

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Марија Б. Станојевић

**ИСПИТИВАЊЕ МЕХАНИЗМА  
СУПРЕСИВНОГ ДЕЈСТВА  
МАГНЕЗИЈУМА НА  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ИЗАЗВАНУ  
ЕПИЛЕПТИФОРМНУ АКТИВНОСТ  
РЕЦИЈУСОВИХ НЕУРОНА ПИЈАВИЦЕ**

докторска дисертација

Београд, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE

Marija B. Stanojević

**INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF  
SUPPRESSIVE EFFECT OF MAGNESIUM  
ON THE EXPERIMENTALLY INDUCED  
EPILEPTIFORM ACTIVITY  
OF RETZIUS NEURONS OF THE LEECH**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

Ментор:

проф. др Владимир Недељков

Институт за патолошку физиологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду

Чланови Комисије за одбрану докторске дисертације:

1. проф. др Милица Простран

Институт за фармакологију, клиничку фармакологију и токсикологију,  
Медицински факултет, Универзитет у Београду

2. доц. др Срђан Лопичић

Институт за патолошку физиологију, Медицински факултет, Универзитет у  
Београду

3. проф. др Зорица Јовановић

Катедра за патолошку физиологију, Факултет медицинских наука, Универзитет у  
Крагујевцу

датум одбране: \_\_\_\_\_

Захвалност дугујем својим родитељима и сестри на великој њиховој љубави на читавом мом путу, проф. др Владимиру Недељкову и доц. др Срђану Лопичићу као учитељима и пријатељима, проф. др Милицы Простран и проф. др Зорици Јовановић на њиховој великој помоћи, колективу Института за патолошку физиологију Медицинског факултета у Београду на прихватању и разумевању, проф. Зорану Гачићу и проф. Павлу Р. Анђусу са Биолошког факултета у Београду на сарадњи, др Милошу М. Петровићу на његовој срдечној помоћи све време у току израде тезе, и, наравно, мојим студентима, јер сам учећи њих – учила и сама.



# ИСПИТИВАЊЕ МЕХАНИЗМА СУПРЕСИВНОГ ДЕЈСТВА МАГНЕЗИЈУМА НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ИЗАЗВАНУ ЕПИЛЕПТИФОРМНУ АКТИВНОСТ РЕЦИЈУСОВИХ НЕУРОНА ПИЈАВИЦЕ

## РЕЗИМЕ

У свету живи више од 50 милиона људи са епилепсијом. Основ лечења епилепсија представља сузбијање напада помоћу антиепилептичких лекова, али чак у приближно трећине случајева постоји фармакорезистентна епилепсија. Магнезијум је биоесенцијални минерал са вишеструким функцијама у живим системима, посебно значајан за ексцитабилна ткива. Антиконвулзивно дејство магнезијума има клиничку примену у лечењу еклампсије. Антиепилептички потенцијал магнезијума недовољно је искоришћен. У овој студији је испитивано антиепилептичко дејство  $Mg^{2+}$  на експерименталном моделу епилептиформне активности индуковане у Рецијусових неурона пијавице (РНП) *H. sanguisuga* блокадом  $Ca^{2+}$  канала помоћу  $Ni^{2+}$ . Коришћене су методе класичне електрофизиологије да се испита механизам супресивног деловања  $Mg^{2+}$  на овом моделу несинаптичке епилептогенезе. Вршено је интрацелуларно регистровање потенцијала мембране, директна електростимулација ћелије и одређивање улазног отпора мембране (УОМ). Индукована епилептиформна активност одликовала се стварањем осцилација потенцијала мембране у облику пароксизмалних таласа деполаризације (ПТД). Мерени су параметри: ПТД фреквенција, ПТД трајање, ПТД амплитуда и број акционих потенцијала по ПТД-у, и рачунат интензитет епилептиформне активности. Нађени резултати показују да у опсегу тестираних концентрација (од 1 mmol/l до 20 mmol/l)  $Mg^{2+}$  супримира  $Ni^{2+}$  – индуковану епилептиформну активност, статистички значајно смањујући вредности свих параметара на дозно – зависан начин. Средња инхибиторна концентрација износила је приближно 10 mmol/l  $Mg^{2+}$ . Концентрација од 20 mmol/l  $Mg^{2+}$  у потпуности је елиминисала епилептиформно пражњење. У циљу

испитивања механизма супресивног дејства  $Mg^{2+}$  на дату епилептиформну активност, испитани су и ефекти  $20 \text{ mmol/l } Mg^{2+}$  на електрофизиолошка својства и активност мембране РНП-а у физиолошким условима. Нађено је да  $Mg^{2+}$  изазива статистички значајну супресију спонтане активности, смањење екситабилности и повећање УОМ-а. У току супресије  $Ni^{2+}$  – индуковане епилептиформне активности,  $20 \text{ mmol/l } Mg^{2+}$  статистички значајно повећава УОМ. Механизам одговоран за описана дејства  $Mg^{2+}$  посредован је смањењем проводљивости мембране РНП-а због затварања јонских канала, највероватније услед блокаде  $Na^+$  канала јонима  $Mg^{2+}$ . Ово би могло имати шири значај не само за неуроне пијавице, већ и за неуроне сисара.

**Кључне речи:** несинаптичка епилептиформна активност, пароксизмални талас деполаризације, Рецијусов неурон пијавице, магнезијум, улазни отпор мембране

**Научна област:** медицина

**Ужа научна област:** патолошка физиологија – неурофизиологија

**УДК број:**

# INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF SUPPRESSIVE EFFECT OF MAGNESIUM ON THE EXPERIMENTALLY INDUCED EPILEPTIFORM ACTIVITY OF RETZIUS NEURONS OF THE LEECH

