

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXX
2010
SUPPLEMENT 2**

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Katarzyna Majak

**Zmiany ekspresji genów w kompleksie podstawno-bocznym
ciała migdałowatego podczas epileptogenezy oraz
klasycznego warunkowania strachu w modelu padaczki
skroniowej u szczura**

*Gene expression changes in the basolateral complex
of amygdala during epileptogenesis and classical fear
conditioning in rat model of temporal lobe epilepsy*

Rozprawa habilitacyjna

Zakład Anatomii i Neurobiologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik: prof. dr hab. med. Janusz Moryś

Gdańsk 2010

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

REDAKTOR NACZELNY

EDITOR-IN-CHIEF
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY

EDITORIAL BOARD

Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Zbigniew Machaliński,
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta,
prof. dr Zdzisław Bereznowski, prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan,
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI

ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@gumed.edu.pl

**Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE**

Articles published in Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Gdański Uniwersytet Medyczny

Wyrażam serdeczne podziękowania:

*Pani Profesor Asli Pitkänen
za wprowadzenie w świat badań nad padaczką, umożliwienie wykonania części
doświadczalnej mojej pracy oraz nieocenioną pomoc w przygotowaniu
publikacji związanych z tym zagadnieniem.*

*Panu Profesorowi Januszowi Morysiowi
za życzliwe uwagi merytoryczne udzielane w trakcie przygotowywania tej pracy.*

*Panu Profesorowi Olgierdowi Narkiewiczowi
za cenne wskazówki motywujące do dalszej pracy.*

*Doktorowi Michałowi Dąbrowskiemu
za nieocenioną pomoc w trakcie analizy bioinformatycznej uzyskanych wyników.*

*Magister Sylwii Scisłowskiej
za pomoc w przygotowaniu szaty graficznej.*

*Doktor hab. Katarzynie Łukasiuk
za cenne uwagi udzielone w trakcie przygotowywania manuskryptu*

*Koleżankom i Kolegom z Laboratorium Badań nad Padaczką Instytutu
A.I. Virtanena w Kuopio (Finlandia) oraz Zakładu Anatomii i Neurobiologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
za życzliwość i wsparcie okazywane w trakcie całej mojej pracy.*

Moim Rodzicom

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	9
1. WSTĘP.....	10
1.1. Padaczka.....	10
1.1.1. Padaczka – wprowadzenie.....	10
1.1.1.1. Uraz początkowy.....	10
1.1.1.2. Epileptogeneza	11
1.1.2. Leczenie padaczki	14
1.2. Padaczka skroniowa	16
1.2.1. Padaczka skroniowa u ludzi	16
1.2.2. Modele zwierzęce padaczek	17
1.3. Ciało migdałowe a strach.....	19
1.4. Zmiany w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowego wywołane procesem epileptogenezy i padaczką oraz ich konsekwencje behawioralne	22
1.5. Mikromacierze DNA jako nowoczesne narzędzie wykrywania zmian ekspresji genów	23
2. CELE PRACY	26
3. MATERIAŁ I METODY.....	27
3.1. Zwierzęta	27
3.2. Wywołanie epileptogenezy.....	27
3.2.1. Operacje	27
3.2.2. Wywołanie stanu drgawkowego.....	29
3.3. Rejestracja EEG oraz zachowania zwierząt.....	30
3.4. Klasyczne warunkowanie strachu.....	31
3.5. Mikrodysekcja laserowa oraz izolacja i amplifikacja RNA.....	33
3.6. Hybrydyzacja do mikromacierzy oligonukleotydowych oraz analiza uzyskanych danych.....	35
3.7. Półilościowa reakcja odwrotnej transkrypcji i łańcuchowa reakcja polimerazy (RT-PCR).....	37
4. WYNIKI.....	40
4.1. Zmiany ekspresji genów w przebiegu procesu epileptogenezy	40
4.1.1. Badania z wykorzystaniem mikromacierzy Affymetrix	40
4.1.2. Weryfikacja otrzymanych wyników metodą półilościowego RT-PCR.....	43
4.1.3. Anotacje funkcjonalne genów (GO terms).....	45
4.1.4. Porównanie z wynikami otrzymanymi za pomocą mikromacierzy w innych modelach epileptogenezy i padaczki	50
4.2. Wpływ epileptogenezy na procesy uczenia się i pamięci emocji w modelu klasycznego warunkowania strachu	50
4.2.1. Różnice w reakcji warunkowej obserwowane u zwierząt kontrolnych oraz będących w trakcie epileptogenezy	50
4.2.2. Wpływ epileptogenezy na zmiany ekspresji genów pod wpływem klasycznego warunkowania strachu	51
4.2.2.1. Wyniki otrzymane za pomocą mikromacierzy Affymetrix.....	51
4.2.2.2. Analiza z wykorzystaniem algorytmu grupowania K-medoids	53
4.2.2.3. Weryfikacja otrzymanych wyników przy użyciu półilościowego RT-PCR.....	55

5. DYSKUSJA	57
5.1. Epileptogeneza w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego	57
5.1.1. Zmiany ekspresji licznych genów w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego szczura wywołane procesem epileptogenezy	57
5.1.2. Molekularne podobieństwa procesu epileptogenezy w różnych modelach doświadczalnych padaczki oraz padaczki u ludzi	58
5.1.3. Wspólne podłoże molekularne epileptogenezy oraz innych chorób ośrodkowego układu nerwowego	61
5.2. Epileptogeneza a procesy leżące u podłoża uczenia się i pamięci emocji	62
5.2.1. Upośledzenie warunkowania strachu w trakcie epileptogenezy	62
5.2.2. Odmiennie kierunki zmian ekspresji genów związanych z warunkowaniem strachu u zwierząt w trakcie epileptogenezy oraz zwierząt kontrolnych	64
5.2.3. Wspólne molekularne podłoże zaburzeń funkcji poznawczych w chorobach ośrodkowego układu nerwowego	67
5.3. Uwagi metodologiczne	68
5.4. Inne czynniki modulujące przebieg procesu padaczkowego oraz jego następstwa behawioralne	69
5.5. Implikacje praktyczne	73
6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI	74
7. STRESZCZENIE	76
8. SUMMARY	78
9. PIŚMIENNICTWO	80

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Cst3	– cystatyna C (<i>cystatin C</i>)
Ctss	– katepsyna S (<i>cathepsin S</i>)
Dock3	– <i>dedicator of cytokinesis 3</i>
EEG	– elektroencefalografia (<i>electroencephalography</i>)
GABA	– kwas γ -aminomasłowy (<i>gamma-aminobutyric acid</i>)
HAFD	– zespół iglic o wysokiej amplitudzie i częstotliwości (<i>high amplitude and frequency discharge</i>)
NMDA	– kwas N-metylo-D-asparaginowy (<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>)
Nrn1	– <i>neuritin 1</i>
OUN	– ośrodkowy układ nerwowy (<i>central nervous system</i>)
RT-PCR	– reakcja odwrotnej transkrypcji i łańcuchowa reakcja polimerazy (<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SE	– stan drgawkowy (<i>status epilepticus</i>)
TLE	– padaczka skroniowa (<i>temporal lobe epilepsy</i>)

1. WSTĘP

1.1. Padaczka

1.1.1. Padaczka – wprowadzenie

Padaczki (epilepsje) to grupa chorób o różnej etiologii, charakteryzujących się samoistnym występowaniem napadów padaczkowych, czyli zaburzeń czynności bioelektrycznej mózgu, którym towarzyszą odpowiednie zmiany w zachowaniu. Padaczka to najczęstsza choroba neurologiczna wieku dziecięcego, a druga co do częstości (po udarach) choroba neurologiczna u dorosłych. Dotyczy ona około 0,8% populacji [167]. Według danych Fundacji Epileptologii w Polsce na padaczkę cierpi około 400 tysięcy osób. Wskaźnik zachorowalności jest zróżnicowany w zależności od wieku (największy u osób starszych i dzieci) i wynosi średnio 60 na 100 tysięcy osób.

Według klasyfikacji opracowanej w 1981 r. przez Międzynarodową Ligę Przeciwpadaczkową (*International League Against Epilepsy, ILAE*) napady padaczkowe dzieli się na dwie duże grupy: napady pierwotnie uogólnione oraz napady częściowe (ogniskowe). W każdej z grup wyróżniane są dodatkowe podgrupy. Część drgawek, które trudno zaliczyć do jednej z wyżej wspomnianych grup zalicza się do napadów niesklasyfikowanych. Z upływem czasu klasyfikacja ta ulegała modyfikacjom, jednak jej podstawowe założenia są nadal aktualne. Innym podziałem jest klasyfikacja semiologiczna, według której napady i zespoły padaczkowe klasyfikuje się względem 5 osi uwzględniających: typ drgawek, uogólniony bądź ogniskowy początek, zespół, przyczynę oraz towarzyszące deficyty [47].

Etapy rozwoju padaczki

Podłożem epilepsji u około 40% pacjentów są czynniki genetyczne [55]. U pozostałych 60% chorych doszło wcześniej do uszkodzenia mózgu w wyniku urazu początkowego, co w konsekwencji prowadzi do wystąpienia samoistnych, nawracających drgawek, równoznacznych z rozpoznaniem choroby. W tej grupie pacjentów proces ten można podzielić na 3 etapy: etap 1 – uraz początkowy; etap 2 – epileptogeneza, czyli bezobjawowy okres latencji (trwający miesiące a nawet lata); etap 3 – samoistne, nawracające i trwające do końca życia drgawki, które są równoznaczne z rozpoznaniem padaczki [122].

1.1.1.1. Uraz początkowy

Urazem początkowym może być uraz czaszkowo-mózgowy, udar (niedokrwienny bądź krwotoczny), zapalenie opon mózgowo rdzeniowych lub mózgu, guz mózgu, stan drgawkowy (o różnej etiologii) czy zabieg neurochirurgiczny. Na przykład padaczka w ciągu roku rozwinię się u około 25% pacjentów po

ciężkim urazie czaszkowo-mózgowym [164]. W przypadku ciężkiego, penetrującego urazu mózgu odsetek ten wzrasta do ponad pięćdziesięciu [53, 177]. Także u około 13% pacjentów onkologicznych pod wpływem uszkodzenia wywołanego obecnością w mózgowiu guza nowotworowego lub zmian metabolicznych mu towarzyszących rozwija się padaczka [62].

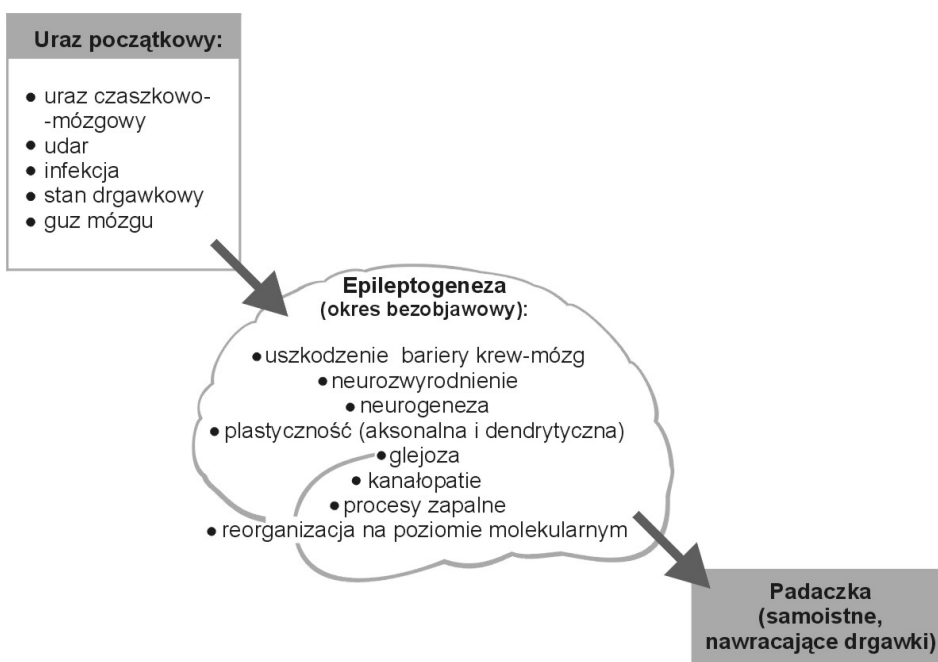
1.1.1.2. Epileptogeneza

Bezobjawowy okres latencji między urazem początkowym a ujawnieniem się padaczki nazywamy epileptogenezą. Trwać on może miesiące, a nawet lata. W tym okresie na poziomie komórkowym i molekularnym zachodzi szereg zjawisk, w wyniku których dochodzi do reorganizacji tkanki nerwowej prowadzącej do wystąpienia samoistnych, nawracających drgawek, czyli padaczki. Główne z nich to uszkodzenie bariery krew-mózg, neurozwyrodnienie, neurogeneza, glejoza, plastyczność aksonalna i dendrytyczna, procesy zapalne czy reorganizacja na poziomie molekularnym. Schematyczne przedstawienie najważniejszych procesów zachodzących w mózgu w trakcie epileptogenezy przedstawia ryc. 1.

Szereg badań wskazuje na to, że zarówno po urazie początkowym jak i drgawkach, w przebiegu padaczki obserwuje się neurozwyrodnienie wybranych populacji neuronalnych w wielu korowych i podkorowych strukturach mózgu [118, 195]. Na przykład w modelach padaczki skroniowej już w 4 godziny po rozpoczęciu stanu drgawkowego w ciele migdałowatym szczura można było stwierdzić pierwsze objawy neurozwyrodnienia [209]. Wiele badań wykazało, że w trakcie epileptogenezy neurony giną zarówno w procesie zaprogramowanej śmierci komórki jak i nekrozy [72, 130].

Z drugiej strony epileptogenezie towarzyszy zwiększona neurogeneza. Niestety, nowopowstałe neurony tworzą zazwyczaj nieprawidłową sieć połączeń [229]. Dalsze badania pomogą wyjaśnić, czy takie patologiczne połączenia promują czy hamują proces epileptogenezy.

Przez długi okres uważano, że w trakcie epileptogenezy główną funkcją gleju jest jego udział w procesach naprawczych (funkcje żerne, tworzenie blizny glejowej). Ostatnie badania wykazały jednak, że głąz w sposób aktywny moduluje przebieg epileptogenezy poprzez wydzielanie szeregu czynników regulujących między innymi: procesy neurozwyrodnienia, neurogenezy czy plastyczności neuronalnej [116, 154, 160, 215].



Rycina 1. Etapy rozwoju procesu padaczkowego. Uraz początkowy inicjuje bezobjawowy okres epileptogenezy, w wyniku którego pojawiają się samoistne, nawracające drgawki równoznaczne z rozpoznaniem padaczki. Podano także rodzaje urazu początkowego, które najczęściej prowadzą do rozwoju padaczki oraz najlepiej poznane zjawiska biologiczne zachodzące w trakcie epileptogenezy

Figure 1. Schematic drawing illustrating different phases of epileptic process, that is initial insult that triggers asymptomatic period called epileptogenesis, which leads to appearance of recurrent, spontaneous seizures that equals diagnosis of epilepsy. Different types of initial insults as well as the best studied biological processes underlying epileptogenesis are also presented

Na przykład w trakcie epileptogenezy dochodzi do aktywacji mikrogleju, który zwiększa ekspresję cząsteczek należących do głównego kompleksu zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex, MHC) jak również wydziela wiele czynników prozapalnych lub cytotoksycznych. Proliferujący astroglej tworzy bliznę w miejscu uszkodzonej przez proces epileptogenezy tkanki nerwowej. Co więcej, reguluje on także przepuszczalność bariery krew-mózg dla czynników zapalnych oraz wytwarza wiele czynników wzrostowych, cytokin oraz proteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. Ponadto glej w sposób bezpośredni wpływa na pobudliwość komórek nerwowych poprzez regulację poziomu wapnia, GABA czy wydzielanie glutaminianu lub zmieniając strukturę receptorów glutaminianu [31].

Podczas epileptogenezy obserwujemy także szereg procesów związanych z plastycznością neuronalną. Najlepiej poznaną formą plastyczności aksonalnej

jest tworzenie obocznic włókien mszystych hipokampa (*mossy fiber sprouting*) w warstwie drobinowej zakrętu zębatego. Zjawisko to obserwowano zarówno w wielu eksperymentalnych modelach padaczki jak i mózгах pacjentów chorych na padaczkę [43, 160]. Stopień jego nasilenia koreluje ze stopniem neurozwyrodnienia we wnętrzu zakrętu zębatego [139], niemniej jednak nadal nie jest jasne, czy wpływa ono korzystnie czy niekorzystnie na rozwój i przebieg padaczki. Kolejna forma plastyczności neuronalnej dotyczy dendrytów. Zaobserwowano na przykład przerost proksymalnej części dendrytów, zmniejszenie rozgałęzienia drzewa dendrytycznego, a także istotne zmiany dotyczące liczby i morfologii kolców dendrytycznych w neuronach zlokalizowanych w strukturach mózgowia dotkniętych przez proces epileptogenezy [160, 219].

Przez wiele lat ośrodkowy układ nerwowy (OUN) uważany był za strukturę immunoprzywilejowaną ze względu na obecność bariery krew-mózg, brak elementów klasycznego układu limfatycznego oraz dość niewielką zawartość limfocytów i monocytów. W ostatnich latach stało się jednak jasne, że reakcje immunologiczne i zapalne stanowią podłoże wielu chorób ośrodkowego układu nerwowego, na przykład choroby Alzheimera, choroby Parkinsona, stwardnienia rozsianego, udarów, urazów czaszkowo-mózgowych oraz padaczki [31, 105, 128, 172, 173, 203, 214]. W schorzeniach tych odpowiedź zapalna może być generowana przez sam mózg lub stanowić następstwo uszkodzenia bariery krew-mózg. Procesy zapalne to także niezwykle istotny element związany z epileptogenezą [31]. U ludzi uszkodzenie bariery krew-mózg oraz obecność wielu markerów procesów zapalnych obserwowano zarówno w chorobach neurologicznych, których przebiegowi towarzyszą napady padaczkowe (np. toczeń rumieniowaty układowy, wole Hashimoto, zapalenie mózgu Rasmussena) jak i po urazie czaszkowo-mózgowym, udarze, drgawkach gorączkowych czy stanie drgawkowym. Zjawiska te w wielu przypadkach zapoczątkowują proces epileptogenezy [31]. Badania na zwierzętach wykazały, że w trakcie epileptogenezy dochodzi do aktywacji mikrogleju i astrogleju, które zwiększają ekspresję cząsteczek głównego kompleksu zgodności tkankowej oraz wydzielają wiele czynników prozapalnych lub cytotoksycznych, na przykład interleukiny 1, 2 i 6, czy transformujący czynnik wzrostu $\beta 1$ [31].

U podstaw wyżej opisanych zjawisk leżą zmiany ekspresji genów i ich produktów, które odpowiedzialne są za rozwój i przebieg epileptogenezy. Wiele z tych genów (oraz ich produktów) wykazuje zaburzoną ekspresję także u chorych na padaczkę. Ze względu na coraz większą liczbę globalnych analiz ekspresji genów, zarówno w modelach doświadczalnych padaczki jak i padaczce u ludzi, możliwe stały się analizy porównawcze mające na celu wyodrębnienie genów szczególnie istotnych dla kolejnych faz rozwoju tej choroby [8, 33, 116, 120]. Analiza wykorzystująca dane i algorytmy zawarte w bazie danych *Gene Ontology* wykazała szereg nadreprezentowanych anotacji funkcjonalnych (*GO terms*) charakterystycznych dla określonych punktów czasowych. Na przykład *GO terms* „czynniki transkrypcyjne” i „odpowiedź na uraz” były nadreprezentowane

w ciągu pierwszych 24h od urazu początkowego, „neurogeneza” – 1dzień po urazie, natomiast „homeostaza jonów”, „taksja” i „odpowiedź na uraz” – w 3 do 8 dni po urazie [116]. *GO term* „odpowiedź immunologiczna” był nadreprezentowany w każdym z punktów czasowych epileptogenezy oraz w trakcie pełnoobjawowej padaczki, zarówno w modelach eksperymentalnych jak i padaczce u ludzi [116]. Do genów związanych z *GO term* „czynniki transkrypcyjne” należą na przykład JUNB i ATF2 i ETS1, które wiązane są z procesami neurozwyrodnienia [19, 112, 227] oraz EGR1 i BHLHB2 zaangażowane w plastyczność neuronalną [87, 220]. Genami związanymi z neurogenezą są na przykład SCRPI i YWHAG [132, 201]. Wiele genów kodujących interleukiny, cytokiny czy antygeny powierzchniowe występuje zarówno w *GO term* „odpowiedź na uraz” jak i „odpowiedź immunologiczna” [116]. Należy zwrócić również uwagę na fakt, że wiele z tych zmian zachodziło w komórkach gleju [116].

Powyższe dane wskazują, że epileptogeneza to proces złożony, a zrozumienie mechanizmów nią zawiadujących jest niezbędne dla opracowania terapii zapobiegających rozwojowi nie tylko padaczki, lecz także innych chorób OUN.

1.1.2. Leczenie padaczki

W chwili obecnej leczenie padaczki to przede wszystkim leczenie objawowe, które sprowadza się do zapobiegania napadom padaczkowym lub zmniejszenia częstości ich występowania. Większość pacjentów cierpiących na padaczkę jest leczona farmakologicznie. U około 60-70% chorych kontrolę napadów padaczkowych można osiągnąć za pomocą jednego lub kilku leków przeciwpadaczkowych [103]. W pozostałej grupie stosuje się terapię dwoma lub trzema lekami przeciwpadaczkowymi. Mimo to u około 30-40% chorych padaczka pozostaje oporna na leczenie farmakologiczne [103].

Wśród leków przeciwpadaczkowych wyróżniamy stosowane od lat klasyczne leki przeciwpadaczkowe (np. fenytoina, karbamazepina, walproinian, fenobarbital, prymidon) oraz leki nowej generacji, czyli wprowadzone po 1993 (np. wigabatryna, lamotrygina, gabapentyna, oksykabazepina, tiagabina, topiramata, felbamat). Leki nowej generacji wykazują lepszą farmakokinetykę, powodują mniej działań niepożądanych i interakcji z innymi lekami, a ich skuteczność w porównaniu z lekami klasycznymi bywa porównywalna. W niektórych rodzajach napadów padaczkowych lekami skuteczniejszymi są ciągle leki klasyczne [56].

Ze względu na mechanizm działania leki przeciwdrgawkowe można podzielić na: blokery kanałów sodowych (np. fenytoina, karbamazepina, oksykabazepina), leki nasilające działanie GABA (np. wigabatryna, fenobarbital, benzodiazepiny), modulatory kwasu glutaminowego (np. topiramata, lamotrygina), blokery kanałów wapniowych typu T (np. etosuksymid, walproinian), blokery kanałów wapniowych typu N i L (np. lamotrygina, topiramata, walproinian, zoni-

samid), modulatory prądów H (gabapentyna, lamotrygina), blokery specyficznych miejsc wiązania (gabapentyna, lewetyracetam) oraz inhibitory anhidrazy węglanowej (topirammat, zonisamid) [35, 181].

W oparciu o wielośrodkowe i wieloletnie badania kliniczne opracowano szereg wytycznych dotyczących stosowania leków przeciwdrgawkowych (np. zalecenia Amerykańskiego Towarzystwa Epileptologicznego opublikowane przez French i współpracowników [52] czy Międzynarodowej Ligi Przeciwpadaczkowej opublikowane w pracy Glauser i współpracowników [56]).

Kiedy leczenie farmakologiczne nie przynosi pożądanych efektów, pomimo zastosowania dwóch lub większej liczby leków przeciwpadaczkowych, mówi się o padaczce lekoopornej (*medically refractory epilepsy*). U części pacjentów możliwe jest wtedy wykonanie zabiegu neurochirurgicznego. Aby pacjenta zakwalifikować do zabiegu neurochirurgicznego, konieczne jest znalezienie ogniska padaczkorodnego. W tym celu wykonuje się badania z wykorzystaniem magnetycznego rezonansu jądrowego (MRI), które łącznie z danymi uzyskanymi w wywiadzie, badaniu przedmiotowym oraz badaniu EEG są podstawą dla określenia strefy padaczkorodnej. Jeśli przy użyciu badania MRI nie udaje się uwidocznnić żadnych zmian, pacjenta można poddać badaniom z wykorzystaniem innych technik neuroradiologicznych, takich jak pozytonowa tomografia emisyjna (PET) czy spektroskopia rezonansu magnetycznego (MRS). Operacje neurochirurgiczne w leczeniu padaczki można podzielić na 3 główne typy: 1) resekcyjne, 2) rozłączeniowe i 3) neurostymulacje [196]. Najczęściej wykonuje się zabiegi resekcyjne, z których większość dotyczy płata skroniowego, np. lobektomia skroniowa czy usunięcie hipokampa. Zabiegi rozłączeniowe (np. kallozotomia, czyli przecięcie włókien biegnących przez spoidło wielkie) i neurostymulacje (np. stymulacja nerwu błędnego czy głęboka stymulacja mózgu) wykonywane są rzadziej, gdyż zarezerwowane są dla bardzo ciężkich przypadków padaczki. U około 60-70% chorych z lekooporną padaczką neurochirurgiczna resekcja obszaru padaczkorodnego całkowicie uwalnia chorego od napadów drgawkowych lub ogranicza je do sporadycznie występujących napadów o łagodniejszym przebiegu [183].

W ciężkich postaciach padaczki, w przypadku braku możliwości leczenia neurochirurgicznego, stosowana bywa dieta ketogenna (uboga w węglowodany a bogata w tłuszcze). Choć zdania co do jej skuteczności i bezpieczeństwa są podzielone, to w ostatnich latach pojawia się coraz więcej publikacji potwierdzających jej skuteczność w leczeniu ciężkiej, lekoopornej padaczki, zwłaszcza u dzieci [51, 135].

W chwili obecnej wiele badań skupia się także na opracowaniu efektywnych terapii zapobiegających zmianom zachodzącym w mózgu podczas epileptogenezy. Opracowanie takich terapii u pacjentów z podwyższonym ryzykiem rozwinięcia się padaczki wydaje się być niezwykle istotne zarówno z punktu widzenia medycznego jak i socjalnego. Jak na razie, ze względu na wiele czynników mających wpływ na proces epileptogenezy, niemożliwe jest nawet wyodrębnienie z

grupy osób, które doznały urazu początkowego tych pacjentów, u których ryzyko rozwoju padaczki jest podwyższone. Jednym z kierunków istotnych dla opracowania terapii zapobiegających rozwojowi padaczki wydaje się ograniczenie neurozwyrodnienia, czyli neuroprotekcja. Szybka interwencja po urazie początkowym miałaby na celu ograniczenie neurozwyrodnienia występującego w trakcie epileptogenezy, które w konsekwencji prowadzi do rozwoju padaczki. Jeśli ten cel byłby niemożliwy, to nowe terapie mogłyby przynajmniej znacząco zmodyfikować przebieg choroby, tzn. skrócić czas trwania i zmniejszyć częstotliwość występowania drgawek lub zapobiegać uogólnieniu drgawek, co także ograniczy dalsze neurozwyrodnienie będące ich następstwem. W chwili obecnej trwają intensywne badania nad neuroprotekcijnymi właściwościami wielu substancji chemicznych, leków przeciwdrgawkowych, czynników neurotroficznych, antyoksydantów, neuropeptydów, hormonów, czy transplantacją komórek nerwowych [2, 210, 218, 226]. Niestety, jak dotąd nie ma przesłanek klinicznych, by terapie takie stosować u pacjentów o podwyższonym ryzyku rozwoju padaczki. Spore nadzieje wiązano na przykład z lekami przeciwdrgawkowymi. Ich neuroprotekcyjne działanie opisane zostało w wielu modelach doświadczalnych padaczki [2, 159]. Jednak zastosowanie ich u pacjentów poddawanych kraniotomii wykazało, że leki te zapobiegają wczesnym drgawkom pourazowym, ale pozostają bez wpływu na rozwój padaczki [205]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach z wykorzystaniem modeli doświadczalnych padaczki. Na przykład Brandt i współpracownicy [23] zaobserwowali neuroprotekcyjne działanie kwasu walproinowego na neurony zespołu hipokampa, choć lek ten pozostawał bez wpływu na pojawienie się samoistnych drgawek. Działanie neuroprotekcyjne pozostające bez wpływu na rozwój procesu padczkowego obserwowano także w przypadku badań z wykorzystaniem dizocilpiny (MK-801) będącej antagonistą receptora NMDA [23]. Mimo to trwają badania nad zastosowaniem nowych substancji w leczeniu epileptogenezy i padaczki. Podsumowując, okres epileptogenezy wydaje się być niezwykle atrakcyjnym dla zastosowania terapii mających na celu zapobieganie rozwojowi padaczki. Aby tego dokonać, trzeba jednak najpierw pogłębić naszą wiedzę dotyczącą procesów morfologicznych i molekularnych zachodzących w mózgu w trakcie tego okresu.

1.2. Padaczka skroniowa

1.2.1. Padaczka skroniowa u ludzi

Według mianownictwa opracowanego przez Międzynarodową Ligę Przeciwpadaczkową padaczka lokalizująca się w obrębie płatów skroniowych nazywana jest padaczką skroniową (*temporal lobe epilepsy, TLE*). TLE należy do padaczek, które najczęściej rozwijają się w wieku dojrzałym. Charakteryzuje się ona występowaniem napadów częściowych prostych (pojedynczych lub w kom-

binacjach), częściowych złożonych i wtórnie uogólnionych. Leczeniem z wyboru jest farmakoterapia, która w około 30% przypadków nie przynosi pożądanych efektów mimo zastosowania politerapii lekami przeciwpadaczkowymi. Dlatego ten właśnie rodzaj padaczki jest najczęstszym wskazaniem do leczenia neurochirurgicznego.

Wyróżnia się dwa główne podtypy TLE: 1) MTLE (*medial temporal lobe epilepsy*), w której zmiany lokalizują się w obrębie zespołu hipokampa oraz 2) non-MTLE – ze zmianami w obszarach kory nowej płata skroniowego. W MTLE, oprócz dominującej atrofii (neurozwyrodnienie z następczą blizną glejową) hipokampa właściwego, często obserwuje się również atrofię ciała migdałowatego. Stwierdzono także neurozwyrodnienie w strukturach połączonych anatomicznie i czynnościowo z uszkodzonym hipokampem, do których należą wzgórze, torebka wewnętrzna, kora śródwęczowa, zakręt przyhipokampowy, pień mózgu czy mózdzek [92].

Struktury płata skroniowego są ściśle związane z procesami uczenia się i pamięci. Związek ten ustalono w latach 50-tych, kiedy to u pacjenta po obustronnej lobektomii skroniowej stwierdzono ciężki zespół amnestyczny [185]. Uważa się, że w padaczce skroniowej zaburzenia procesów pamięciowych mogą dotyczyć nawet 60% chorych [61]. Charakter i stopień tych zaburzeń zależy w znacznej mierze od zasięgu i lokalizacji uszkodzeń mózgu. Wykazano na przykład, że gdy ognisko znajduje się w półkuli dominującej pod względem mowy (zazwyczaj lewej), wtedy częściej obserwujemy zaburzenia pamięci werbalnej [83]. Zaburzenia procesów pamięciowych w padaczce skroniowej mają charakter progresywny, tzn. im proces chorobowy trwa dłużej, tym większych zaburzeń możemy się spodziewać [30]. Uszkodzenie struktur płata skroniowego nie jest jedynym czynnikiem mającym wpływ na zaburzenia procesów poznawczych. Padaczka skroniowa powoduje także zmiany w układzie nerwowym poprzez metaboliczne i pobudzająco-toksyczne efekty neurotransmiterów i samych napadów. Nie bez wpływu pozostaje także leczenie farmakologiczne i neurochirurgiczne, jak również stany emocjonalne i motywacje pacjentów [83].

1.2.2. Modele zwierzęce padaczek

W chwili obecnej do badań naukowych dostępne są w zasadzie tylko fragmenty tkanek uzyskane *post mortem* lub podczas neurochirurgicznej resekcji części mózgowia będącego ogniskiem pierwotnym drgawek. Materiał ten pochodzi więc wyłącznie od pacjentów z rozpoznaną chorobą (najczęściej jest to padaczka skroniowa) po wieloletniej farmakoterapii lekami przeciwdrgawkowymi. Dlatego też niezbędne stało się opracowanie modeli doświadczalnych padaczki, które umożliwią uzyskanie do badań materiału pochodzącego z okresu epileptogenezy.

