

Új, az idegi aktivitás megváltozásának nyomon követésére alkalmas toxikológiai teszrendszer

Az idegi működés és annak változása az idegsejtek elektromos tulajdonságainak mérésével jól nyomon követhető. Ezzel párhuzamosan az aktivitás háttérében lévő membránfehérjék mennyiségi viszonyai is megváltozhatnak, ami megfelelő módszerekkel szintén kimutatható. A pályázat keretein belül a mikotoxinok hatásának elemzésére egy olyan *in vitro* teszrendszer alakítottunk ki, mely több szempont szerint alkalmas a toxikus anyagok hatásának elemzésére. A teszrendszer újdonsága, egyedisége, hogy különböző kezeléseket követően egy vizsgálati metodika-kombinációban szisztematikusan összevethető eredményeket szolgáltat az elemi idegi működés és az idegi hálózati aktivitás megváltozására vonatkozóan. Az adott pályázat keretein kívül is alkalmas egyéb anyagok toxikus hatásának tesztelésére

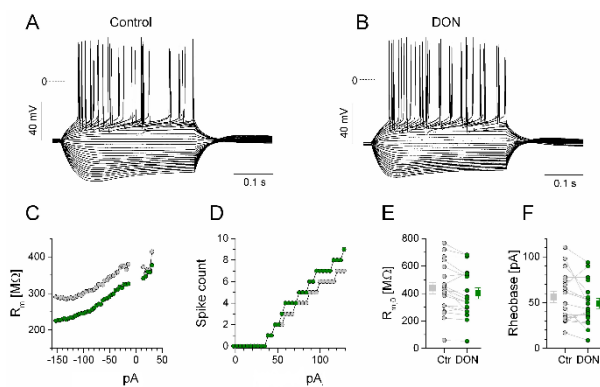
A kísérleti minta, az agyszelet preparátum készítése

Ezekhez a vizsgálatokhoz kísérleti állatként laboratóriumi patkányok vagy egerek használhatók. Az állatok megfelelő mélységig történő altatása után az agy kivételre kerül, és a vizsgálandó régióból 300-400 μm vastag, élő metszetek készülnek. Ezek a szeletek megfelelő inkubáló oldatban (mesterséges agyfolyadék: 126 mM NaCl; 26 mM NaHCO₃; 1,8 mM KCl; 1,25 mM KH₂PO₄; 1,3 mM MgSO₄; 2,4 mM CaCl₂; 10 mM glükóz) hosszabb ideig életben tarthatók. Egy-egy agyszelet kerül az adott vizsgálati eszközben mérésre, ahol a preparátum megfelelő idejű túléléséhez a közeg biztosított (átáramló mesterséges agyfolyadék, állandó hőmérséklet, megfelelő oxigén- és tápanyagellátás).

A túlélő agyszeletek készülhetnek *in vivo* előkezelt állatokból, ebben az esetben akut (azonnali), szubkrónikus (4 hét) vagy krónikus (több hét vagy hónap) anyagadásokat követően kerül az agyi minta feldolgozásra. Akut kezelések kivitelezhetők azonban oly módon is, hogy az agyszeletek elkészítése után tesszük ki ezeket toxinhatásnak meghatározott ideig történő hatóanyagot (toxint) tartalmazó oldatban való inkubálással, vagy esetleg a mérés során történő közvetlen, a perfúziós oldatban való adagolással. Adott hatóanyag különböző dózisban történő adagolása dózis-hatás görbék felvételére is lehetőséget ad. Egy-egy vizsgálati állatból nagyobb számú minta kerülhet elemzésre, így a különböző technikákkal ugyanabból az állatból készült agyszeletek tanulmányozhatók, az eredmények jobban összevethetők, csökkenthetők az adott mennyiségű vizsgálat elvégzéséhez szükséges állatszámok, ami összhangban áll az állatok védelméről szóló rendelkezésekkel.

1. Patch clamp vizsgálatok – sejtmembrán paraméterek mérése

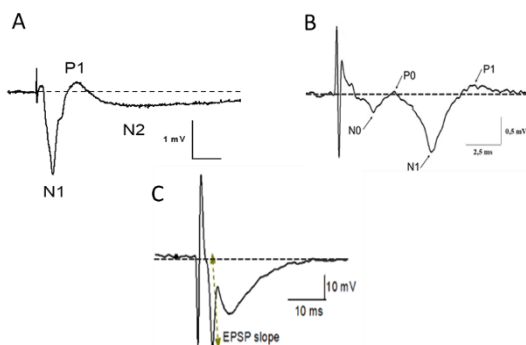
Ezzel a vizsgálati módszerrel meghatározhatók egyetlen sejtbe helyezett üveg mikroelektroda segítségével az adott neuron elektromos membrántulajdonságai, így a toxinhatások jól mérhetők. A vizsgálat során a mérőelektrodán keresztül áramlépcsős ingerléssel kiváltott membránpotenciál változások alapján a toxikus hatás kialakulásában érintett feszültségfüggő ioncsatornák meghatározhatók.