## ABSTRACT

There are more than 50 million people globally living with epilepsy. The basis to epilepsy treatment is controlling epileptic seizures with antiepileptic drugs. However, in as many as around 1/3 of cases pharmacoresistance occurs. Magnesium is a bioessential mineral with multiple functions in living organisms, especially important for excitable cells. Anticonvulsive effect of magnesium is used to treat eclampsia, but its antiepileptic potential is therapeutically not used sufficiently. This study examines the antiepileptic effect of  $Mg^{2+}$  on an experimental model of epileptiform activity induced in Retzius nerve cells (RNC) of the leech *H. sanguisuga* by blocking  $Ca^{2+}$  channels with  $Ni^{2+}$ . Methods of classical electrophysiology were used to investigate the mechanism of suppressive effect of  $Mg^{2+}$  on this model of nonsynaptic epileptogenesis. We performed intracellular membrane potential recording, direct electrostimulation of the cell and determination of the input membrane resistance (IMR). The induced epileptiform activity was characterized by generation of membrane potential oscillations in a form of paroxysmal depolarization shifts (PDSs). Several parameters were measured: PDS frequency, PDS duration, PDS amplitude and the number of action potentials per PDS. The intensity of epileptiform activity was calculated. The results obtained show that within the range of concentrations tested (from 1 mmol/l to 20 mmol/l)  $Mg^{2+}$  acts to suppress  $Ni^{2+}$  – induced epileptiform activity, causing a statistically significant decrease in the values of all parameters observed in a dose – dependent manner. Half – maximal inhibitory concentration was found to be approximately 10 mmol/l  $Mg^{2+}$ . Concentration of 20 mmol/l  $Mg^{2+}$  completely abolished epileptiform activity. In order to examine the mechanism of epileptiform activity suppression by  $Mg^{2+}$ , we tested for the effects of 20 mmol/l  $Mg^{2+}$  on electrophysiological

properties and activity of RNC membrane under physiological conditions. Magnesium was found to cause statistically significant spontaneous activity suppression, cell excitability decrease and IMR increase. Statistically significant increase in IMR with 20 mmol/l  $Mg^{2+}$  was also found during  $Ni^{2+}$  – induced epileptiform activity suppression. The mechanism underlying the described suppressive effects of  $Mg^{2+}$  is mediated by a decrease in RNC membrane conductivity, most probably due to  $Na^+$  channel blockade by  $Mg^{2+}$ . This finding could have a broader significance, referring not only to invertebrate, but mammalian neurons as well.

**Key words:** non – synaptic epileptiform activity, paroxysmal depolarization shift, leech Retzius neuron, magnesium, input membrane resistance

**Research area:** medicine

**Specific research field:** pathological physiology – neurophysiology

**UDC code:**

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД .....</b>	<b>1</b>
1.1. Пароксизмални талас деполаризације .....	2
1.2. Несинаптички механизми настанка епилептичке активности .....	8
1.3. Улога перзистентне натријумске струје у настанку хиперексцитабилности неурона у епилепсији .....	12
1.4. Рецијусов неурон пијавице као модел натријумског осцилатора у изучавању ћелијских механизма епилептогенезе .....	17
1.5. Магнезијум и епилепсија .....	21
<b>2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА .....</b>	<b>33</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....</b>	<b>34</b>
3.1. Препарат .....	34
3.2. Метода .....	37
3.3. Електрични уређаји за регистровање и дражење .....	39
3.4. Одређивање улазног отпора мембране .....	42
3.5. Коришћени раствори .....	43
3.6. Анализа резултата .....	44
<b>4. РЕЗУЛТАТИ .....</b>	<b>48</b>
4.1. Индукција епилептиформне активности у Рецијусових неурона применом никла .....	48

4.2. Дејство магнезијума на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона .....	55
4.2.1. Дејство 1 mmol/l MgCl <sub>2</sub> на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона .....	56
4.2.2. Дејство 3 mmol/l MgCl <sub>2</sub> на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона .....	59
4.2.3. Дејство 7 mmol/l MgCl <sub>2</sub> на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона .....	61
4.2.4. Дејство 10 mmol/l MgCl <sub>2</sub> на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона .....	64
4.2.5. Дејство 20 mmol/l MgCl <sub>2</sub> на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона .....	67
4.3. Одлике магнезијумске супресије никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона .....	71
4.3.1. Дозна зависност магнезијумске супресије никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона .....	71
4.3.1.1. Анализа ефеката растућих концентрација магнезијума на параметре никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона .....	75
4.3.2. Реверзибилност магнезијумске супресије никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона .....	79
4.4. Ефекат магнезијума на електрофизиолошка својства мембране и спонтану активност Рецијусових неурона .....	83
4.4.1. Дејство 20 mmol/l MgCl <sub>2</sub> на потенцијал мембране и спонтану активност Рецијусових неурона .....	83

4.4.2. Дејство 20 $\text{mmol/l}$ $\text{MgCl}_2$ на ексцитабилност мембране Рецијусовог неурона .....	85
4.4.3. Утицај Рингеровог раствора са 20 $\text{mmol/l}$ $\text{MgCl}_2$ на улазни отпор мембране Рецијусовог неурона .....	87
4.5. Дејство магнезијума на улазни отпор мембране Рецијусовог неурона у току никлом индуковане епилептиформне активности .....	90
4.5.1. Утицај Рингеровог раствора са 3 $\text{mmol/l}$ $\text{NiCl}_2$ на улазни отпор мембране Рецијусовог неурона .....	90
4.5.2. Дејство 20 $\text{mmol/l}$ $\text{MgCl}_2$ на улазни отпор мембране Рецијусовог неурона у току никлом индуковане епилептиформне активности .....	93
<b>5. ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>97</b>
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ .....</b>	<b>112</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>114</b>

## 1. УВОД

Епилепсија (грч. *ἐπιληψία* – зграбити, шчепати; препасти) је хронично неуролошко обољење које се одликује предиспозицијом ка понављаним непровоцираним епилептичким нападима. Епилептички напад представља нагло насталу и пролазну клиничку абнормалност узроковану прекомерним и неконтролисаним електричним пражњењем групе неурона у мозгу (Book, 2004). Епилепсија представља најчешће од тешких хроничних неуролошких обољења. Процењује се да епилепсија погађа глобално више од 50 милиона људи, односно око 0.5 – 2.0 % светске популације. У развијеним земљама се јавља код 0.5 – 1.0 % људи, а незванични статистички подаци указују на приближно једнаку учесталост епилепсије и у нашој земљи. Епилепсија и данас представља тежак неуролошки поремећај удружен са смањењем квалитета живота и повећањем смртности у односу на општу популацију<sup>1</sup>.

