: 2285-95.
Thomson A.M. 2000. Molecular frequency filters at central synapses. Progress in Neurobiology, 62: 159-196.

Tocco G., Bi X., Vician L., Lim I.K., Herschman H., Baudry M. 1996. Two synaptotagmin genes, syt1 and syt4, are differentially regulated in adult brain during postnatal development following kainic acid-induced seizures. Molecular Brain Research, 40: 229-239.

Van der Pool A.N., Obrietan K., Belousov A. 1996. Glutamate hyperexcitability and seizurelike activity throughout the brain and spinal cord upon relief from chronic glutamate receptor blockade in culture. Neuroscience, 74, 3: 653-674.

Vician L., Lim I.K., Ferguson G.D., Tocco G., Baudry M., Herschman H.R. 1995. Synaptotagmin IV is an immediate early gene induced by depolarization in PC12 cells and in brain. Neurobiology, 92: 2164-2168.

Walker P.D., Carlock L.B. 1993. Immediate early gene activation during the initial phases of the excitotoxic cascade. Journal of Neuroscience Research, 36, 5: 588-595.

Wang C.-T., Grishanin R., Earles C.A., Chang P.Y., Martin T.F.J., Chapman E.R., Jackson M.B. 2001. Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics of regulated exocytosis of dense-core vesicles. Science Reports, 284: 1111-1115

Wang C.-T., Lu J.-C., Bai J., Chang P.Y., Martin T.F.J., Chapman E.R., Jackson M.B. 2003. Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion. Letters to Nature, 424: 943-947.

Wang Q., Yu S., Simonyi A., Sun G.Y., Sun A.Y. 2004. Kainic acid-mediate excitotoxicity as a model for neurodegeneration. Molecular Neurobiology, 31: 1-13.

Wyneken U., Smalla K.H., Marengo J.J., Soto D., De La Cerda A., Tischmayer W., Grimm R., Boeckers T.M., Wolf G., Orrego F., Gundelfinger E.D. 2001. Kainate-induced seizures alter protein composition and N-methyl-D-aspartate receptor function of rat forebrain postsynaptic densities. Neuroscience, 1, 102: 65-74.

White R. J., Reynolds I.J. 1996. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. The Journal of Neuroscience, 16, 18: 5688-5697.

Winkler H., Fischer-Colbrie R. 1998. Regulation of biosynthesis of Large Dense Core Vesicles in chromaffin cells and neurons. Cellular and molecular neurobiology, 18, 2: 193-209.

Witter M.P., Amaral D.G. 1991. Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. The Journal of comparative neurology, 307, 3: 437-59.

Zagulska-Szymczak S., Filipkowski R.K., Kaczmarek L. 2001. Kainate-induced genes in the hippocampus: lessions from expression patterns. Neurochemistry International, 38: 485-501.

Zhang Q., Fukuda M., Van Bockstaele E., Pascual O., Haydon P.G. 2004. Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 101: 9441-9446.

Zhang J., Zhang D., Mcquade J.S., Behbehani M., Tsien J. Z., Xu M. 2002. C-fos regulates neuronal excitability and survival. Nature letters, 30: 416-420.

Yeckel M.F., Berger T.W. 1990. Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: Redefinition of the role of the trisynaptic pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87: 5832-5836.

Yoneda Y., Kuramoto N., Kitayama T., Hinoli E. 2001. Consolidation of transient ionotropic glutamate signals through nuclear transcription factors in the brain. Progress in Neurobiology, 63: 697-719.

Yoshihara M., Adolfsen B., Galle K.T., Littleton J.T. 2006. Retrograde signaling by syt 4 induces presynaptic release and synapse-specific growth. Science Reports, 310: 858-862.

http://www.bris.ac.uk/.../info/pathway/hippocampal.htm (22. 7. 2005)

http://instruct1.cit.cornell.edu/courses/bionb424/students/cth5/anatomy.html (24.2.2007)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start

http://www.bris.ac.uk/

http://www.chrisparsons.de/Chris (22.7.2005)

http://predator.pnb.uconn.edu/~wwwpnb/courses/PNB297/Sp06_Rubio/PNB297%20Hipp%20 web.pdf (PNB297, Brain Cytoarchitecture and Function 2006) (12.2.2007)

http://www.nature.com/neuro/journal/v5/n9/fig_tab/nn0902-823_F1.html (23.2.2007)

http://www.uni-leipzig.de/~vetana/Hippocampus/legende_graphic.html (22.3.2006)

ZAHVALA

Naloga je bila narejena na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, za kar se vsem najlepše zahvaljujem.