Istnieje wiele eksperymentalnych modeli padaczki, które podzielić można na następujące grupy [163]:

- 1) modele *in vitro* (np. modele badające elektrofizjologiczne mechanizmy generowania i rozprzestrzeniania się drgawek na skrawkach mózgowych),
- 2) modele z indukcją drgawek u zwierząt zdrowych (np. drgawki inicjowane systemowym podaniem substancji chemicznych o właściwościach konwulsyjnych takich jak: kwas kainowy, pilokarpina, pentylenotetrazol czy pikrotoksyna),
- 3) modele padaczek o podłożu genetycznym (np. mysie modele choroby Unverrichta-Lundborga z mutacją w genie kodującym inhibitor proteaz – cystatynę B lub łagodnych rodzinnych drgawek noworodków związane z mutacją w genach KCNQ2 i KCNQ3 kodujących podjednostki M napięcioczulych kanałów potasowych),
- 4) modele ze zlokalizowanym ogniskiem padaczkorodnym (np. modele kindlingu elektrycznego bądź chemicznego czy zastosowany w niniejszej pracy model drażnienia prądem elektrycznym jądra bocznego ciała migdałowego szczura),
- 5) modele, w których padaczka rozwija się w następstwie uszkodzenia mózgu wywołanego np. urazem czaszkowo-mózgowym lub udarem.

Optymalny model zwierzęcy padaczki powinien imitować wszystkie etapy procesu padaczkowego, co w przypadku padaczki skroniowej, która rozwija się w następstwie urazu początkowego, sprowadza się do trzech etapów rozwoju tej choroby. Na początku występuje uraz początkowy, następnie obserwuje się bezobjawowy okres epileptogenezy, podczas którego zachodzą liczne procesy prowadzące do wystąpienia samoistnych, nawracających napadów drgawkowych, czyli padaczki. Dobrze scharakteryzowane zostały modele padaczki rozwijające się, na przykład w następstwie stanu drgawkowego, urazu czaszkowo-mózgowego czy udaru niedokrwiennego [90, 91, 94, 217].

Jednym z lepiej opisanych zwierzęcych modeli padaczki jest model padaczki skroniowej wywołanej elektryczną stymulacją ciała migdałowego u szczura opracowany przez Nissinena i współpracowników [138]. Urazem początkowym w tym modelu jest samoutrzymujący się stan drgawkowy (*status epilepticus*, SE) wywołany elektryczną stymulacją jądra bocznego ciała migdałowego szczura. W modelu tym stan drgawkowy ustępuje w kilka godzin po stymulacji, po czym następuje okres bezobjawowy czyli epileptogeneza. Po około miesiącu od stymulacji (mediana 32 dni) u szczurów pojawiają się samoistne, nawracające drgawki, które trwają do końca życia zwierzęcia [138]. U takiego zwierzęcia rozpoznawana jest padaczka. W modelu tym, w mózgach zwierząt doświadczalnych, obserwuje się zmiany neuropatologiczne przypominające zmiany w mózgach chorych na padaczkę skroniową. Obserwuje się więc neurozwyrodnienie i glejozę w zespole hipokampa oraz innych strukturach płata skroniowego, plastyczność neuronalną pod postacią obocznicowania włókien mszystych hipokampa (*mossy fiber sprouting*) oraz neurogenezę w zakręcie zębatym [93, 133,

134, 138, 154]. Model ten może być więc wykorzystywany nie tylko w celu badania samej padaczki, ale przede wszystkim procesu epileptogenezy, co nie jest możliwe na materiale ludzkim.

1.3. Ciało migdałowe a strach

Emocje towarzyszą człowiekowi od początku życia, a pamięć emocji ma istotne znaczenie w przetrwaniu oraz radzeniu sobie z problemami życia codziennego. Jedną z najbardziej pierwotnych emocji jest strach. Stany emocjonalne związane ze strachem to najsilniejsze i najbardziej odporne na wygaszanie rodzaje emocji. Pamięć o nich utrzymuje się przez całe nasze życie, nawet jeśli sytuacja wywołująca strach wystąpiła tylko jeden raz. Stanom emocjonalnym związanym ze strachem przypisuje się udział w patogenezie procesów takich, jak: fobie, stany lękowe, zespół stresu pourazowego czy zaburzenia obsesyjno-kompulsywne [188].

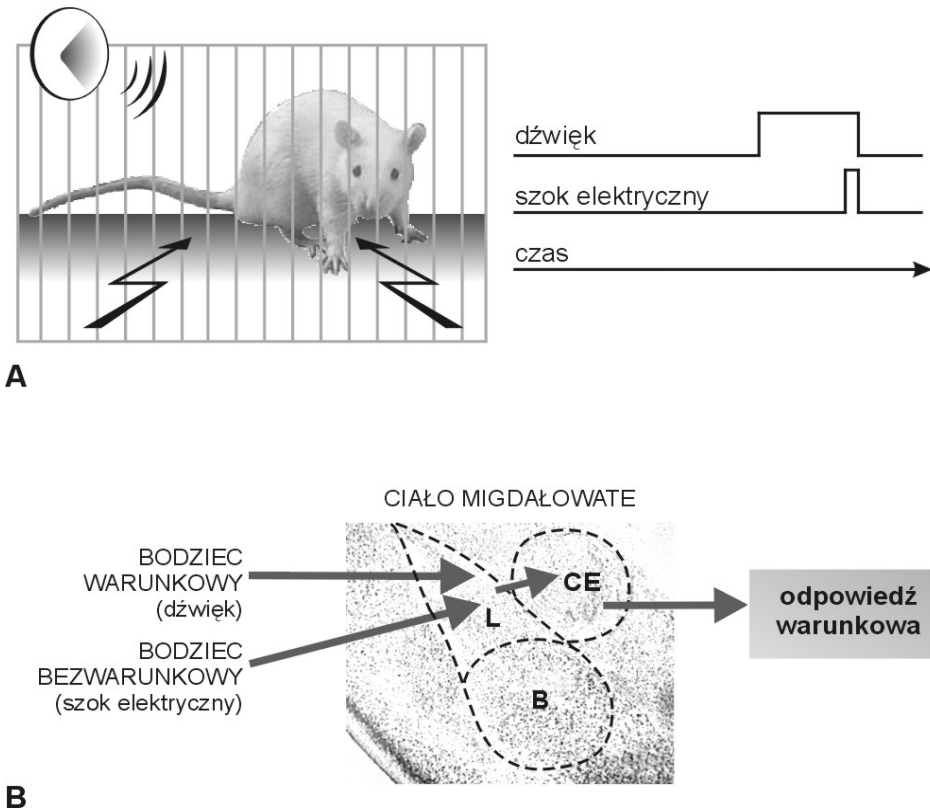
Doniesienia o znaczącej roli ciała migdałowego w procesach emocjonalnych związanych ze strachem uzyskano najpierw w oparciu o badania na zwierzętach, a następnie badania z wykorzystaniem czynnościowego rezonansu magnetycznego (fMRI) u pacjentów z selektywnie uszkodzonym ciałem migdałowatym [3]. Już ponad 100 lat temu Brown i Schafer zaobserwowali brak starchu u małp z uszkodzonym płatem skroniowym [24]. Podobne objawy charakteryzowały opisane przez Klüvera i Bucy'ego w latach trzydziestych XX-go wieku zespół wywołany uszkodzeniem części płata skroniowego u reżysów [97]. Późniejsze badania wykazały, że kluczową strukturą płata skroniowego, której uszkodzenie wywołuje wyżej wspomniany zespół objawów, jest ciało migdałowe [68, 80]. W chwili obecnej ciało migdałowe uważa się za strukturę istotną dla percepcji strachu u ludzi oraz generowanie zespołu reakcji uwarunkowanych strachem u zwierząt i ludzi. Szeroko stosowana w ostatnich latach technika fMRI, wykazała obustronną aktywację ciała migdałowego u osób zdrowych, którym prezentowano zdjęcia twarzy z wyrazem strachu [149]. Z drugiej strony testy psychologiczne wykazały znaczne upośledzenie lub wręcz niezdolność do rozpoznawania strachu na twarzy innych osób przez pacjentów z selektywnie uszkodzonym ciałem migdałowatym [3]. Aktywację ciała migdałowego obserwowano także u osób badanych podczas prezentacji słuchowych bodźców awersyjnych, takich jak płacz dziecka lub krzyk osoby przestraszonej [150].

Z drugiej strony ciało migdałowe jest strukturą kluczową dla procesu warunkowania strachu u ludzi i zwierząt. Klasyczne warunkowanie strachu (Pawłowowskie warunkowanie strachu) to powszechnie wykorzystywany model procesów uczenia się i pamięci emocji [106, 152, 176]. W rzeczywistości większość informacji o procesach leżących u podstaw uczenia się i pamięci emocji zawdzięczamy temu właśnie modelowi. W klasycznym warunkowaniu strachu zwierzęciu (lub człowiekowi) prezentowane są powiązane ze sobą bodźce: wa-

runkowy – czyli w normalnej sytuacji bodziec neutralny połączony z silnym bodźcem awersyjnym, zwanym bodźcem bezwarunkowym. Przy odpowiednio silnym bodźcu awersyjnym wystarczy nawet pojedyncza łączna prezentacja obu bodźców, aby zwierzę zaczęło prezentować reakcję warunkową (objawy strachu) przy prezentacji bodźca pierwotnie neutralnego. Objawy wchodzące w skład reakcji warunkowej nie różnią się od tych, jakie pojawiają się u zwierząt podczas reakcji obronnej zwierzęcia znajdującego się w sytuacji naturalnego zagrożenia. Na objawy te składają się między innymi: znieruchomienie (*freezing*), nasilenie odruchów mięśniowych (*potentiated startle*), analgezja, piloerekcja, wzrost ciśnienia tętniczego, przyspieszenie akcji serca oraz wydzielanie do krwi hormonów stresu [95].

Na podstawie wielu doświadczeń ustalono, że strukturą kluczową dla warunkowania strachu jest ciało migdałowate, a w szczególności kompleks podstawno-boczny oraz jądro środkowe. W kompleksie podstawno-bocznym oba bodźce, warunkowy i bezwarunkowy, ulegają asocjacji, natomiast jądro środkowe poprzez swoje połączenia ze strukturami pnia mózgu i podwzgórza, odpowiada za wyzwalanie szeregu reakcji fizjologicznych i behawioralnych wywołanych strachem, na przykład: poprzez połączenia z istotą szarą okołowodociągową wywoływane jest znieruchomienie, zaś z boczną częścią podwzgórza – wzrost ciśnienia krwi oraz zwiększenie częstości akcji serca i oddechu, a z jądrem łożyskowym prążka krańcowego – wydzielanie hormonów stresowych [95]. Schemat klasycznego warunkowania strachu u szczura przedstawia rycina 2.

Badania z wykorzystaniem czynnościowego rezonansu magnetycznego (fMRI) oraz pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) potwierdzają zaangażowanie ciała migdałowatego w warunkowanie strachu także u ludzi. Obustronną aktywność ciała migdałowatego obserwowano podczas prezentacji tym osobom bodźca warunkowego [129, 150]. U pacjentów z uszkodzeniem ciała migdałowatego obserwowano za to upośledzenie warunkowania strachu pod postacią zaburzeń asocjacji bodźców: warunkowego i bezwarunkowego, zaburzeń w rozpoznawaniu emocjonalnej wartości danego bodźca bądź nawet całkowitej niemożności uzyskania reakcji warunkowej [14, 25, 121].



Rycina 2. Schematyczne przedstawienie modelu klasycznego warunkowania strachu wykorzystanego w niniejszej pracy. **A.** Zwierzęciu prezentowany jest bodziec warunkowy (dźwięk) zakończony bodźcem bezwarunkowym (szokiem elektrycznym) dostarczanym przez metalową podłogę aparatu do warunkowania strachu. **B.** Informacja o jednoczesnej prezentacji bodźców: warunkowego (pierwotnie neutralnego) oraz bodźca bezwarunkowego (awersyjnego) dociera do jądra bocznego ciała migdałowatego, gdzie następuje ich asocjacja. Stąd informacja przekazywana jest do jądra środkowego, które wysyła połączenia do struktur anatomicznych, odpowiedzialnych za wywołanie reakcji warunkowej (w skład której wchodzi szereg reakcji fizjologicznych i behawioralnych). L – jądro boczne, B – jądro podstawne, CE – jądro środkowe

Figure 2. Schematic representation of classical fear conditioning procedure used in current study. **A.** Animal receives conditioned stimulus (tone) co-terminated by unconditioned stimulus (electrical footshock) delivered through the metal floor of fear conditioning apparatus. **B.** The information about both stimuli, that is conditioned stimulus (primarily neutral) and unconditioned stimulus (aversive) reaches lateral nucleus of amygdala where the association takes place. Next the information is conducted to central nucleus which is interconnected with several structures responsible for eliciting conditioned response (consisting of variety of physiologic and behavioral symptoms). L – lateral nucleus, B – basal nucleus, CE – central nucleus

1.4. Zmiany w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego wywołane procesem epileptogenezy i padaczką oraz ich konsekwencje behawioralne

Jak już wcześniej wspomniano, w padaczce skroniowej wyróżnione zostały dwa podtypy: typ MTLE, w którym zmiany dominują w obrębie zespołu hipokampa pod postacią stwardnienia centralno-skroniowego (*mesial temporal sclerosis, MTS*) oraz typ non-MTLE obejmujący korę płata skroniowego (zwykle, np.: guz, zaburzenia rozwojowe kory czy malformacje naczyniowe). Liczne prace doświadczalne i kliniczne wskazują również, że padaczce skroniowej towarzyszy zanik jąder podkorowych takich, jak na przykład ciało migdałowate, lub okolic korowych płata skroniowego [57, 58, 118, 158, 178, 179]. W dostępnym do badań histochemicznym materiale ludzkim i zwierzęcym oprócz neurozwyrodnienia obserwuje się także: glejozę, plastyczność neuronalną (pod postacią obocznicowania włókien mszystych hipokampa), neurogenezę w zakręcie zębatym czy zjawiska towarzyszące procesom zapalnym [2, 20, 144, 158, 165, 214].

W wyniku uszkodzenia wielu struktur płata skroniowego zaburzenia procesów poznawczych, a w szczególności zaburzenia pamięci, są często obserwowanym zespołem neuropsychologicznym u pacjentów z padaczką płata skroniowego [83]. Zasięg i lokalizacja uszkodzenia mózgu wiąże się z charakterem i stopniem zaburzeń funkcji poznawczych. Na zaburzenia pamięci wpływać mogą także zmiany w układzie nerwowym wywołane metabolicznymi efektami samych napadów lub leczeniem farmakologicznym czy neurochirurgicznym. Na przykład u chorych z dominującą pod względem mowy lewą półkulą i ogniskiem padaczkowym po stronie lewej obserwuje się większe trudności w pamięci werbalnej [70].

U chorych na padaczkę skroniową wykazano także nieprawidłową funkcję ciała migdałowatego w przebiegu procesów pamięciowych związanych z rozpoznawaniem lub warunkowaniem strachu. Jak już wcześniej wspomniano, gdy osobie zdrowej prezentowano fotografie twarzy wyrażających strach, obserwowano obustronne pobudzenie ciała migdałowatego. Podczas tego samego testu u chorych na padaczkę skroniową obserwowano lateralizację aktywacji ciała migdałowatego, czyli patologiczne pobudzenie tej struktury po stronie przeciwnej do ogniska padaczkowego [182]. Warunkowanie strachu było również upośledzone u pacjentów, u których z powodu padaczki skroniowej dokonano jednostronnej resekcji części płata skroniowego zawierającej ciało migdałowate [104, 148].

Powyższe dane dowodzą, że zmiany patologiczne, które rozwijają się w procesie epileptogenezy w ciele migdałowatym w istotny sposób wpływają na funkcję tej struktury, a zwłaszcza na procesy emocjonalne związane ze strachem.

1.5. Mikromacierze DNA jako nowoczesne narzędzie wykrywania zmian ekspresji genów

W ostatnich latach nastąpił znaczny rozwój technologii wykorzystywanych do badania ekspresji genów. Na przykład monitorowana w czasie rzeczywistym reakcja odwrotnej transkrypcji wraz z reakcją łańcuchową polimerazy (RT-PCR) umożliwiła jednoczesne badanie do kilkuset genów. Kolejnym etapem było opracowanie mikromacierzy DNA (*DNA microarray*), czyli systemów umożliwiających jednoczesne badanie ekspresji wielu tysięcy genów. W chwili obecnej, dzięki udoskonaleniu technik mikrodrukowania i syntezy nukleotydów oraz zmniejszeniu ilości RNA potrzebnego do wykonania eksperymentu, możliwe jest jednoczesne zbadanie nawet całego genomu danego organizmu.

Do badania profilu ekspresji genów wykorzystywane są najczęściej dwa rodzaje mikromacierzy DNA: mikromacierze cDNA i mikromacierze oligonukleotydowe.

Mikromacierze cDNA to najczęściej szklane płytki, na które mikrodrukarka nanosi sondy cDNA o długości od kilkuset do kilku tysięcy par zasad, co odpowiada często pełnym sekwencjom mRNA, czyli kompletnej sekwencji wariantu genu lub sekwencji EST (*expressed sequence tag*). Do uzyskania cDNA wykorzystuje się jako matrycę chromosomalne DNA.

Mikromacierze oligonukleotydowe podzielić można na mikromacierze zawierające krótkie (18-25 nukleotydów) lub długie (50-70 nukleotydów) oligonukleotydy. Przykładem może być technologia opracowana i rozwinięta przez Affymetrix Inc. (USA). Mikromacierz oligonukleotydowa Affymetrix to płytka, na której *in situ* wykonuje się techniką fotolitograficzną syntezę oligonukleotydów składających się z około 20 nukleotydów. Technika ta umożliwia wytworzenie mikromacierzy oligonukleotydowych o wysokiej gęstości sond na podstawie baz danych. Wiele sond o sekwencji charakterystycznej dla danego genu umieszcza się w określonym polu mikromacierzy. W celach kontrolnych, tzn. oszacowania sygnału tła wynikającego z niespecyficznego związania DNA, w punkcie tym umieszcza się także sondy różniące się jednym nukleotydem (pary „perfect match/mismatch”). Obecnie dostępne są mikromacierze Affymetrix umożliwiające badania całego genomu człowieka, zwierząt (np. szczura, myszy, psa, muszki owocówki, *Caenorhabditis elegans*) oraz roślin (np. ryżu, winorośli, pszenicy).

W ostatnich latach firma Illumina wprowadziła nowy rodzaj mikromacierzy łączących zalety mikromacierzy wysokiej gęstości oraz mikromacierzy przepływowych (*bead arrays, microfluidic system, flow-throu technology*). W mikromacierzach tych setki tysięcy kopii jednej sondy (o długości około 50 nukleotydów) kotwiczone są za pomocą odcinka łącznikowego (*address sequence*) są na ziarnach silikonowych o średnicy kilku μm . Ziarna umieszczane są w dołku na płycie silikonowej w odległości kilku μm od siebie, co sprawia że płytka o

wielkości szkiełka mikroskopowego może zwierać sześć identycznych mikromacierzy po kilkadziesiąt tysięcy genów każda.

Istnieją także mikromacierze umożliwiające badanie sekwencji genów (genotypowanie) lub mutacji i polimorfizmów DNA (*single nucleotide polymorphisms, SNPs*), szacowanie liczby kopii genów (*Comparative Genomic Hybridization, CGH*) czy mapowanie genów i klonów.

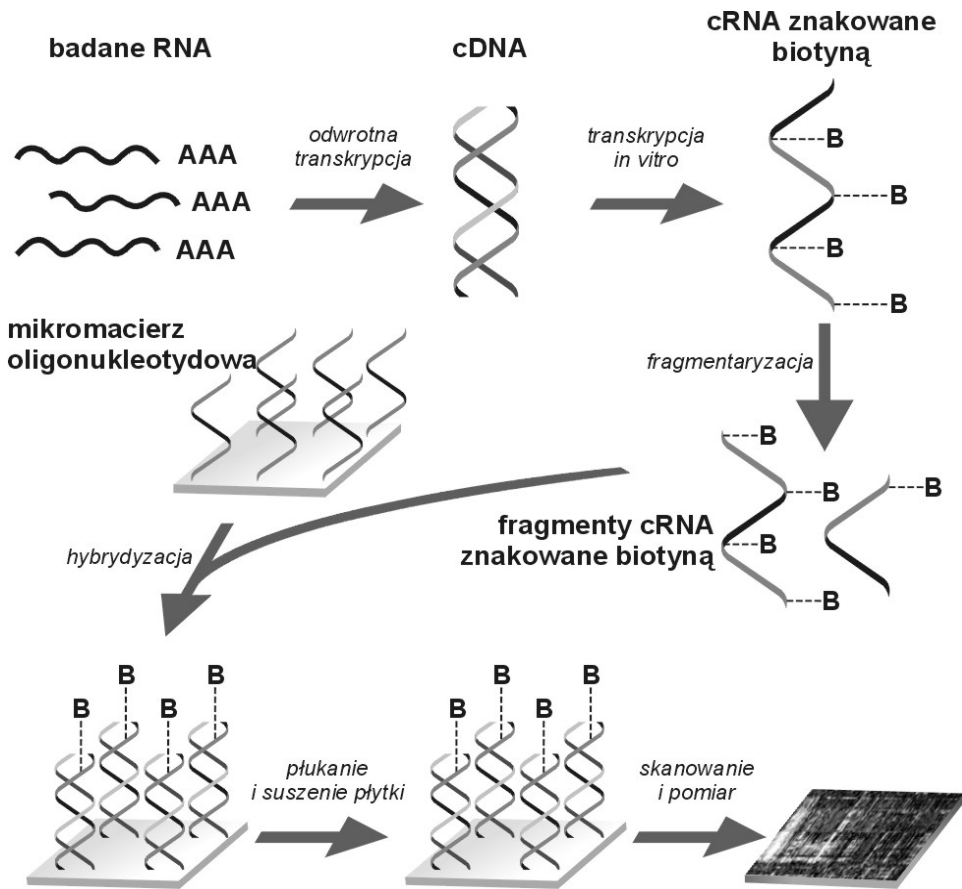
W doświadczeniu z wykorzystaniem zarówno mikromacierzy cDNA, jak i oligonukleotydowych, można wyróżnić następujące etapy:

- 1) izolacja RNA z badanych próbek,
- 2) synteza cDNA na matrycy wyizolowanego RNA,
- 3) wyznakowanie cDNA lub synteza wyznakowanego RNA na podstawie cDNA,
- 4) hybrydyzacja wyznakowanego kwasu nukleinowego do mikromacierzy,
- 5) odczyt za pomocą laserowego skanera wzbudzonej fluorescencji (natężenie fluorescencji jest proporcjonalne do liczby przyhybrydyzowanych cząsteczek kwasu nukleinowego),
- 6) przekształcenie obrazu w zbiór danych o wartościach ekspresji dla każdej sondy,
- 7) normalizacja danych.

Schemat doświadczenia z użyciem oligonukleotydowych mikromacierzy Affymetrix przedstawia rycina 3.

Ze względu na olbrzymią liczbę sond i genów badanych przy użyciu mikromacierzy otrzymane dane poddawane są obróbce i analizie za pomocą metod bioinformatycznych. Istnieje szereg komercyjnych lub powszechnie dostępnych w sieci Internet programów komputerowych, które służą temu celowi [41].

Podsumowując, mikromacierze DNA to nowoczesne narzędzie umożliwiające jednoczesne badania zmian ekspresji tysięcy genów, a nawet całego genomu, wywołanych różnorodnymi czynnikami fizjologicznymi bądź patologicznymi.



Rycina 3. Schematyczne przedstawienie eksperymentu z wykorzystaniem mikromacierzy oligonukleotydomowych. Na matrycy wyizolowanego RNA metodą odwrotnej transkrypcji syntetyzowane jest cDNA. Następnie na matrycy cDNA zachodzi transkrypcja cRNA wyznakowanego biotyną, po czym otrzymane cRNA poddane zostaje fragmentaryzacji, a otrzymane fragmenty hybrydyzowane są do mikromacierzy oligonukleotydomowej (np.: Affymetrix). Po odpłukaniu niespecyficznie związanych substancji i wysuszeniu mikromacierzy następuje skanowanie i pomiar sygnału, co pozwala na przekształcenie obrazu w zbiór danych opisujących ekspresję dla sond reprezentujących dany gen

Figure 3. Schematic drawing illustrating oligomicroarray experiment. Isolated RNA serves as the template for reversely transcribed cDNA. Next cDNA serves as the template for biotin-labeled cRNA transcription and then the cRNA undergoes fragmentation and hybridization to oligomicroarray (for example Affymetrix). After washing which removes unspecifically bound particles and drying the oligomicroarray is scanned to obtain the intensity profiles characterizing the expression levels of probes representing each gene

2. CELE PRACY

Ciało migdałowe, a co za tym idzie kompleks postawno-boczny, należą do struktur, które w pierwszej kolejności dotknięte są przez proces epileptogenezy oraz padaczkę skroniową. Jak już wcześniej wspomniano, jedną z lepiej poznanych funkcji ciała migdałowego, jest jego udział w procesach związanych z uczeniem się i pamięcią emocji. U podstaw tych zjawisk leżą między innymi zmiany ekspresji genów, których produkty białkowe odpowiedzialne są za szereg procesów towarzyszących rozwojowi padaczki jak i tworzeniu się pamięci emocji. W literaturze spotkać można wiele prac dotyczących zaburzeń ekspresji genów w epileptogenezie i padaczce. Niemniej jednak większość tych badań dotyczy dużych obszarów mózgowia, a nie pojedynczych struktur [33, 116]. Zmiany ekspresji genów w trakcie procesów tworzenia się pamięci emocji (głównie strachu) badane były przede wszystkim w mózgu zdrowym [143, 171], dlatego w swojej pracy skupiłam się na analizie zmian ekspresji genów w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowego u zwierząt będących w trakcie epileptogenezy, czyli w warunkach, gdy struktura ta dotknięta jest już patologią. Szczegółowe pytania, na które postanowiłam udzielić odpowiedzi to:

1. Które geny zmieniają ekspresję w trakcie epileptogenezy w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowego szczura?
2. Czy zmiany ekspresji tych genów występowały także w innych doświadczalnych modelach padaczki lub wiązano je z padaczką u ludzi?
3. W jaki sposób proces epileptogenezy wpływa na warunkowanie strachu u szczura?
4. Czy występują różnice w ekspresji genów związanych z warunkowaniem strachu u zwierząt będących w trakcie epileptogenezy i zwierząt kontrolnych?

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Zwierzęta

Badania przeprowadzone zostały na 30 dorosłych szczurach płci męskiej, rasy Harlan Sprague-Dawley. Waga zwierząt wynosiła od 280 do 330 g. Wszystkie szczury pochodziły ze Zwierzętarni Doświadczalnej przy Uniwersytecie w Kuopio (Finlandia). Szczury przebywały w osobnych klatkach w temperaturze utrzymywanej pomiędzy 19-21°C oraz wilgotności 40-60%. Wszystkie procedury doświadczalne zatwierdzone były przez Lokalną Komisję Biotyczną przy Uniwersytecie w Kuopio i opracowane zostały zgodnie z wytycznymi Rady Europy (uchwała nr 86/609/EEC).

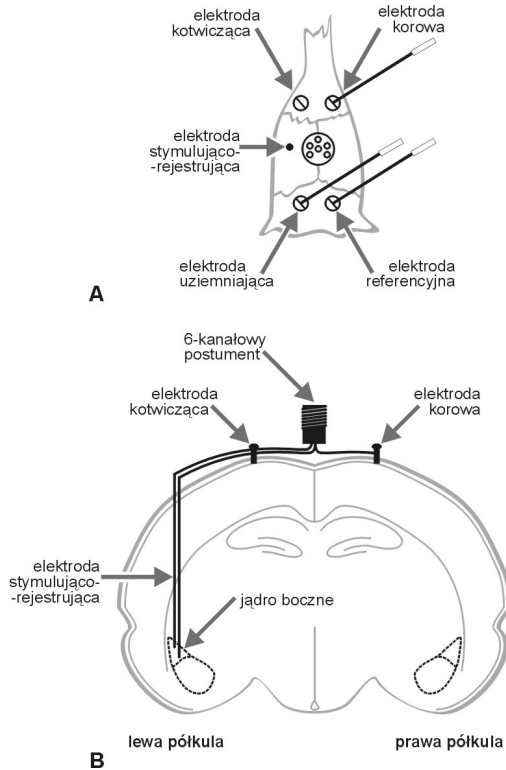
3.2. Wywołanie epileptogenezy

W celu wywołania procesu epileptogenezy wykorzystano model padaczki skroniowej u szczura opracowany przez Nissinena i współpracowników [138]. W modelu tym jądro boczne lewego ciała migdałowatego drażnione jest prądem elektrycznym, co prowadzi do wystąpienia stanu drgawkowego (status epilepticus, SE). Ustępujący samoistnie po około 24 godzinach SE rozpoczyna okres epileptogenezy (bezbobjawowy okres latencji), który trwa do pojawienia się spontanicznych drgawek, co równoznaczne jest z rozpoznaniem padaczki. W swoich badaniach wykorzystałam wyżej wymieniony model, gdyż okres latencji od urazu wywołanego przez SE do pojawienia się samoistnych, nawracających drgawek jest w nim stosunkowo długi (mediana wynosi około miesiąca [138]), co umożliwiło badanie ekspresji genów na stosunkowo wczesnym etapie epileptogenezy.

3.2.1. Operacje

Do zabiegu operacyjnego zwierzęta znieczulane były dootrzewnowym podaniem mieszaniny pentobarbitalu sodu (9,7 mg/ml), wodzianu chloralu (10 mg/ml), siarczanu magnezu (21,2 mg/ml), glikolu propylenowego (40%) oraz absolutnego alkoholu (10%) w ilości 0,4 ml/100 g masy ciała szczura. Zastosowane znieczulenie pozwalało na przeprowadzenie zabiegu operacyjnego trwającego do 2 h. Po znieczuleniu zwierzęta umieszczano w aparacie stereotaktycznym (firmy Kopf, model 900, Tujunga, CA, USA) i z zachowaniem zasad aseptyki wykonywano kraniektomie w uprzednio wyznaczonych obszarach w celu implantacji elektrod. W jądrze bocznym lewego ciała migdałowatego umieszczano dwubiegunową elektrodę stymulująco-rejestrującą (średnica 0,127 mm, odległość między biegunami stymulującym i rejestrującym = 0,4

mm; Franco Corradi, Włochy), a na powierzchni mózgowia – elektrody korowe (#E363/20, Plastics One Inc. Roanoke, VA, USA). Rozmieszczenie elektrod, opracowane w oparciu o atlas stereotaktyczny kory szczura [146], przedstawiają rycina 4 i tabela 1. Następnie elektrody podłączone zostały do postumentu (#MS363 Plastics One Inc.), a całość przymocowana została do czaszki akrylem dentystycznym. Po kontroli hemostazy ranę operacyjną zeszywano oraz podawano antybiotyki.