Епилептички напад је нагло настали поремећај функције мозга који се одликује пароксизмалним стереотипним променама понашања удруженим са синхроним прекомерним пражњењем у великим групама неурона. Епилептички напад представља један од основних начина реаговања мозга на велики број различитих нокси (Kostić, 2007). Приближно 5% популације доживи бар један епилептички напад током живота. У неуролошкој пропедевтици ово је један од најзначајнијих знакова постојања надражаја или оштећења мозга. Испољава се као изненадни, и обично краткотрајни и пролазни, али исцрпљујући поремећај функције мозга – моторике, сензибилитета, сензоријума, понашања, психичких или вегетативних функција. Епилептички напади могу се јављати непровоцирано, као манифестација хроничне неуролошке болести епилепсије, али и симптоматски, услед бројних обољења и оштећења мозга, и различитих метаболичких поремећаја. Епилептички напад је резултат продуженог, прекомерног и хиперсинхронизованог електричног пражњења велике групе хиперексцитираних неурона. Стога је у изучавању узрокâ и механизма њиховог настанка кључно откривање

---

<sup>1</sup> <http://www.wfneurology.org/world-brain-day-2015>



функционалних промена одговорних за хиперексцитабилност неурона и хиперсинхронизацију њихове електричне активности (Yaari и Beck, 2002).

Лечење епилепсије подразумева сузбијање епилептичких напада применом антиепилептичких лекова, као терапије првог избора. Па ипак, многи болесници остају рефрактарни на ове лекове или трпе њихова значајна нежељена дејства. Процењује се да је из ових разлога чак у око 1/3 случајева епилепсија фармакорезистентна. Стога је развој нових антиепилептичких лекова, као и нефармаколошких приступа у терапији епилепсије кључан у лечењу овог стања.

Упркос напретку електроенцефалографске (ЕЕГ) анализе и метода неуроосликавања, и обимним базичним и клиничким истраживањима током последњих деценија, многи аспекти патогенезе епилепсије и даље остају нејасни. Типичан за епилепсију је клинички налаз спонтаног интерикталног епилептиформног пражњења на конвенционалном ЕЕГ запису. Претпоставља се да су ова интериктална епилептиформна пражњења својеврсни „мини“ епилептички напади који нису довољно дугог трајања да би се клинички развили. Постоји такође и претпоставка да су интериктална пражњења удружена са периодом повишеног прага за дражење, те заправо одражавају постојање механизма који штити од напада (Alarcón и сар., 2012).

Епилептички напад је узрокован пароксизмалном прекомерном и хиперсинхроном електричном активношћу одређене групе хиперексцитираних неурона. Сматра се да се абнормално повишена електрична активност повезана са епилептичким нападима развија услед хиперексцитабилности неурона и хиперсинхронизованости њиховог пражњења. На ћелијском нивоу, епилептичка активност се манифестује ритмичном појавом осцилација мембранског потенцијала у виду пароксизмалних таласа продужене деполаризације.

### **1.1. Пароксизмални талас деполаризације**

Упркос великом броју истраживања и растућем знању о основним својствима епилептичког процеса, базични механизми развоја и тока епилептичке активности

још увек нису у потпуности разјашњени. Нарочито интензивно се испитују ћелијске и јонске основе епилептогенезе. Њихово изучавање олакшано је успостављањем бројних експерименталних модела епилептиформне активности. Сматра се да облици експерименталног епилептиформног пражњења, као и сама епилептичка активност која одликује хуману епилепсију вероватно настају суштински сличним патофизиолошким механизмима. Такође, обзиром да се у општем случају базична функционална организација једног система боље разуме анализом различитих стања поремећаја, то и студије експерименталне епилепсије не доприносе само разумевању посебне патофизиологије епилептичких напада, већ такође имају значај и за општу физиологију централног нервног система (ЦНС).

Експериментално највише изучаван облик епилепсије је фокална епилепсија због њене високе инциденције у поређењу са другим типовима, као и лаког изазивања у огледних животиња. Фокалну епилепсију одликује абнормална електрична активност неурона у ограниченом подручју структурâ мозга. Док генерализовани напад може захватити готово читав ЦНС, фокални напад представља поремећај функције само неке структуре мозга, једног епилептичког фокуса. Према базичном концепту који је успоставио Hughlings Jackson, епилептички фокус је лезија у мозгу која се изненадно и прекомерно електрично празни, и тиме окида епилептички напад. Локализована форма пражњења ограничена је на епилептички фокус; из фокуса се стање хиперактивности може ширити даље.

Постоје бројни доступни начини да се експериментално изазову епилептички фокуси. Један веома ефикасан начин јесте да се *in vivo* постави кристал пеницилина директно на површину коре великог мозга огледне животиње. Епилептички фокус индукован пеницилином веома наликује на природно настали епилептички фокус. Апликација пеницилина, често коришћеног епилептичког агенса, доводи до успостављања понављаних експлозивних и синхроних епилептичких пражњења у фокусу. Фокални електрични пароксизам који се може регистровати са кортикалног фокуса који се празни, ограниченог је обима и може бити екстремно стереотипан. Сматра се да ограничени пароксизмални интериктални ЕЕГ шилци у општем случају представљају најједноставнији облик епилептиформне активности. Карактеристичан целуларни феномен кортикалног епилептичког фокуса јесте

пароксизмални талас деполаризације (ПТД) кога сачињава изненадни талас велике и продужене деполаризације удружен са праском акционих потенцијала (АП). Једнако као што се епилептички напад може посматрати као пароксизам у електричној активности мозга, тако и ПТД представља пароксизам у електричној активности неурона. Пароксизмални помак деполаризације који се интрацелуларно региструје са активних неурона у епилептичком фокусу, представља ћелијски корелат епилептичке активности. Овакви ПТД-и неурона епилептичког фокуса могу бити изазвани мноштвом различитих физичких и фармаколошких агенаса.

Интензивна изучавања епилептичке активности на ћелијском нивоу почела су шездесетих година XX века, што су омогућили бројни експериментални модели епилепсије на бескичмењацима и кичмењацима. Било је очигледно да су бихејвиоралне абнормалности у животиња и клиничке манифестације у људи са епилептичким нападима, као и сама пароксизмална пражњења у ЕЕГ-у – производ активности великих група неурона, али је једнако тако очигледно било и да би сами захваћени неурони морали показивати неки облик абнормалне електричне активности. Ране опсежне *in vivo* интрацелуларне студије експерименталне епилепсије пружиле су обиље сазнања о ћелијским променама у процесу настанка епилептичких напада и саме болести епилепсије. Изучавање целуларних феномена у фокалној иктогенези и епилептогенези такође је значајно допринело и спознаји базичних аспеката нормалне функције мозга.