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Janku Božiču, somentorju izr. prof. Marku Živinu in dr. Gordani Glavan za strokovno vodstvo ter vzpodbudo pri raziskovalnem delu.

Za pomoč pri učenju metod in tehnik laboratorijskega dela se zahvaljujem Heleni Kupšek in Ksenji Babič-Benedik.

Prof. dr. Rudolfu Pavlinu se zahvaljujem za lektoriranje naloge.

Nenazadnje se zahvaljujem domačim, vsem prijateljem in Davidu za nesebično podporo na moji raziskovalni poti.

PRILOGA





Upregulation of synaptotagmin IV protein in kainate-induced seizures

Špela Glišovič, Gordana Glavan, Mehdi M. Saghafi and Marko Živin

Brain Research Laboratory, Faculty of Medicine, Institute of Pathophysiology, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

Correspondence to Dr Marko Živin, Brain Research Laboratory, Faculty of Medicine, Institute of Pathophysiology, University of Ljubljana, Zaloška 4, 1000 Ljubljana, Slovenia

Tel: + 386 I 543 7058; fax: + 386 I 543 702I; e-mail: zivin@mf.uni-Ij.si

Received 23 January 2007; accepted 6 February 2007

Synaptotagmin IV is a product of immediate early-response gene. It is involved in the regulated neurosecretion in the brain. Its putative role, however, in vesicular transport and localization in secretory vesicles is still a matter of debate. Here we followed the spatiotemporal pattern of synaptotagmin IV protein upregulation in the hippocampus, caudate putamen, nucleus accumbens, nucleus amygdalae, piriform and entorhinal cortices of rats with tainate-induced seizures. We found that upregulation pattern paralleled the direction of depolarization through the hippocampus and also reflecting seizure activity spreading to other brain regions. We speculate that synaptotagmin IV may have a role in the vesicular transport of the upregulated peptides and proteins involved in the plasticity and/or neurodegeneration provoked by the kainate. *NeuroReport* 00:000–000 © 2007 Lippincott Williams & Wilkins.

Keywords: immunohistochemistry, kainate, plasticity, synaptotagmin IV, upregulation

Introduction

Synaptotagmins are transmembrane proteins implicated in the regulation of Ca²⁺-dependent membrane trafficking and fusion of vesicles with plasma membrane in neurons and endocrine cells [1,2]. Synaptotagmin IV (Syt IV) is an immediate early gene induced by depolarization in PC12 cells [3]. Furthermore, in the hypersensitive striatum of hemiparkinsonian rats, the dopamine D1 receptor-mediated upregulation of Syt IV mRNA was shown after the treatment with the directly and indirectly acting dopaminergic agonists SKF-82958 and L-DOPA, respectively [4,5]. In the striatum of intact rats the Syt IV mRNA was upregulated by the indirectly acting dopaminergic agonist cocaine [6]. Syt IV could be crucial for learning as well as for memory in the hippocampus, the two processes thought to be based on synaptic plasticity. An important support to this hypothesis comes from Syt IV null mutant mice, which exhibit abnormalities in some forms of hippocampus-related memory [7]. Although Syt IV protein is expressed preferentially by glial cells in the hippocampus of intact rats [8], Tocco et al. [9] described its mRNA elevation in the hippocampal pyramidal cells and piriform (PirC) cortex in kainic acid [KA, (2-carboxy-3-carboxymethyl-4-isopropenylpyrrolidine) hydrate]-induced seizures.

KA is an excitotoxic analogue of glutamate that directly stimulates kainate and á-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptors in the brain [10]. Systemic administration of KA to adult rats causes neuronal hyperexcitation and sustained seizure activity, which leads to neurodegeneration, hippocampal plasticity and gliosis [10,11]. KA causes neurodegeneration in the hippocampal CA3, CA1 subfields and in the hilus of dentate gyrus (DG), but leaves the granular cells of DG consistently spared and even initiate new synaptic contacts on mossy fibers [12]. These physiological and histological changes are modulated by short-term and long-term alterations in the gene expression [11]. The examination of spatiotemporal patterns of various mRNA upregulation and, what is more important, the patterns of corresponding protein expression, may help understanding the molecular mechanisms of KAinduced changes in hippocampal neurons.