Rycina 4. Rozmieszczenia elektrod w mózgu szczura w modelu padaczki skroniowej, która rozwija się w następstwie stanu drgawkowego indukowanego drażnieniem prądem elektrycznym jądra bocznego lewego ciała migdałowatego. **A.** Widok górnej powierzchni sklepienia czaszki. **B.** Przekrój czołowy z widoczną elektrodą stymulująco-rejestrującą w jądrze bocznym lewego ciała migdałowatego. Widoczne jest także połączenie elektrod z postumentem, poprzez który następuje przyłączenie do aparatu EEG

Figure 4. Schematic drawing illustrating the placement of electrodes in the experimental model of temporal lobe epilepsy which develops following status epilepticus induced by electrical stimulation of the lateral nucleus of the left amygdala. **A.** Dorsal view of cranial vault. **B.** Coronal section at the level of placement of stimulation-recording electrode in lateral nucleus of the left amygdala. The connection of the electrodes with pedestal which serves for plugging to EEG-recording apparatus is also presented

Tabela 1. Rozmieszczenie elektrod u szczurów użytych w eksperymencie. AP – kierunek przód-tył; LR – kierunek lewo-prawo; DV – kierunek grzbietowo-brzuszny. Koordynaty stereotaktyczne wyznaczone w oparciu o atlas stereotaktyczny mózgu szczura Paxinos i Watsona [146]

Table 1. Placement of the electrodes in rats used in the experiment. AP – antero-posterior location; LR – left-right location; DV – dorso-ventral location. Stereotaxic coordinates were calculated according to stereotaxic atlas of rat brain by Paxinos and Watson [146]

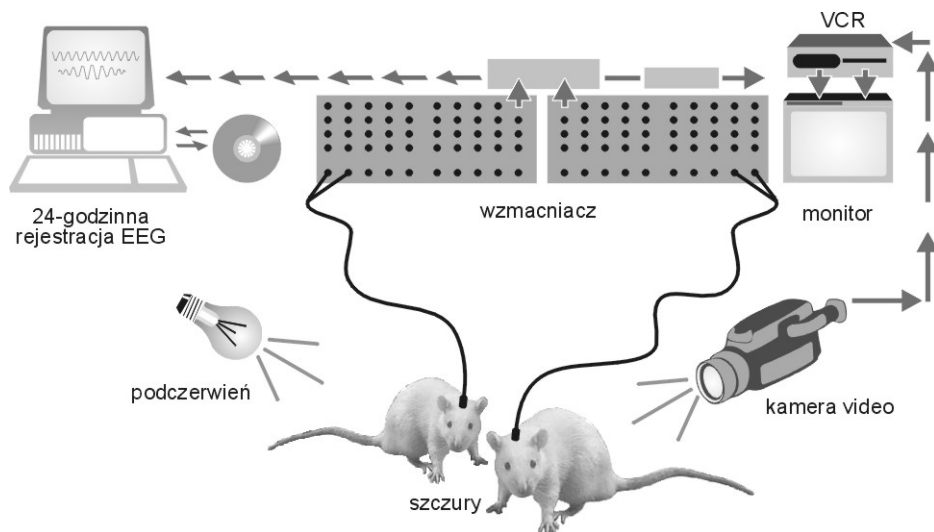
Rodzaj elektrody <i>Electrode type</i>	Obszar mózgu <i>Brain region</i>	Koordynaty stereotaktyczne wyznaczone wg bregma <i>Stereotaxic coordinates according to bregma</i>		
		AP	LR	DV
korowa kotwicząca <i>anchoring electrode</i>	kora czołowa lewa <i>left frontal cortex</i>	+3,0	-2,1	-
korowa rejestrująca <i>cortical recording</i>	kora czołowa prawa <i>right frontal cortex</i>	+3,0	+2,1	-
korowa uziemiająca <i>cortical ground</i>	lewa półkula mózdzku <i>left cerebellar hemisphere</i>	-10,3	-2,0	-
korowa referencyjna <i>cortical reference</i>	prawa półkula mózdzku <i>right cerebellar hemisphere</i>	-10,3	+2,0	-
stymulująco-rejestrująca <i>stimulating-recording</i>	jądro boczne lewego ciała migdałowatego <i>lateral nucleus of the left amygdaloid complex</i>	-3,6	-5,0	-6,5

3.2.2. Wywołanie stanu drgawkowego

Po około 2 tygodniach od zabiegu operacyjnego zwierzęta podłączone zostały do systemu (rycina 5) składającego się z rejestratora elektroencefalogramu (Nervus EEG Recording System, Tautagreining, Islandia) połączony ze wzmacniaczem (ISO-1032 Amplifier, Braintronics, Holandia), rejestratora wideo (SVT-S3000P Hitachi Time Lapse 168, OCR, Japonia) współpracującego z biało-czarną kamerą (Panasonic WV-CL350 Video Kamera, Japonia) oraz stymulatora (A300 Pulsemaster Stymulator, World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, USA). System ten umożliwił jednoczesną rejestrację aktywności elektrycznej mózgu oraz zachowania zwierząt. U każdego szczura wykonano najpierw 15 minutowy zapis rytmu podstawowego, a następnie przez około 20-40 min drażniono jądro boczne lewego ciała migdałowatego prądem elektrycz-

nym (100 milisekundowy ciąg dwubiegunowych impulsów prostokątnych o parametrach 1 ms, 400 μ A, 60 Hz, podawany co 0,5 s), co prowadziło do wystąpienia SE.

Osiem zwierząt kontrolnych podłączono również do systemu, ale nie przeprowadzano u nich drażnienia ciała migdałowego.



Rycina 5. Schematyczne przedstawienie systemu do 24-godzinnej rejestracji EEG zsynchronizowanego z zapisem wideo. Każde ze zwierząt, poprzez wzmacniacz, podłączone jest do rejestratora EEG oraz wideo. Lampa podczerwieni umożliwia rejestrację zachowania się zwierząt w nocy

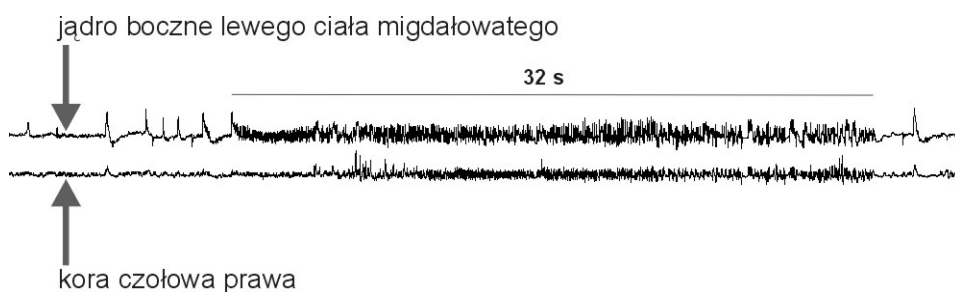
Figure 5. Schematic illustration of 24h-EEG recording system synchronized with video follow-up. Each animal is connected to the EEG-recording system (through the amplifier) and video recorder. Infrared lamp enables monitoring of animal behavior at night

3.3. Rejestracja EEG oraz zachowania zwierząt

Od momentu zakończenia stymulacji aż do uśmiercenia zwierzęta były monitorowane za pomocą systemu wideo-EEG 24 h/dobę. W nocy rejestrację zachowania zwierząt umożliwiała lampa podczerwieni (Videmech Ltd., Wielka Brytania). Codziennie przeprowadzano kontrolę wagi zwierząt i w miarę potrzeb podawano podskórnym roztwór soli fizjologicznej, aby zapobiegać odwodnieniu zwierząt.

Z 22 szczurów, u których drażniono jądro boczne ciała migdałowego, 4 zginęło w ciągu pierwszych 36 h od wywołania SE. Do dalszej części doświadczeń użyto tylko tych szczurów, u których w ciągu pierwszych trzech godzin trwania SE obserwowano co najmniej 50 drgawek zdefiniowanych jako zespoły iglic o amplitudzie dwukrotnie większej niż załamki zapisu podstawowego i

częstotliwości przekraczającej 8 Hz, trwających co najmniej 5 s (high amplitude and frequency discharges, HAFDs), gdyż jak dowiodły badania Nissinena i współpracowników [138] u ponad 90% zwierząt, które przeżyły taki uraz, rozwija się padaczka skroniowa. Przykład drgawki wyindukowanej w jądrze bocznym ciała migdałowego i uogólniającej się na przeciwstronną korę czołową przedstawia rycina 6. Pięć z pozostałych przy życiu 18 zwierząt nie spełniało wyżej wymienionych kryteriów dla SE, który rozpoczyna proces epileptogenezy. Zostały więc one wyłączone z dalszego etapu badań. W ciągu 8 dni obserwacji po indukcji SE u 3 kolejnych szczurów wystąpiły spontaniczne drgawki, a u kolejnych 2 nieprawidłowy zapis EEG (składający się z krótkotrwałych zespołów iglic), tak więc zwierzęta te zostały wykluczone z dalszej części doświadczeń, aby wyeliminować wpływ drgawek na zmiany ekspresji genów.



Rycina 6. Przykład zespołu iglic (HAFD) trwającego 32 s, który rozpoczyna się w jądrze bocznym ciała migdałowego i uogólnia się na przeciwstronną korę czołową. Drgawkę zarejestrowano w trakcie trwania stanu drgawkowego u szczura # K-222

Figure 6. An example of high amplitude and frequency discharge (HAFD) lasting 32 s which starts in lateral nucleus of amygdala and spreads to contralateral frontal cortex. The discharge was recorded during status epilepticus in rat # K-222

3.4. Klasyczne warunkowanie strachu

Klasyczne warunkowanie strachu to powszechnie wykorzystywany model procesów uczenia się i pamięci emocji, w których kluczową rolę odgrywa ciało migdałowe. W trakcie tej procedury zwierzęciu prezentowane są powiązane ze sobą bodźce: warunkowy – czyli bodziec neutralny połączony z silnym bodźcem awersyjnym, zwanym bodźcem bezwarunkowym, aby zwierzę zaczęło prezentować reakcję warunkową (objawy strachu) przy kolejnej prezentacji bodźca pierwotnie neutralnego. Zanim jednak przystąpiono do procedury warunkowania strachu, pięć dni po indukcji stanu drgawkowego rozpoczęto habituację (przyzwyczajanie) zwierząt z grupy kontrolnej oraz zwierząt będących w trakcie epileptogenezy, zarówno do osoby eksperymentatora jak i klatki testowej aparatu do warunkowania strachu (Coulbourn Instruments, Allentown, PA, USA). Dwa

razy dziennie, przez 3 kolejne dni, każde ze zwierząt spędzało 1 min na rękach eksperymentatora, a następnie 10 min w klatce testowej. Habituaacja zwierząt miała na celu wyeliminować zmiany ekspresji genów zachodzące pod wpływem pojawienia się w środowisku zwierzęcia nowych bodźców.

Tabela 2. Charakterystyka stanu drgawkowego i/lub procedury behawioralnej u poszczególnych zwierząt, których RNA wykorzystano zarówno do eksperymentów przy użyciu mikromacierzy jak również weryfikacji tych wyników metodą RT-PCR

Table 2. Characteristics of status epilepticus and/or behavioral paradigm used in each experimental animal which RNA was used for both, microarray study and RT-PCR verification of the microarray results

Grupa eksperymentalna <i>Experimental group</i>	Numer szczura <i>Rat code</i>	Kod próbki do mikromacierzy <i>Microarray sample code</i>	Długość stymulacji (min) <i>Stimulation time</i>	Liczba drgawek w ciągu pierwszych 3h SE <i>Number of HAFDS during first 3h of SE</i>
zwierzęta kontrolne, bodźce sparowane <i>control rats, paired stimuli</i>	229	CP	-	-
	234	CP	-	-
	235	CP1	-	-
	242	CP1	-	-
zwierzęta kontrolne, bodźce niesparowane <i>control rats, unpaired stimuli</i>	228	CU	-	-
	230	CU	-	-
	241	CU1	-	-
	246	CU1	-	-
zwierzęta w trakcie epileptogenezy, bodźce sparowane <i>epileptogenic rats, paired stimuli</i>	222	EP	40	77
	232	EP	20	80
	260	EP1	20	225
	263	EP1	40	57
zwierzęta w trakcie epileptogenezy, bodźce niesparowane <i>epileptogenic rats, unpaired stimuli</i>	223	EU	20	68
	233	EU	20	53
	238	EU1	30	119
	245	EU1	30	102

Ósmego dnia zwierzęta kontrolne i będące w trakcie epileptogenezy zostały losowo przydzielone do jednej z grup: otrzymujących sparowane lub niesparowane bodźce: warunkowy (dźwięk) i bezwarunkowy (szok elektryczny).

Tak więc w grupie, która otrzymała bodźce sparowane 4 szczury z grupy kontrolnej i 4 z grupy będącej w trakcie epileptogenezy poddane zostały sesji składającej się z dwukrotnej prezentacji dźwięku o natężeniu 75 dB trwającego 20 s, przy czym podczas ostatniej 0,5 s poprzez podłogę klatki testowej podawany był impuls elektryczny o natężeniu 1,5 mA. W grupie, która otrzymała bodźce niesparowane, zwierzęta dwukrotnie otrzymały najpierw impuls elektryczny (1,5 mA przez 0,5 s), a 1 min później usłyszały dźwięk (75 dB przez 20 s). W wyniku tych doświadczeń otrzymałam 4 grupy eksperymentalne:

- 1) zwierzęta kontrolne, które otrzymały sparowane bodźce (n=4),
- 2) zwierzęta kontrolne, które otrzymały niesparowane bodźce (n=4),
- 3) zwierzęta w trakcie epileptogenezy, które otrzymały sparowane bodźce (n=4),
- 4) zwierzęta w trakcie epileptogenezy, które otrzymały niesparowane bodźce (n=4).

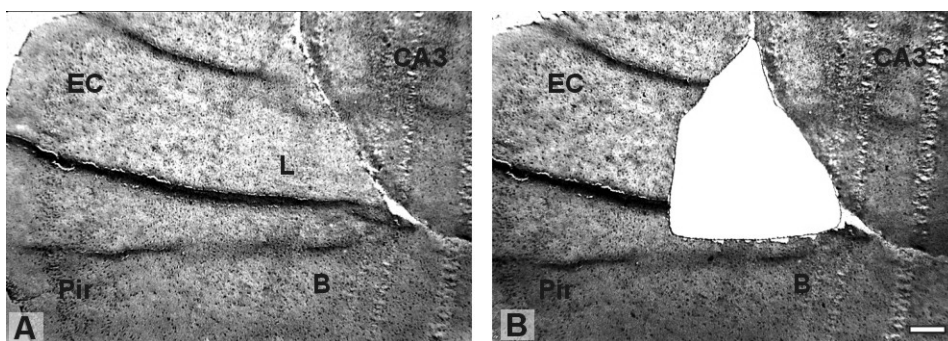
Szczegółowe dane charakteryzujące poszczególne zwierzęta w wykorzystanych grupach eksperymentalnych przedstawia tabela 2.

Następnie, analizując taśmy wideo z zarejestrowanym przebiegiem doświadczenia, dla każdego ze zwierząt zmierzono czas w jakim zwierzę pozostawało w bezruchu (freezing) podczas 20-sekundowej prezentacji bodźca warunkowego (dźwięku) w trakcie każdej z sesji. Stopień uczenia się odpowiedzi warunkowej określany jest za pomocą jednego ze składników reakcji lękowej, czyli czasu jaki zwierzę spędza w bezruchu po prezentacji bodźca warunkowego. Różnice między czasem bezruchu podczas prezentacji pierwszego i drugiego dźwięku u poszczególnych zwierząt, a także między poszczególnymi grupami eksperymentalnymi sprawdzano U-testem Mann-Whitney'a. Przyjęto poziom istotności $p=0,05$.

3.5. Mikrodysekcja laserowa oraz izolacja i amplifikacja RNA

Trzy godziny po zakończeniu procedury klasycznego warunkowania strachu zwierzęta uśmiercano za pomocą gilotyny, a z otrzymanych mózgów wyizolowano fragment półkuli zawierający lewe ciało migdałowe. Fragmenty te natychmiast zanurzono w medium przeznaczonym do cięcia preparatów w niskich temperaturach (Tissue-Tek® OCT, Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, USA), zamrażano i przechowywano w temperaturze -80°C . Następnie na kriostacie (HM 525, MICROM International GmbH, Niemcy) fragmenty mózgowia krojono w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 7 μm . Potem umieszczano je na szkiełkach zawierających ramkę z błoną do laserowej mikrodysekcji (#11505158, Leica Microsystems, Niemcy). W każdej z ramek na błonie

umieszczano 6 skrawków. Z jednego fragmentu mózgowia uzyskiwano zazwyczaj 10-12 ramek, na których znajdowały się skrawki zawierające kompleks podstawno-boczny ciała migdałowatego. Ramki ze skrawkami wybarwiono 1% fioletem krezyłu, co pozwoliło na dokładną identyfikację granic struktur mózgowia. Zarówno roztwór fioletem krezyłu jak i alkohole użyte do barwień były wolne od RNaz. Po wybarwieniu ramki ze skrawkami zostały umieszczone w Układzie do Mikrodysekcji Laserowej (AS LMD Laser Microdissection System, Leica Microsystems) i z kolejnych skrawków wycinano kompleks podstawno-boczny ciała migdałowatego (rycina 7).



Rycina 7. Wybarwiony fioletem krezyłu lewy płąt skroniowy szczura na przekroju czołowym przed (A) i po (B) laserowej mikrodysekcji jądra bocznego ciała migdałowatego. B – jądro podstawne ciała migdałowatego; CA3 – sektor CA3 hipokampa; EC – kora śródwęczowa; L – jądro boczne ciała migdałowatego; Pir – kora gruszkowa. Długość skali = 80 μ m

Figure 7. Cresyl violet stained coronal section of the left temporal lobe before (A) and after (B) performing the laser-capture microdissection of the lateral nucleus of the amygdala. B – basal nucleus of the amygdaloid complex; CA3 – CA3 subfield of hippocampus; EC – entorhinal cortex; L – lateral nucleus of the amygdaloid complex; Pir – piriform cortex. Scale bar = 80 μ m

Granice kompleksu podstawno-bocznego wyznaczano według opisu podanego przez Pitkänen i współpracowników [157]. Wycięte laserowo fragmenty zbierane były do probówek typu Eppendorf o pojemności 0,5 ml zawierających 200 μ l buforu pochodzącego z zestawu do izolacji niewielkich ilości RNA (PicoPure RNA Isolation Kit, #Kit0214, Arcturus, Sunnyvale, CA, USA). Po zakończeniu mikrodysekcji całkowite RNA wyizolowane zostało za pomocą tego zestawu zgodnie z protokołem podanym przez producenta. Ilość wyizolowanego RNA mierzona była za pomocą spektrofotometru NanoDrop-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Zazwyczaj z kompleksu podstawno-bocznego ciała migdałowatego jednego zwierzęcia uzyskiwano 40-60 ng całkowitego RNA.

Następnie 30 ng całkowitego RNA z każdego zwierzęcia poddano 2 rundom amplifikacji przy użyciu zestawu MessageAmp II aRNA (Ambion, Austin, TX, USA) zgodnie z protokołem zalecanym przez producenta. Do amplifikacji wykorzystano termocykler MJ Research Inc. (Cambridge, MA, USA), a czas transkrypcji *in vitro* wynosił 14 h w każdej z dwóch rund amplifikacji. Po każdej z rund amplifikacji ilość aRNA mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop-1000, a jego jakość sprawdzano na 1,5% żelu agarozowym.

Po amplifikacji po 3 µg aRNA z dwóch zwierząt z tej samej grupy eksperymentalnej połączono w 1 próbkę. W wyniku tych działań każda z grup eksperymentalnych była reprezentowana przez 2 próbki. Dla grupy zwierząt kontrolnych, które otrzymały sparowane bodźce warunkowy i bezwarunkowy, były to próbki oznaczone jako CP i CP1; dla zwierząt kontrolnych, które otrzymały bodźce niesparowane – CU i CU1; dla zwierząt będących w trakcie epileptogenezy, które otrzymały bodźce sparowane – EP i EP1; dla zwierząt będących w trakcie epileptogenezy, które otrzymały bodźce niesparowane – EU i EU1. Przedstawia to tabela 2.

3.6. Hybrydyzacja do mikromacierzy oligonukleotydowych oraz analiza uzyskanych danych

Badania z wykorzystaniem mikromacierzy oligonukleotydowych o wysokiej gęstości przeprowadzone zostały w Centrum Mikromacierzy DNA należącym do Centrum Biotechnologii przy Uniwersytecie w Turku (Finlandia). W badaniach wykorzystano 8 mikromacierzy oligonukleotydowych Rat Genome 230 2.0 Gene Chip (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Mikromacierze te zawierają 31099 zestawów sond reprezentujących ponad 28000 genów szczura. Całość doświadczenia przeprowadzono w oparciu o protokoły i odczynniki zalecane przez firmę Affymetrix, które stosowane są w Centrum Mikromacierzy DNA (<http://microarrays.btk.fi/index.php?id=874>).

Do jednej mikromacierzy Rat Genome 230 2.0 Gene Chips (Affymetrix) hybrydyzowano 5 µg aRNA pochodzącego z jednej próbki (CU, CU1, CP, CP1, EU, EU1, EP oraz EP1). Warunki reakcji przedstawione zostały w tabeli 3.

Dane dotyczące ekspresji każdej z 31099 sond na każdej z 8 mikromacierzy zostały zanalizowane wstępnie przy użyciu oprogramowania MAS 5.0 (Affymetrix). Dalszej analizie poddane zostały tylko sygnały z sond, których sygnał oznaczony został jako „Obecny” lub „Śladowy” („Present” i „Marginal”), w obu próbkach, w co najmniej jednej z badanych grup. Z 15560 takich sond 14466 przypisanych zostało do 11559 identyfikatorów z baz danych UniGene i Entrez Gene w oparciu o anotacje producenta (Rat230_2 Annotation, NetAffx, Affymetrix, wersja z 22 Marca 2007).

Tabela 3. Parametry charakteryzujące proces hybrydyzacji oraz skanowania mikromacierzy Rat Genome 230 2.0 Gene Chip (Affymetrix)

Table 3. Parameters characterizing hybridization and scanning process of each Rat Genome 230 2.0 Gene Chip (Affymetrix)

Protokół cRNA <i>cRNA protocol</i>	one-cycle (affymetrix IVT) EukGE-WS2v5_450
Wash A1 Recovery Mixes:	0
Wash A1 Temperature (°C):	30
Number of Wash A1 Cycles:	10
Mixes per Wash A1 Cycle:	2
Wash B Recovery Mixes:	0
Wash B Temperature (°C):	50
Number of Wash B Cycles:	6
Mixes per Wash B Cycle:	15
Stain Temperature (°C):	35
First Stain Time (seconds):	300
Wash A2 Recovery Mixes:	0
Wash A2 Temperature (°C):	30
Number of Wash A2 Cycles:	10
Mixes per Wash A2 Cycle:	4
Second Stain Time (seconds):	300
Third Stain Time (seconds):	300
Wash A3 Recovery Mixes:	0
Wash A3 Temperature (°C):	35
Number of Wash A3 Cycles:	15
Mixes per Wash A3 Cycle:	4
Holding Temperature (°C):	25
Fluidics Station:	1
Fluidics Module:	1
Scanner ID:	50205570
Pixel Size:	1.56 µm
Filter:	570 nm
Number of Scans:	1

Surowe dane wraz ze szczegółowym opisem przebiegu doświadczenia zostały umieszczone w bazie danych mikromacierzowych Gene Expression Omnibus prowadzonej przez National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) pod numerem GSE13624.

Do analizy biostatystycznej użyto wartości „log₂ (ekspresja)”, czyli logarytmu o podstawie 2 ze średniego profilu intensywności sygnału dla każdej ze zmapowanych sond podzielonego przez średni sygnał dla danego genu (ze wszystkich ośmiu próbek).

Za pomocą programu Mathematica v.6. (Wolfram Research) \log_2 (ekspresja), zwana dalej zlogarytmowaną ekspresją, poddana została:

- a) analizie wariancji z dwoma czynnikami (ANOVA) lub t-testowi;
- b) korekcie FDR (*false-discovery rate*) na wielokrotność testów; wartości p dla poszczególnych genów otrzymanych za pomocą ANOVA lub t-testu importowano do środowiska statystycznego R (<http://www.R-project.org>), w celu obliczenia wartości q przy użyciu odpowiednich algorytmów (R q -value package [193]);
- c) hierarchicznej analizie skupień (*hierarchical agglomerative clustering*);
- d) analizie skupień metodą K-medoids (*K-medoids clustering*);
- e) wizualizacji ekspresji poszczególnych genów w każdej z próbek;
- f) analizie nadreprezentacji grup funkcjonalnych genów z użyciem Gene Ontology [10] z wykorzystaniem programu Rank GStat [17] przy ustawieniach domyślnych: Wilcoxon Signed Rank test, Benjamini False Discovery Rate correction for multiple testing; jako „ranks” użyto wartości p uzyskanych za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA dla czynnika „epileptogeneza”.

Ponadto listę identyfikatorów z bazy UniGene dla genów, które w sposób istotny zmieniały swoją ekspresję pod wpływem epileptogenezy porównano z listą genów zamieszczoną w pracy Lukasiuk i współpracowników [116]. Lista ta przedstawia geny istotne dla procesów epileptogenezy i padaczki wyodrębnione na podstawie danych uzyskanych z mikromacierzy DNA i zawartych w publikacjach opisujących zmiany ekspresji genów zarówno w zwierzęcych modelach padaczki jak i u chorych na padaczkę. Aby umożliwić porównanie danych uzyskanych z innych niż szczur gatunków ssaków, identyfikatory z bazy Entrez Gene zostały zamienione na identyfikatory bazy HomoloGene (NCBI, Realease 54, March 2007).

3.7. Półilościowa reakcja odwrotnej transkrypcji i łańcuchowa reakcja polimerazy (RT-PCR)

W celu weryfikacji wyników otrzymanych za pomocą mikromacierzy wykorzystano zestaw do półilościowej oceny ilości RNA – QuantumRNA™ 18S Internal Standards (# 1716, Ambion, Austin, TX, USA) oraz aRNA, które wykorzystano do hybrydyzacji do mikromacierzy. Tym razem aRNA z każdego ze zwierząt było badane indywidualnie. Najpierw aRNA z każdego ze zwierząt poddane zostało reakcji odwrotnej transkrypcji (RT) z użyciem enzymu M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). Reakcję przeprowadzono w 50 μ l mieszaniny reakcyjnej. W tym celu 4 μ g aRNA mieszało z 2 μ l niespecyficznego starterów (Random Primers, Promega), a całość inkubowano w 70°C przez 5 min. Następnie próbki schłodzono w lodzie i odwirowano. Po czym

do dodano do nich 5 μ l buforu reakcyjnego (5x M-MLV buffer, Promega), 10 μ l mieszaniny deoksynukleotydów (10 mM dNTPmix, Finnzymes, Espoo, Finland), 1 μ l inhibitora rybonukleaz (RNAsin, Promega) i 2 μ l odwrotnej transkryptazy M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). Całość ponownie inkubowano w 37°C przez 1h. Następnie objętość mieszaniny dopełniono do 200 μ l i przechowywano w -20°C do czasu wykorzystania do reakcji łańcuchowej polimerazy. Ilość cDNA została zmierzona za pomocą spektrofotometru NanoDrop-1000.

Następnie przeprowadzono reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) z użyciem zestawu RNA – QuantumRNA™ 18S Internal Standards (Ambion), który umożliwia półilościową ocenę produktu. Reakcję przeprowadzono w 25 μ l mieszaniny zawierającej 5 μ g cDNA, 0,2 mM deoksynukleotydów (dNTPs, Finnzymes), 0,2 μ M starterów specyficznych dla danego genu, 0,25 μ l polimerazy DNA (Taq DNA polymerase, 5U/ μ l, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) oraz 2 μ l mieszaniny 18S starterów z kompetimerem (Quantum™ Internal Standard, Ambion) stanowiących wewnętrzny standard. Używano termocyklera (MJ Research Inc.) zaprogramowanego na: 94°C przez 30 s; 60°C przez 1min; 72°C przez 1min. Liczbę cykli jak również stosunek starterów 18S do kompetimera użyty dla poszczególnych genów ustalano wcześniej, gdyż w metodzie tej istotne jest, aby zatrzymać amplifikację w fazie jej logarytmicznego wzrostu, ponieważ jeśli reakcja osiągnie plateau, niemożliwa staje się półilościowa ocena wyników.

Następnie 25 μ l produktu reakcji mieszano z uniwersalnym buforem obciążającym do elektroforezy agarozowej i nakładano na 1,5% spolimeryzowany żel agarozowy. Elektroforezę przeprowadzano w buforze 1xTBE, a żel barwiono roztworem 1:10000 barwnika przyłączającego się do kwasów nukleinowych SYBR® Gold (SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Ilość produktu mierzono densytometrycznie przy użyciu systemu Gel Doc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), skanowano oraz poddawano obróbce komputerowej, używając programu Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories). Wydajność reakcji normalizowano przy użyciu standardu 18S.

Startery dla badanych genów wykorzystane w reakcji PCR zaprojektowano przy użyciu ogólnodostępnego w sieci Internet programu FastPCR (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>) w oparciu o dane zawarte na stronach firmy Affymetrix (Netaffx Analysis Centem). Sekwencję starterów użytych dla poszczególnych genów oraz wielkość produktu przedstawia tabela 4.

Otrzymane wartości poddano analizie statystycznej. Założenia analizy wariancji były sprawdzone testem Bartletta. Istotność różnic międzygrupowych była sprawdzana nieplanowanym testem najmniejszych istotnych różnic (NIR, *the least significance difference, LSD*). Przyjęto poziom istotności $p=0,05$.

Tabela 4. Charakterystyka starterów wykorzystanych w reakcji RT-PCR; pz – pary zasad*Table 4.* Characteristics of starters used for RT-PCR; bp – base pairs

Symbol genu	Startery		Produkt (pz)
	Starters		
Gene symbol	Wiodący Forward	Odwrotny Reverse	Product (bp)
Cst3	5'-agctccgcaggaggcagatgccca-3'	5'-gcagctggattttgtcagggtgtg-3'	319
Ctss	5'-cgtctcatctggaaaagaatc-3'	5'-gacacttttcatccatggcttt-3'	465
Nrn1	5'-ggctcctcctaatgagaagcgagg-3'	5'-gcagtggaactgaaggaggcca-3'	310
Dock3	5'-taacctctgcattctgtgc-3'	5'-gagctaaaaggcttgagc-3'	360

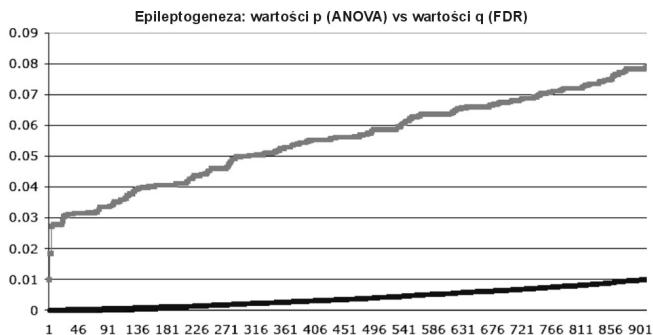
4. WYNIKI

4.1. Zmiany ekspresji genów w przebiegu procesu epileptogenezy

4.1.1. Badania z wykorzystaniem mikromacierzy Affymetrix

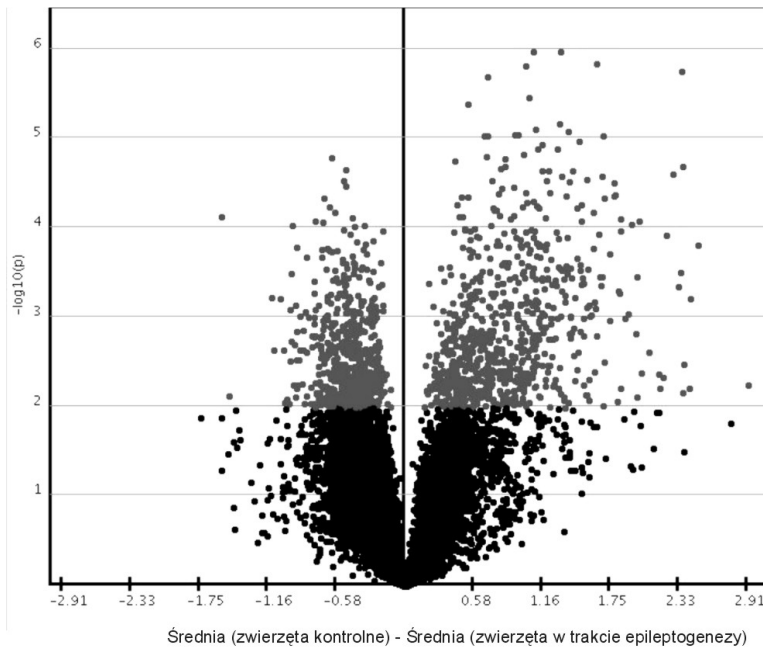
Aby wyszukać zmiany ekspresji genów istotnych dla procesu epileptogenezy w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego, dla wartości zlogarytmowanej ekspresji dokonano analizy wariancji z dwoma czynnikami głównymi ANOVA (dla czynników „epileptogeneza”, „parowanie bodźców” oraz ich interakcji) oraz t-testu porównującego zwierzęta kontrolne (CP, CP1, CU, CU1) oraz będące w trakcie epileptogenezy (EP, EP1, EU, EU1). Następnie za pomocą korekty FDR sprawdzono, czy otrzymane wartości p są istotne statystycznie.