Једну од најранијих студија фокалног епилептичког пражњења на ћелијском нивоу извели су Goldensohn и Purpura (1963). Испитивали су који то електрични процеси појединачних неурона епилептогене лезије кортекса доприносе фокалном епилептичком пражњењу у ЕЕГ запису. Аутори су нашли да шиљци и оштри таласи, елементарне пароксизмалне ЕЕГ абнормалности интерикталних пражњења епилептогених фокуса, временски корелирају са интраћелијски регистрованим продуженим деполаризацијама и хиперполаризацијама кортикалних неурона у експерименталном епилептичком жаришту коре великог мозга мачке. На овом моделу по први пут су виђене велике деполаризације потенцијала мембране неурона удружене са кортикалним пароксизмалним пражњењима у ЕЕГ-у, које су се показале као карактеристичан абнормални ћелијски одговор епилептичног ткива.

Matsumoto и Ajmone - Marsan (1964a, б) и Matsumoto (1964) дају фундаментално запажање интраћелијски регистроване изненадне деполаризације велике амплитуде (20 – 30 mV) и продуженог трајања (50 – 100 ms), удружене са високофреквентним шиљак потенцијалима у праску, коју показују многи неокортикални неурони акутних пеницилинских епилептичких фокуса. Овај феномен појединачних неурона који се јавља истовремено са интерикталним ЕЕГ шиљцима, аутори су назвали „пароксизмални талас деполаризације“ (*енг.* paroxysmal depolarization shift, PDS). Нађено је да ПТД-и представљају општи образац неуронског одговора који на ћелијском нивоу управо одговара појединачним фокалним кортикалним пароксизмима у ЕЕГ запису епилептиформне активности. Ayala и сарадници (1973) испитивали су однос деполаризације и праска шиљак потенцијала у ПТД-у, обзиром да се ове промене карактеристично удружено виђају у неурона у епилептичком фокусу. Нађено је да је управо велики талас продужене деполаризације основни пароксизмални целуларни догађај удружен са кортикалним пражњењем у ЕЕГ-у, и да се прасак АП-а секундарно јавља, њега пратећи. Са овим првим регистрацијама интраћелијског записа са епилептичког фокуса установљен је функционални концепт „епилептичког неурона“, чијом се главном карактеристиком сматра управо ПТД.

Епилептиформна пражњења могуће је изазвати и у *in vitro* препаратима исечака мозга у различитим експерименталним условима. Примена модела *in vitro* епилептогенезе значајно је порасла почев од '70. година прошлог века. Тако се по излагању пеницилину препарата исечака хипокампуса у свим подручјима хипокампуса развијало ритмичко високофреквентно пражњење. При том, епилептиформно пражњење индуковано пеницилином перзистирало је само у СА3 области чак и при његовој потпуној изолацији од СА1 подручја и аференци из грануларних ћелија gyrus-a dentatus-a, што је указивало на то да су пирамидне ћелије СА3 региона представљале водич ритма ове епилептиформне активности хипокампуса. При том је ову пеницилинску епилептогенезу у исечцима хипокампуса блокирала перфузија растворима са ниским садржајем  $Ca^{2+}$  и високим садржајем  $Mg^{2+}$ , који блокирају синаптичку активност. Нађено је, међутим, да су у хипокампусу присутни неурони који се спонтано високофреквентно ритмички

празне, и да већина САЗ пирамидних неурона може нормално спонтано да генерише ПТД-е, и без излагања каквом епилептогеном агенсу. Такође су ове ћелије у стандардним јонским условима генерисале ПТД-е изазвано стимулацијом деполаризујућим импулсима, што је указивало на пражњење интринсичко за дате неуроне и независно од синаптичких улаза (Prince, 1978).

Често заступана хипотеза о механизму настанка ПТД-а била је да он заправо представља збир синхроних ексцитаторних постсинаптичких потенцијала (ЕПСП) генерисаних сложеним интеракцијама у великим групама неурона, у којима долази до појачања ексцитаторне и/или депресије инхибиторне синаптичке активности – хипотеза циновског постсинаптичког потенцијала. Запажање да се ПТД може изазвати у неурона неокортекса или хипокампуса ортодромним, али не и директним интрацелуларним дражењем било је узето као потврда хипотезе о синаптичком пореклу ПТД-а. Међутим, идентична амплитуда, трајање и друге карактеристике ПТД-а, стабилност фреквенције и стереотипија њиховог јављања, те репетитивна, осцилујућа природа ПТД активности, могли су говорити у прилог интринсичке природе процеса, ендogene за неурон сâм. Најзад, нађено је да ПТД-и могу настајати и у условима делимичне или потпуне изолације неурона од њихових уобичајених синаптичких везâ (какве постоје у условима *in vivo*) – након блокаде хемијске неуротрансмисије, у култури ћелија, чак и у појединачних, изолованих неурона, што је све указивало на то да ПТД може бити интринсички одговор нервне ћелије на епилептогено дејство. Стога је алтернативно било предложено да би пароксизмални помак деполаризације могао настати као интринсички феномен неурона активним процесима у мембрани, ендогеним за сâм епилептички неурон, при чему би синаптички процеси служили пре као механизам синхронизације активности неуронâ у популацији, него ли као генератори сâмих ПТД-â (Prince, 1978).

Од времена ових раних интраћелијских студија велики број истраживања се бавио ћелијским механизмима епилептогенезе. Механизми настанка ПТД-â, међутим, још увек нису у потпуности расветљени (Üge и Altrup, 2006). Питање механизма настанка ПТД-а јесте питање његовог базичног порекла: од промена синаптичких утицаја, и/или интринсичких промена мембранске проводљивости

неурона, и/или ефеката електричног поља<sup>2</sup>, и/или промена услова ванћелијске средине (јонског састава, киселости и осмолалности ванћелијске течности). Разумевање процеса електрогенезе ПТД-а, као и значаја фактора који делују да допринесу иктогенези и хроничној епилептогенези, могли би да имају значајну улогу у откривању нових терапијских приступа у лечењу фармакорезистентне епилепсије. И са аспекта механизма патогенезе, и у крајњем – са терапијског аспекта, важно је разумети релативни допринос који различити абнормални целуларни одговори имају у настанку спонтано настале епилептичке и експериментално изазване епилептиформне активности.