Using immunohistochemistry we therefore performed a time-course study to visualize whether KA upregulates Syt IV protein in the hippocampus. Furthermore, we investigated the spatiotemporal pattern of Syt IV protein upregulation also in other brain regions involved in the seizures after KA administration. On the basis of our findings, we discuss the possible role of Syt IV protein in the KA-induced neuronal plasticity and degeneration.

Materials and methods

Animals and kainic acid administration

We used adult male Wistar rats (290–330 g) maintained on a 12 h light/dark cycle (lights on 07.00–19.00 h) in a temperature-controlled colony room at 22–24°C with free access to rodent pellets and tap water. They were handled according to the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. KA (Sigma Chemicals, St Louis, Missouri, USA) was dissolved in 0.9% saline and injected intraperitoneally (i.p.) at a dose 10 mg/kg. Seizure activity was recorded during the next 2h. Only rats that exhibited behavioral

L

seizures classes III–V according to the Racine scale [13] were used for further investigations.

Tissue preparation

At 0 h (*n*=3), 4 h (*n*=3), 8 h (*n*=3) and 24 h (*n*=3) after injection of KA or saline treatment (*n*=3), rats were deeply anesthetized with Rompun (Bayer, Leverkusen, Germany; 8 mg/kg, i.p.) and Ketanest (Parke Davies, Wien, Austria; 60 mg/kg, i.p.) and transcardially perfused with cold (4°C) saline followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate-buffered saline (NaPBS) (pH 7.2–7.4). After perfusion, the brains were removed, postfixed overnight in 20% sucrose in 4% paraformaldehyde, submerged in 20% sucrose in NaPBS at 4°C for 48 h. Coronal (15 µm) sections were cut using freezing-stage microtome. Free-floating sections were stored at -20°C in a cryoprotectant solution for immunohistochemical processing.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) was performed using avidinbiotin peroxidase (ABC) substrate. Briefly, sections were incubated for 30 min in potassium PBS (50 mM; pH 7.2) with 4.0% normal goat serum and 1.0% bovine serum albumin followed by an incubation with rabbit polyclonal antibody raised against Syt IV C2A domain (a gift from Mitsunori Fukuda, Rinken Institute, Japan) [14] diluted 1:500 in KPBS with 1.0% normal goat serum and 1.0% bovine serum albumin for 12 h at 4°C. After rinses in KPBS, biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, California, USA) was applied at 1:1000 for 1 h. Rinses in KPBS and ABC incubation followed for 1h (ABC Elite Standard Kit, Vector, Laboratories, Burlingame, California, USA). The immunoreactive product was visualized by 3,3'diaminobenzidine (DAB; Aldrich Chemicals, Milwaukee, Wisconsin, USA). Processed sections were mounted, coverslipped with DePeX (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) and analyzed under light microscope (Olympus IX81) with an attached digital camera (Nikon DXM 1200).

Densitometry

AO1

IHC signal was quantified densitometrically with MCID, M4 image analyzer (Imaging Research Inc., St. Catharines, Ontario, Canada) in the regions of interest that was manually outlined. The relative optical density (ROD) measurements were performed on three sections for each animal. With every new slide measurement, the ROD of the coverslip with glass slide and DePeX was subtracted from the picture. All data in graphs were expressed as mean- $s\pm$ SEM and analyzed by one-way analysis of variance followed by Scheffe's multiple-comparison test (*P* < 0.05).

Results

Control experiments

In the control animals that received saline injection or were perfused immediately (0 h) after KA Syt IV immunoreactivity (Syt IV-IR) signal was low and diffuse in the hippocampus (Fig. 1a, i), consistent with the report of Zhang *et al.* [8]. The Syt IV-IR signal was also low in the PirC and entorhinal (EC) cortices, nucleus amygdalae (AMG), caudate putamen (CPu) and nucleus accumbens (NAc) (Fig. 2i).