Analiza wartości zlogarytmowanej ekspresji wykazała, że dla czynnika „epileptogeneza” uzyskane wartości p są istotne statystycznie po korekcie ze względu na liczbę równocześnie testowanych hipotez. Odcięcie wartości p na poziomie 0,01 (ANOVA) odpowiadało wartości $q < 0,08$ (czyli 8% false discovery rate). Podobne wyniki uzyskano porównując zwierzęta kontrolne (CP, CP1, CU, CU1) oraz będące w trakcie epileptogenezy (EP, EP1, EU, EU1) t-testem. Rycina 8 przedstawia wykres wartości p dla czynnika epileptogeneza (ANOVA) oraz odpowiadających im wartości q (FDR).



Rycina 8. Histogram przedstawiający wartości p dla czynnika epileptogeneza (ANOVA) – linia szara oraz odpowiadające im wartości q (FDR) – linia czarna. Na uwagę zasługuje pik niskich wartości p (czyli „true positive”) na tle spodziewanego losowo rozkładu jednostajnego. Odcięcie wartości p na poziomie 0,01 odpowiada wartości $q = 0,08$

Figure 8. Histogram of p -values for factor epileptogenesis (ANOVA) – grey line with corresponding q -values (FDR) – black line. Note the uniform distribution and peak of low p -values (that is “true positive”) at 0.01 that correspond to q -value = 0.08



Rycina 9. Wykres ilustrujący zmiany ekspresji genów w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego w 8 dniu epileptogenezy. Na osi X umieszczono różnice średnich z log (relative change) pomiędzy grupami porównywanymi t-testem, tj. CU, CU1, CP, CP1 vs EU, EU1, EP, EP1. Na osi Y umieszczono \log_{10} (wartości p) z t-testu. W trakcie epileptogenezy liczne geny w sposób znaczący zmieniają swoją ekspresję (szare kropki na wykresie)

Figure 9. Volcano plot illustrating changes in gene expression pattern in the basolateral complex of amygdala on the 8th day of epileptogenesis. The X-axis represents mean log (relative change) between groups compared using t-test, that is CU, CU1, CP, CP1 vs. EU, EU1, EP, EP1. The Y-axis represents \log_{10} (p-value) obtained by t-test. Grey dots represents numerous genes that changed their expression levels during epileptogenesis

Rycina 9 zaś, prezentuje różnice średnich wartości log (relative change) dla poszczególnych genów porównywanych t-testem w grupie zwierząt będących w trakcie epileptogenezy oraz zwierząt kontrolnych.

Analiza ANOVA wykazała, że w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego w 8 dni po urazie początkowym (czyli stanie drgawkowym) aż 657 genów miało zmienioną ekspresję w porównaniu do zwierząt kontrolnych. W grupie tej 363 geny zwiększyły, a 294 geny zmniejszyły swoją ekspresję. Geny, których ekspresja zmieniła się najbardziej przedstawia tabela 5. Na przykład do genów, których ekspresja zwiększała się najbardziej należą: Msr2_predicted (*macrophage scavenger receptor 2, predicted*) – ponad dwunastokrotnie czy LOC679629 (*similar to smoothelin*) i Fam64a (*family with sequence similarity 64, member A*) – około dziewięciokrotnie. Wśród genów, których

ekspresja zmniejszała się najbardziej znaleźć można: *Ngb* (*neuroglobin*) – pięciokrotnie czy *Hpcal4* (*hippocalcin-like 4*) i *Palmd* (*palmdelphin*) – ponad trzykrotnie.

Tabela 5. Lista genów, których poziom ekspresji zmienił się najbardziej w trakcie procesu epileptogenezy. E / C – poziom ekspresji danego genu u zwierząt będących w trakcie epileptogenezy w stosunku do poziomu ekspresji tego genu u zwierząt kontrolnych

Table 5. List of genes with the most prominent changes in their expression level in response to epileptogenesis. E / C – gene expression level in epileptogenic vs. control rats

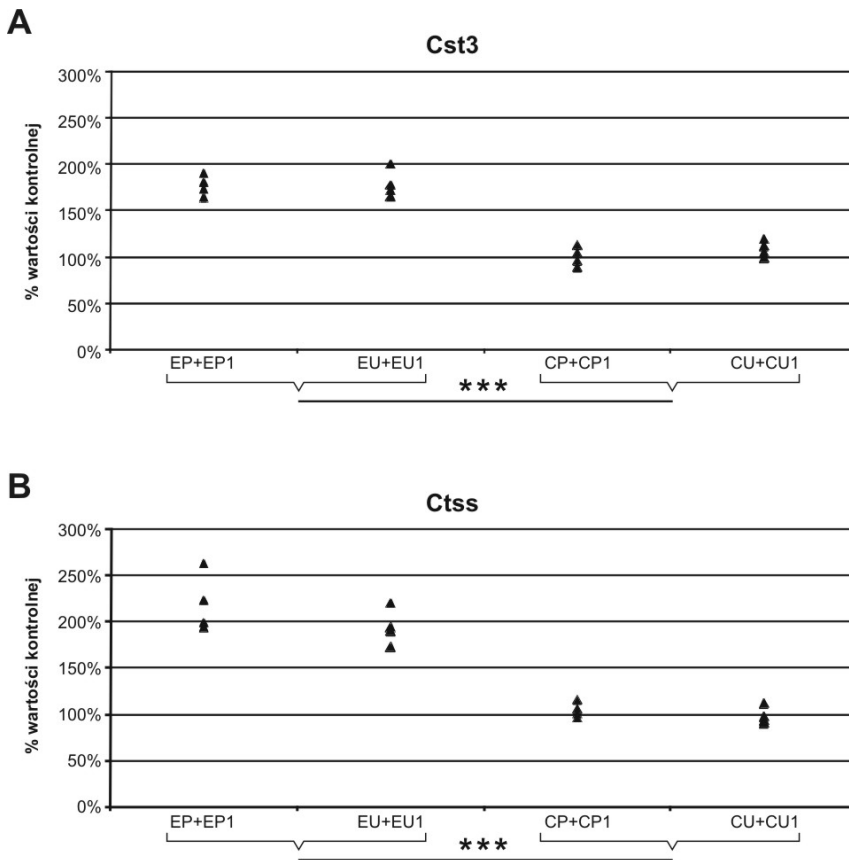
UniGene <i>UniGene</i>	Symbol genu <i>Gene symbol</i>	Nazwa genu <i>Gene name</i>	P (Anova)	E / C
Rn.76819	Msr2_predicted	Macrophage scavenger Receptor 2 (predicted)	0,0022	12,1
Rn.32487	LOC679629 / LOC687788	Similar to smoothelin, like	0,0017	9,2
Rn.167124	---	Transcribed locus	0,0032	9,0
Rn.35007	RGD1308747 predicted	Similar to hypothetical protein FLJ10156 (predicted)	0,0099	8,8
Rn.164418	---	Transcribed locus	0,0004	7,7
Rn.17885	Ms4a6b	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B	0,0061	7,1
Rn.91512	Gfap	Glial fibrillary acidic protein	0,0017	6,5
Rn.10022	Prkr	Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent	0,0096	6,5
Rn.45852	RGD1563207 predicted	Similar to epithelial stromal interaction 1 isoform a (predicted)	0,0014	6,1
Rn.6379	LOC362792	Similar to phospholipase D family, member 4	0,0002	6,0
Rn.6731	---	Transcribed locus	0,0050	6,0
Rn.32080	Aif1	Allograft inflammatory factor 1	0,0075	5,9
Rn.18019	Rnaset2 predicted	Ribonuclease T2 (predicted)	0,0007	5,9
Rn.10373	Mx1	Myxovirus (influenza virus) resistance 1	0,0006	5,8
Rn.10383	Oas1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1	0,0003	5,6
Rn.42903	Ppp3r1	Protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform	0,0009	5,5
Rn.147115	---	Transcribed locus	0,0045	5,5
Rn.6282	Igf1	Insulin-like growth factor 1	0,0034	5,5
Rn.14819	Tlr7_predicted	Toll-like receptor 7 (predicted)	0,0036	5,4
Rn.1475	Ctsz	Cathepsin Z	0,0009	5,3
Rn.164677	---	Transcribed locus	0,0002	5,3
Rn.34397	Tagln	Transgelin	0,0063	5,1
Rn.64635	Fgl2	Fibrinogen-like 2	0,0060	5,1
Rn.24799	Laptm5	Lysosomal-associated protein transmembrane 5	0,0001	5,1

UniGene <i>UniGene</i>	Symbol genu <i>Gene symbol</i>	Nazwa genu <i>Gene name</i>	P (Anova)	E / C
Rn.51246	---	Transcribed locus	0,0045	0,4
Rn.102820	Hpcal1	Hippocalcin-like 1	0,0076	0,4
Rn.103382	Mal2	Mal, T-cell differentiation protein 2	0,0005	0,4
Rn.35503	Odz2	Odd Oz/ten-m homolog 2	0,0067	0,4
Rn.147180	---	Transcribed locus	0,0041	0,4
Rn.15193	Slc4a10	Solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like	0,0076	0,4
Rn.33665	RGD1564773 predicted	Similar to GalNAc transferase 10 Isoform a (predicted)	0,0060	0,4
Rn.44476	Fgf14	Fibroblast growth factor 14	0,0023	0,4
Rn.162955	Nov	Nephroblastoma overexpressed gene	0,0004	0,4
Rn.10321	Calb2	Calbindin 2	0,0030	0,4
Rn.151470	Fstl5 predicted	Ollistatin-like 5 (predicted)	0,0057	0,4
Rn.156144	---	Transcribed locus	0,0076	0,4
Rn.198986	LOC684884 / LOC691835	Similar to Potassium channel tetramerisation domain-containi	0,0016	0,4
Rn.47513	Ltk predicted	Leukocyte tyrosine kinase (predicted)	0,0070	0,4
Rn.162367	Agtr2	Angiotensin II receptor, type 2	0,0007	0,4
Rn.63561	---	Transcribed locus	0,0051	0,3
Rn.24602	Palmd	Palmdelphin	0,0042	0,3
Rn.34529	Hpcal4	Hippocalcin-like 4	0,0052	0,3
Rn.64645	Ngb	Neuroglobin	0,0065	0,2

Tak więc nawet w stosunkowo niewielkiej strukturze, jaką jest kompleks podstawno-boczny ciała migdałowego, proces epileptogenezy znacząco wpływa na poziom ekspresji wielu genów.

4.1.2. Weryfikacja otrzymanych wyników metodą ilościowego RT-PCR

W celu weryfikacji wyników otrzymanych z wykorzystaniem mikromacierzy oligonukleotydowych Affymetrix, a dotyczących zmian ekspresji genów wywołanych procesem epileptogenezy wykonano analizę z wykorzystaniem reakcji odwrotnej transkrypcji (*reverse transcription*, RT) oraz reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction*, PCR). W reakcji łańcuchowej polimerazy wykorzystano zestaw QuantumRNA™ 18S Internal Standards firmy Ambion zawierający 18S RNA, który odgrywa rolę wewnętrznej kontroli, względem której określa się ekspresję badanego genu. W analizie tej wykorzystano indywidualnie aRNA każdego ze zwierząt biorących udział w eksperymencie (łącznie 16 szczurów).



Rycina 10. Weryfikacja wyników otrzymanych za pomocą mikromacierzy oligonukleotyduowych metodą półilościowego RT-PCR. Dane prezentowane są jako procent ekspresji 18S RNA. Każde kropki reprezentowane jest przez jeden punkt. Ekspresja dwóch wybranych genów, tj. Cst3 (**A**) oraz Ctss (**B**), była znacząco wyższa u zwierząt będących w trakcie epileptogenezy (aRNA z tych zwierząt po połączeniu hybrydizowano do mikromacierzy jako próbki: EP, EP1, EU, EU1) w porównaniu do zwierząt kontrolnych (aRNA z tych zwierząt po połączeniu hybrydizowano do mikromacierzy jako próbki: CP, CP1, CU, CU1) (***) $p < 0,001$, test NIR)

Figure 10. Verification of gene expression changes detected by oligomicroarrays using semi-quantitative multiplex RT-PCR. The data are presented as percentage of control value. Each dot represents one animal. The expression levels of two selected genes, that is Cst3 (A) and Ctss (B) were upregulated in rats undergoing epileptogenesis (aRNAs from these animals were pooled and hybridized to microarrays as samples: EP, EP1, EU, EU1) in comparison to control animals (aRNAs from these animals were pooled and hybridized to microarrays as samples: CP, CP1, CU, CU1); (***) $p < 0.001$, LSD test)

Z listy 657 genów związanych z procesem epileptogenezy wyselekcjonowanych przy użyciu mikromacierzy wybranych zostało 5 genów: beta-2 microglobulina (*beta 2 microglobulin*, B2m), fosfolipaza D1 (*phospholipase D1*,

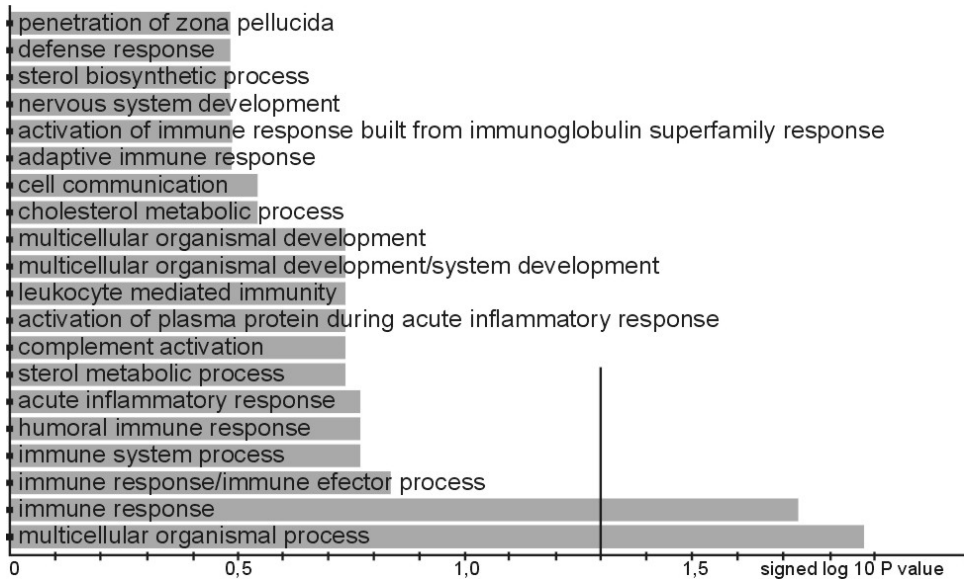
Pld1), czynnik różnicowania neurogenicznego 1 (*neurogenic differentiation*, Neurod1), cystatyna C (*cystatin C*, Cst3) oraz katepsyna S (*cathepsin S*, Ctss). Analiza statystyczna porównująca ekspresję danego genu wykrytą metodą PCR u zwierząt kontrolnych oraz będących w trakcie epileptogenezy wykazała, że pod wpływem procesów związanych z epileptogenezą zwiększa się ekspresja genów B2m, Pld1, Cst3 oraz Ctss, a zmniejsza genu Neurod1 ($p < 0,001$). Graficzne przedstawienie ekspresji genów Cst3 oraz Ctss u poszczególnych zwierząt (wyrażone jako procent wartości ekspresji wewnętrznej kontroli – 18S RNA) ilustruje rycina 10.

Dla genów B2m, Pld1 oraz Neurod 1 wartości te przedstawia rycina 2 opublikowana w pracy Majak i współpracowników [119]. Tak więc wyniki uzyskane metodą ilościowej RT-PCR potwierdziły wyniki otrzymane przy użyciu mikromacierzy.

4.1.3. Anotacje funkcjonalne genów (GO terms)

Gene Ontology można porównać do słownika pojęć opisujących produkty genów (RNA czy białka) w organizmach żywych. Pojęcia te, nazywane anotacjami funkcjonalnymi (*Gene Ontology terms*, GO terms), opisywane są w trzech kategoriach. Anotacje „proces biologiczny” (biological process) określają proces biologiczny, w którym dany gen bierze udział. Anotacje „funkcja molekularna” (molecular function) dotyczą podstawowych funkcji produktów danych genów, a „lokalizacja komórkowa” (*cellular compartment*) opisuje, w którym przedziale komórkowym dany produkt działa. Przy użyciu algorytmów zawartych w bazie Gene Ontology zbadano, które anotacje funkcjonalne są nadreprezentowane wśród genów zmieniających swoją ekspresję pod wpływem epileptogenezy w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego szczura. Analiza wykazała aż 20 nadreprezentowanych anotacji związanych z kategorią funkcjonalną „proces biologiczny”. Pełną listę tych anotacji przedstawia rycina 11. Jedną z najsilniej nadreprezentowanych była anotacja „odpowiedź immunologiczna” (immune response). Ponadto nadreprezentowanych było szereg anotacji związanych z funkcjonowaniem układu odpornościowego (*immune response/immune effector process, immune system process, humoral immune response*).

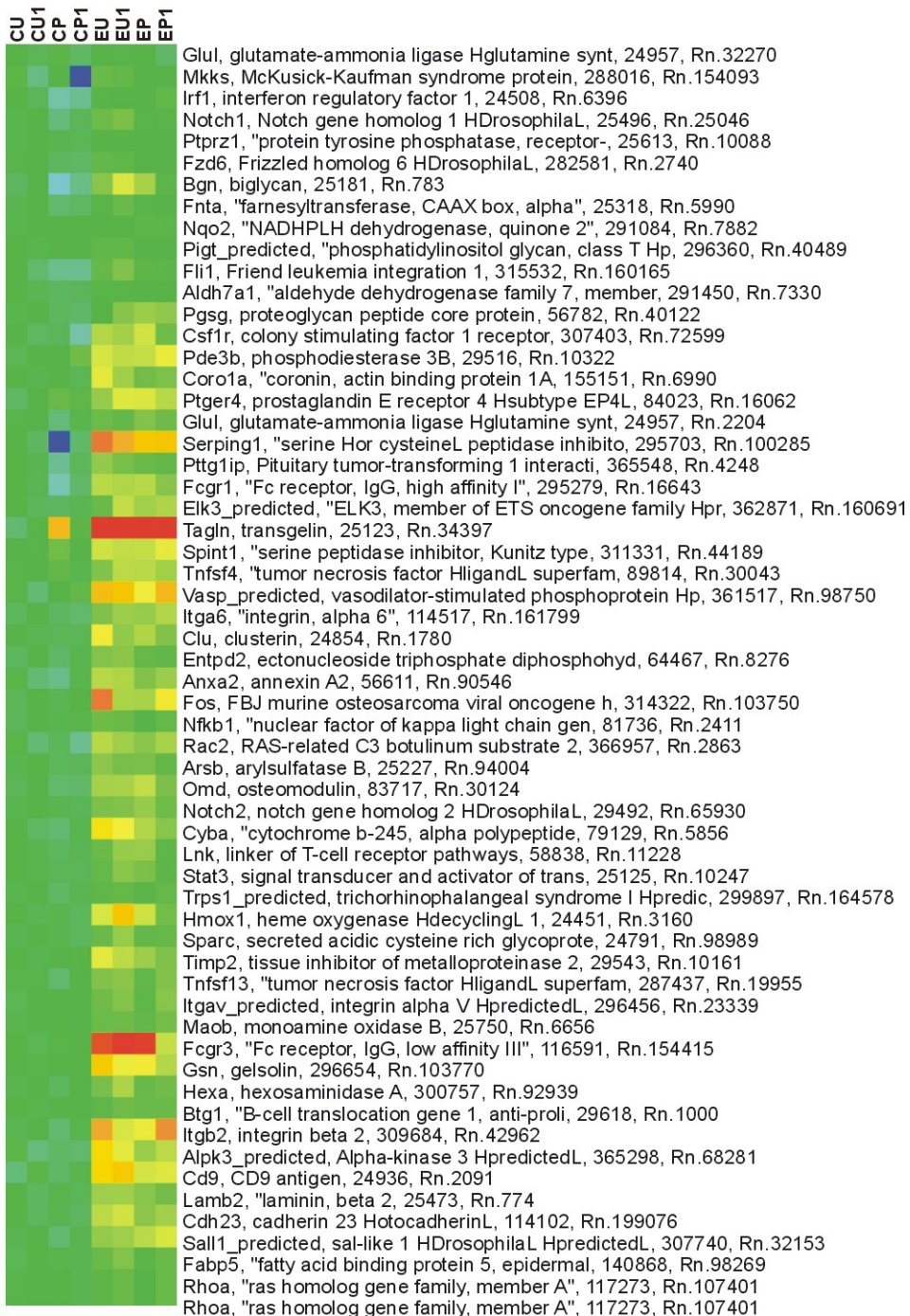
Analizując zmiany profili ekspresji poszczególnych genów dla anotacji „odpowiedź immunologiczna” jak i innych nadreprezentowanych anotacji (np.: „proces charakterystyczny dla organizmów wielokomórkowych”) zaobserwować można dwie grupy genów – te, które zwiększają i te, które zmniejszają swoją ekspresję w przebiegu procesu epileptogenezy. Ilustruje to rycina 12 przedstawiająca zmiany profili ekspresji genów zaangażowanych w proces epileptogenezy dla anotacji funkcjonalnej „proces charakterystyczny dla organizmów wielokomórkowych” (*multicellular organismal process*).



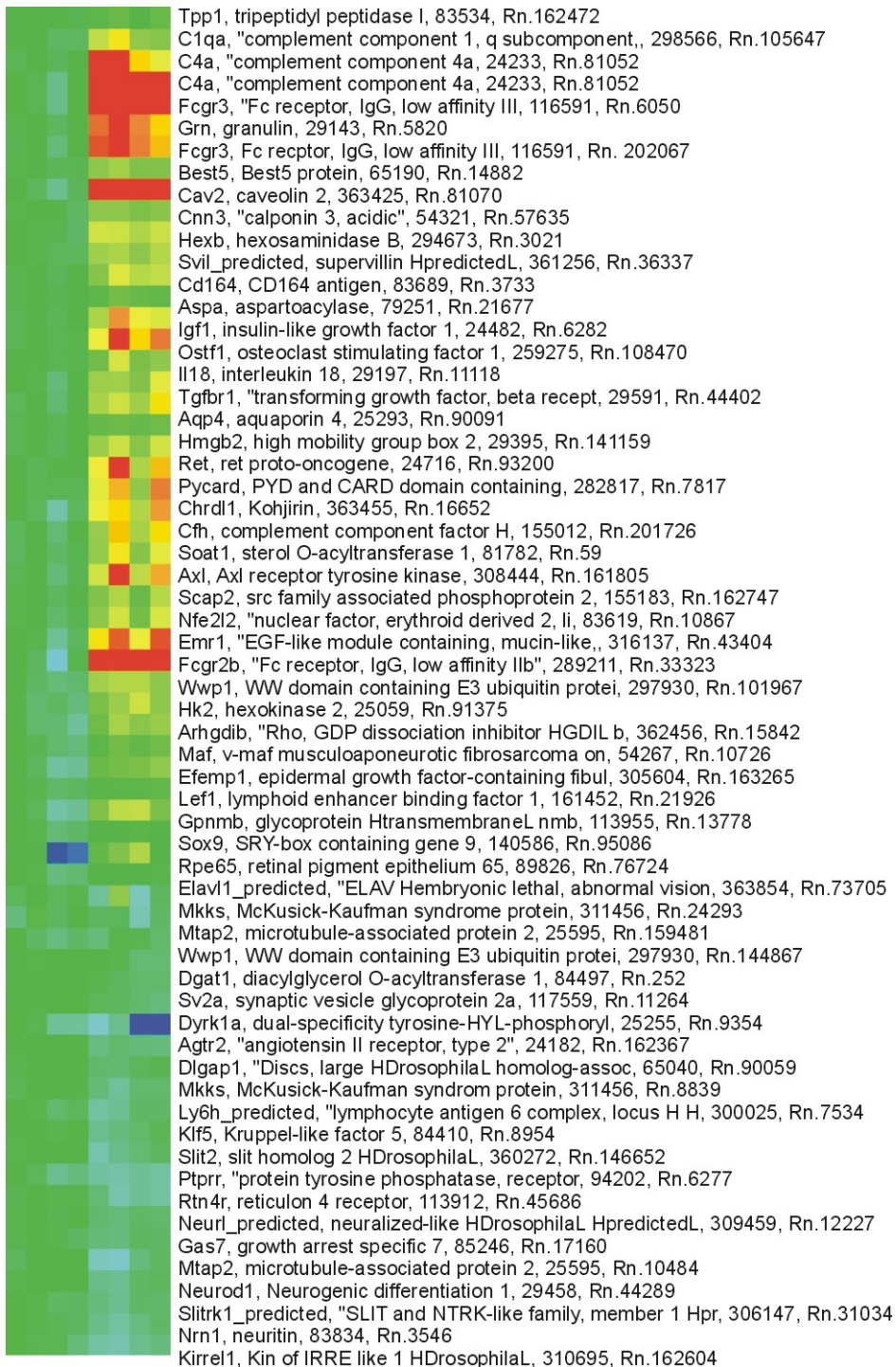
Rycina 11. Anotacje (GO terms), do których należą geny w sposób istotny zmieniające swoją ekspresję w trakcie epileptogenezy nadreprezentowane w kategorii „proces biologiczny”. Dane uzyskane w oparciu o algorytmy dostępne w bazie Gene Ontology. Pionowa kreska oznacza wartość $p = 0,05$ po korekcie wg Benjamini (FDR)

Figure 11. Subset of Gene Ontology terms (GO terms) overrepresented in “biological process” category to which genes of particular importance for epileptogenesis are linked. This data were obtained using algorithms available at Gene Ontology database. Vertical line indicates p -value = 0.05 after Benjamini correction (FDR)

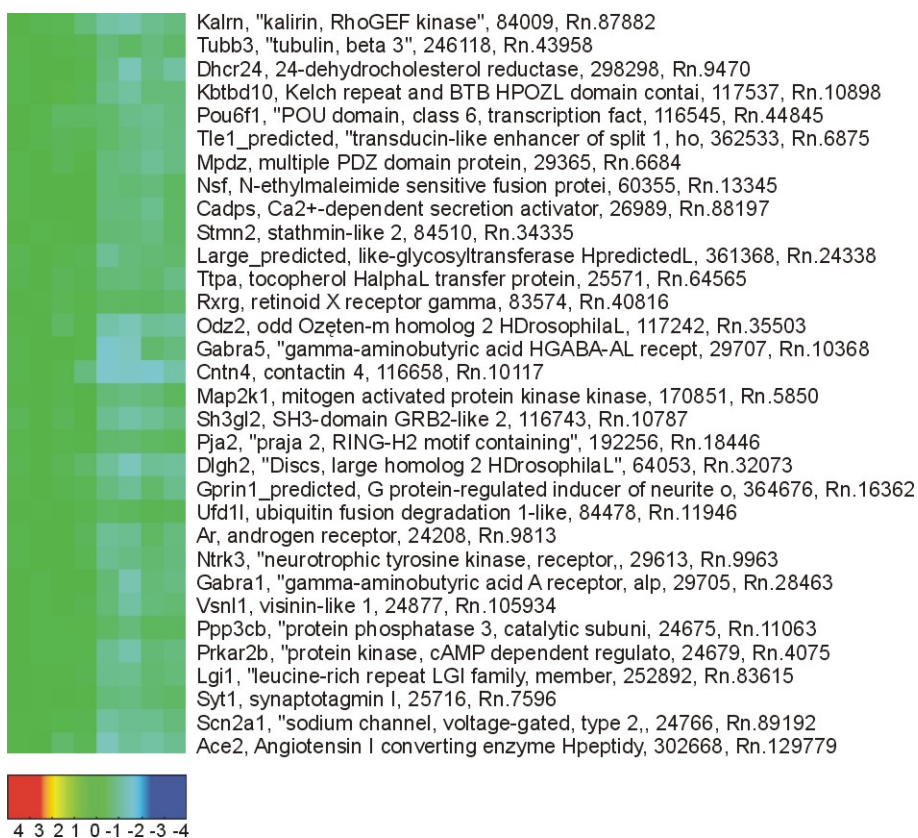
Powyższe dane wskazują, że wyżej wymienione procesy biologiczne, a co za tym idzie związane z nimi szlaki metaboliczne, są szczególnie istotne dla procesu epileptogenezy.



Ryc. 12 / Fig. 12



Ryc. 12 / Fig. 12



Rycina 12. Profile ekspresji genów istotnych dla procesu epileptogenezy, należących do anotacji (GO term): „proces charakterystyczny dla organizmów wielokomórkowych”, które pogrupowano przy użyciu algorytmów analizy skupień (*hierarchical agglomerative clustering*). W każdym z rzędów znajdują się profile ekspresji jednego genu (oznaczonego symbolem oraz nazwą) uzyskane z każdej z ośmiu badanych mikromacierzy. Ekspresję danego genu względem wartości kontrolnej reprezentuje skala kolorystyczna. Wśród genów tych wyróżnić można dwie zasadnicze grupy: geny, które zwiększają oraz geny, które zmniejszają swoją ekspresję w trakcie procesu epileptogenezy (EU, EU1, EP, EP1 vs CU, CU1, CP, CP1)

Figure 12. Expression profiles of the epileptogenesis-regulated genes assigned to overrepresented GO term “multicellular organismal process” which are grouped by hierarchical agglomerative clustering and represented by conventional heat maps. Each row contains the expression profiles of one gene (indicated by gene symbol and name) obtained from eight microarrays used in the study. The expression level of each gene in relation to its control value is represented by color scale. These genes segregate into two groups of up- or down-regulated genes following epileptogenesis-inducing insult (EU, EU1, EP, EP1 vs CU, CU1, CP, CP1)

4.1.4. Porównanie z wynikami otrzymanymi za pomocą mikromacierzy w innych modelach epileptogenezy i padaczki

Listę 657 genów, które zmieniały ekspresję pod wpływem epileptogenezy, porównano z listą genów zamieszczoną w publikacji Lukasiuk i współpracowników [116]. W pracy tej autorzy porównali dane z kilku publikacji charakteryzujących zmiany ekspresji genów w trakcie epileptogenezy i padaczki, a uzyskanych przy pomocy różnych typów mikromacierzy DNA. Należy również zaznaczyć, że te dane dotyczą zarówno modeli zwierzęcych epileptogenezy i padaczki (w których czynnikiem zapoczątkowującym proces epileptogenezy był stan drgawkowy lub uraz mózgu) jak i tkanki uzyskanej w wyniku resekcji ognisk padaczkorodnych u chorych cierpiących na padaczkę.

Porównanie to wykazało, że 81 z 657 genów, które zmieniały swoją ekspresję w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego w 8 dniu epileptogenezy było już wcześniej wiązane z procesami epileptogenezy lub padaczki, zarówno w modelach zwierzęcych jak i u ludzi. Pełny wykaz tych genów przedstawia tabela 2 opublikowana w pracy Majak i współpracowników [119].

Tak więc zmiany ekspresji 81 genów w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego wywołane procesem epileptogenezy, nie są charakterystyczne wyłącznie dla użytego przez mnie punktu czasowego, modelu padaczki skroniowej czy struktury mózgu.

4.2. Wpływ epileptogenezy na procesy uczenia się i pamięci emocji w modelu klasycznego warunkowania strachu

4.2.1. Różnice w reakcji warunkowej obserwowane u zwierząt kontrolnych oraz będących w trakcie epileptogenezy

Uzyskane przeze mnie wyniki dowodzą, że już jednokrotna prezentacja sparowanych bodźców: warunkowego (dźwięk) i bezwarunkowego (szok elektryczny), sprawia, że zarówno szczury kontrolne jak i te będące w trakcie epileptogenezy uczą się związku między jednym a drugim bodźcem, czyli reakcji warunkowej. Miarą reakcji warunkowej w modelu klasycznego warunkowania strachu jest czas, w jakim zwierzęta pozostają w bezruchu (freezing). Podczas 20-sekundowej prezentacji dźwięku w trakcie drugiej sesji, zarówno zwierzęta kontrolne jak i zwierzęta w trakcie epileptogenezy pozostawały w bezruchu znacząco dłużej niż podczas prezentacji dźwięku w pierwszej sesji, tj. średnio $12,4 \pm 3,8$ s vs $1,3 \pm 1,6$ s w grupie kontrolnej oraz $6,0 \pm 0,8$ s vs $1,4 \pm 1,1$ s w grupie będącej w trakcie epileptogenezy ($p < 0,029$). Czas bezruchu podczas prezentacji dźwięku w drugiej sesji u zwierząt kontrolnych oraz będących w trakcie epileptogenezy, które otrzymały bodźce niesparowane, nie różnił się między sesjami. Należy także podkreślić, że w grupach szczurów, którym prezentowano bodźce

sparowane, czas bezruchu podczas prezentacji dźwięku w drugiej sesji był prawie dwukrotnie krótszy u zwierząt w trakcie epileptogenezy niż u zwierząt kontrolnych, tj. $12,4 \pm 3,8$ s vs $6,0 \pm 0,8$ s ($p < 0,029$). Podsumowując, już w 8 dniu po stanie drgawkowym u zwierząt będących w trakcie epileptogenezy, zaobserwować można upośledzenie procesu uczenia się asocjacji bodźca warunkowego i bezwarunkowego.