Кључно је, дакле, питање којим то механизмом неурони постају епилептички? Да ли је ПТД појава синаптичке, несинаптичке или мешовите природе? Из којих то процеса проистиче: на нивоу популације неурона у епилептичком фокусу, на ћелијском или супћелијском нивоу? Многа базична истраживања епилепсије бавила су се питањем да ли ПТД представља циновски синаптички потенцијал или активни одговор неурона. Једно је гледиште било да епилептичко пражњење проистиче из поремећаја синаптичких механизма у постојећим неуронским колима, а без квалитативних промена основних неуронских својстава. Према другом гледишту, у мембрани неурона настају промене које узрокују да неурон сâм генерише измењени, епилептички образац одговора. Ове две теорије при том нису међусобно искључиве. Епилептички целуларни феномени: деполаризациони помак и хиперполаризација која може да га прати, могли би да проистичу из комбинованих, паралелних или сукцесивних целуларно – синаптичких механизма епилептогенезе. У општем случају, може се сматрати да настанку ових промена доприноси више типова механизма, те да ПТД-и настају као резултат интринсичке, синаптичке и ефаптичке активности захваћених неурона.

---

<sup>2</sup> комуникација међу неуронима посредством ефеката електричног поља – ефаптичка трансмисија

## 1.2. Несинаптички механизми настанка епилептичке активности

Велики број студија бави се феноменом епилептогенезе независне од функције хемијске синапсе и механизмима који леже у њеној основи (Dudek и сар., 1998; Perez Velazquez и Carlen, 2000; Voss и сар., 2009; Jin и Chen, 2011; Mylvaganam и сар., 2014).

У прилог несинаптичких механизма настанка ПТД-а говоре промене јонске микросредине за које је утврђено да настају у току епилептогенезе. Да би се објаснила тенденција настанка епилептиформне активности у хипокампусу, било је предложено да би епилептогенези могле да допринесу промене ванћелијске јонске микросредине. Хипотеза да јони  $K^+$  које ослобађају неурони, у ограниченом делу ванћелијског простора могу да достигну концентрације довољне да утичу на активност околних неурона и најзад доведу до развоја напада – потврђена је налазима да се  $K^+$  заиста ослобађа током епилептогенезе. Примена  $K^+$  јон – селективних микроелектрода за мерење кортикалне концентрације  $K^+$  пружила је прве директне доказе да значајне јонске промене настају током ћелијске активности, и да би стога оне могле имати улогу у несинаптичкој модулацији ексцитабилности неурона. Низ студија процеса епилептогенезе током '70. година XX века показао је да пораст ванћелијске концентрације јона  $K^+$  ( $[K^+]_o$ ) настаје током интерикталних шиљака, као и икталних епизода у неокортексу и хипокампусу. Одлике овог великог фокалног интракортикалног пораста  $[K^+]_o$  су да представља дуготрајну промену (одржава се стабилно током више секунди), има ламинарну дистрибуцију кроз кортекс (обично са порастом у дубину), и тенденцију да досегне и ниво од 10 – 12 mmol/l  $K^+_o$ , те може значајно допринети деполаризацији неурона. Такође је нађено да чак и мала повећања  $[K^+]$  у перфузионој течности имају драматичан ефекат на епилептиформну активност индуковану пеницилином у хипокампусу, али и да повишење  $[K^+]_o$  на 10 – 12 mmol/l може да индукује епилептиформна пражњења у препарату пресека хипокампуса и без претходног излагања дејству хемијског конвулзива (Prince, 1978).

У вези са улогом измењене јонске микросредине у епилептогенези, премда пажња јесте фокусирана на ефекте  $K^+$ , не треба занемарити ни дејство других јона. Тако, нпр.  $Ca^{2+}$  учествује у ослобађању неуротрансмитера, стварању дендритичних шиљака, те регулацији проводљивости мембране, а тиме и модулацији екцитабилности мембране. Иако је било очекивано да током интензивне активности неурона дође до смањења ванћелијске концентрације јона  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_o$ ), процену овог ефекта постало је могуће вршити тек са развојем  $Ca^{2+}$  – сензитивне микроелектроде, што је дозволило мерење активности  $Ca^{2+}$  током епилептогенезе. Потврђено је да у огњишту епилептичке активности  $[K^+]_o$  расте, а  $[Ca^{2+}]_o$  опада. Значајно и дуготрајно смањење  $[Ca^{2+}]_o$  на нивое реда величине 0.9 – 0.5 mmol/l нађено је током икталне активности, услед уласка  $Ca^{2+}$  у пресинаптичке нервне завршетке. При том су ове концентрације  $Ca^{2+}$  биле у стању да изазову епилептиформна пражњења CA1 и CA3 хипокампаљних пирамидних ћелија. Закључено је да смањење  $[Ca^{2+}]_o$  које настаје у кортексу током напада такође може повећати екцитабилност неурона и деловати у истом смислу са повишењем  $[K^+]_o$  (Prince, 1978). Prince и Wong (1981) описали су ортодромном стимулацијом изазване продужене таласе деполаризације велике амплитуде са салвама АП-â и у епилептичних неурона хуманог неокортекса *in vitro* на препаратима хируршки одстрањеног ткива мозга. Тиме су аутори показали да су интрацелуларни феномени хуманих неурона укључених у процес епилептогенезе у својој појави слични са онима у различитих анималних модела.