1.ábra: Az ábra A és B részén az áramlépcsők hatására kialakuló membránpotenciál változásokra látható példa. Eltérés mutatkozik a kontroll és toxinhatásnak kitett neuronok válaszaiban. A C-F ábrarész a mérési eredmények értékelésére mutat példát. A toxinkezelések hatására jelentős eltérések tapasztalhatók az ellenállási viszonyokban, és a tüzelési mintázatban.

2. Kiváltott potenciál mérések – sejtcsoportok aktivitásának jellemzésére

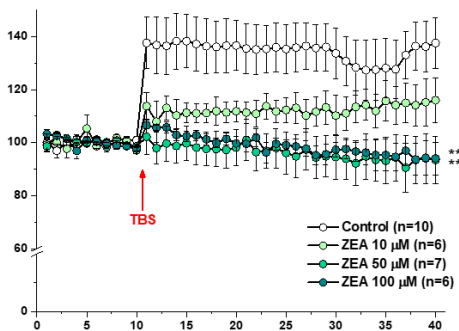
A különböző agyterületekről származó túlélő szeletek normál tápoldatban nem mutatnak mérhető spontán aktivitást. Ha mérőelektrodákat helyezünk el adott területen a sejt közötti térben, és a befutó fehérállományi rostokat ingereljük, akkor az adott területre jellemző mintázatú kiváltott mezőpotenciálok mérhetők. Ezen kiváltott válaszok megváltozása utal az adott toxin esetleges idegi aktivitást befolyásoló hatására. A kiváltott szinaptikus válaszok jellegzetes paramétereinek elemzésével képet kaphatunk arról, hogy milyen, a válaszadás háttérében álló mechanizmus lehet érintett az adott hatóanyag által.



2.ábra: Az ábrákon különböző agyterületek jellemző kiváltott válasza láthatók. Az A panel az agykérgi, a B az accumbens mag, a C pedig a hippocampus kiváltott szinaptikus válaszát mutatja. A kiváltott válaszok megjelenési latenciája, az egyes hullámok amplitúdó változása, a kiváltott válaszok felfutási meredekségének jóvá változás jó paraméter az anyaghatások jellemzésére.

3. A szinaptikus hatékonyság hosszútávú változásának tesztelése (LTP indukció)

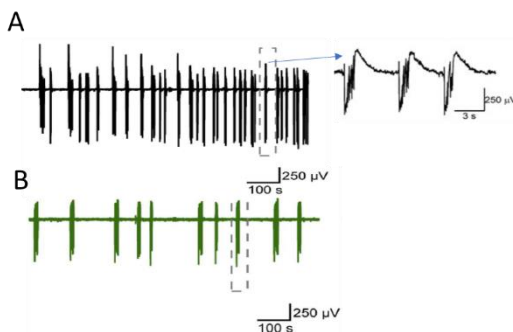
A különböző toxinok idegi aktivitást befolyásoló hatása nem csak az alapaktivitásra kifejtett hatásában mutatkozhat meg, hanem a szinaptikus működés hatékonyságát is megváltoztathatja. Különösen a hosszútávú válaszadási készség módosulása jelentős ebből a szempontból. Nagy szakirodalma van az ún. LTP indukció jelenségének. Röviden, ezekben a mérésekben folyamatos ingerléssel kiváltott mezőpotenciál válaszok detektálhatók, melyek amplitúdója egy rövid, nagyfrekvenciás ingerlést követően jelentősen megváltozhat. Ha hosszabb ideig fennálló amplitúdó növekedést tapasztalunk, akkor az a szinaptikus hatékonyság növekedésére utal. Ennek mértékét befolyásolhatják a különböző toxinhatások.



3.ábra: Az ábrán látható egy példa a különböző dózisban adott toxin LTP indukciót befolyásoló hatására. Az alapválasz indukciót (TBS – rövid idejű elektromos stimulálás) követő növekedése a kontrollhoz képes jelentős mértékben, dóziszfüggően csökken egy mikotoxin, a ZEA előkezelés hatására. Az x tengelyen az idő látható percekben, az y tengelyen pedig a relatív változás %-os mértékben.