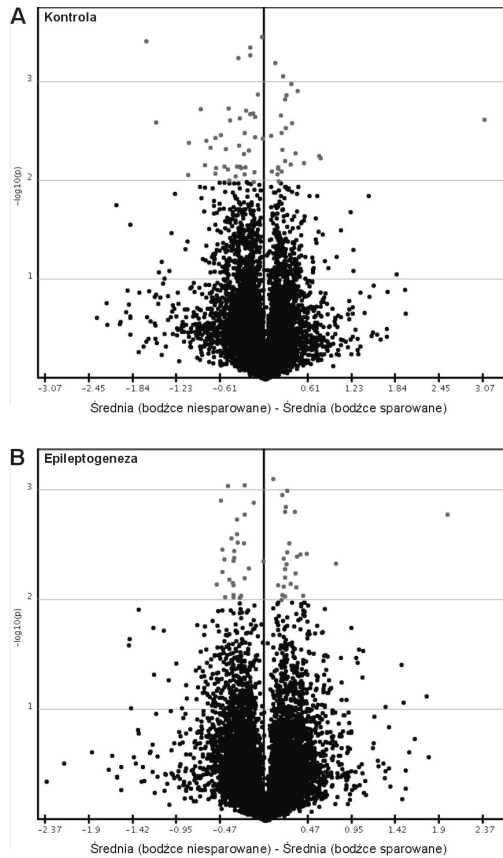
4.2.2. Wpływ epileptogenezy na zmiany ekspresji genów pod wpływem klasycznego warunkowania strachu

4.2.2.1. Wyniki otrzymane za pomocą mikromacierzy Affymetrix

Aby wyszukać geny istotne dla procesu warunkowania strachu w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego, analizowano ekspresję genów u zwierząt będących w trakcie epileptogenezy oraz zwierząt kontrolnych, które otrzymały dwukrotnie prezentację sparowanych lub niesparowanych bodźców: warunkowego (dźwięk) i bezwarunkowego (szok elektryczny).

W tym celu wykonano analizę wariancji z dwoma czynnikami głównymi (ANOVA, dla czynników bodźce sparowane vs bodźce niesparowane) oraz t-test porównujący zwierzęta kontrolne albo będące w trakcie epileptogenezy, które otrzymały bodźce sparowane i niesparowane (CP, CP1 vs CU, CU1 oraz EP, EP1 vs EU, EU1). Następnie za pomocą korekty FDR sprawdzono, czy otrzymane wartości p są istotne statystycznie. Obie analizy ujawniły, że procedura warunkowania strachu wywołała niewielkie zmiany ekspresji w nielicznej grupie genów, zarówno u zwierząt kontrolnych jak i będących w trakcie epileptogenezy (rycina 13). Jednakże korekta FDR wykazała, że wartości q dla otrzymanych genów są równe 1, tak więc nie możemy wiarygodnie zidentyfikować genów leżących u podłoża procesu warunkowania strachu wśród wszystkich genów.

W związku z tym, aby zidentyfikować geny związane z procedurą warunkowania strachu, na które istotny wpływ ma epileptogeneza, najpierw wytypowano 657 genów, dla których wartość p dla czynnika „epileptogeneza” była mniejsza niż 0,01. Z kolei spośród tych genów wybrano tylko takie, dla których wartość p dla interakcji pomiędzy tym czynnikiem a czynnikiem „bodźce sparowane” była również mniejsza od 0,01. W wyniku tej analizy otrzymano 26 genów. Wartości q dla interakcji obu tych czynników dla tych 26 genów otrzymane po korekcie FDR były mniejsze od 0,25. Wytypowane w ten sposób geny to geny związane z procesem epileptogenezy, na ekspresję których ma wpływ procedura warunkowania strachu (czyli prezentacja sparowanych bodźców warunkowego i bezwarunkowego). Przedstawia je tabela 6.

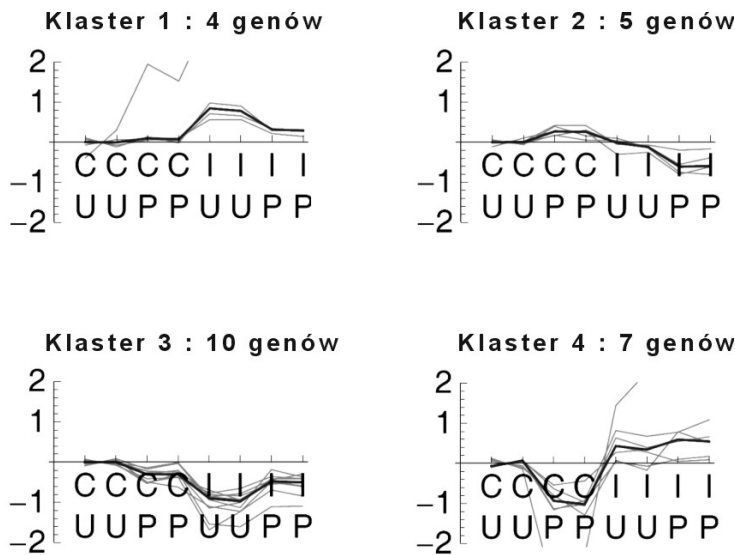


Rycina 13. Wykresy typu volcano ilustrujące zmiany ekspresji genów w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego po warunkowaniu strachu u zwierząt kontrolnych (**A**) oraz będących w trakcie epileptogenezy (**B**). Na osi X umieszczono różnicę średnich z \log (*relative change*) pomiędzy grupami porównywanymi t-testem, tj. CU, CU1 vs CP, CP1 dla zwierząt kontrolnych (**A**) oraz EU, EU1 vs EP, EP1 dla zwierząt w trakcie epileptogenezy (**B**). Na osi Y umieszczono \log_{10} (wartość p) z t-testu. W obu grupach procedura warunkowania strachu wywołała niewielkie zmiany ekspresji nielicznych genów w porównaniu do zwierząt, które otrzymały bodźce niesparowane (szare kropki na wykresach A i B)

Figure 13. Volcano plot illustrating changes in gene expression pattern in the basolateral complex of amygdala after fear conditioning in control (A) and epileptogenic (B) animals. The X-axis represents mean $\log(\text{relative change})$ between groups compared using t-test, that is CU, CU1 vs. CP, CP1 (A) for controls and EU, EU1 vs. EP, EP1 (B) for rats undergoing epileptogenesis. The Y-axis represents $\log_{10}(p\text{-value})$ obtained by t-test. In both groups the fear conditioning procedure resulted in mild changes in expression levels of few genes as compared to animals which received unpaired presentation of these stimuli (grey dots in A and B)

4.2.2.2. Analiza z wykorzystaniem algorytmu grupowania K-medoids

Analiza z wykorzystaniem algorytmu grupowania miała na celu wyszukanie genów, których profile ekspresji zmieniają się w podobny sposób. W swoich badaniach wykorzystałam algorytm grupowania K-medoids (przy liczbie klasterych $K=4$), aby wśród genów (dla których wartość p dla interakcji czynników „epileptogeneza i „bodźce sparowane” była mniejsza od 0,01) wyodrębnić grupy o podobnych profilach ekspresji. Na uwagę zasługuje fakt, że pięć genów (Dock3, Itsn1, Kcnc2, Myt1l oraz Nrn1) z grupy 26 genów (czyli genów związanych z procesem epileptogenezy, na ekspresję których ma wpływ procedura warunkowania strachu), zaangażowanych w procesy związane z plastycznością neuronalną, znajdowały się w klastrze 3, czyli posiadały profile ekspresji, które zmieniały się w podobny sposób w poszczególnych grupach doświadczalnych. Ilustrują to rycina 14 oraz tabela 6.



Rycina 14. Wyniki zastosowania algorytmu grupowania profili ekspresji genów, na które wpływ miały zarówno epileptogeneza jak i procedura warunkowania strachu. Przedstawiono wyniki algorytmu K-medoids dla profili ekspresji 26 genów, dla których wartość p w ANOVA $< 0,01$ przy $K = 4$. Zlogarytmowane ekspresje każdego z genów przedstawione są jako line szare, podczas gdy linia czarna przedstawia średnią wartość zlogarytmowanej ekspresji dla danego klastrera

Figure 14. Clustering of expression profiles of genes most strongly affected by the interaction between epileptogenesis and fear conditioning. Results of the K-medoid clustering of expression profiles of 26 genes with ANOVA interaction p -value < 0.01 for $k=4$ is presented. Log2 expression profiles of individual genes are plotted in gray and the median profile of each cluster is plotted in black

Tabela 6. Charakterystyka genów w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego, na poziom ekspresji których ma wpływ zarówno proces epileptogenezy jak i procedura warunkowania strachu. Informacje dotyczące funkcji poszczególnych genów lub ich produktów opracowano przy użyciu baz PubMed oraz Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dla każdego z genów podano także numer klastera, w którym dany gen znalazł się w wyniku zastosowania algorytmu grupowania K-medoids (przy liczbie klasterów K=4)

Table 6. Characteristic of genes which expression levels are affected both, by epileptogenesis and fear conditioning procedure. The information about function of individual genes was obtained in PubMed and Entrez Gene databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). For each gene the number of cluster assigned by K-medoids clustering (cluster number K=4) is also provided

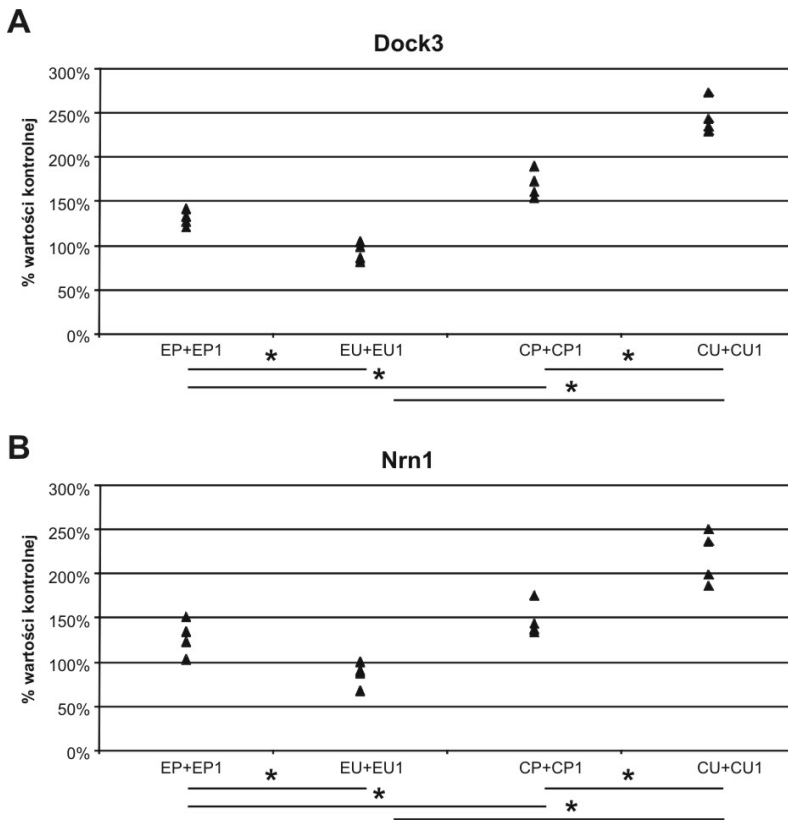
Symbol genu Gene symbol	Nazwa genu Gene name	Unigene Unigene	Funkcja genu Gene function	Numer klastera Cluster number
Pigt	phosphatidylinositol glycan, class T	Rn.40489	różnicowanie neuronów, zaprogramowana śmierć komórki	1
Gnb211	guanine nucleotide binding protein beta polypeptide 2 like 1	Rn.55487	plastyczność neuronalna; przekazywanie z udziałem wapnia; rozwój OUN; wydzielanie neuroprzekazników	1
RT1-M3	RT1 class Ib, locus M3	Rn.92606	nieznana	1
Oas1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1	Rn.10383	nieznana	1
Asna1	arsA arsenite transporter, ATP-binding homolog 1	Rn.7354	nieznana	2
LOC366012	similar to RIKEN cDNA G430055L02	Rn.105581	nieznana	2
Dgat1	diacylglycerol O-acyltransferase 1	Rn.252	nieznana	2
EST	transcribed locus	Rn.22097	nieznana	2
EST	transcribed locus	Rn.29773	nieznana	2
Myt11	myelin transcription factor 1-like	Rn.10559	plastyczność neuronalna, rozwój OUN, regulacja transkrypcji	3
Kcnc2	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 2	Rn.9733	plastyczność neuronalna, rozwój OUN	3
Nrn1	neurexin	Rn.3546	plastyczność neuronalna, rozwój OUN, neurogeneza	3
Dock3	dedicator of cytokinesis 3	Rn.19982	plastyczność neuronalna	3
Itsn1	intersectin 1	Rn.48657	plastyczność neuronalna	3
Armc1_predicted	admadillo repeat containing 1	Rn.17507	nieznana	3
EST	transcribed locus	Rn.167869	nieznana	3
Klf5	Kruppel-like factor 5	Rn.8954	nieznana	3
EST	transcribed locus	Rn.24009	nieznana	3

Symbol genu <i>Gene symbol</i>	Nazwa genu <i>Gene name</i>	Unigene <i>Unigene</i>	Funkcja genu <i>Gene function</i>	Numer klastera <i>Cluster number</i>
EST	transcribed locus	Rn.169618	nieznana	3
Kctd12_ predicted	potassium channel tetramerisation domain	Rn.13832	rozwój OUN, neurogeneza	4
EST	transcribed locus	Rn.46692	nieznana	4
Nid1	nidogen 1	Rn.105658	plastyczność neuronalna, rozwój OUN, neurogeneza	4
Cyp7b1	cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1	Rn.53969	uczenie się i pamięć	4
Baz1a_ predicted	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A	Rn.1864	nieznana	4
EST	transcribed locus	Rn.164418	nieznana	4
RGD1560 157	similar to hypothetical protein LOC168850	Rn.141461	nieznana	4

4.2.2.3. Weryfikacja otrzymanych wyników przy użyciu półilościowego RT-PCR

W celu weryfikacji wyników otrzymanych przy użyciu mikromacierzy oligonukleotydowych wykonano półilościową reakcję RT-PCR dla 4 wybranych genów: Dock3 (*dedicator of cyto-kinesis 3*), Nrn1 (*neuritin 1*), Kcnc2 (*potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 2*) i Cyp7b1 (*cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1*). Analiza statystyczna porównująca ekspresję genów wykrytą metodą PCR potwierdziła, że prezentacja sparowanych bodźców: warunkowego i bezwarunkowego obniża ekspresję danych genów u zwierząt kontrolnych, podczas gdy podwyższa ekspresję tych genów u szczurów w trakcie epileptogenezy ($p \leq 0,005$). Graficzne przedstawienie ekspresji genów Nrn1 i Dock3 u poszczególnych zwierząt w każdej z grup eksperymentalnych (wyrażone jako procent wartości ekspresji wewnętrznej kontroli) ilustruje rycina 15. Dla genów Cyp7b1 oraz Kcnc2 wartości te przedstawia rycina 2 opublikowana w pracy Majak i współpracowników [119].

Tak więc część wyników uzyskanych przy użyciu mikromacierzy potwierdzona została metodą RT-PCR.



Rycina 15. Weryfikacja wyników otrzymanych za pomocą mikromacierzy oligonukleotydowych metodą półilościowego RT-PCR. Dane prezentowane są jako procent wartości kontrolnej. Każde zwierzę reprezentowane jest przez jeden punkt. Ekspresja dwóch wybranych genów, tj. *Nrn1* oraz *Dock3*, zwiększała się pod wpływem warunkowania strachu u zwierząt będących w trakcie epileptogenezy (aRNA z tych zwierząt po połączeniu hybrydyzowano do mikromacierzy jako próbki: EP, EP1 vs EU, EU1), podczas gdy zmniejszała się u zwierząt kontrolnych (aRNA z tych zwierząt po połączeniu hybrydyzowano do mikromacierzy jako próbki: CP, CP1 vs CU, CU1); (* $p < 0,05$, test NIR)

Figure 15. Verification of gene expression changes detected by oligomicroarrays using semi-quantitative multiplex RT-PCR. The data are presented as percentage of control value. Each dot represents one animal. The expression levels of two selected genes, that is *Nrn1* (A) and *Dock3* (B) were upregulated after fear conditioning procedure in animals undergoing epileptogenesis (aRNAs from these animals were pooled and hybridized to microarrays as samples: EP, EP1 vs. EU, EU1) and downregulated in control animals (aRNAs from these animals were pooled and hybridized to microarrays as samples: CP, CP1 vs. CU, CU1); (* $p < 0.05$, LSD test)

5. DYSKUSJA

5.1. Epileptogeneza w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego

5.1.1. *Zmiany ekspresji licznych genów w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego szczura wywołane procesem epileptogenezy*

W ostatnich latach opublikowanych zostało wiele badań charakteryzujących ekspresję genów w przebiegu padaczki u ludzi [15, 16, 48, 81, 109, 141, 212]. Zazwyczaj do badań tych wykorzystuje się fragmenty tkanki uzyskane drogą resekcji ogniska padaczkorodnego [16, 48, 96]. Natomiast podobne badania wykorzystujące modele doświadczalne padaczki pozwalają na charakterystykę procesów zachodzących w trakcie epileptogenezy, które prowadzą do rozwoju padaczki [16, 46, 59, 66, 71, 116, 202].

Swoje badania ograniczyłam do niewielkiego obszaru mózgowia, jakim jest kompleks podstawno-boczny ciała migdałowatego szczura. Przy użyciu mikromacierzy oligonukleotydowych Affymetrix zawierających sondy reprezentujące cały genom szczura stwierdziłam, że w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego, aż 657 genów zmieniło swoją ekspresję w trakcie procesu epileptogenezy. Należy wspomnieć, że wiele z nich nie było jeszcze nigdy wiązanych z procesami epileptogenezy lub padaczki.

Pierwsze mikromacierze cDNA zawierały od kilkuset do kilku tysięcy sond reprezentujących tylko część genomu wybranego organizmu. Dopiero postęp technologiczny umożliwiający uzyskanie wysokiej gęstości sond w jednej mikromacierzy oraz zsekwencjonowanie genomu wielu organizmów roślinnych i zwierzęcych, umożliwiło wprowadzanie do badań mikromacierzy zawierających cały genom danego organizmu. Na przykład Lukasiuk i współpracownicy [115] przeprowadzili globalną analizę ekspresji genów zaangażowanych w epileptogenezę i pełnoobjawową padaczkę, w modelu eksperymentalnym wykorzystującym drażnienie elektryczne ciała migdałowatego szczura, czyli modelu, który ja również zastosowałam w swoich badaniach. W swoim doświadczeniu autorzy ci hybrydyzowali RNA wyizolowane z hipokampa właściwego lub płata skroniowego szczura do mikromacierzy cDNA zawierającej około 5000 sond w pierwszym, czwartym i czternastym dniu epileptogenezy, jak również u szczurów, u których w 14 dniu po indukcji stanu drgawkowego stwierdzono samoistne nawracające drgawki. Badacze ci stwierdzili zmienioną ekspresję w przypadku 87 genów w zespole hipokampa i 208 genów w strukturach będących odpowiednikiem płata skroniowego naczelnych w co najmniej jednym ze wspomnianych punktów czasowych. W moim badaniu zaobserwowałam aż 657 genów, których ekspresja zmieniła się w jednym punkcie czasowym w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego, będącego stosunkowo niewielką częścią płata

skroniowego użytego w badaniu Lukasiuk i współpracowników [115]. Tak więc wykorzystanie mikromacierzy oligonukleotydowych Affymetrix zawierających sondy molekularne reprezentujące cały genom szczura pozwala na zbadanie zmian transkryptomu zachodzących pod wpływem epileptogenezy nawet w tak niewielkiej strukturze, jaką jest kompleks podstawno-boczny ciała migdałowego szczura.

5.1.2. Molekularne podobieństwa procesu epileptogenezy w różnych modelach doświadczalnych padaczki oraz padaczki u ludzi

W ostatnich latach opublikowano szereg badań wykorzystujących mikromacierze w celu zidentyfikowania genów odpowiedzialnych za mechanizmy prowadzące do rozwoju padaczki (epileptogenezy) oraz postęp tej choroby w różnych modelach doświadczalnych oraz w padaczce u ludzi. Co więcej, rozwój metod bioinformatycznych wykorzystujących informacje zawarte w dostępnych powszechnie bazach danych charakteryzujących funkcję genów (np. Gene Ontology, National Center for Biotechnology Information, itp.) umożliwił wykonanie pierwszych metaanaliz, których celem było znalezienie genów jak również klas funkcjonalnych genów istotnych dla tych procesów.

W pierwszej kolejności uzyskane przez siebie wyniki porównałam z metaanalizą wykonaną przez Lukasiuk i współpracowników [116], którzy podjęli próbę identyfikacji mechanizmów molekularnych charakteryzujących proces epileptogenezy, wykorzystując dane uzyskane za pomocą mikromacierzy w modelach doświadczalnych, w których urazem początkowym były SE lub uraz mózgu. Porównanie to wykazało, że 81 genów spośród tych, które wyselekcjonowałam jako istotne dla procesu epileptogenezy w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowego, było wcześniej wymienione w opracowaniu Lukasiuk i współpracowników [116].

Jednym z genów, wspólnych dla mojego badania jak i innych zajmujących się problematyką epileptogenezy i padaczki, jest gen kodujący cystatynę C (Cst3). Cystatyna C to inhibitor proteaz cysteinowych, który po raz pierwszy powiązany został z procesem epileptogenezy przez Lukasiuk i współpracowników [115]. W badaniu tym wykorzystany został ten sam model zwierzęcy, który ja zastosowałam w swoich badaniach, lecz badano ekspresję genów w strukturach płata skroniowego lub hipokampa u szczurów w pierwszym, czwartym oraz czternastym dniu trwania epileptogenezy oraz u zwierząt, u których w czternastym dniu po indukcji stanu drgawkowego stwierdzono padaczkę. Ponadto przy użyciu metod immunohistochemicznych wykazano, że podczas epileptogenezy oprócz ekspresji genu, wzrastał także poziom białka w komórkach mikrogleju oraz neuropilu, zwłaszcza w strukturach dotkniętych procesem neurozwyrodnienia [115]. Dalsze badania wykazały, że poziom tego białka wzrasta w trakcie epileptogenezy również w innych modelach eksperymentalnych padaczki (np.

wywołanej podaniem kwasu kainowego lub udarem fototrombotycznym), jak również w hipokampie szczurów i ludzi z padaczką skroniową [7, 154, 155, 156]. Rola cystatyny C w mózgu jest nadal niewyjaśniona. Jako inhibitor katepsyn B, H i L, cystatyna C może regulować procesy proteolizy [64, 208]. Udowodniono jednak, że białko to wpływa także na procesy związane z neurogenezą w zakręcie zębatym hipokampa [154, 155, 204].

Kolejne 2 geny, wspólne dla publikacji Lukasiuk i współpracowników [116] jaki i mojego badania, to geny kodujące beta-2-mikroglobulinę oraz katepsynę S. Oba geny zostały wcześniej opisane przez Lieuallen i współpracowników [110] jako te, których ekspresja jest trwale zwiększona u myszy, u których wykonano knock-out genu kodującego cystatynę B (Cstb). Konsekwencją mutacji tego genu u człowieka jest miokloniczna padaczka Unverrichta-Lundborga, a wyżej wspomniane myszy stanowią doświadczalny model tej choroby [147].

Katepsyna S należy do rodziny proteaz cysteinowych. Udowodniono, że oprócz swojej fizjologicznej roli w metabolizmie białek komórkowych, katepsyna S bierze udział w prezentacji antygenów oraz moduluje procesy zapalne [216, 230]. W mózgu katepsyna S zlokalizowana jest przede wszystkim w komórkach mikrogleju [4, 110]. Inhibitorem katepsyny S jest cystatyna B, co potwierdziło się u chorych na padaczkę Unverrichta-Lundborga, u których zmniejszona aktywność cystatyny B wiązała się ze zwiększeniem aktywności katepsyny S [170]. Ekspresja genu kodującego katepsynę S jak również poziomu białka ulegał zwiększeniu w hipokampie myszy, które przeżyły stan drgawkowy wywołany podaniem kwasu kainowego [4]. Tak więc zwiększenie aktywności tego enzymu obserwowane jest w różnych modelach padaczki u zwierząt jak i w przypadku padaczki u ludzi. Dokładna rola katepsyny S w tych procesach nie jest jednak znana. Może mieć ona jednak związek z procesami odpowiedzi immunologicznej, których istotny wpływ na rozwój i przebieg procesu padaczkowego został także opisany w tej pracy.

Beta-2-mikroglobulina (B2m) to niskocząsteczkowe białko obecne na powierzchni większości komórek ustroju, a zwłaszcza na limfocytach T, B oraz makrofagach. Może ono występować jako wolny monomer lub integralna część antygenów głównego układu zgodności tkankowej klasy I. Białko to wykorzystuje się jako marker diagnostyczny stosowany w chorobach układu immunologicznego, schorzeniach nerek, a ostatnio także w chorobach nowotworowych. W mózgu wzrost poziomu tego białka obserwowano w reaktywnych astrocytach zwierząt chorych na scarpie [38]. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o znaczącej roli, jaką B2m odgrywa w procesach regeneracyjnych oraz plastyczności będących następstwem aksonotomii [206]. Uszkodzone aksony neuronów ruchowych myszy z knock-outem genu B2m regenerowały się znacznie gorzej, a liczba synaps była znacząco mniejsza niż u myszy z genotypem niezmienionym, które poddano takiej samej procedurze [140]. Dane te mogą sugerować, że wzrost ekspresji genu B2m ma na celu wspomaganie procesów naprawczych w neuronach uszkodzonych wskutek SE rozpoczynającego proces epileptogenezy.

Z drugiej strony, poprzez wspomaganie procesów związanych z plastycznością neuronalną, B2m może przyczyniać się powstawania patologicznych połączeń między neuronami, co może mieć niekorzystny wpływ na przebieg choroby.

Analizując literaturę naukową poświęconą innym genom (lub produktom tych genów), których ekspresja zmieniała się w przebiegu epileptogenezy, można znaleźć geny zawiadujące procesami już wcześniej łączonymi z tym zjawiskiem. Dobrym przykładem jest tu gen kodujący fosfolipazę D1 (Pld1), którego ekspresja była zwiększona w przebiegu epileptogenezy także w moim badaniu (dane uzyskane przy użyciu mikromacierzy oligonukleotydowych, potwierdzone metodą RT-PCR). Fosfolipaza D1 to jedna z dwóch występujących u ssaków izoform enzymu hydrolizującego fosfatydylocholinę z wytworzeniem kwasu fosfatydowego i cholicy [198]. Wykazano, że zlokalizowana w błonie presynaptycznej fosfolipaza D1 reguluje neurotransmisję, kontrolując liczbę miejsc wydzielających neurotransmitery w zakończeniach nerwowych [77], jak również wpływa na wzrost neurytów [225, 228]. Ta ostatnia funkcja odgrywa szczególną rolę w patogenezie padaczki, gdyż fosfolipaza D1, poprzez regulację poziomu tkankowego aktywatora plazminogenu, wpływa na stopień nasilenia obocznicowania włókien mszystych hipokampa w modelu padaczki skroniowej wywołanej podaniem kwasu kainowego do ciała migdałowatego szczura [228].

Kolejny gen, Neurod1 (neurogenic differentiation 1), koduje czynnik transkrypcyjny istotny dla różnicowania się komórek prekursorowych w neurony [107]. Wysoki poziom ekspresji Neurod1 obserwowany jest w trakcie rozwoju w mózgu ssaków. Badania Liu i współpracowników [113] wykazały, że u myszy mutacja tego genu prowadziła między innymi do zaburzeń w rozwoju warstwy ziarnistej zakrętu zębatego oraz śmierci licznych komórek w tej strukturze. Co więcej, u myszy tych rejestrowano samoistne napady drgawkowe zarówno w hipokampie jak i obszarach kory nowej [113]. W swoich badaniach obserwowałam zmniejszenie ekspresji genu kodującego Neurod1, co w połączeniu z neurozwyrodnieniem w licznych strukturach (włączając w to zakręt zębaty) obserwowanym w zastosowanym przeze mnie modelu, sprzyja zaburzeniom czynności bioelektrycznej mózgu objawiającym się występowaniem samoistnych drgawek.

Należy również wspomnieć o genie kodującym klasterynę (zwaną inaczej apolipoproteiną J), którego ekspresja była znacząco podwyższona zarówno w trakcie epileptogenezy w moim badaniu, jak również w hipokampie pacjentów cierpiących na padaczkę [141]. Wcześniejsze badania dowiodły, że ekspresja genu kodującego klasterynę wzrasta znacząco w astrocytach hipokampa po stanie drgawkowym. Natomiast wysoki poziom samego białka był obserwowany w neuronach sektora CA1 hipokampa oraz zakrętu zębatego, które później uległy neurozwyrodnieniu [42]. Późniejsze badania dowiodły, że klasteryna to białko modulujące procesy śmierci komórkowej niezależne od kaspazy-3 [65]. Można więc uznać, że gen ten związany jest z procesami neurozwyrodnieniowymi bę-

dącymi następstwem zarówno urazu początkowego jak i później występujących napadów drgawkowych.

Kolejnym etapem moich badań było wyselekcjonowanie funkcjonalnych grup genów, na ekspresję których istotny wpływ miała epileptogeneza. Analiza anotacji funkcjonalnych (GO terms) z wykorzystaniem algorytmów zawartych w bazie Gene Ontology dla kategorii „proces biologiczny” wykazała, że jedną z najsilniej nadreprezentowanych anotacji była anotacja „odpowiedź immunologiczna”. Szereg wcześniejszych analiz ekspresji genów wykorzystujących zarówno modele eksperymentalne padaczki jak również fragmenty mózgu uzyskane drogą resekcji u chorych na padaczkę, zwraca uwagę na istotną rolę, jaką układ immunologiczny odgrywa w procesie padaczkowym [9, 81, 116, 212]. W rzeczywistości od ponad 20 lat w piśmiennictwie publikowane są doniesienia sugerujące udział układu immunologicznego w etiopatogenezie niektórych postaci padaczki [1, 21, 214]. Obserwowano na przykład zaburzenia w układzie immunologicznym w zespołach Lennox-Gastaut, Rasmussena czy Landau-Kleffner, a także zmniejszenie częstości napadów padaczkowych po zastosowaniu leków modulujących funkcję układu odpornościowego (np. immunoglobulin, analogów adrenokortykotropiny). Również w przebiegu niektórych chorób będących następstwem zaburzeń układu immunologicznego (np. toczeń rumieniowaty układowy, celiakia, zespół sztywności uogólnionej) ryzyko wystąpienia padaczki jest znacznie wyższe [21]. Wiele z tych obserwacji znalazło potwierdzenie w badaniach doświadczalnych, które wykazały, że drgawki nie pozostawały bez wpływu na poziom wielu cytokin, hormonów peptydowych, neurotransmiterów czy ich receptorów [21]. Tak więc moje dane dostarczają kolejnego dowodu na to, że zaburzenia funkcjonowania układu immunologicznego mają znaczący wpływ na rozwój procesu padaczkowego.

5.1.3. Wspólne podłoże molekularne epileptogenezy oraz innych chorób ośrodkowego układu nerwowego

Warto również wspomnieć, że zmiany ekspresji wyżej wymienionych genów (lub ich produktów), nawet jeśli nie były wcześniej wiązane z epileptogenezą lub padaczką, pojawiały się także w kontekście innych procesów patologicznych rozwijających się w OUN. Na przykład ekspresja genu kodującego B2m jak i poziom samego białka był zwiększony w motoneuronach szczurów starych w porównaniu do zwierząt młodych, co wiązano ze zmianą aktywności starzejących się neuronów [45], podczas gdy ekspresja tego genu był zmniejszona w korze przedczołowej u alkoholików [85]. Beta-2-mikroglobulina oraz cytatyna C, izolowane z płynu mózgowo-rdzeniowego, są użytecznymi markerami diagnostycznymi w chorobie Alzheimera [27]. Także klasteryna to gen kodujący białko odgrywające istotną rolę w chorobie Alzheimera [18, 26]. Inne badania wykazały, że motoneurony oraz neurony dopaminergiczne istoty czarnej,

w których ekspresja B2m jest wysoka, ulegają częściej neurozwyrodnieniu w chorobie Parkinsona oraz stwardnieniu zanikowym bocznym [18, 27, 111]. Trwają badania nad zastosowaniem katepsyny S jako markera monitorującego progresję gwiazdziaków i glejaków [49]. Obserwowano także zwiększoną ekspresję genu kodującego katepsynę S w komórkach mikrogleju pobranych z mózgow myszy z chorobą Creutzfeldta-Jakoba [11].