Синхронизовано пражњење неурона, виђено у свом најдраматичнијем облику у току епилептичког пражњења, било је у општем случају приписивано синаптичким интеракцијама, и то порасту екцитаторних синаптичких утицаја и/или селективној инхибицији инхибиторних синапси. Међутим, сматрало се да би овде ипак могли да суделују додатни, синергистички механизми измењених својстава мембране неурона. Тако почетком '80. година прошлог века већи број аутора открива да и несинаптички механизми могу играти улогу у стварању и ширењу епилептиформне активности у ЦНС-у сисара (Jefferys и Haas, 1982; Taylor и Dudek, 1982; Yaari и сар., 1983). Ови аутори описали су спонтано стабилно ритмичко високофреквентно пражњење CA1 хипокампаљних пирамидних ћелија пацова које се развија након што



се блокира хемијска синаптичка трансмисија раствором са ниским садржајем  $\text{Ca}^{2+}$  и високим садржајем  $\text{Mg}^{2+}$ . Ова се активност пропагирала по читавом СА1 подручју хипокампуса упркос комплетне блокаде хемијске неуротрансмисије, и била је праћена пролазним повишењем  $[\text{K}^+]_o$  и снижењем концентрације  $\text{Na}^+$  у ванћелијској течности ( $[\text{Na}^+]_o$ ). Убрзо потом су и Konnerth и сар. (1986) описали несинаптичку епилептогенезу у сисара на *in vitro* моделу епилептиформне активности исечака хипокампуса пацова у условима снижења  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  или његовог потпуног одсуства. Ови услови ( $[\text{Ca}^{2+}]_o < 0.1 \text{ mmol/l}$ ) нису компатибилни са хемијском неуротрансмисијом. Но, упркос блоку синаптичких одговора у ниском  $\text{Ca}^{2+}_o$ , у СА1 подручју хипокампуса спонтано долази до развоја интензивне синхроне масивне ексцитације велике популације СА1 неурона, у виду правилне и стабилне пароксизмалне активности ових ћелија, која при постепеном повећању  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  престаје при његовом нивоу од  $0.3 \text{ mmol/l}$ . Закључено је да је хипокампадно СА1 подручје у стању да генерише епилептиформну активност у основи које леже снажне несинаптичке ексцитаторне интеракције. Предложено је да примарну улогу у њеном настанку игра акумулација јона  $\text{K}^+$  у екстрацелуларном простору и деполаризација посредована повишењем  $[\text{K}^+]_o$ .

Jensen и Yaagi (1997) су на *in vitro* моделу хипокампадне епилепсије у раствору са високим садржајем  $\text{K}^+$ , описали да епилептиформно пражњење производе неурони СА1 регије који се интринсички високофреквентно празне, чиме регрутују и друге пирамидне неуроне, док је синхронизација активности посредована синаптичким, електричним и јонским ексцитаторним интеракцијама. Cameron и сар. (2000) су, пак, нашли да је блокада  $\text{K}^+$  проводљивости применом интрацелуларног  $\text{Cs}^+$  или екстрацелуларног  $\text{Ba}^{2+}$  доводила до стварања деполаризационог помака у потенцијалу мембране мотонеурона мозданог стабла младунчади пацова. Дакле, поремећаји јонског састава ванћелијске течности, а пре свега повишење  $[\text{K}^+]_o$  заједно са снижењем  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  настали услед интензивне неуронске активности, представљају фокалне кортикалне јонске промене које испољавају ефекат на електрофизиолошка својства и активност неурона у виду изазивања значајног пораста њихове ексцитабилности. Хиперексцитабилност неурона у средини са високим садржајем  $\text{K}^+$  и ниским садржајем  $\text{Ca}^{2+}$  води у развој

ПТД-а, чиме доприноси интерикталној епилептогенези, као и преласку интерикталне у икталну активност. Да динамика промене јонских концентрација у унутарћелијској и ванћелијској течности има важну улогу у модулацији неуронске екситабилности и да може бити механизам којим се преводи спонтана у осцилаторну активност неурона и отпочиње епилептиформно пражњење, потврдили су и Varreto и Cressman (2011) на једноставном моделу неурона заснованом на јонским проводљивостима.

Један од кључних фактора у основи несинаптичке епилептогенезе може бити поремећај јонских проводљивости мембране неурона, нарочито волтажно – зависних, са крајњом превагом деполаришућих струја (Avanzini и Franceschetti, 2003). Значај мембранских јонских струја над интеракцијама у неуронској мрежи у настанку икталне и интерикталне епилептиформне активности истакли су Neilman и Quattrochi (2004), разматрајући целуларне основе епилепсије на компјутерском моделу хипокампалног пирамидног неурона.

Волтажно – зависни јонски канали су трансмембрански протеини који проводе јоне великим брзинама регулисано разликом потенцијала кроз мембрану. Они играју кључну улогу у настанку и пропагацији нерввог импулса и хомеостазе ћелије. Волтажни сензор је део каналског протеина мембране који носи наелектрисане аминокиселинске резидуе које се померају при променама у електричном пољу мембране. Овај померај сензора иницира конформациону промену у вратницама водене поре канала, чиме се контролише проток јона. Велики напредак у областима молекуларне биологије, електрофизиологије, спектроскопије и структурних техника омогућио је да се окарактеришу главне особине и функција бројних волтажно – зависних јонских канала (Bezaniilla, 2005). Каналопатије представљају наследне или стечене поремећаје структуре и функције јонских канала. Изучавање каналопатија пружа нови увид у молекулске механизме многих болести, укључујући и епилепсију (Kass, 2005). Стечене каналопатије нађене су као део молекулских и ћелијских промена у оквиру пластичности нерввог ткива, која доприноси хроничној епилептогенези (Leung и Wu, 2006; Pitkänen и Lukasiuk, 2009).

### 1.3. Улога перзистентне натријумске струје у настанку хиперексцитабилности неурона у епилепсији

Волтажно – зависни јонски канали су трансмембрански протеини који се отварају при промени потенцијала мембране да дозволе пролазак јонâ кроз пору канала. Заједно са процесом активације почиње и процес инактивације канала, али му је потребно дуже време да се развије. Деле се према селективности за јоне које пропуштају на канале за  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  и  $\text{H}^+$ , и неселективне јонске канале.