Systemic injection of kainic acid upregulated the expression of Sy tIV protein in the hippocampus

In the granule cell layer of DG the Syt IV-IR was upregulated significantly 4 h after KA administration (Fig. 1b, e, i), then declined remarkably at 8 h (Fig. 1b, i) and



Fig. 1 The time course of Syt IV protein upregulation in the hippocampus after KA (I0 mg/kg, i.p.). (a) to (d) IHC on coronal sections of whole hippocampus from rats killed at different time points after KA. (e) to (h) Higher magnification showing more detailed picture of KA-elevated Syt IV: (e) in the stratum granulare of DG (DGg) at 4 h, (f) in the cells of hilus of DG at 24 h, (g) in the stratum pyramidale of CAI region at 24 h and (h) in the stratum pyramidale of CA3 region at 8 h. (i) Graph represents the mean ROD values \pm SEM (one-way analysis of variance with Scheffe's multiple-comparison test) of Syt IV-IR signal. *P < 0.05 vs. 0 h for each subregion. DGg, stratum granulare of dentate gyrus; CAI, stratum pyramidale of CAI region; CA3, stratum pyramidale of CA3, IHG, immunohistochemistry; KA, kainic acid; ROD, relative optical density; Str.Or., stratum oriens, Str.Rad., stratum radiatum, Syt IV, synaptotagmin IV. Scale bar, 20 μ m.



Fig. 2 Syt IV protein upregulation in the piriform (PirC) and entorhinal (EC) cortices, nucleus amygdalae (AMG), caudate putamen (CPu) and nucleus accumbens (NAc) at different times after KA. (a) to (d) IHC on coronal sections showing the Syt-IR signal in PirC, EC, AMG and CPu. (e) Graph represents the time course of the elevation of Syt IV IHC signal in different brain regions. Data are shown as mean ROD values \pm SEM (one-way analysis of variance with Scheffe's multiple-comparison test). **P* < 0.05 vs. 0 h for each brain region. IHC, immunohistochemistry; KA, kainic acid; ROD, relative optical density; Syt IV, synaptotagmin IV.

almost disappeared at 24 h after KA administration (Fig. 1d, i). At 4 and 8 h after KA, the Syt IV signal was seen in somatodendritic part of a dense population of globular cells in the stratum granulare of DG (Fig. 1e). In the hilus of DG, the Syt IV-IR was significantly elevated at 8 h (Fig. 1c, i) and even intensified at 24 h after KA administration (Fig. 1d, f, i). At 8 h after the KA administration, moderate to strong Syt IV-labeled polymorphic cells were detected, probably of two types: basket cells at the hilar border with the granule cell layer and stellate cells, occupying the hilus (Fig. 1c, f). At 24 h after KA administration, the Syt IV-IR signal intensified and the density of hilar cells was the highest (Fig. 1d, f, i). At this time point, Syt IV-IR was displayed also in the mossy cells. Beside soma and dendrites the processes of hilar cells were strongly Syt IV-IR (Fig. 1f). In other subregions only some of Syt IV-IR cells were detected in CA3 and CA1 areas in the first 4 h after KA administration (Fig. 1a). In the CA3 stratum pyramidale quite a few cells were labeled at 8 and

24 h after KA administration (Fig. 1c, d, h). In the CA1 stratum pyramidale, we detected a dense population of Syt IV-IR cells at 8 h after KA administration (Fig. 1c), where the signal strongly intensified at 24 h after KA administration (Fig. 1d, g, i).

Systemic injection of kainic acid upregulated the expression of synaptotagmin IV protein in other brain regions In brain areas other than hippocampus, KA upregulated the Syt IV-IR in PirC and EC cortices, nucleus AMG, CPu and (NAc) (Fig. 2). The peak of Syt IV-IR upregulation appeared in the regions of EC and PirC cortices, nucleus AMG and CPu at 8h after KA administration (Fig. 2b, d, e). The upregulation of Syt IV-IR was seen also in NAc at 4h after KA administration (Fig. 2e). In CPu and nucleus accumbens the upregulation pattern of Syt IV-IR was transient and declined to the basal level at 24h after KA administration, whereas it remained elevated in other regions (Fig. 2e).

Discussion

To the best of our knowledge, we are first to describe the KA-evoked increased levels of Syt IV protein in the hippocampus of rats. Depending on the time after seizure KA differentially upregulated Syt IV protein in the hippocampal subfields that displayed a similar pattern of its KA-induced mRNA as reported by Tocco *et al.* [9]. Syt IV up-regulation first occurred in the stratum granulare of DG, followed by the upregulation in the neurons of hilus and then cells of the strata pyramidale of CA regions. The Syt IV-IR signal labeled densely packed spherical cell bodies in DG, most of them resembling granular cells. The upregulation of Syt IV occurred in the defined cell layer of strata pyramidale of CA regions, most of them representing pyramidal cells. We are, however, not able to exclude its upregulation in the interneurons and glia.