Istnieje więc duże prawdopodobieństwo, że geny, których ekspresja zmieniła się w trakcie epileptogenezy, są istotne dla patogenezy wielu chorób ośrodkowego układu nerwowego, którym towarzyszy neurozwyrodnienie. Poznanie takich „wspólnych” genów oraz szlaków metabolicznych, w które są zaangażowane, przyczynić się może w przyszłości do opracowania nowych terapii neuroprotektoryjnych w tych chorobach.

5.2. Epileptogeneza a procesy leżące u podłoża uczenia się i pamięci emocji

5.2.1. Upośledzenie warunkowania strachu w trakcie epileptogenezy

Warunkowanie strachu to szeroko stosowany model do badań nad procesami uczenia się i pamięci emocji. W klasycznym warunkowaniu strachu prezentowany jest bodziec warunkowy (neutralny) w powiązaniu z silnym bodźcem bezwarunkowym (awersyjnym). W wyniku tej procedury rozwija się reakcja warunkowa, w skład której wchodzi szereg objawów strachu typowych dla reakcji obronnej podczas realnego zagrożenia [95]. Miarą reakcji warunkowej jest występowanie (a właściwie stopień nasilenia) jej objawów, czyli, np.: znieuruchomienia, nasilenia odruchów mięśniowych, wzrostu ciśnienia tętniczego, przyspieszenia akcji serca czy wydzielania do krwi hormonów stresu. Strukturą kluczową dla asocjacji bodźców warunkowego i bezwarunkowego jest kompleks podstawno-boczny ciała migdałowatego [95, 98], który jest uszkodzany na wczesnym etapie epileptogenezy [6].

Moje badania wykazały, że w modelu padaczki skroniowej zapoczątkowanej elektrycznym drażnieniem jądra bocznego ciała migdałowatego w ósmym dniu epileptogenezy obserwowano upośledzenie warunkowania strachu w postaci skrócenia o połowę czasu znieuruchomienia (*freezing*) u szczurów będących w trakcie epileptogenezy w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi (odpowiednio $6,0 \pm 0,8$ s vs $12,4 \pm 3,8$ s). Tak więc jeszcze przed pojawieniem się samoistnych drgawek zaobserwować można zaburzenia procesów związanych z tworzeniem się pamięci emocji. Wcześniejsze badania nad użytym przeze mnie modelem wykazały, że warunkowanie strachu było upośledzone u szczurów z pełnoobjawową padaczką, natomiast dotychczas nie badano warunkowania strachu w trakcie procesu epileptogenezy. W tych badaniach procedurę warunkowania strachu rozpoczynano dopiero po wystąpieniu co najmniej 2 samoistnych drga-

wek [93]. Podobnie jak w moich badaniach, szczury z padaczką pozostawały w bezruchu o połowę krócej niż szczury kontrolne podczas prezentacji bodźca warunkowego [93]. Ci sami autorzy obserwowali także podobny stopień upośledzenia warunkowania strachu u szczurów, u których padaczka rozwinęła się w następstwie stanu drgawkowego wywołanego dootrzewnowym podaniem kwasu kainowego [93]. Należy podkreślić, że na wyniki w obu modelach nie miały wpływu czynniki takie, jak: uszkodzenie słuchu, wrażliwość na ból, aktywność lokomotoryczna czy poziom lęku, gdyż pod tym względem zwierzęta kontrolne i cierpiące na padaczkę nie różniły się [93]. Co więcej, autorzy ci wykazali, że w obu modelach czas znieruchomienia nie korelował ze stopniem uszkodzenia jądra bocznego ciała migdałowego ani z częstotliwością występowania napadów drgawkowych. Ponadto dos Santos i współpracownicy [40] wykazali, że w dwa miesiące po przebytych stanie drgawkowym wywołanym podaniem pilokarpiny, przy nieznacznym uszkodzeniu kompleksu podstawno-bocznego ciała migdałowego, reakcja warunkowa (znieruchomienie) jest znacznie krótsza niż u zwierząt kontrolnych. Należy również dodać, że u większości tych zwierząt obserwowano samoistne, nawracające napady drgawkowe. Yin i współpracownicy [224] także wykazali, że przy braku widocznego neurozwyrodnienia w ciele migdałowym warunkowanie strachu jest upośledzone u zwierząt, które przeżyły stan drgawkowy wywołany dokomorowym podaniem kwasu kainowego. Warto wspomnieć również, że Szyndler i współpracownicy [200] zaobserwowali upośledzenie warunkowania strachu zależnego od kontekstu u szczurów, u których padaczka rozwinęła się na skutek stanu drgawkowego wywołanego podaniem pilokarpiny. Ten rodzaj warunkowania wymaga zaangażowania nie tylko ciała migdałowego, ale także hipokampa [106]. Wprawdzie autorzy ci stwierdzili zmiany neurozwyrodnieniowe w obu tych strukturach, należy jednak zaznaczyć, że i w tym badaniu wrażliwość na ból u zwierząt cierpiących na padaczkę i zwierząt kontrolnych nie różniła się [200].

Tak więc badania te wskazują, że neurozwyrodnienie obserwowane w strukturach kluczowych dla warunkowania strachu, nie jest jedynym czynnikiem wpływającym na zaburzenia pamięci emocji. Moje badania wskazują, że kolejnym czynnikiem mogą być zmiany na poziomie transkryptomu, które związane są nierozdzielnie z procesem epileptogenezy.

Ze względu na niemożność jednoznacznego wyodrębnienia chorych, u których w przyszłości rozwinie się padaczka (czyli będących w trakcie epileptogenezy), w literaturze brak jest danych dotyczących zaburzeń procesów pamięciowych związanych ze strachem w tej grupie. Zaburzenia w nabywaniu reakcji warunkowej, w postaci upośledzenia asocjacji bodźców warunkowego i bezwarunkowego, obserwowano u pacjentów, u których dokonano resekcji ogniska padaczkorodnego w płacie skroniowym [104, 148]. Opisano także przypadek, w którym chora po resekcji ognisk padaczkorodnych nie rozpoznawała bodźców wzrokowych i słuchowych związanych ze strachem [184].

Podsumowując, w swoich badaniach wykazałam, że w badanym przez mnie eksperymentalnym modelu padaczki skroniowej klasyczne warunkowanie strachu jest upośledzone jeszcze zanim pojawią się samoistne, nawracające napady padaczkowe. Jest to najprawdopodobniej związane nie tylko z uszkodzeniem struktur płata skroniowego, ze szczególnym uwzględnieniem kompleksu podstawno-bocznego ciała migdałowatego, lecz innymi czynnikami towarzyszącymi epileptogenezie takimi, jak, np. przerwanie lub reorganizacja połączeń anatomicznych między strukturami zaangażowanymi w uczenie się i pamięć emocji oraz, jak wykazały moje badania, zmiany na poziomie transkryptomu.

5.2.2. Odmienne kierunki zmian ekspresji genów związanych z warunkowaniem strachu u zwierząt w trakcie epileptogenezy oraz zwierząt kontrolnych

Celem mojej pracy było także zbadanie, czy w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego szczura epileptogeneza wpływa na ekspresję genów związanych z procesem asocjacji bodźca warunkowego i bezwarunkowego podczas klasycznego warunkowania strachu. Model klasycznego warunkowania strachu był i jest szeroko wykorzystywany w celu badania procesów uczenia się i pamięci emocji [106, 152, 176], włączając w to badania nad zmianami transkryptomu istotnymi dla tego procesu [69, 194, 171]. Ze względu na fakt, że tak wiele genów zmienia swoją ekspresję w trakcie epileptogenezy, można się spodziewać, że nie pozostanie to bez wpływu na molekularne podstawy procesów uczenia się i pamięci emocji. Potwierdzają to, na przykład badania Resslera i współpracowników [168], którzy zaobserwowali, że zarówno podanie kwasu kainowego skutkujące pojawieniem się drgawek jak i warunkowanie strachu (bodźcem warunkowym był bodziec świetlny lub zapachowy) wywołują zmiany ekspresji genów w strukturach płata skroniowego u szczura. W ciele migdałowatym zmiany te dotyczyły siedmiu genów, a największe nasilenie tych zmian obserwowano w 30-240 min od zadziałania bodźca. Do genów, których ekspresja zmieniała się najwcześniej należały geny kodujące czynniki transkrypcyjne takie, jak: c-fos, zif268/EGR1 czy c-jun. Nieco później zmiany obserwowano dla genu kodującego czynnik transkrypcyjny nurr-1 czy genach: NF-1 i gephyrinie kodujących białka cytoszkieletu lub neurograninie kodującej substrat kinazy proteinowej C [168]. Niestety autorzy nie badali, jak wyglądałyby zmiany ekspresji tych genów u zwierząt, które otrzymały zarówno kwas kainowy jak i poddane zostały procedurze warunkowania strachu. Co więcej, w literaturze naukowej nie ma doniesień opisujących zmiany ekspresji genów leżących u podstaw klasycznego warunkowania strachu u zwierząt będących w trakcie epileptogenezy.

Moja analiza wykazała, że w trakcie klasycznego warunkowania strachu kierunek zmian ekspresji 26 genów jest przeciwny u zwierząt będących w trak-

cie epileptogenezy w porównaniu do zwierząt kontrolnych, tj. pod wpływem sparowanej prezentacji bodźca warunkowego i bezwarunkowego ekspresja 25 genów spadała u zwierząt kontrolnych, podczas gdy u zwierząt będących w trakcie epileptogenezy wzrastała, natomiast ekspresja genu (Rn.46692) wzrastała u zwierząt kontrolnych a spadała u zwierząt będących w trakcie epileptogenezy. Żaden z tych genów nie został wykryty we wcześniej wspomnianym badaniu wykonanym przez Resslera i współpracowników [168]. Należy zaznaczyć jednak, że badania te różnią się zarówno rodzajem bodźca warunkowego w modelu warunkowania strachu (w badaniach tych wykorzystano bodźce świetlne i zapachowe) jak również punktami czasowymi oraz metodami badania ekspresji genów.

Funkcja większości z 26 wykrytych przeze mnie genów nie jest znana. Tak więc w mojej pracy część z nich została po raz pierwszy powiązana z molekularnymi procesami leżącymi u podstaw uczenia się i pamięci emocji badanymi w modelu warunkowania strachu. Kilka genów było już wcześniej wymieniane jako te, które mogą mieć istotny wpływ na inne formy uczenia się i pamięci. Wśród nich należy wspomnieć gen *Cyp7b1*. Koduje on cytochrom szeroko rozpowszechniony w mózgu, a zwłaszcza hipokampie [175]. Produkt tego genu odpowiedzialny jest za konwersję dehydroepiandrosteronu oraz pregnenolonu do ich 7-hydroksylowanych metabolitów [175]. Obecność tych metabolitów w mózgu wspomaga procesy uczenia się i pamięci przestrzennej [223]. Z kolei gen *Nid1* (zwany także entaktyną) koduje glikoproteinę błony podstawnej, której wysoka ekspresja obserwowana jest w neuronach rozwijającego się mózgu [100, 137, 186]. Uważa się, że gen ten ma istotny wpływ na stopień pobudliwości neuronalnej lub zjawiska takie jak: krótkotrwałe i długotrwałe wzmocnienie synaptyczne czy bocznikowanie aksonów [100, 213]. Co więcej, u szczurów, które przeżyły stan drgawkowy wywołany podaniem kwasu kainowego, zaobserwowano zwiększenie ekspresji białka *Nid1* w naczyniach hipokampa oraz komórkach astrogleju [137].

Kolejny z genów, *Gnb211*, znany jest także pod nazwą receptor dla aktywowanej kinazy C (RACK1), gdyż była to pierwsza z jego odkrytych i opisanych funkcji [174]. Obecnie wiadomo już, że białko kodowane przez ten gen współdziała z wieloma innymi białkami sygnałowymi takimi, jak: białka z rodziny kinaz *Src*, integryny beta czy receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 [189]. *Gnb211* reguluje również poziom wapnia (Ca^{+2}) wewnątrz komórki poprzez wiązanie się z receptorem dla trójfosforanu inozytolu (IP3), w następstwie czego zwiększa się wiązanie IP3 z receptorem, co skutkuje uwalnianiem jonów Ca^{+2} z magazynów wewnątrzkomórkowych [145]. Uwalnianie Ca^{+2} zależne od receptorów IP3 to jeden z podstawowych mechanizmów odpowiedzialnych za długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (long-term potentiation, LTP), które jest modelem doświadczalnym procesów zachodzących w trakcie uczenia się i pamięci na poziomie synapsy [189]. Co więcej, białko *Gnb211* reguluje także funkcję głównego receptora biorącego udział w powstawaniu LTP, tj. re-

ceptora N-methyl-D-asparaginianowego (NMDAR). Białko Gnb211 wiąże się z podjednostką NR2B tego receptora oraz Fyn (kinazą tyrozynową z rodziny Src), hamując fosforylację NR2B przez kinazę Fyn [221]. Tak więc w przypadku tego genu istnieją dane bezpośrednio wiążące go z molekularnymi zjawiskami leżącymi u podstaw uczenia się i pamięci.

Na uwagę zasługuje fakt, że 5 z wcześniej wspomnianej grupy 26 genów, tj. Dock3, Itsn1, Kcnc2, Myt1l oraz Nrn1, znalazło się wspólnie w klasterze 3, czyli profile ich ekspresji zmieniały się w podobny sposób w poszczególnych grupach doświadczalnych pod wpływem czynników takich, jak epileptogeneza oraz warunkowanie strachu. Na podstawie dostępnej literatury stwierdzić można, że geny te zaangażowane są w procesy istotne dla rozwoju OUN oraz plastyczności neuronalnej. Na przykład wysoka ekspresja Dock3 występuje w trakcie różnicowania się neuronów, stymulując rozwój neurytów zależny od neuronalnego czynnika wzrostu [29]. Z kolei kodowane przez Itsn1 białko jest specyficzne dla mózgu i występuje zarówno w neuronach jak i gleju. W neuronach wpływa ono na rozwój kolców dendrytycznych [79]. Gen Kcnc2 (znany także jako Kv3.2) koduje podjednostkę bramkowanego napięciem kanału potasowego występującą głównie w GABA-ergicznym neuronach wstawkowych, choć zaobserwowano ją także w zakończeniach synaptycznych na tych neuronach oraz komórkach gleju [32, 124]. Obecność tej podjednostki stwierdzono między innymi w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego [124]. Gen Nrn1 koduje białko modulujące procesy wzrostu drzewa aksonalnego i dendrytycznego, neurogenezę, procesy dojrzewania układu synaptycznego oraz żywotność neuronów [39, 54, 108, 131]. Co więcej, wzrost ekspresji Nrn1 zapoczątkowany jest przez przyłączenie białka wiążącego się z elementem odpowiedzi na cAMP (CREB) do promotora Nrn1 *in vivo* ([54].

Porównując zmiany ekspresji genów w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego szczura towarzyszące procesowi epileptogenezy i warunkowania strachu na uwagę zwraca różnica w liczbie genów, które powiązane były z tymi procesami. W moim badaniu aż 657 genów zmieniało swoją ekspresję w trakcie epileptogenezy, podczas gdy na 26 genów wpływ miała procedura warunkowania strachu. Najprawdopodobniej jest to związane ze stosunkowo niewielką liczbą komórek zaangażowanych bezpośrednio w asocjację bodźców warunkowego i bezwarunkowego w ciele migdałowatym w porównaniu do procesu padaczkowego. Jak wykazały moje wcześniejsze badania, tylko 6% neuronów kompleksu podstawno-bocznego ciała migdałowatego wysyłających projekcję do kory śródwęchowej zaangażowanych było w warunkowanie strachu [117]. Badania nad epileptogenezą w tej strukturze wykazały natomiast, że już w kilka godzin po urazie początkowym ponad 50% neuronów tej struktury ulega neurozwyrodnieniu [209].

Powyższe dane wskazują, że proces epileptogenezy znacząco zmienia ekspresję genów zaangażowanych w warunkowanie strachu u szczura. Zaburzenia

te mogą być jedną z przyczyn upośledzenia procesów leżących u podstaw uczenia się i pamięci emocji obserwowanych w trakcie procesu padaczkowego.

5.2.3. Wspólne molekularne podłoże zaburzeń funkcji poznawczych w chorobach ośrodkowego układu nerwowego

W przypadku niektórych z 26 genów, których ekspresja jest zaburzona w trakcie procesów uczenia się i pamięci emocji u zwierząt będących w trakcie epileptogenezy, w literaturze naukowej istnieją także doniesienia o związku tych genów z innymi chorobami układu nerwowego, którym towarzyszą zaburzenia funkcji poznawczych, a co za tym idzie także procesów pamięciowych. To świadczy o doniosłym znaczeniu ich produktów białkowych dla funkcji mózgu. Na przykład rodzinnie występująca mutacja w genie *Dock3* u ludzi predysponuje do wczesnego ujawnienia się zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (*ADHD*) i upośledzenia umysłowego [37]. Białko kodowane przez ten gen jest także wiązane z chorobą Alzheimera, gdyż jego obecność stwierdzono w kłębkach neurofibrylarnych charakterystycznych dla tej choroby [28]. Ma być ono także odpowiedzialne za zmniejszenie ilości białka prekursorowego beta-amyloidu [28]. Jak już wcześniej wspomniano, *Cyp7b1* koduje cytochrom, który przeprowadza konwersję dehydroepiandrosteronu i pregnenolonu do ich 7-hydroksylowanych metabolitów [175]. Obecność tych metabolitów w mózgu wspomaga procesy uczenia się i pamięci przestrzennej u zwierząt starych [223]. Natomiast w mózgu pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera obserwowano o połowę mniej *Cyp7b1* mRNA niż u osób zdrowych [222]. Zaburzony poziom białka *Gnb211* obserwowany był w wielu chorobach OUN jak również w trakcie starzenia [189]. Wielu z tych schorzeń, towarzyszą zaburzenia procesów poznawczych. Na przykład niedobory białka *Gnb211* stwierdzono post mortem w mózgach chorych na Alzheimera oraz zwierzęcych modelach starzenia się [189]. Obniżony poziom białka *Gnb211* obserwowany był także w korze pacjentów z zespołem Downa, u których w młodym wieku rozwinęła się choroba Alzheimera [151]. Za to podwyższony poziom białka *Gnb211* stwierdzono u pacjentów z chorobą Parkinsona leczonych rasagiliną [12]. Doświadczenia wykonane przez Alme i współpracowników [5] w modelu depresji pourazowej wykazały, że przewlekłe stosowanie leku przeciwdepresyjnego – fluoksetyny, zwiększało poziom ekspresji kolejnego z genów – *Nrn1*, co znacząco wspomagało procesy związane z plastycznością neuronalną. W świetle tych badań wnioskować można, że w przypadku mojego doświadczenia zwiększenie poziomu ekspresji genów takich, jak, np. *Gnb211* oraz *Nrn1*, mogło wspomagać procesy związane z tworzeniem się pamięci emocji, które upośledzone zostały na skutek epileptogenezy.

Z powyższych danych wynika, że co najmniej kilka genów kluczowych dla uczenia się i pamięci emocji jest charakterystyczne nie tylko dla tej formy pro-

cesów pamięciowych. Tak więc różnorodne zaburzenia pamięci towarzyszące wielu schorzeniom ośrodkowego układu nerwowego mogą, przynajmniej w pewnym zakresie, mieć wspólne podłoże molekularne.

5.3. Uwagi metodologiczne

Przy interpretacji zaprezentowanych powyżej wyników należy pamiętać, że zostały one uzyskane przy użyciu modelu doświadczalnego padaczki skroniowej rozwijającej się w następstwie przebytego stanu drgawkowego. Wprawdzie większość danych charakteryzujących okres epileptogenezy została uzyskana przy użyciu modeli, w których urazem pierwotnym jest stan drgawkowy wywołany podaniem substancji drgawkorodnych (np. kwasu kainowego, pilokarpiny) lub elektryczną stymulacją różnych części mózgowia (np. ciało migdałowe, hipokamp), jednak model ten może nie najlepiej odwzorowywać procesy zachodzące w trakcie epileptogenezy u człowieka. Po pierwsze dlatego, że u człowieka stan drgawkowy jest stosunkowo rzadką przyczyną prowadzącą do rozwoju padaczki u dorosłych [67, 126]. Padaczka ta rozwija się najczęściej w następstwie udaru lub urazu czaszkowo-mózgowego [67]. Ponadto w modelach padaczki rozwijającej się po wystąpieniu stanu drgawkowego neurozwyrodnienie obserwowane jest w tych samych strukturach mózgu, jakkolwiek jest zazwyczaj znacznie bardziej nasilone u zwierząt niż u człowieka [190]. Pomimo tych ograniczeń należy jednak pamiętać, że badania wykorzystujące model padaczki skroniowej rozpoczynającej się w następstwie przebytego stanu drgawkowego służą do wstępnej weryfikacji skuteczności nowych metod diagnostycznych oraz potencjalnych terapii mogących mieć korzystny wpływ na rozwój lub przebieg padaczki lub jej powikłań [2, 36, 63, 136, 169].

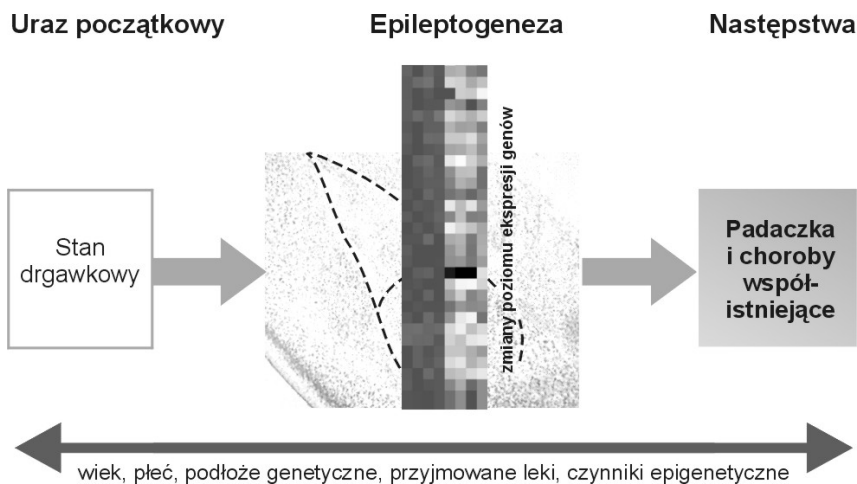
Kolejnym istotnym elementem, o którym należy pamiętać interpretując uzyskane przeze mnie wyniki jest fakt, że do badań przy użyciu mikromacierzy jak również RT-PCR wykorzystano RNA pochodzące z fragmentów kompleksu podstawno-bocznego ciała migdałowego zawierających zarówno neurony, komórki gleju, a także komórki wchodzące w skład naczyń zaopatrujących badaną strukturę. Tak więc na podstawie moich badań trudno jest jednoznacznie stwierdzić, w której populacji komórek dochodzi do zmian ekspresji poszczególnych genów. W wielu przypadkach, na podstawie danych opublikowanych wcześniej w literaturze naukowej, można z dużym prawdopodobieństwem określić, która (lub które) z populacji komórkowych może (mogą) mieć istotne znaczenie dla ekspresji danego genu. Na przykład rola Cst3 w przebiegu epileptogenezy omawiana była we wcześniejszych rozdziałach. W trakcie epileptogenezy wzrost ekspresji genu Cst3 jak i białka będącego jego produktem obserwowano głównie w komórkach astro- i mikrogleju oraz nielicznych neuronach [7, 114, 155, 156]. Warto zwrócić uwagę na fakt, że dane te pochodzą z modeli, gdzie urazem pierwotnym rozpoczynającym proces epileptogenezy był stan

drgawkowy, który rozwinął się wskutek drażnienia elektrycznego jądra boczno-go ciała migdałowatego (czyli model zastosowany przez mnie) lub podania kwasu kainowego oraz udaru fototrombotycznego [114, 155, 156]. Co więcej, Pirttila i współpracownicy [155] wykazali obecność tego białka zarówno w komórkach astrogleju jak i neuronach w hipokampie człowieka. W porównaniu z ludźmi zdrowymi u pacjentów cierpiących na padaczkę skroniową ekspresja Cst3 w komórkach gleju zwiększała się, a w neuronach zmniejszała się [155]. Kolejny gen związany z procesem epileptogenezy to katepsyna S (Ctss). Ctss zlokalizowana jest przede wszystkim w komórkach mikrogleju [4, 110]. Wzrost ekspresji białka kodowanego przez ten gen obserwowano przede wszystkim w komórkach mikrogleju w hipokampie myszy, które tydzień wcześniej przebyły stan drgawkowy wywołany podaniem kwasu kainowego [4]. Także zmiany ekspresji niektórych genów związanych z procesami leżącymi u podstaw pamięci emocji obserwowano w komórkach innych niż neurony [124, 137]. Na przykład białko kodowane przez Nid1 obecne jest w ścianach naczyń OUN, zwłaszcza w trakcie rozwoju. Jego poziom znacząco wzrasta po stanie drgawkowym wywołanym podaniem kwasu kainowego do ciała migdałowatego zarówno u osobników młodych jak i dorosłych [137]. Niewielką ilość białka Kcnc2 stwierdzono także w komórkach gleju ciała migdałowatego szczura, choć białko to przede wszystkim obecne jest w neuronach wstawkowych [124]. Tak więc w celu dokładnego określenia, w której z populacji komórkowych dochodzi do zaburzeń ekspresji poszczególnych genów, wymagane byłyby dalsze, szczegółowe badania indywidualnie dla każdego z genów.

5.4. Inne czynniki modulujące przebieg procesu padaczkowego oraz jego następstwa behawioralne

Jednym z priorytetów w badaniach procesu padaczkowego jest poznanie zjawisk zachodzących na poziomie komórkowym i molekularnym, w konsekwencji których pojawiają się samoistne, nawracające drgawki lub choroba szybko postępuje. Szereg badań wskazuje na to, że na rozpoczęcie oraz przebieg procesu epileptogenezy jak również progresję samej padaczki oraz występowanie chorób współistniejących, oprócz rodzaju urazu początkowego oraz następstw z nim związanych, ma wpływ także wiele innych czynników takich, jak: podłoże genetyczne, czynniki epigenetyczne, wiek, płeć czy rodzaj przyjmowanych leków [118, 166]. Przedstawią to rycina 16.

Na przykład badania na różnych szczepach szczurów i myszy wykazały, że pewne z nich są bardziej podatne na neurozwyrodnienie wywołane stanem drgawkowym lub urazem czaszkowo-mózgowym, a w konsekwencji także na rozwój procesu padaczkowego [29, 78].



Rycina 16. Inne czynniki mogące mieć znaczący wpływ na rozwój i przebieg procesu padaczkowego u poszczególnych osobników. Przebieg każdego z etapów tego procesu, tj. stanu drgawkowego, epileptogenezy (wraz z towarzyszącymi jej zmianami ekspresji licznych genów) jak również padaczki oraz chorób z nią współistniejących, jest modulowany przez czynniki takie jak wiek, płeć, podłoże genetyczne, przyjmowane leki oraz czynniki epigenetyczne. W związku z tym przebieg procesu padaczkowego oraz jego następstwa behawioralne u poszczególnych pacjentów różnią się od siebie

Figure 16. Other factors which may significantly influence the development and course of epileptic process in each individual. Each phase of this process, that is status epilepticu, epileptogenesis (which is accompanied by alterations in gene expression levels) as well as epilepsy and its comorbidities are subject to modulation by age, sex, genetic background, current drug treatment or epigenetic factors. In result the course of epileptic process as well as its behavioral consequences differ among patients

Ponadto stwierdzono różnice we wrażliwości różnych szczepów myszy na drgawki indukowane fluoroethylem [142] lub stymulacją ciała modzelowatego [50]. Na podstawie tych badań przypuszczać więc można, że podłoże genetyczne może mieć także wpływ na rozwój i przebieg epileptogenezy u człowieka.

Kolejnym czynnikiem, na który wpływ mogą mieć zarówno podłoże genetyczne jak i zmiany ekspresji genów towarzyszących procesom epileptogenezy lub padaczki, jest pojawienie się w przebiegu procesu padaczkowego chorób współistniejących. Należą do nich między innymi: upośledzenie umysłowe, nerwice czy choroby afektywne [44, 73, 88]. Wspólnymi elementami łączącymi są tu między innymi zaburzenia w funkcjonowaniu neuroprzebieżników takich, jak: serotonina, dopamina, norepinefryna czy GABA, których związek z patogenizacją wyżej wspomnianych chorób jest dobrze poznany [88, 89]. Udowodniono na przykład, że pewne mutacje genetyczne predysponują zarówno do wystąpienia padaczki jak również chorób afektywnych [84, 101, 199]. Dotyczy to np. podjednostek $\alpha 1$ i $\beta 3$ receptora GABA_A czy białka Homer1 [101, 199].

Odpowiedniki wyżej wspomnianych chorób współistniejących obserwowano w modelach doświadczalnych padaczki [99, 123, 125]. Na przykład Koh i współpracownicy [99] wykazali, że drgawki wywołane kwasem kainowym zmniejszają ekspresję genu kodującego receptor serotoninowy 5B, czemu towarzyszyły objawy depresji. Warto dodać, że wzbogacenie środowiska spowodowało wzrost ekspresji tego genu i ustąpienie objawów depresji [99].

Również czynniki środowiskowe nie pozostają bez wpływu na przebieg i konsekwencje behawioralne procesu padaczkowego. Badania na zwierzęcych modelach padaczki wykazały, że młode szczury, które przebyły stan drgawkowy i pozbawione zostały opieki matczynej, uczyły się znacznie gorzej niż szczury, które przez cały czas przebywały z matkami [76]. Z drugiej jednak strony środowisko wzbogacone o różnorodne bodźce sprzyja lepszemu uczeniu się młodych zwierząt, które przebyły stan drgawkowy [76].

W ostatnim czasie w literaturze naukowej pojawiły się również doniesienia o wpływie czynników epigenetycznych na rozwój i przebieg procesu padaczkowego. Czynniki epigenetyczne to takie, które wpływają na aktywność genów, choć nie mają wpływu na ich sekwencję. Należą do nich między innymi: metylacja DNA czy metylacja lub acetylacja histonów. Na przykład modyfikacja histonów promotorów genów związanych z plastycznością neuronalną lub kodujących czynniki transkrypcyjne obserwowana była w następstwie drgawek [76, 191, 192, 207]. Dobrym przykładem może być regulacja transkrypcji neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF). Wzrost ekspresji BDNF obserwowany w krótkim czasie po wystąpieniu stanu drgawkowego związany jest z acetylacją histonu H4, podczas gdy długotrwały wzrost ekspresji – z acetylacją histonu H3 [76, 207]. Kolejną interesującą obserwacją jest fakt, że lek przeciwdrgawkowy, walproinian sodu, poprzez hamowanie deacetylacji i demetylacji histonów wpływa na ekspresję genów [60, 127, 153]. Jak wykazały badania Jessbergera i współpracowników [82] oraz Brandt i współpracowników [23] kwas walproinowy, poprzez hamowanie deacetylacji histonów, wykazywał działanie neuroprotekcyjne oraz zmniejszał nasilenie zaburzeń poznawczych będących następstwem stanu drgawkowego w modelach zwierzęcych padaczki. Działanie to pozostawało jednak bez wpływu na rozwój i przebieg epileptogenezy [23, 75]. Powyższe dane wskazują, że czynniki epigenetyczne mogą także w modyfikować rozwój i przebieg procesu padaczkowego oraz jego następstwa. Nasza wiedza na ten temat jest jednak w chwili obecnej niewielka.