Настанак и пропацију АП-â већине нервних и других ексцитабилних ћелија омогућава активација волтажно – зависних  $\text{Na}^+$  канала (*енг.* voltage – gated sodium channels, VGSC). Ови молекули представљају комплексе сачињене од полипептидних субјединица: једне велике  $\alpha$  са једном или две мање  $\beta$  субјединице. Сама  $\alpha$  субјединица је довољна за функцију јонског канала при експресији у хетерологим моделима, али се тек у присуству регулаторних  $\beta$  субјединица јављају нормална кинетика и волтажна зависност канала. Општа ознака је  $\text{Na}_v$  („v“ од *енг.* voltage, да означи да је волтажа физиолошки регулатор функције јонског канала) (Петровић, 2006). При том  $\alpha$  субјединица  $\text{Na}^+$  канала садржи четири повезана хомолога домена, сачињена од по шест трансмембранских сегмената, од којих се четврти сегмент (S4) понаша као волтажни сензор. Функцију сензора трансмембранског потенцијала дозвољава му примарна структура са понављајућом секвенцом богатом резидуама аминокиселине аргинина, које су при физиолошком рН позитивно наелектрисане. Захваљујући постојању сензора, канал реагује на промене јачине електричног поља кроз мембрану, променом конформационог стања и активности. Канал пролази кроз три конформациона и функционална стања на временски и волтажно – зависан начин: затворено, отворено и инактивирано. Активира се када деполаризација мембране индукује отварање поре канала. Инактивира се када продужена деполаризација затвори инактивациона врата која образује интрацелуларна петља између трећег и четвртог домена, чиме се блокира унутрашњи отвор поре канала. Волтажно – зависни  $\text{Na}^+$  канал поседује већи број рецепторских места за која се везују супстанце блокатори и активатори  $\text{Na}^+$  канала,

међу којима су бројни неуротоксини и лекови из група локалних анестетика, антиаритмика и антиепилептика (Mantegazza, 2012).

Волтажно – зависни  $\text{Na}^+$  канали кључни су посредници екситабилности нервних и мишићних ћелија. Измењена регулација и абнормална активност  $\text{Na}^+$  канала значајна је у патогенези већег броја неуролошких поремећаја, укључујући и епилептичке нападе. Мутације гена за субјединице  $\text{Na}^+$  канала могу узроковати наследне форме епилепсије, хронични бол и неколико других синдрома. Многи од највише коришћених антиепилептичких лекова (укључујући фенитоин, карбамазепин, ламотригин) делују као инхибитори функције волтажно – зависних  $\text{Na}^+$  канала. И нови потенцијални антиепилептици са овим механизмом дејства испитују се у погледу ефикасности и подношљивости. Тако нпр. нови лактам YWI92 који делује да блокира  $\text{Na}^+$  канал хуманих неурона  $\text{hNa}_v1.2$  са већим афинитетом за инактивне канале, показује ефикасност у супресији епилептиформног пражњења CA1 неурона *in vitro*, као и ефикасност антиепилептичког деловања на анималним моделима акутних епилептичких напада и хроничне темпоралне епилепсије, уз добру подношљивост (Jones и сар., 2009). Клинички подаци такође указују на ефикасност блокатора волтажно – зависних  $\text{Na}^+$  канала у лечењу многих неепилептичких поремећаја нервног система, као што су мигрена, мултипла склероза, неуродегенеративне болести и неуропатски бол (Mantegazza и сар., 2010).

Натријумске струје су неопходне за иницијацију и пропагацију електричне активности неурона. Транзијентна волтажно – зависна  $\text{Na}^+$  струја ( $I_{\text{NaT}}$ ) је брзо активирајућа и тренутно инактивирајућа струја  $\text{Na}^+$  која посредује узлазну фазу АП-а. Поред  $I_{\text{NaT}}$ , улазна струја кроз волтажно – зависне  $\text{Na}^+$  канале многих типова екситабилних ћелија показује и неинактивирајућу или споро инактивирајућу компоненту: перзистентну струју  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{NaP}}$ ). Централни неурони сисара такође имају неинактивирајућу компоненту ТТХ – сензитивне  $\text{Na}^+$  струје (тетродотоксин, ТТХ – специфичан блокатор волтажно – зависних  $\text{Na}^+$  канала). Мала фракција  $\text{Na}^+$  струје означена као  $I_{\text{NaP}}$  не успева да се значајно инактивира чак и при продуженим деполаризацијама. Механизам  $I_{\text{NaP}}$  није познат. Истраживања на скелетним мишићним ћелијама и неуронима указују на модалну промену регулације активности конвенционалних  $\text{Na}^+$  канала, али је такође могуће да  $I_{\text{NaP}}$  протиче кроз

посебан подтип неинактивирајућих  $\text{Na}^+$  канала. Премда амплитуда  $I_{\text{NaP}}$  јесте мања од 1% амплитуде  $I_{\text{NaT}}$ , она има своју функционалну важност јер се активира на потенцијалу око 10 mV нижем од прага активације транзијентне  $\text{Na}^+$  струје, при ком је мало волтажно – зависних  $\text{Na}^+$  канала активирано, а улазни отпор мембране неурона висок (Grill, 1996). Стога је перзистентна  $\text{Na}^+$  струја од пресудног значаја за ексцитабилност многих типова неурона у ЦНС-у и у физиолошким и у патофизиолошким условима.

Физиолошки,  $I_{\text{NaP}}$  доприноси синаптичкој струји, а постоје и докази да је присутна на дендритима, где већ релативно мале деполаризације активирају  $I_{\text{NaP}}$ , тиме повећавајући ефикасност дисталне деполаришуће синаптичке активности. Патофизиолошки, нађено је да  $I_{\text{NaP}}$  доприноси процесу неуродегенерације зависне од  $\text{Na}^+$ . У условима исхемије и хипоксије мозга, недостатак кисеоника и снижен енергетски метаболизам узрокују инхибицију активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  пумпе, што доводи до деполаризације мембране. Деполаризација мембране може активирати  $I_{\text{NaP}}$ , што резултује прекомерним накупљањем јона  $\text{Na}^+$  у ћелији. Унутарћелијско накупљање  $\text{Na}^+$  посредством активације  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  измењивача узрокује инфлукс  $\text{Ca}^{2+}$ , чиме затвара врзино коло даље деполаризације мембране која на послетку доводи до оштећења неурона. Такође, обзиром да се  $I_{\text{NaP}}$  активира у потпраговном опсегу волтаже, у стању је да амплификује одговор неурона на синаптички улаз и појача његову способност репетитивног пражњења. Модулација  $I_{\text{NaP}}$  могла би имати значајан ефекат на трансдукцију синаптичких струја од стране неурона.