KA directly stimulates kainate and AMPA receptors located on neurons of DG and CA subfields, whereas indirectly increases the glutamate release from nerve terminals causing depolarization [10]. The depolarization in the hippocampus spreads from DG to the CA3 region via mossy fibers and then to CA1 region via Schaffer's collaterals. The experiments on PC12 cells prove that the depolarization upregulates Syt IV [3]. Our experiment showed that the spatial-temporal pattern of KA-induced upregulation of Syt IV protein parallels the direction of the KA-induced depolarization propagation through the hippocampus.

Another distinctive property of the Syt IV protein upregulation is its transient upregulation in DG, but delayed and then prolonged in CA regions, as reported previously also with the c-fos, c-jun and Syt IV KA-evoked mRNA upregulation [9,15]. The time course of the Syt IV upregulation in DG coincides with its upregulation in PC12 cells as shown by Ferguson *et al.* [16] and could be explained as the response of the neurons to the 'simple' depolarization.

In contrast, the prolonged Syt IV upregulation that was observed in CA regions could be the consequence of a pyramidal neuron prolonged depolarization in response to the synchronized burst activity generation that is formed by the dense network of recurrent collateral glutamatergic axons, which interconnect pyramidal cells [17]. Other main brain regions beside the hippocampus that become hyperactivated by KA are also nucleus accumbens, cortex and nucleus AMG [12]. In adult rats, high doses of KA cause limbic seizures with origin in the forebrain. Paroxymal activity usually spreads from the original structure to other limbic regions and then follows an activation of structures beyond the limbic system, neocortex and basal ganglia [10]. Consistently, we found the Syt IV upregulation in nucleus AMG, CPu, NAc, EC and PirC cortices.

The precise role of Syt IV in secretory vesicle exocytosis is still confusing, so it is not clear whether Syt IV functions as a positive or negative exocytosis regulator. Studies from mammalian neurons and neuroendocrine cells show that Syt IV, when overexpressed, does not alter fast synaptic transmission related to the exocytosis of classical neurotransmitters from small synaptic vesicles [18]. Several experiments using recombinant protein technology indicated that Syt IV overexpression maybe reducing Ca2+stimulated release from dense-core vesicles (DCVs) [19,20]. By contrast, Fukuda and Yamamoto [2] have demonstrated that when this synaptotagmin is induced by forskolin in PC12 cells, nerve growth factor (NGF) is required for sorting Syt IV to mature DCVs and transported to the periphery where it promotes secretion. DCVs in neuroendocrine cells resemble DCVs in neurons in many ways: they share many common properties like ultrastructural features and biochemical compositions [21]. It is therefore possible that Syt IV is involved in the regulation of the molecule secretion from DCVs in neurons.

Conflicting reports also exists concerning the Syt IV subcellular localization in neurons. Using immunohistochemistry, Ibata et al. [14] showed that Syt IV does not colocalize well with Syt I in a synaptic protein-vesicle fraction from homogenized brain. By analogy in PC12 cells, Syt IV was found to be located preferentially on Golgi and DCVs [2]. Syt IV is an immediate early-response gene [3]. One of the main attributes of immediate early-response genes is their rapid upregulation and quick cessation after the stimulus. It is known that some proteins that are upregulated after stimulus are transported via DCVs and are further secreted by regulated exocytosis. We presume that Syt IV when elevated is involved in the regulated transport of molecules in granular and pyramidal cells of hippocampus, synthesized in the first few hours after the KA injection that are then trafficked to other cellular compartments and/or secreted via DCVs. The possible candidates are certain neuropeptides, receptors and/or growth factors, for example neuropeptide Y, glutamate receptors, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and NGF [22–25]. We therefore propose that Syt IV is involved in the regulation of the transport and release of the molecules responsible for the KA-induced synaptic plasticity and neurodegeneration that take place in the neurons of hippocampus.

Conclusions

This study shows that KA upregulates Syt IV protein in the hippocampus, nucleus AMG, EC and pirifom cortices, nucleus accumbens and CPu. Regarding the spatiotemporal pattern of Syt IV protein up-regulation that parallels the direction of depolarization propagation through the hippocampus, Syt IV upregulation in hippocampus primarily occurs in the granular and pyramidal cells. We conclude that Syt IV serves as a good marker that may reveal the course and the intensity of the activation of different brain regions by seizures.

Acknowledgements

We thank Mrs Helena Kupšek and Mrs Ksenja Babič-Benedik for technical assistance. This work was supported by Slovenian Research Agency, Grant *P*-0171.