Istotnym czynnikiem wpływającym na przebieg procesu padaczkowego oraz jego następstwa behawioralne jest wiek. Częstość występowania padaczki jest największa u dzieci [102]. U podłoża padaczek wieku dziecięcego leżą jednak najczęściej wady wrodzone, zaburzenia rozwojowe oraz czynniki genetyczne [180]. Znacznie rzadziej rozwijają się one w następstwie urazu początkowego, którym może być na przykład: uraz czaszkowo-mózgowy, stan drgawkowy lub zapalenie mózgu. Badania z wykorzystaniem zwierzęcych modeli padaczki wykazały, że młody mózg jest znacznie mniej podatny na następstwa, jakie niesie

ze sobą uraz, niż mózg dorosłego, tj. u szczurów, które doświadczyły drgawek poniżej czternastego dnia życia, zmiany neurozwyrodnieniowe są bardzo słabo nasilone, a wyniki testów sprawdzających procesy kognitywne w niewielkim stopniu różnią się od zwierząt „zdrowych”, podczas gdy drgawki u zwierząt starszych niż czternaście dni wywołują zmiany przypominające te, które obserwuje się u osobników dorosłych, tj. neurozwyrodnienie w wielu strukturach mózgu oraz upośledzenie procesów związanych z pamięcią przestrzenną i emocji [118]. Nie mniej jednak nawet u osobników młodych powtarzające się napady padaczkowe prowadzą do nieodwracalnych zmian w mózgu oraz progresji choroby. Drugą grupą wiekową, w której częstość występowania padaczki wzrasta, stanowią osoby starsze [102]. W tej grupie wiekowej najczęstszą przyczyną prowadzącą do rozwoju padaczki są choroby naczyniowe mózgu [102]. Badania wykonane na modelach doświadczalnych padaczki wykazały, że następstwa urazu początkowego są tu znacznie bardziej nasilone ze względu na szereg zmian biochemicznych oraz strukturalnych obserwowanych w mózgach osobników starszych [86, 187].

W chwili obecnej coraz więcej badań podkreśla różnice w przebiegu padaczki w zależności od płci [34, 102, 211]. Z reguły badania te wskazują na nieco większą częstość występowania padaczki u mężczyzn niż u kobiet, przy czym u mężczyzn częściej występują napady uogólnione, a u kobiet napady częściowe [102, 211]. Co więcej, uważa się, że niektóre rodzaje napadów padaczkowych w pewnych grupach wiekowych są charakterystyczne prawie wyłącznie dla żeńskiej części populacji [197]. Także stan hormonalny organizmu kobiety nie pozostaje bez wpływu na przebieg procesu padaczkowego. U części pacjentek częstotliwość napadów padaczkowych wzrasta, gdy poziom estrogenów i progesteronu jest niski, a zmniejsza się, gdy poziom progesteronu jest relatywnie wysoki w porównaniu z poziomem estrogenu [74]. Tak więc terapia progesteronowa znalazła zastosowanie w leczeniu na przykład padaczki przy-miesiączkowej [13]. Doniesienia te znalazły potwierdzenie także w modelach doświadczalnych padaczki [22, 211]. Szereg badań sugeruje także neuroprotekcijną rolę hormonów jajnikowych, choć prospektywne i retrospektywne badania u ludzi nie wykazały takich zależności [74].

Kolejnym znaczącym czynnikiem mogącym modyfikować przebieg procesu padaczkowego są przyjmowane leki. Idealną terapią byłby lek, który całkowicie zapobiegałby następstwom urazu pierwotnego, czyli epileptogenezie oraz padaczce. Pomimo intensywnych badań w chwili obecnej takie terapie nie istnieją. Są jednak leki, których podanie może mieć modyfikujący wpływ tej choroby [2]. Na przykład udowodniono, że podanie diazepamu lub atipamezolu (antagonisty receptora adrenergicznego α_2) po wystąpieniu stanu drgawkowego u szczurów zmniejszało ryzyko wystąpienia padaczki lub, jeśli padaczka rozwinęła się, jej objawy były znacznie mniej nasilone [161, 162]. Szereg badań nad doświadczalnymi modelami padaczki sugeruje także neuroprotekcijną rolę es-

trogenów, progesteronu, pregnolonu, erytropoetyny czy melatoniny po zadziałaniu urazu początkowego [2].

Powyższe badania wskazują na złożoność i dynamikę wzajemnego oddziaływania wielu czynników, w rezultacie których przebieg procesu padaczkowego oraz jego następstwa mogą znacząco różnić się u poszczególnych osobników.

5.5. Implikacje praktyczne

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy to próba zidentyfikowania genów oraz procesów biologicznych, które powodują, że po urazie pierwotnym (jakim jest, np. stan drgawkowy) w mózgu szczura rozpoczynają się procesy, które w konsekwencji doprowadzają do pojawienia się samoistnych, nawracających drgawek (czyli padaczki) oraz jak zmiany te wpływają na ekspresję genów zaangażowanych w procesy związane z pamięcią emocji.

Moje badania potwierdziły, że w trakcie epileptogenezy w kompleksie podstawnobocznym ciała migdałowatego dochodzi do zmian ekspresji wielu genów. Część z nich była już wcześniej opisywana w trakcie epileptogenezy lub padaczki, a część to geny, których produkty nie były wcześniej wiązane z epileptogenezą. Podobnie rzecz miała się z grupami funkcjonalnie powiązanych ze sobą genów charakteryzujących różne procesy biologiczne zachodzące w trakcie epileptogenezy. Na szczególną uwagę zasługuje tutaj grupa genów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną mózgu, gdyż proces ten coraz częściej jest wymieniany w kontekście analizy wielu danych pochodzących zarówno z modeli eksperymentalnych jak i padaczki u ludzi. Co więcej, moje badania wykazały, że proces epileptogenezy znacząco wpływa na ekspresję genów zaangażowanych w procesy związane z tworzeniem się pamięci emocji.

Dalsze, szczegółowe badania roli poszczególnych genów jak i funkcjonalnie powiązanych grup genów w procesie epileptogenezy przyczyni się do pogłębienia wiedzy na temat rozwoju padaczki jak i zaburzeń poznawczych jej towarzyszących. W przyszłości może przyczynić się to do opracowania nowych terapii zapobiegających rozwojowi tej choroby lub przynajmniej w korzystny sposób modyfikujących rozwój padaczki oraz jej powikłań.

6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

1. W kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego szczura, osiem dni od wystąpienia stanu drgawkowego rozpoczynającego proces epileptogenezy, zaobserwowałam zmiany ekspresji 657 genów. Wśród nich 363 geny zwiększyły, a 294 geny zmniejszyły swoją ekspresję. Tak więc w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego proces epileptogenezy znacząco wpływa na ekspresję wielu genów.
2. Porównanie wyników uzyskanych w mojej pracy oraz metaanalizy zawierającej dane z kilku publikacji charakteryzujących zmiany ekspresji genów w trakcie epileptogenezy uzyskanych przy pomocy różnych typów mikromacierzy DNA wykazało, że 81 z 657 genów było już wcześniej wiązanych z procesami epileptogenezy lub padaczki zarówno w modelach zwierzęcych jak i u ludzi. Wiele genów było jednak po raz pierwszy wymienianych w kontekście tych procesów.
3. Część z wyodrębnionych przeze mnie genów przynależy do 20 anotacji funkcjonalnych (GO terms) w kategorii „proces biologiczny”. Jedną z najsilniej nadreprezentowanych była anotacja „odpowiedź immunologiczna” co wskazuje na jej kluczową rolę w przebiegu epileptogenezy.
4. Wykonane przeze mnie badania wykazały istotne upośledzenie procesu uczenia się asocjacji bodźca warunkowego i bezwarunkowego już w ósmym dniu epileptogenezy, co świadczy o znacznym upośledzeniu warunkowania strachu. Tak więc już na wczesnym etapie procesu epileptogenezy u badanych zwierząt zaobserwować można upośledzenie procesów uczenia się i pamięci emocji.
5. W kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego szczura znaleziono 26 genów związanych z procedurą warunkowania starchy, w których kierunki zmian ekspresji były różne u zwierząt będących w trakcie epileptogenezy oraz zwierząt zdrowych. Tak więc proces epileptogenezy znacząco wpływa na ekspresję genów zaangażowanych w procesy uczenia się i pamięci emocji, co stanowić może jeden z mechanizmów prowadzących do upośledzenia funkcji poznawczych u chorych na padaczkę.
6. Pięć spośród wspomnianych powyżej 26 genów, tj.: Dock3, Itsn1, Kcnc2, Myt1l oraz Nrn1, odgrywa znaczącą rolę w procesach związanych z plastycznością neuronalną, co potwierdza ich zaangażowanie w procesy związane z tworzeniem się pamięci emocji w ciele migdałowatym.
7. Uzyskane wyniki wskazują, że wyodrębnione przeze mnie w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego szczura geny lub funkcjonalnie powiązane grupy genów odgrywają kluczową rolę w trakcie epileptogenezy oraz procesach związanych z tworzeniem się pamięci emocji. Dane te nie tylko pogłębiają naszą wiedzę na temat rozwoju padacz-

ki jak i zaburzeń poznawczych jej towarzyszących, ale stanowiącą podstawę do opracowania nowych terapii zapobiegających rozwojowi tej choroby oraz jej powikłań.

7. STRESZCZENIE

Padaczka to najczęstsza choroba neurologiczna wieku dziecięcego, a druga co do częstości (po udarach) choroba neurologiczna u dorosłych. U około 60% chorych padaczka rozwija się w następstwie urazu początkowego (np. urazu czaszkowo-mózgowego, udaru, zapalenia mózgu lub stanu drgawkowego). Proces ten można podzielić na 3 etapy, czyli uraz początkowy, epileptogenezę (bezobjawowy okres latencji trwający miesiące a nawet lata) oraz samoistne, nawracające drgawki, równoznaczne z rozpoznaniem padaczki. Jedną z padaczek rozwijających się najczęściej w wieku dorosłym jest padaczka skroniowa (TLE), a strukturą, która często dotknięta jest przez proces epileptogenezy jest ciało migdałowate. Jedną z lepiej poznanych funkcji ciała migdałowatego jest jego udział w procesach związanych z uczeniem się i pamięcią emocji. U podłoża szeregu zjawisk towarzyszących zarówno epileptogenezie jak i tworzeniu się pamięci emocji leżą zmiany w ekspresji genów. W literaturze spotkać można wiele prac dotyczących zaburzeń ekspresji genów w epileptogenezie i padaczce, nie mniej jednak większość tych badań dotyczy dużych obszarów mózgowia, a nie pojedynczych struktur. Natomiast zmiany ekspresji genów w trakcie tworzenia się pamięci emocji (głównie strachu) badane były przede wszystkim w mózgu zdrowym. Dlatego też w swoich badaniach skupiłam się na analizie zmian ekspresji genów w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego u szczurów będących w trakcie epileptogenezy, czyli w warunkach, gdy struktura ta dotknięta jest już patologią. W szczególności postanowiłam udzielić odpowiedzi na pytania:

1. Które geny zmieniają ekspresję w trakcie epileptogenezy w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego szczura?
2. Czy zmiany ekspresji tych genów występowały także w innych doświadczalnych modelach padaczki lub wiązano je z padaczką u ludzi?
3. W jaki sposób proces epileptogenezy wpływa na warunkowanie strachu u szczura?
4. Czy i jakie różnice obserwowane są w ekspresji genów związanych z warunkowaniem strachu u zwierząt będących w trakcie epileptogenezy i zwierząt kontrolnych?

Proces epileptogenezy zapoczątkowany został elektrycznym drażnieniem ciała migdałowatego, które wywołuje stan drgawkowy (SE). W osiem dni po SE zwierzęta w trakcie epileptogenezy oraz zwierzęta kontrolne poddane zostały procedurze klasycznego warunkowania strachu, która stanowi uznany model uczenia się i pamięci emocji. Z mózgowi tych zwierząt przy użyciu laserowej mikrodysekcji wyodrębniono kompleks podstawno-bocznego ciała migdałowatego, a z uzyskanej tkanki wyizolowano i zamplifikowano RNA, które następnie hybrydyzowane było do mikromacierzy oligonukleotydowych Affymetrix zawierających sondy reprezentujące cały genom szczura. Dane uzyskane za pomocą mikromacierzy poddane zostały analizie bioinformatycznej. Część wyników

uzyskanych za pomocą mikromacierzy potwierdzono metodą ilościowego RT-PCR.

Moje badania wykazały, że w trakcie procesu epileptogenezy w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego szczura aż 657 genów znacząco zmieniło swoją ekspresję. Co najmniej 81 z nich było już wcześniej opisywanych w trakcie epileptogenezy lub padaczki, ale znaczna część to geny, które nie były jeszcze wiązane z tym procesem. Na szczególną uwagę zasługuje także grupa funkcjonalnie powiązanych ze sobą genów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną mózgu, gdyż proces ten jest coraz częściej wymieniany jako jedno z kluczowych zjawisk towarzyszących epileptogenezie i padaczce. Zaobserwowałam także, że już na wczesnym etapie epileptogenezy obserwuje się upośledzenie warunkowania strachu. Co więcej, moje badania wykazały, że proces epileptogenezy w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego szczura znacząco wpływał na ekspresję 26 genów, tj. pod wpływem warunkowania strachu obserwowano przeciwstawne kierunki zmian ekspresji tych genów u zwierząt będących w trakcie epileptogenezy oraz zwierząt kontrolnych. Wśród nich na uwagę zasługuje grupa 5 genów związanych z procesami plastyczności neuronalnej, tj. *Dock3*, *Itsn1*, *Kcnc2*, *Myt1l* oraz *Nrn1*, których ekspresja zmieniała się w podobny sposób w pod wpływem warunkowania strachu. Podsumowując, moje badania wykazały więc, że proces epileptogenezy znacząco wpływa na zmianę ekspresji wielu genów w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego. Część z tych genów była już wcześniej wiązana z procesami epileptogenezy i padaczki, lecz większość z nich była jednak po raz pierwszy wymieniana w kontekście tych procesów. Moje badania podkreślają także znaczącą rolę genów powiązanych funkcjonalnie z anotacją „odpowiedź immunologiczna” w patomechanizmie epileptogenezy. Na wczesnym etapie epileptogenezy zaobserwować można także upośledzenie procesu uczenia się i pamięci emocji. Zmiany te mogą być, między innymi, wywołane zaburzeniami w ekspresji genów zaangażowanych w procesy uczenia się i pamięci emocji w kompleksie podstawno-bocznym ciała migdałowatego dotkniętego procesem epileptogenezy. Zaburzenia te stanowią mogą jeden z mechanizmów prowadzących do upośledzenia funkcji poznawczych u chorych na padaczkę.

Szczegółowe badania roli poszczególnych genów jak i funkcjonalnie powiązanych grup genów w procesie epileptogenezy przyczynią się do pogłębienia wiedzy na temat rozwoju padaczki jak i zaburzeń poznawczych jej towarzyszących. W przyszłości może przyczynić się to do opracowania nowych terapii zapobiegających rozwojowi tej choroby lub przynajmniej w korzystny sposób modyfikujących rozwój padaczki oraz chorób z nią współistniejących.

8. SUMMARY

Epilepsy is the most common neurological disorder in children and second most common (after stroke) in adults. In approximately 60% of those patients epilepsy develops as a result of initial insult (e.g. brain injury, stroke, brain inflammation, or status epilepticus). In this group of patients the epileptic process develops in three phases, that is: 1) initial insult, 2) epileptogenesis (seizure-free latency phase that can last for years) and 3) spontaneous recurrent seizures that equal epilepsy. One of the most common type of epilepsy in adults is temporal lobe epilepsy (TLE) and the structure that is frequently affected by this process is the amygdaloid complex. Amygdaloid complex is the key structure playing role in emotional learning and memory processing. The processes underlying both, epileptogenesis and emotional learning include gene expression changes. In the scientific literature we already can find data related to gene expression changes in epileptogenesis and epilepsy, but in those studies larger brain region (e.g. whole temporal lobe) rather than single structure (like amygdala) were analyzed. On the other hand gene expression changes underlying formation of emotional memories (fear memories in general) were performed on intact brain. Therefore in my analysis I have focused on gene expression changes within the basolateral nucleus of the amygdaloid complex in rats undergoing epileptogenesis, that is in pathologic conditions. In particular, the question I aimed to answer were:

1. Which genes change their expression during epileptogenesis in the basolateral nucleus of rat amygdala?
2. Were they previously linked to epileptogenesis in other experimental models or human epilepsy?
3. Does epileptogenesis influence fear conditioning in rat?
4. Are there any differences in gene expression pattern related to fear conditioning procedure in epileptogenic and healthy animals?

Epileptogenesis was triggered by electrical stimulation of the lateral nucleus of amygdala which resulted in status epilepticus (SE). Eight days later the classical fear conditioning, a well established model of emotional learning and memory, was performed. Three hours after termination of the fear conditioning procedure the animals were sacrificed and the temporal lobes were isolated. Then, the basolateral nuclei of amygdala were laser-microdissected, their RNAs were isolated, amplified and subjected to molecular profiling using Affymetrix Gene Chip covering whole genome of rat. The obtained data were analyzed using standard bionformatical methods. Part of the microarray data was confirmed using semi-quantitative RT-PCR.

My analysis revealed that epileptogenesis induced significant changes in expression of 657 genes within the basolateral nucleus of amygdala. At least 81 of them were previously implicated to play role in this process. It is important to mention genes that were functionally linked to immune response which appears

to be one of the key processes underlying epileptogenesis or epilepsy. At this stage of epileptogenesis the impairment of classical fear conditioning was also observed. My analysis revealed that in the basolateral amygdala epileptogenesis significantly influenced expression of 26 genes, that is after acquisition of fear conditioning the opposite direction of changes in expression levels were observed in rats undergoing epileptogenesis and healthy controls. Further analysis indicated that fear conditioning induced similar changes in expression pattern of genes like *Dock3*, *Itsn1*, *Kcnc2*, *Mytl1* and *Nrn1* that have already been demonstrated to have functions in neuronal plasticity.

Summarizing, this study revealed that epileptogenesis significantly influences expression pattern of numerous genes in the basolateral nucleus of rat amygdala. Some of them were previously linked to epileptogenesis or epilepsy, but majority of them was related to this process for the first time. This data also indicate the important role of genes functionally linked to GO term “immune response” in pathomechanism of epileptogenesis. At the early stages of epileptogenesis the impairment of emotional learning and memory processing can also be observed. Differences in expression pattern of genes within the epileptogenesis-affected basolateral amygdala may partially be responsible for this process. These changes may constitute one of the pathomechanism underlying cognitive function deficits in epileptic patients.

Understanding the function of altered genes or functionally linked groups of genes during epileptogenesis will help us to understand the complexity of this process as well as cognitive deficits accompanying it. These data provide an attractive avenue for identification of novel drug targets for preventing epileptogenesis or at least having positive disease-modifying effect on epilepsy and its comorbidities.

9. PIŚMIENICTWO

1. Aarli J.A.: Epilepsy and the immune system. *Arch. Neurol.* 2000, 57, 1689-1692.
2. Acharya M.M., Hattiangady B., Shetty A.K.: Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy. *Prog. Neurobiol.* 2008, 84, 363-404.
3. Adolphs A.: Is the human amygdala specialized for processing of social information? W: Shinnick-Gallagher P., Pitkanen A., Cahill L. (red.): *The amygdala in brain function.* New York: The New York Academy of Sciences, 2003, s. 326-340.
4. Akahoshi N., Murashima Y.L., Himi T., Ishizaki Y., Ishii I.: Increased expression of the lysosomal protease cathepsin S in hippocampal microglia following kainate-induced seizures. *Neurosci. Lett.* 2007, 429, 136-141.
5. Alme M.N., Wibrand K., Dagestad G., Bramham C.R.: Chronic fluoxetine treatment induces brain region-specific upregulation of genes associated with BDNF-induced long-term potentiation. *Neural. Plast.* 2007, 26496.
6. Aroniadou-Anderjaska V., Fritsch B., Qashu F., Braga M.F.: Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. *Epilepsy Res.* 2008, 78, 102-116.
7. Aronica E., van Vliet E.A., Hendriksen E., Troost D., Lopes da Silva F.H., Gorter J.A.: Cystatin C, a cysteine protease inhibitor, is persistently up-regulated in neurons and glia in a rat model for mesial temporal lobe epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* 2001, 14, 1485-1491.
8. Aronica E., Gorter J.A.: Gene expression profile in temporal lobe epilepsy. *Neuroscientist* 2007, 13, 2, 100-8.
9. Aronica E., Boer K., Becker A., Redeker S., Spliet W.G., van Rijen P.C., Wittink F., Breit T., Wadman W.J., Lopes da Silva F.H., Troost D., Gorter J.A.: Gene expression profile analysis of epilepsy-associated gangliogliomas. *Neuroscience* 2008, 151, 272-292.
10. Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A., Botstein D., Butler H., Cherry J.M., Davis A.P., Dolinski K., Dwight S.S., Eppig J.T., Harris M.A., Hill D.P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J.C., Richardson J.E., Ringwald M., Rubin G.M., Sherlock G.: Gene ontology: tool for the unification of biology. *The Gene Ontology Consortium. Nat Genet.* 2000, 25, 25-29.
11. Baker C.A., Martin D., Manuelidis L.: Microglia from Creutzfeldt-Jakob disease-infected brains are infectious and show specific mRNA activation profiles. *J. Virol.* 2002, 76, 10905-10913.
12. Bar Am O., Amit T., Youdim M.B.: Contrasting neuroprotective and neurotoxic actions of respective metabolites of anti-Parkinson drugs rasagiline and selegiline. *Neurosci. Lett.* 2004, 355, 169-172.

13. Bauer J.: Interactions between hormones and epilepsy in female patients. *Epilepsia*, 2001, 42, supl. 3, 20-22.
14. Bechara A., Tranel D., Damasio H., Adolphs R., Rockland C., Damasio A.R.: Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science*, 1995, 269, 1115-1118.
15. Becker A.J., Chen J., Paus S., Normann S., Beck H., Elger C.E., Wiestler O.D., Blumcke I.: Transcriptional profiling in human epilepsy: expression array and single cell real-time qRT-PCR analysis reveal distinct cellular gene regulation. *Neuroreport*, 2002, 13, 1327-1333.
16. Becker A.J., Chen J., Zien A., Sochivko D., Normann S., Schramm J., Elger C.E., Wiestler O.D., Blumcke I.: Correlated stage- and subfield-associated hippocampal gene expression patterns in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* 2003, 18, 2792-2802.
17. Beissbarth T., Speed T.P.: Gostat: find statistically overrepresented Gene Ontologies within a group of genes. *Bioinformatics*, 2004, 20, 1464-1465.
18. Bell R.D., Sagare A.P., Friedman A.E., Bedi G.S., Holtzman D.M., Deane R., Zlokovic B.V.: Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007, 27, 909-918.
19. Belluardo N., Mudo G., Dell'Albani P., Jiang X.H., Condorelli D.F.: NMDA receptor-dependent and -independent immediate early gene expression induced by focal mechanical brain injury. *Neurochem. Int.* 1995, 26, 5, 443-53.
20. Bernardino L., Ferreira R., Cristovao A.J., Sales F., Malva J.O.: Inflammation and neurogenesis in temporal lobe epilepsy. *Curr Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 2005, 4, 349-360.
21. Billiau A.D., Wouters C.H., Lagae L.G.: Epilepsy and the immune system: is there a link? *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 2005, 9, 29-42.
22. Brandt C., Potschka H., Löscher W., Ebert U.: 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*, 2003, 118, 3, 727-40.
23. Brandt C., Gastens A.M., Sun M., Hausknecht M., Löscher W.: Treatment with valproate after status epilepticus: effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats. *Neuropharmacology*, 2006, 51, 789-804.
24. Brown S., Schafer E.A.: An investigation into the functions of occipital and temporal lobe of the monkey's brain. *Philosoph. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1888, 179, 303-327.
25. Cahill L., Babinsky R., Markowitsch H.J., McGaugh J.L.: The amygdala and emotional memory. *Nature*, 1995, 377, 295-296.

26. Calero M., Rostagno A., Frangione B., Ghiso J.: Clusterin and Alzheimer's disease. *Subcell. Biochem.* 2005, 38, 273-298.
27. Carrette O., Demalte I., Scherl A., Yalkinoglu O., Corthals G., Burkhard P., Hochstrasser D.F., Sanchez J.C.: A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Proteomics*, 2003, 3, 1486-1494.
28. Chen Q., Kimura H., Schubert D.: A novel mechanism for the regulation of amyloid precursor protein metabolism. *J. Cell. Biol.* 2002, 158, 79-89.
29. Chen Q., Chen T.J., Letourneau P.C., Costa Lda F., Schubert D.: Modifier of cell adhesion regulates N-cadherin-mediated cell-cell adhesion and neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 2005, 25:281-290.
30. Cheung M.C., Chan A.S., Chan Y.L., Lam J.M., Lam W.: Effects of illness duration on memory processing of patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 2006, 47, 1320-1328.
31. Choi J., Koh S.: Role of brain inflammation in epileptogenesis. *Yonsei. Med. J.* 2008, 49, 1-18.
32. Chow A., Erisir A., Farb C., Nadal M.S., Ozaita A., Lau D., Welker E., Rudy B.: K(+) channel expression distinguishes subpopulations of parvalbumin- and somatostatin-containing neocortical interneurons. *J. Neurosci.* 1999, 19, 9332-9345.
33. Crino PB.: Gene expression, genetics, and genomics in epilepsy: some answers, more questions. *Epilepsia.* 2007, 48, suppl. 2, 42-50.
34. Christensen J., Kjeldsen M.J., Andersen H., Friis M.L., Sidenius P.: Gender differences in epilepsy. *Epilepsia*, 2005, 46, 956-960.
35. Czapinski P., Blaszczyk B., Czuczwar S.J.: Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* 2005, 5, 3-14.
36. Dedeurwaerdere S., Jupp B., O'Brien T.J.: Positron Emission Tomography in basic epilepsy research: a view of the epileptic brain. *Epilepsia*, 2007, 48, suppl. 4, 56-64.
37. de Silva M.G., Elliott K., Dahl H.H., Fitzpatrick E., Wilcox S., Delatycki M., Williamson R., Efron D., Lynch M., Forrest S.: Disruption of a novel member of a sodium/hydrogen exchanger family and DOCK3 is associated with an attention deficit hyperactivity disorder-like phenotype. *J. Med. Genet.* 2003, 40, 733-740.
38. Diedrich J.F., Carp R.I., Haase A.T.: Increased expression of heat shock protein, transferrin, and beta 2-microglobulin in astrocytes during scrapie. *Microb. Pathog.* 2003, 15, 1-6.
39. Di Giovanni S., Faden A.I., Yakovlev A., Duke-Cohan J.S., Finn T., Thouin M., Knobloch S., De Biase A., Bregman B.S., Hoffman E.P.: Neuronal plas-

- ticity after spinal cord injury: identification of a gene cluster driving neurite outgrowth. *FASEB J.* 2005, 19, 153-154.
40. Dos Santos J.G., Jr., Longo B.M., Blanco M.M., Menezes de Oliveira M.G., Mello L.E.: Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res.* 2005, 1066, 37-48.
 41. Draghici S., Kuklin A.: *Tools for DNA Microarrays.* CRC Press. 2003. ISBN 1584883154.
 42. Dragunow M., Preston K., Dodd J., Young D., Lawlor P., Christie D.: Clusterin accumulates in dying neurons following status epilepticus. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 1995, 32, 279-290.
 43. Dudek F.E., Sutula T.P.: Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective. *Prog Brain Res.* 2007, 163, 755-73.
 44. Dudra-Jastrzebska M., Andres-Mach M.M., Luszczki J.J., Czuczwar S.J.: Mood disorders in patients with epilepsy. *Pharmacol. Rep.* 2007, 59, 369-378.
 45. Edstrom E., Kullberg S., Ming Y., Zheng H., Ulfhake B.: MHC class I, beta2 microglobulin, and the INF-gamma receptor are upregulated in aged motoneurons. *J. Neurosci. Res.* 2004, 78, 892-900.
 46. Elliott R.C., Miles M.F., Lowenstein D.H.: Overlapping microarray profiles of dentate gyrus gene expression during development- and epilepsy-associated neurogenesis and axon outgrowth. *J. Neurosci.* 2003, 23, 2218-2227.
 47. Engel J. Jr.: A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 2001, 42, 796-803.
 48. Fassunke J., Majores M., Tresch A., Niehusmann P., Grote A., Schoch S., Becker A.J.: Array analysis of epilepsy-associated gangliogliomas reveals expression patterns related to aberrant development of neuronal precursors. *Brain*, 2008, 131, 3034-3050.
 49. Flannery T., McQuaid S., McGoohan C., McConnell R.S., McGregor G., Mirakhur M., Hamilton P., Diamond J., Cran G., Walker B., Scott C., Martin L., Ellison D., Patel C., Nicholson C., Mendelow D., McCormick D., Johnston P.G.: Cathepsin S expression: An independent prognostic factor in glioblastoma tumours--A pilot study. *Int. J. Cancer*, 2006, 119, 854-860.
 50. Flynn C., Monfils M.H., Kleim J.A., Kolb B., McIntyre D.C., Teskey G.C. Differential neuroplastic changes in neocortical movement representations and dendritic morphology in epilepsy-prone and epilepsy-resistant rat strains following high-frequency stimulation. *Eur. J. Neurosci.* 2004, 19, 2319-2328.
 51. Freeman J.M., Kossoff E.H., Hartman A.L.: The ketogenic diet: one decade later. *Pediatrics*, 2007, 119, 535-543.

52. French J.A. et al.: Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs I: treatment of new onset epilepsy: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee and Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Neurology*, 2004, 62, 1252-1260.
53. Frey L.C.: Epidemiology of posttraumatic epilepsy: a critical review. *Epilepsia* 2003, 44, supl. 10, 11-7.
54. Fujino T., Lee W.C., Nedivi E.: Regulation of cpg15 by signaling pathways that mediate synaptic plasticity. *Mol. Cell. Neurosci.* 2003, 24, 538-554.
55. Gardiner R.M.: Impact of our understanding of the genetic aetiology of epilepsy. *J. Neurol.* 2000, 247, 327-34.
56. Glauser T., Ben-Menachem E., Bourgeois B., Cnaan A., Chadwick D., Guerreiro C., Kalviainen R., Mattson R., Perucca E., Tomson T.: ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia*, 2006, 47, 1094-1120.
57. Goncalves Pereira P.M., Insausti R., Artacho-Perula E., Salmenpera T., Kalviainen R., Pitkanen A.: MR volumetric analysis of the piriform cortex and cortical amygdala in drug-refractory temporal lobe epilepsy. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2005, 26, 319-332.
58. Goncalves-Pereira P.M., Oliveira E., Insausti R.: Quantitative volumetric analysis of the hippocampus, amygdala and entorhinal cortex: normative database for the adult Portuguese population. *Rev. Neurol.* 2006, 42, 713-722.
59. Gorter J.A., Van Vliet E.A., Rauwerda H., Breit T., Stad R., van Schaik L., Vreugdenhil E., Redeker S., Hendriksen E., Aronica E., Lopes da Silva F.H., Wadman W.J.: Dynamic changes of proteases and protease inhibitors revealed by microarray analysis in CA3 and entorhinal cortex during epileptogenesis in the rat. *Epilepsia*, 2007, 48, supl. 5, 53-64.
60. Gottlicher M., Minucci S., Zhu P., Kramer O.H., Schimpf A., Giavara S., Sleeman J.P., Lo Coco F., Nervi C., Pelicci P.G., Heinzl T.: Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 2001, 20, 6969-6978.
61. Grabowska-Grzyb A., Jędrzejczak J., Naganska E., Fiszer U.: Risk factors for depression in patients with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2006, 8, 411-417.
62. Grewal J., Grewal H.K., Forman A.D.: Seizures and epilepsy in cancer: etiologies, evaluation, and management. *Curr. Oncol. Rep.* 2008, 10, 63-71.
63. Grohn O., Pitkanen A.: Magnetic resonance imaging in animal models of epilepsy-noninvasive detection of structural alterations. *Epilepsia*, 2007, 48, supl. 4, 3-10.