4. Az epileptikus aktivitásra való hajlam változásának tesztelése

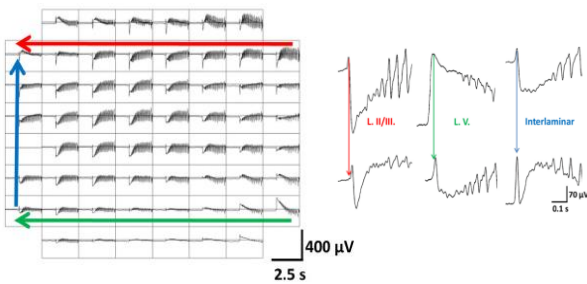
Amint azt az előzőekben már bemutattuk, standard tápoldatban a szeletek nem mutatnak spontán aktivitást. Különböző görcskeltő hatású anyagokkal azonban indukálható spontán aktivitás, ún. epileptikus görcskisülés, mely a szövetbe helyezett üveg mérőelektrodokkal detektálható. A görcsaktivitás megjelenési latenciájának, a kisülések hosszának, frekvenciájának, belső mintázatának elemzése szintén jó jellemzője lehet a toxinhatásoknak. A működés fokozódás jelentős érzékenyítődsre, a lassulás gátlásra utal



4.ábra: Az ábrán egy példa látható az epileptikus görcsaktivitás mintázatának megváltozására. Az A panel kontroll esetben mutatja a görcskeltő oldat hatására kialakuló spontán aktivitást. A kis inzerben nagyobb időfelbontásban is látható a kisülések belső mintázata. A B panel egy toxinkezelés hatását mutatja. Jelen esetben az epileptikus aktivitás kialakulásának jelentős mértékű gátlása figyelhető meg.

5. Sokcsatornás elektródrendszerrel (MEA) történő mérések - aktivitás terjedésének mérése

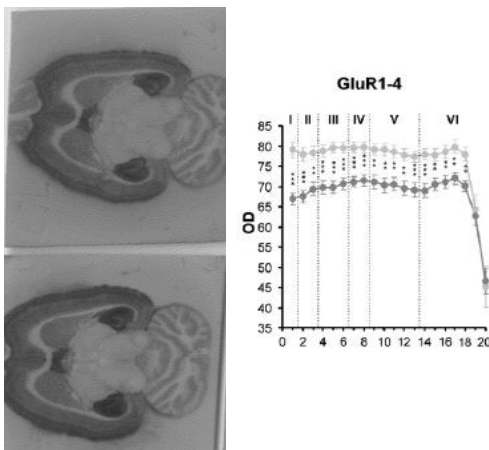
Az agyszeletek aktivitásának mérése kivitelezhető egyidőben sok elvezetési pontot alkalmazva is. Ezekben a mérőrendszerekben azonban nem üveg, hanem pontszerű fémelektrodokat használnak. Ebben a vizsgálati rendszerben is indukálható epileptikus kisülés, de más ritmusú aktivitás is kiváltható a tápoldat összetételének módosításával. Az egyes elektródok ingerlő elektródként is használhatók, és így mérhető kiváltott mezőpotenciál is. A spontán aktivitás mintázatának elemzése lehetőséget ad az aktivitás terjedésének meghatározására, így a toxikus anyagok idegi vezetési sebességét befolyásoló hatása is elemezhető.



5.ábra: Az ábra bal oldali részén 60 csatornás elvezetési rendszerben mért, agykérgi szeletben kiváltott epileptikus aktivitás regisztrátuma látható. Az aktivitás a szelet minden részén mérhető, de nem mindenhol egyforma intenzitású. A jobb oldali részen látható, hogy a különböző elektródokon mért jelek időbeli eltérése alapján a vezetés sebesség meghatározható.

6. Hisztoblott vizsgálatok transzmitterreceptor- és egyéb membránfehérjék változásának tesztelésére

A különböző *in vivo* kezelések hatására, különösen a hosszabb ideig tartó, vagy nagyobb intenzitású behatásokat követően feltételezhető, hogy a szinaptikus átvitel hatékonyságában alapvető szerepet játszó transzmitterreceptorok mennyisége és aránya is változik. Ennek kimutatására kínál jó lehetőséget a hisztoblott technika. A toxikus anyagokkal való kezeléseket követően az agykból vékony szeleteket vágva immunreakciókkal a receptorok detektálhatók, megfelelő specifikus festések alapján a mennyiségi viszonyok meghatározhatók.



6.ábra: Az ábrán lévő metszeteken látható, hogy az immunológiai festésen átesett agyszeletek egyes területein az adott receptorok mennyisége eltérést mutat. A kontroll és a kezelésen átesett állatokból származó szeletek egyes területein az optikai denzitás (OD) összevetésével megállapítható a változások mértéke és iránya. A grafikonon az agykéreg különböző rétegeiben mért értékek mutatják, hogy a serkentő aminosav transzmitter receptorok (GluR) mennyisége a kezelés hatására minden rétegben jelentős mértékben lecsökkent, ami a serkenthetőség csökkenését eredményezheti. (a grafikon a római számok az egyes agykérgi rétegeket jelölik).

A javasolt tesztrendszer a bemutatott elektrofiziológiai mérési technikákat rendszerszerűen alkalmazva, kiegészítve a specifikus szövettani módszerrel alkalmas a különböző toxikus hatású anyagok, így a mikotoxinok alapvető idegi hatásának elemzésére.