References

- 1. Marqueze B, Berton F, Seagar M. Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag? *Biochimie* 2000; 82:409–420.
- Fukuda M, Yamamoto A. Effect of forskolin on synaptotagmin IV protein trafficking in PC12 cells. J Biochem 2004; 136:245–253.
- Vician L, Lim IK, Ferguson G, Tocco G, Baudry M, Herschman HR. Synaptotagmin IV is an immediate early gene induced by depolarization in PC12 cells and in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:2164–2168.
- Glavan G, Zorec R, Babic K, Sket D, Zivin M. Dopaminergic regulation of synaptotagmin I and IV mRNAs in hemiparkinsonian rats. *NeuroReport* 2000; 11:4043–4047.
- Glavan G, Zivin M. Differential expression of striatal synaptotagmin mRNA isoforms in hemiparkinsonian rats. *Neuroscience* 2005; 135:545– 554.
- Denovan-Wright EM, Newton RA, Armstrong JN, Babity JM, Robertson HA. Acute administration of cocaine, but not amphetamine, increases the level of synaptotagmin IV mRNA in the dorsal striatum of rat. *Mol Brain Res* 1998; 55:350–354.
- Ferguson GD, Anagnostaras SG, Silva AJ, Herschman HR. Deficits in memory and motor performance in synaptotagmin IV mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:5598–5603.
- Zhang Q, Fukuda M, Van Bockstaele E, Pascual O, Haydon PG. Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc Natl Acad Sci* U S A 2004; 101:9441–9446.
- Tocco G, Bi X, Vician L, Lim IK, Herschman H, Baudry M. Two synaptotagmin genes, *Syt1* and *Syt4*, are differentially regulated in adult brain and during postnatal development following kainic acid-induced seizures. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 40:229–239.

- Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé SL. Models of seizures and epilepsy. San Diego: Elsevier Academic Press; 2006.
- Zagulska-Szymczak S, Filipkowski RK, Kaczmarek L. Kainate-induced genes in the hippocampus: lessons from expression patterns. *Neurochem Int* 2001; 38:485–501.
- Sperk G, Lassmann H, baran H, Kish SJ, Seitelberger F, Hornykiewicz O. Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience* 1983; 10:1301–1315.
- Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II Motor seizures. *Electroencephal Clin Neurophysiol* 1972; 32:281–294.
- Ibata K, Fukuda M, Hamada T, Kabayama H, Mikoshiba K. Synaptotagmin IV is present at the Golgi and distal parts of neurites. J Neurochem 2000; 74:518–526.
- Sng JCG, Taniura H, Yoneda Y. Inhibition of histone deacetylation by trichostatin A intensifies the transcriptions of neuronal *c-fos* and *c-jun* genes after kainate stimulation. *Neurosci Lett* 2005; 386:150–155.
- Ferguson GD, Thomas DM, Elferink LA, Herschman HR. Synthesis, degradation, and subcellular localization of synaptotagmin IV, a neuronal immediate early gene product. J Neurochem 1999; 72:1821–1831.
- 17. Ben-Ari Y, Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 2000; **23**:580–587.
- Ting JT, Kelley BG, Sullivan JM. Synaptotagmin IV does not alter excitatory fast synaptic transmission or fusion pore kinetics in mammalian CNS neurons. J Neurosci 2006; 26:372–380.
- Wang CT, Grishanin R, Earles CA, Chang PY, Martin TFJ, Chapman ER, et al. Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Science* 2001; 294:1111–1115.
- Machado HB, Liu W, Vician LJ, Herschman HR. Synaptotagmin IV overexpression inhibits depolarization-induced exocytosis in PC12 cells. J Neurosci Res 2004; 76:334–341.
- Winkler H. The adrenal chromaffin granule: a model for large dense core vesicles of endocrine and nervous tissue. J Anat 1993; 183:237–252.
- 22. Wu Y, Li S. Neuropeptide Y expression in mouse hippocampus and its role in neuronal excitotoxicity. *Acta Pharmac Sin* 2005; **261**:63–68.
- Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J* 1990; 9:3545– 3550.
- Wyneken U, Smalla K-H, Marengo JJ, Soto D, De la Cerda A, Tischmeyer W, et al. Kainate-induced seizures alter protein composition and nmethyl-d-aspartate receptor function of rat forebrain postsynaptic densities. *Neuroscience* 2001; **102**:65-74.
- 25. Lerma J. Kainate receptor physiology. Curr Opin Pharmacol 2006; 6:89-97.