64. Guinec N., Dalet-Fumeron V., Pagano M.: *In vitro* study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. Digestion of collagen IV, laminin, fibronectin, and release of gelatinase activities from basement membrane fibronectin. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 1993, 374, 1135-1146.
65. Han B.H., DeMattos R.B., Dugan L.L., Kim-Han J.S., Brendza R.P., Fryer J.D., Kierson M., Cirrito J., Quick K., Harmony J.A., Aronow B.J., Holtzman D.M.: Clusterin contributes to caspase-3-independent brain injury following neonatal hypoxia-ischemia. *Nat. Med.* 2001, 7, 338-343.
66. Hatazaki S., Bellver-Estelles C., Jimenez-Mateos E.M., Meller R., Bonner C., Murphy N., Matsushima S., Taki W., Prehn J.H., Simon R.P., Henshall D.C.: Microarray profile of seizure damage-refractory hippocampal CA3 in a mouse model of epileptic preconditioning. *Neuroscience*, 2007, 150, 467-477.
67. Hauser W.A., Annegers J.F., Kurland L.T.: Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia* 1993, 34, 453-468.
68. Hayman L.A., Rexer J.L., Pavol M.A., Strite D., Meyers C.A.: Kluver-Bucy syndrome after bilateral selective damage of amygdala and its cortical connections. *J. Neuropsychiatry. Clin. Neurosci.* 1998, 10, 354-358.
69. Helmstetter F.J., Parsons R.G., Gafford G.M.: Macromolecular synthesis, distributed synaptic plasticity, and fear conditioning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2008, 89, 324-337.
70. Hendriks M.P., Aldenkamp A.P., Alpherts W.C., Ellis J., Vermeulen J., van der Vlugt H.: Relationships between epilepsy-related factors and memory impairment. *Acta. Neurol. Scand.* 2004, 110, 291-300.
71. Hendriksen H., Datson N.A., Ghijsen W.E., van Vliet E.A., da Silva F.H., Gorter J.A., Vreugdenhil E.: Altered hippocampal gene expression prior to the onset of spontaneous seizures in the rat post-status epilepticus model. *Eur J. Neurosci.* 2001, 14, 1475-1484.
72. Henshall D.C., Simon R.P.: Epilepsy and apoptosis pathways. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2005, 25, 12, 557-72.
73. Hermann B., Seidenberg M., Jones J. The neurobehavioural comorbidities of epilepsy: can a natural history be developed? *Lancet Neurol.* 2008, 7, 151-160.
74. Hoffman G.E., Merchenthaler I., Zup S.L. Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease. *Endocrine* 2006, 29, 217-231.
75. Hoffmann K., Czapp M., Löscher W.: Increase in antiepileptic efficacy during prolonged treatment with valproic acid: role of inhibition of histone deacetylases? *Epilepsy Res.* 2008, 81, 107-13.

76. Huang L.T., Holmes G.L., Lai M.C., Hung P.L., Wang C.L., Wang T.J., Yang C.H., Liou C.W., Yang S.N.: Maternal deprivation stress exacerbates cognitive deficits in immature rats with recurrent seizures. *Epilepsia*, 2002, 43, 1141-1148.
77. Humeau Y., Vitale N., Chasserot-Golaz S., Dupont J.L., Du G., Frohman M.A., Bader M.F., Poulain B.: A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2001, 98, 15300-15305.
78. Hunt R.F., Scheff S.W., Smith B.N.: Posttraumatic epilepsy after controlled cortical impact injury in mice. *Exp. Neurol.* 2009, 215, 243-252.
79. Irie F., Yamaguchi Y.: EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nat. Neurosci.* 2002, 5, 1117-1118.
80. Jacobson R.: Disorders of facial recognition, social behaviour and affect after combined bilateral amygdalotomy and subcaudate tractotomy--a clinical and experimental study. *Psychol. Med.* 1986, 16, 439-450.
81. Jamali S., Bartolomei F., Robaglia-Schlupp A., Massacrier A., Peragut J.C., Regis J., Dufour H., Ravid R., Roll P., Pereira S., Royer B., Roeckel-Trevisiol N., Fontaine M., Guye M., Boucraut J., Chauvel P., Cau P., Szepe-towski P.: Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. *Brain*, 2006, 129, 625-641.
82. Jessberger S., Nakashima K., Clemenson G.D. Jr., Mejia E., Mathews E., Ure K., Ogawa S., Sinton C.M., Gage F.H., Hsieh J.: Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline. *J. Neurosci.* 2007, 27, 5967-75.
83. Jędrzejczak J.: Zastosowanie funkcjonalnego rezonansu magnetycznego w ocenie zaburzeń pamięci u chorych z padaczką. *Postępy Nauk Medycznych.* 2006, 93-93.
84. Jobe P.C.: Common pathogenic mechanisms between depression and epilepsy: an experimental perspective. *Epilepsy Behav.* 2003, 4, suppl. 3, S14-24.
85. Johansson S., Fuchs A., Okvist A., Karimi M., Harper C., Garrick T., Sheedy D., Hurd Y., Bakalkin G., Ekstrom T.J.: Validation of endogenous controls for quantitative gene expression analysis: application on brain cortices of human chronic alcoholics. *Brain Res.* 2007, 1132, 20-28.
86. Jyoti A., Sethi P., Sharma D.: Aging accelerates the progression and manifestation of seizures in post-traumatic model of epilepsy. *Neurosci. Lett.* 2009, 453, 86-91.
87. Kabos P., Kabosova A., Neuman T.: Neuronal injury affects expression of helix-loop-helix transcription factors. *Neuroreport*, 2002, 13, 2385-2388.
88. Kanner A.M.: Epilepsy and mood disorders. *Epilepsia*, 2007, 48, suppl., 9, 20-22.

-
89. Kanner A.M., Balabanov A.: Depression and epilepsy: how closely related are they? *Neurology*, 2002, 58, S27-39.
 90. Karhunen H., Jolkkonen J., Sivenius J., Pitkanen A.: Epileptogenesis after experimental focal cerebral ischemia. *Neurochem. Res.* 2005, 30, 1529-1542.
 91. Karhunen H., Bezvenyuk Z., Nissinen J., Sivenius J., Jolkkonen J., Pitkanen A.: Epileptogenesis after cortical photothrombotic brain lesion in rats. *Neuroscience*, 2007, 148, 314-324.
 92. Keller S.S., Roberts N.: Voxel-based morphometry of temporal lobe epilepsy: an introduction and review of the literature. *Epilepsia*, 2008, 49, 741-757.
 93. Kempainen E.J., Nissinen J., Pitkanen A.: Fear conditioning is impaired in systemic kainic acid and amygdala-stimulation models of epilepsy. *Epilepsia*, 2006, 47, 820-829.
 94. Kharatishvili I., Nissinen J.P., McIntosh T.K., Pitkanen A.: A model of post-traumatic epilepsy induced by lateral fluid-percussion brain injury in rats. *Neuroscience* 2006, 140, 685-697.
 95. Kim J.J., Jung M.W.: Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2006, 30, 188-202.
 96. Kim S.K., Wang K.C., Hong S.J., Chung C.K., Lim S.Y., Kim Y.Y., Chi J.G., Kim C.J., Chung Y.N., Kim H.J., Cho B.K.: Gene expression profile analyses of cortical dysplasia by cDNA arrays. *Epilepsy Res.* 2003, 56, 175-183.
 97. Klüver H., Bucy P.C.: Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Arch. Neurol. Psychiatry.* 1939, 42, 979-1000.
 98. Knapska E., Radwanska K., Werka T., Kaczmarek L.: Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiol. Rev.* 2007, 87, 1113-1173.
 99. Koh S., Magid R., Chung H., Stine C.D., Wilson D.N.: Depressive behavior and selective down-regulation of serotonin receptor expression after early-life seizures: reversal by environmental enrichment. *Epilepsy Behav.* 2007, 10:26-31.
 100. Kohling R., Nischt R., Vasudevan A., Ho M., Weiergraber M., Schneider T., Smyth N.: Nidogen and nidogen-associated basement membrane proteins and neuronal plasticity. *Neurodegener. Dis.* 2006, 3, 56-61.
 101. Korpi E.R., Sinkkonen S.T.: GABA(A) receptor subtypes as targets for neuropsychiatric drug development. *Pharmacol. Ther.* 2006, 109:12-32.
 102. Kotsopoulos I.A., van Merode T., Kessels F.G., de Krom M.C., Knottnerus J.A.: Systematic review and meta-analysis of incidence studies of epilepsy and unprovoked seizures. *Epilepsia*, 2002, 43, 1402-1409.

103. Kwan P., Brodie M.J.: Clinical trials of antiepileptic medications in newly diagnosed patients with epilepsy. *Neurology*, 2003, 60:S2-12.
104. LaBar K.S., LeDoux J.E., Spencer D.D., Phelps E.A.: Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans. *J Neurosci.* 1995, 15, 6846-6855.
105. Lassmann H.: Mechanisms of inflammation induced tissue injury in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2008, 274, 1-2, 45-7.
106. LeDoux J.E.: Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 2000, 23, 155-184.
107. Lee J.E., Hollenberg S.M., Snider L., Turner D.L., Lipnick N., Weintraub H.: Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science*, 1995, 268, 836-844.
108. Lee W.C., Nedivi E.: Extended plasticity of visual cortex in dark-reared animals may result from prolonged expression of *cpg15*-like genes. *J Neurosci.* 2002, 22, 1807-1815.
109. Lee T.S., Mane S., Eid T., Zhao H., Lin A., Guan Z., Kim J.H., Schweitzer J., King-Stevens D., Weber P., Spencer S.S., Spencer D.D., de Lanerolle N.C.: Gene expression in temporal lobe epilepsy is consistent with increased release of glutamate by astrocytes. *Mol. Med.* 2007, 13, 1-13.
110. Lieuallen K., Pennacchio L.A., Park M., Myers R.M., Lennon G.G.: Cystatin B-deficient mice have increased expression of apoptosis and glial activation genes. *Hum. Mol. Genet.* 2001, 10, 1867-1871.
111. Linda H., Hammarberg H., Piehl F., Khademi M., Olsson T.: Expression of MHC class I heavy chain and beta2-microglobulin in rat brainstem motoneurons and nigral dopaminergic neurons. *J. Neuroimmunol.* 1999, 101, 76-86.
112. Lindwall C., Kanje M.: The Janus role of c-Jun: cell death versus survival and regeneration of neonatal sympathetic and sensory neurons. *Exp. Neurol.* 2005, 196, 1, 184-94.
113. Liu M., Pleasure S.J., Collins A.E., Noebels J.L., Naya F.J., Tsai M.J., Lowenstein D.H.: Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000, 97, 865-870.
114. Lukasiuk K., Pirttila T.J., Pitkanen A.: Upregulation of cystatin C expression in the rat hippocampus during epileptogenesis in the amygdala stimulation model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 2002, 43, suppl. 5, 137-145.
115. Lukasiuk K., Kontula L., Pitkanen A.: cDNA profiling of epileptogenesis in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 2003, 17, 271-279.
116. Lukasiuk K., Dabrowski M., Adach A., Pitkanen A.: Epileptogenesis-related genes revisited. *Prog. Brain. Res.* 2006, 158:223-241.

117. Majak K., Pitkanen A.: Activation of the amygdalo-entorhinal pathway in fear-conditioning in rat. *Eur. J. Neurosci.* 2003, 18, 1652-1659.
118. Majak K., Pitkanen A.: Do seizures cause irreversible cognitive damage? Evidence from animal studies. *Epilepsy Behav.* 2004, 5, supl. 1, 35-44.
119. Majak K., Dabrowski M., Pitkanen A.: Epileptogenesis alters gene expression pattern in rats subjected to amygdala-dependent emotional learning. *Neuroscience*, 2009, 159, 468-482.
120. Majores M., Schoch S., Lie A., Becker A.J.: Molecular neuropathology of temporal lobe epilepsy: complementary approaches in animal models and human disease tissue. *Epilepsia*, 2007, 48, supl. 2, 4-12.
121. Markowitsch H.J., Calabrese P., Wurker M., Durwen H.F., Kessler J., Babinsky R., Brechtelsbauer D., Heuser L., Gehlen W.: The amygdala's contribution to memory--a study on two patients with Urbach-Wiethe disease. *Neuroreport*, 1994, 5, 1349-1352.
122. Mathern G.W., Babb T.L., Leite J.P., Pretorius K., Yeoman K.M., Kuhlman P.A.: The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy. Res.* 1996, 26, 151-161.
123. Mazarati A., Shin D., Auvin S., Caplan R., Sankar R.: Kindling epileptogenesis in immature rats leads to persistent depressive behavior. *Epilepsy Behav.* 2007, 10, 377-383.
124. McDonald A.J., Mascagni F.: Differential expression of Kv3.1b and Kv3.2 potassium channel subunits in interneurons of the basolateral amygdala. *Neuroscience*, 2006, 138, 537-547.
125. McIntyre D.C., Gilby K.L.: Genetically seizure-prone or seizure-resistant phenotypes and their associated behavioral comorbidities. *Epilepsia* 2007, 48, supl. 9, 30-32.
126. Meierkord H.: The risk of epilepsy after status epilepticus in children and adults. *Epilepsia*, 2007, 48, sup. 8, 94-95.
127. Milutinovic S., D'Alessio A.C., Detich N., Szyf M.: (2007) Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis*, 28:560-571.
128. Morganti-Kossmann M.C., Satgunaseelan L., Bye N., Kossmann T.: Modulation of immune response by head injury. *Injury*, 2007, 38, 12, 1392-400.
129. Morris J.S., Dolan R.J.: Dissociable amygdala and orbitofrontal responses during reversal fear conditioning. *Neuroimage*, 2004, 22, 372-380.
130. Naegele J.R.: Neuroprotective strategies to avert seizure-induced neurodegeneration in epilepsy. *Epilepsia*, 2007, 48, supl. 2, 107-17.

131. Naeve G.S., Ramakrishnan M., Kramer R., Hevroni D., Citri Y., Theill .L.E.: Neuritin: a gene induced by neural activity and neurotrophins that promotes neuritogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1997, 94, 2648-2653.
132. Namikawa K., Su Q., Kiryu-Seo S., Kiyama H.: Enhanced expression of 14-3-3 family members in injured motoneurons. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 1998, 55, 315-320.
133. Narkilahti S., Nissinen J. Pitkanen A.: Administration of caspase 3 inhibitor during and after status epilepticus in rat: effect on neuronal damage and epileptogenesis. *Neuropharmacology*, 2003, 44, 1068-1088.
134. Narkilahti S., Jutila L., Alafuzoff I., Karkola K., Paljarvi L., Immonen A., Vapalahti M., Mervaala E., Kalviainen R., Pitkanen A.: Increased expression of caspase 2 in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Neuro-molecular Med.* 2007, 9, 129-144.
135. Neal E.G., Chaffe H., Schwartz R.H., Lawson M.S., Edwards N., Fitzsimmons G., Whitney A., Cross J.H.: A randomized trial of classical and medium-chain triglyceride ketogenic diets in the treatment of childhood epilepsy. *Epilepsia*, 2009, 50, 1109-1117.
136. Nehlig A.: What is animal experimentation telling us about new drug treatments of status epilepticus? *Epilepsia*, 2007, 48, suppl. 8, 78-81.
137. Niquet J., Represa A.: Entactin immunoreactivity in immature and adult rat brain. *Brain. Res. Dev. Brain Res.* 1996, 95, 227-233.
138. Nissinen J., Halonen T., Koivisto E., Pitkanen A.: A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat. *Epilepsy Res.* 2000, 38, 177-205.
139. Nissinen J., Lukasiuk K., Pitkanen A.: Is mossy fiber sprouting present at the time of the first spontaneous seizures in rat experimental temporal lobe epilepsy? *Hippocampus*, 2001, 11, 299-310.
140. Oliveira A.L., Thams S., Lidman O., Piehl F., Hokfelt T., Karre K., Linda H., Cullheim S.: A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2004, 101, 17843-17848.
141. Ozbas-Gerceker F. Redeker S. Boer K. Ozguc M. Saygi S. Dalkara T. Soylemezoglu F. Akalan N. Baayen J.C., Gorter J.A., Aronica E.: Serial analysis of gene expression in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 2006, 138, 457-474.
142. Papandrea D., Anderson T.M., Herron B.J., Ferland R.J.: Dissociation of seizure traits in inbred strains of mice using the flurothyl kindling model of epileptogenesis. *Exp. Neurol.* 2009, 215, 60-68.
143. Pape H.C., Stork O.: Genes and mechanisms in the amygdala involved in the formation of fear memory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003, 985, 92-105.

144. Parent J.M.: Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Prog. Brain Res.* 2007, 163, 529-540.
145. Patterson R.L., Boehning D., Snyder S.H.: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu. Rev. Biochem.* 2004, 73, 437-465.
146. Paxinos G., Watson C.: *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press, San Diego, 1986. ISBN 0125476213.
147. Pennacchio L.A., Bouley D.M., Higgins K.M., Scott M.P., Noebels J.L., Myers R.M.: Progressive ataxia, myoclonic epilepsy and cerebellar apoptosis in cystatin B-deficient mice. *Nat. Genet.* 1998, 20, 251-258.
148. Peper M., Karcher S., Wohlfarth R., Reinshagen G., LeDoux J.E.: Aversive learning in patients with unilateral lesions of the amygdala and hippocampus. *Biol. Psychol.* 2001, 58, 1-23.
149. Peper M.: Imaging emotional brain functions: conceptual and methodological issues. *J. Physiol. Paris.* 2006, 99, 293-307.
150. Peper M., Herpers M., Spreer J., Hennig J., Zentner J.: Functional neuroimaging of emotional learning and autonomic reactions. *J. Physiol. Paris* 2006, 99, 342-354.
151. Peyrl A., Weitzdoerfer R., Gulesserian T., Fountoulakis M., Lubec G.: Aberrant expression of signaling-related proteins 14-3-3 gamma and RACK1 in fetal Down syndrome brain (trisomy 21). *Electrophoresis*, 2002, 23, 152-157.
152. Phelps E.A., LeDoux J.E.: Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron*, 2005, 48, 175-187.
153. Phiel C.J., Zhang F., Huang E.Y., Guenther M.G., Lazar M.A., Klein P.S.: Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 36734-36741.
154. Pirttila T.J., Lukasiuk K., Hakansson K., Grubb A., Abrahamson M., Pitkanen A.: Cystatin C modulates neurodegeneration and neurogenesis following status epilepticus in mouse. *Neurobiol. Dis.* 2005, 20, 241-253.
155. Pirttila T.J., Manninen A., Jutila L., Nissinen J., Kalviainen R., Vapalahti M., Immonen A., Paljarvi L., Karkola K., Alafuzoff I., Mervaala E., Pitkanen A.: Cystatin C expression is associated with granule cell dispersion in epilepsy. *Ann. Neurol.* 2005, 58, 211-223.
156. Pirttila T.J., Pitkanen A.: Cystatin C expression is increased in the hippocampus following photothrombotic stroke in rat. *Neurosci. Lett.* 2006, 395, 108-113.
157. Pitkanen A., Savander V., LeDoux J.E.: Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends. Neurosci.* 1997, 20, 517-523.

158. Pitkanen A., Tuunanen J., Kalviainen R., Partanen K., Salmenpera T.: Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 1998, 32, 233-253.
159. Pitkanen A.: Drug-mediated neuroprotection and antiepileptogenesis: animal data. *Neurology*, 2002, 59, S27-33.
160. Pitkänen A., Sutula T.P.: Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol.* 2002, 1, 3, 173-81.
161. Pitkanen A., Kubova H.: Antiepileptic drugs in neuroprotection. *Expert Opin. Pharmacother.* 2004, 5, 777-798.
162. Pitkanen A., Kharatishvili I., Narkilahti S., Lukasiuk K., Nissinen J.: Administration of diazepam during status epilepticus reduces development and severity of epilepsy in rat. *Epilepsy Res.* 2005, 63, 27-42.
163. Pitkanen A., Schwartzkroin P., Moshe S.: *Models of Seizures and Epilepsy*: Academic Press, 2005. ISBN 0120885549.
164. Pitkanen A., McIntosh T.K.: Animal models of post-traumatic epilepsy. *J. Neurotrauma.* 2006, 23, 241-261.
165. Pitkanen A., Kharatishvili I., Karhunen H., Lukasiuk K., Immonen R., Nairismagi J., Grohn O., Nissinen J.: Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia*, 2007, 48, suppl., 2:13-20.
166. Pitkanen A., Lukasiuk K.: Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2009, 14, suppl. 1, 16-25.
167. Porter R.J.: Classification of epileptic seizures and epileptic syndromes. W: Laidlaw J., Richens A., Chadwick D. (red.): *A textbook of epilepsy*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1993, s. 1-22.
168. Ressler K.J., Paschall G., Zhou X.L., Davis M.: Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning. *J. Neurosci.* 2002, 22, 7892-7902.
169. Riban V., Fitzsimons H.L., Doring M.J.: Gene therapy in epilepsy. *Epilepsia*, 2007, 50, 24-32.
170. Rinne R., Saukko P., Jarvinen M., Lehesjoki A.E.: Reduced cystatin B activity correlates with enhanced cathepsin activity in progressive myoclonus epilepsy. *Ann. Med.* 2002, 34, 380-385.
171. Rodrigues S.M., Schafe G.E., LeDoux J.E.: Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron*, 2004, 44, 75-91.
172. Rodriguez-Yanez M., Castillo J.: Role of inflammatory markers in brain ischemia. *Curr. Opin. Neurol.* 2008, 21, 3, 353-7.

173. Rojo L.E., Fernandez J.A., Maccioni A.A., Jimenez J.M., Maccioni R.B.: Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch. Med. Res.* 2008, 39, 1, 1-16.
174. Ron D., Chen C.H., Caldwell J., Jamieson L., Orr E., Mochly-Rosen D.: Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1994, 91, 839-843.
175. Rose K.A., Stapleton G., Dott K., Kieny M.P., Best R., Schwarz M., Russell D.W., Bjorkhem I., Seckl J., Lathe R.: Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7alpha-hydroxy dehydroepiandrosterone and 7alpha-hydroxy pregnenolone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1997, 94, 4925-4930.
176. Rosen J.B., Donley M.P.: Animal studies of amygdala function in fear and uncertainty: relevance to human research. *Biol. Psychol.* 2006, 73, 49-60.
177. Salazar A.M., Jabbari B., Vance S.C., Grafman J., Amin D., Dillon J.D.: Epilepsy after penetrating head injury. I. Clinical correlates: a report of the Vietnam Head Injury Study. *Neurology*, 1985, 35, 10, 1406-14.
178. Salmenpera T., Kalviainen R., Partanen K., Mervaala E., Pitkanen A.: MRI volumetry of the hippocampus, amygdala, entorhinal cortex, and perirhinal cortex after status epilepticus. *Epilepsy Res.* 2000, 40, 155-170.
179. Salmenpera T., Kalviainen R., Partanen K., Pitkanen A.: Quantitative MRI volumetry of the entorhinal cortex in temporal lobe epilepsy. *Seizure*, 2000, 9, 208-215.
180. Sander J.W., Shorvon S.D.: Epidemiology of the epilepsies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1996, 61, 433-443.
181. Sankar R., Holmes G.L.: Mechanisms of action for the commonly used antiepileptic drugs: relevance to antiepileptic drug-associated neurobehavioral adverse effects. *J. Child. Neurol.* 2004, 19, suppl. 1, 6-14.
182. Schacher M., Winkler R., Grunwald T., Kraemer G., Kurthen M., Reed V., Jokeit H.: Mesial temporal lobe epilepsy impairs advanced social cognition. *Epilepsia*, 2006, 47, 2141-2146.
183. Schramm J., Clusmann H.: The surgery of epilepsy. *Neurosurgery* 2008, 62, suppl. 2, 463-481.
184. Scott S.K., Young A.W., Calder A.J., Hellawell D.J., Aggleton J.P., Johnson M.: Impaired auditory recognition of fear and anger following bilateral amygdala lesions. *Nature*, 1997, 385, 254-257.
185. Scoville W.B., Milner B.: Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1957, 20, 11-21.
186. Sernalul M.O., Boutros P.C., Likhodi O., Okey A.B., Van Tol H.H., Wong A.H.: Microarray analysis of the developing cortex. *J. Neurobiol.* 2006, 66, 1646-1658.

187. Shetty A.K., Hattiangady B., Rao M.S.: Vulnerability of Hippocampal GABA-ergic Interneurons to Kainate Induced Excitotoxic Injury During Old Age. *J. Cell. Mol. Med.* 2009 (in press).
188. Shinnick-Gallagher P., Pitkanen A., Shekhar A., Cahill L.: *The Amygdala in Brain Function*. New York: The New York Academy of Sciences, 2003, vol. 985. ISBN 1573314056.
189. Sklan E.H., Podoly E., Soreq H.: RACK1 has the nerve to act: structure meets function in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 2006, 78, 117-134.
190. Sloviter R.S., Zappone C.A., Bumanglag A.V., Norwood B.A., Kudrimoti H.: On the relevance of prolonged convulsive status epilepticus in animals to the etiology and neurobiology of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 2007, 48, suppl. 8, 6-10.
191. Sng J.C., 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.
192. Sng J.C., Taniura H., Yoneda Y.: Histone modifications in kainate-induced status epilepticus. *Eur. J. Neurosci.* 2006, 23, 1269-1282.
193. Storey J.D., Tibshirani R.: Statistical methods for identifying differentially expressed genes in DNA microarrays. *Methods. Mol. Biol.* 2003, 224, 149-157.
194. Stork O., Pape H.C.: Fear memory and the amygdala: insights from a molecular perspective. *Cell. Tissue Res.* 2002, 310, 271-277.
195. Sutula T.P., Hagen J., Pitkänen A.: Do epileptic seizures damage the brain? *Curr. Opin. Neurol.* 2003, 16, 2, 189-95.
196. Szczerbicki M., Maksymowicz W., Bacia T., Barczewska M.: Chirurgiczne leczenie padaczki. *Problemy Lekarskie*, 2006, 45, 27-30.
197. Szucs A., Barcs G., Jakus R., Rasonyi G., Lalit N., Hollo A., Kelemen A., Janszky J., Halasz P.: Late-life absence status epilepticus: a female disorder? *Epileptic Disord.* 2008, 10, 156-161.
198. Szumiło M, Rahden-Staroń I.: Fosfolipaza D w komórkach ssaków – budowa, właściwości, rola fizjologiczna i patologiczna. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 2006, 60, 421-430.
199. Szumlinski K.K, Kalivas P.W., Worley P.F.: Homer proteins: implications for neuropsychiatric disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2006, 16, 251-257.
200. Szyndler J., Wierzba-Bobrowicz T., Skorzewska A., Maciejak P., Walkowiak J., Lechowicz W., Turzyska D., Bidzinski A., Plaznik A.: Behavioral, biochemical and histological studies in a model of pilocarpine-induced spontaneous recurrent seizures. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2005, 81, 15-23.

201. Takahashi N., Tochimoto N., Ohmori S.Y., Mamada H., Itoh M., Inamori M., Shinga J., Osada S., Taira M.: Systematic screening for genes specifically expressed in the anterior neuroectoderm during early *Xenopus* development. *Int. J. Dev. Biol.* 2005, 49, 939-951.
202. Tang F.R., Lee W.L., Yang J., Sim M.K., Ling E.A.: Expression of metabotropic glutamate receptor 1alpha in the hippocampus of rat pilocarpine model of status epilepticus. *Epilepsy Res.* 2001, 46, 179-189.
203. Tansey M.G., Frank-Cannon T.C., McCoy M.K., Lee J.K., Martinez T.N., McAlpine F.E., Ruhn K.A., Tran T.A.: Neuroinflammation in Parkinson's disease: is there sufficient evidence for mechanism-based interventional therapy? *Front Biosci.* 2007, 13, 709-17.
204. Taupin P., Ray J., Fischer W.H., Suhr S.T., Hakansson K., Grubb A., Gage F.H.: FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor. *Neuron*, 2000, 28, 385-397.
205. Temkin N.R.: Antiepileptogenesis and seizure prevention trials with antiepileptic drugs: meta-analysis of controlled trials. *Epilepsia*, 2001, 42, 515-524.
206. Thams S., Oliveira A., Cullheim S.: MHC class I expression and synaptic plasticity after nerve lesion. *Brain Res. Rev.* 2008, 57, 265-269.
207. Tsankova N.M., Kumar A., Nestler E.J.: Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J. Neurosci.* 2004, 24, 5603-5610.
208. Turk B., Turk D., Turk V.: Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1477, 98-111.
209. Tuunanen J., Lukasiuk K., Halonen T., Pitkanen A.: Status epilepticus-induced neuronal damage in the rat amygdaloid complex: distribution, time-course and mechanisms. *Neuroscience*, 1999, 94, 473-495.
210. Urbanska E.M., Czuczwar S.J., Kleinrok Z., Turski W.A.: Excitatory amino acids in epilepsy. *Restor Neurol Neurosci.* 1998, 13, 25-39.
211. Vagnerova K., Koerner I.P., Hurn P.D.: Gender and the injured brain. *Anesth Analg.* 2008, 107, 201-214.
212. van Gassen K.L., de Wit M., Koerkamp M.J., Rensen M.G., van Rijen P.C., Holstege F.C., Lindhout D., de Graan P.N.: Possible role of the innate immunity in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 2008, 49, 1055-1065.
213. Vasudevan A., Ho M.S., Weiergräber M., Nischt R., Schneider T., Lie A., Smyth N., Köhling R.: Basement membrane protein nidogen-1 shapes hippocampal synaptic plasticity and excitability. *Hippocampus* 2009, Jun 15, [Epub ahead of print].
214. Vezzani A., Granata T.: Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia*, 2005, 46, 11, 1724-43.

215. Vezzani A., Ravizza T., Balosso S., Aronica E.: Glia as a source of cytokines: implications for neuronal excitability and survival. *Epilepsia*, 2008, 49, suppl. 2, 24-32.
216. Wendt W., Lubbert H., Stichel C.C.: Upregulation of cathepsin S in the aging and pathological nervous system of mice. *Brain Res.* 2008, 1232, 7-20.
217. Williams P.A., Dudek F.E.: A chronic histopathological and electrophysiological analysis of a rodent hypoxic-ischemic brain injury model and its use as a model of epilepsy. *Neuroscience*, 2007, 149, 943-961.
218. Wojtal K., Trojnar M.K., Czuczwar S.J.: Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids. *Pharmacol. Rep.* 2006, 58, 335-340.
219. Wong M.: Modulation of dendritic spines in epilepsy: cellular mechanisms and functional implications. *Epilepsy Behav.* 2005, 7, 4, 569-77.
220. Worley P.F., Christy B.A., Nakabeppu Y., Bhat R.V., Cole A.J., Baraban J.M.: Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1991, 88, 5106-5110.
221. Yaka R., Thornton C., Vagts A.J., Phamluong K., Bonci A., Ron D.: NMDA receptor function is regulated by the inhibitory scaffolding protein, RACK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2002, 99, 5710-5715.
222. Yau J.L., Rasmuson S., Andrew R., Graham M., Noble J., Olsson T., Fuchs E., Lathe R., Seckl J.R.: Dehydroepiandrosterone 7-hydroxylase CYP7B: predominant expression in primate hippocampus and reduced expression in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 2003, 121, 307-314.
223. Yau J.L., Noble J., Graham M., Seckl J.R.: Central administration of a cytochrome P450-7B product 7 alpha-hydroxypregnenolone improves spatial memory retention in cognitively impaired aged rats. *J. Neurosci.* 2006, 26, 11034-11040.
224. Yin H., Bardgett M.E., Csernansky J.G.: Kainic acid lesions disrupt fear-mediated memory processing. *Neurobiol Learn Mem.* 2002, 77, 389-401.
225. Yoon M.S., Yon C., Park S.Y., Oh D.Y., Han A.H., Kim D.S., Han J.S.: Role of phospholipase D1 in neurite outgrowth of neural stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 329, 804-811.
226. Zaremba P.D., Bialek M., Blaszczyk B., Cioczek P., Czuczwar S.J.: Non-epilepsy uses of antiepilepsy drugs. *Pharmacol Rep.* 2006, 58, 1-12.
227. Zhang C., Kavurma M.M., Lai A., Khachigian L.M.: Ets-1 protects vascular smooth muscle cells from undergoing apoptosis by activating p21WAF1/Cip1: ETS-1 regulates basal and and inducible p21WAF1/Cip1: ETS-1 regulates basal and inducible p21WAF1/Cip1 transcription via distinct cis-acting elements in the p21WAF/Cip1 promoter. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 27903-27909.

-
228. Zhang Y., Kanaho Y., Frohman M.A., Tsirka S.E.: Phospholipase D1-promoted release of tissue plasminogen activator facilitates neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 2005, 25, 1797-1805.
 229. Zhao C.S., Overstreet-Wadiche L.: Integration of adult generated neurons during epileptogenesis. *Epilepsja*, 2008, 49, supl. 5, 3-12.
 230. Żeromski J., Samara H., Mozer-Lisewska I.: Komórki dendrytyczne: czy wszystko o nich wiemy? *Postępy Biologii Komórki*, 2007, 34, 541-556.