Све бројнији су и налази експерименталних студија о епилептиформној активности вођеној  $I_{\text{NaP}}$ , на моделима бескичмењака и сисара. Тако су Opdyke и Calabrese (1994) у срчаних интернеурона пијавице регистровали синхрони осцилаторни ритам активности у условима блокаде  $\text{Ca}^{2+}$  струје у раствору са  $\text{Co}^{2+}$  и без  $\text{Ca}^{2+}$ , и/или блокаде излазних  $\text{K}^+$  струја помоћу тетраетиламонијума (ТЕА) у унутрашњем раствору. Ово је указивало на то да су овако индуковани  $\text{Ca}^{2+}$  – независни деполаришући платои посредовани проводљивошћу мембране за друге јоне. Блокада хиперполаризацијом активираних улазних катјонских струја ( $I_h$ ) помоћу  $\text{Cs}^+$  сузбијала је шиљак потенцијале ових осцилација. У мембрани ових ћелија изолована је  $I_{\text{NaP}}$ .

Слично, Su и сарадници (2001) налазе да снижење  $[Ca^{2+}]_o$  може да изазове развој интринсичког високофреквентног пражњења хипокампаљних СА1 пирамидних ћелија пацова повећањем  $I_{NaP}$ . Овде, међутим, блокада  $Ca^{2+}$  – активирание  $K^+$  струје ( $I_{K(Ca)}$ ) помоћу  $Ni^{2+}$  није индуковала епилептиформну активност. Обзиром да је репетитивна активност неурона у хипокампусу удружена са значајним снижењем  $[Ca^{2+}]_o$ , аутори закључују да ово може представљати механизам којим се неурони хипокампуса регрутују у  $I_{NaP}$  – зависно епилептиформно пражњење. На даље, Timofeev и сарадници (2004) истовременим интрацелуларним регистровањем са блиско локализованих неурона коре налазе готово идентичне флукутације потенцијала мембране у току електрографског епилептиформног кортикалног пражњења. Аутори наводе да настанку ПТД-а и високом степену фокалне синхрониије међу захваћеним неуронима током пароксизмалног пражњења, вероватно значајно доприносе несинаптички, односно интринсички ћелијски фактори неурона, укључујући  $I_{NaP}$  и  $I_{K(Ca)}$ . Слично, Yue и сарадници (2005) показују да пирамидне ћелије СА1 подручја хипокампуса показују изразиту склоност да развију високофреквентно пражњење, која је одређена појавом значајне накнадне деполаризације након шиљак потенцијала (*енг.* spike afterdepolarizations). Транзијентну  $Na^+$  струју АП-а која брзо опада, прати накнадна  $Na^+$  струја дугог трајања, те аутори закључују да се овде преобладајно ради о  $I_{NaP}$  неуронске соме. Такође, Leung и Wu (2006) наводе да је епилепсијом изазвано повећање екситабилности хипокампаљних неурона делом посредовано измењеним  $Na^+$  струјама. Промене  $Na^+$  канала нађене на анималним моделима након напада темпоралне епилепсиије, али и код људи оболелих од фармакорезистентне темпоралне епилепсиије, резултују већим  $Na^+$  струјама у нивоу мировног мембранског потенцијала. Најзад, Golomb и сарадници (2006) чак наводе да интринсички образац пражњења СА1 пирамидних неурона хипокампуса варира у континууму од регуларног пражњења до ритмичке епилептиформне активности, у зависности од јонског састава екстрацелуларне течности. На моделу СА1 пирамидног неурона заснованом на јонским проводљивостима мембране неуронске соме, аутори су симулирали експериментални налаз индуковања епилептиформне активности при снижењу  $[Ca^{2+}]_o$  управо повећањем  $I_{NaP}$ .

Улогу волтажно – зависних  $\text{Na}^+$  канала у стеченој и наследној епилепсији истичу Mantegazza и Catterall (2010). Обимна литература документује мутације  $\text{Na}^+$  канала које су основ већег броја људских болести, укључујући и епилепсију. Неке од ових мутација доводе до повећане неуронске ексцитабилности управо изменом  $I_{\text{NaP}}$  (Stafstrom, 2007). Обзиром да  $I_{\text{NaP}}$  повећава ексцитабилност централних неурона у близини прага окидања, то повећана  $I_{\text{NaP}}$  може узроковати хиперексцитабилност неурона и довести до абнормалног неуронског пражњења, као што бива у епилепсији. Стога  $I_{\text{NaP}}$  представља важну потенцијалну мету за дејство антиепилептичних лекова, као и неуропротективних супстанци уопште (Mantegazza и сар., 2010), и такође у лечењу неких неепилептичних неуролошких стања и обољења. Хие и сарадници (2011) налазе да  $I_{\text{NaP}}$  такође има улогу у настанку неуропатског бола, обзиром да рилузол, селективни блокатор  $I_{\text{NaP}}$ , у нервних влакана спиналних неурона после компресије дорзалне ганглије пацова – блокира њихову ектопичну спонтану активност и потпраговне осцилације потенцијала мембране. Такође је нађено је да  $I_{\text{NaP}}$  може допринети развоју хроничног епилептичног стања, а не само акутних епилептичких напада. Stafstrom (2011) и Chen и сарадници (2011) показују да  $I_{\text{NaP}}$  снажно доприноси интринсичком високофреквентном пражњењу СА1 пирамидних ћелија на моделу хроничне темпоралне епилепсије која се развија након епилептичког статуса изазваног пилокарпином.

Процесу несинаптичке епилептогенезе, осим патофизиолошког појачања деполаризујућих мембранских струја, може допринети патофизиолошко слабљење тоничких хиперполаризујућих јонских проводљивости мембране неурона. Један од кључних фактора у настанку хиперексцитабилности неурона током епилептогенезе може бити нисходна регулација  $I_{\text{K(Ca)}}$ , односно блокада  $\text{Ca}^{2+}$  – активираних  $\text{K}^+$  канала ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ). Активација  $\text{K}_{\text{Ca}}$  канала класично се сматра главним јонским механизмом физиолошке депресије ексцитабилности неурона, обзиром да посредује фазу реполаризације АП-а, као и настанак накнадне хиперполаризације која за њим следи. Стога би појачање патофизиолошки ослабљене  $I_{\text{K(Ca)}}$  могло представљати ефикасан приступ у лечењу епилепсије. Ови потврђују и резултати Garduño-а и сарадника (2005) на моделу епилептогенезе индуковане у СА3 пирамидних неурона хипокампуса раствором са блокатором  $\text{K}^+$  канала 4-аминопиридином (4-AP) и

каинатом (агонистом каинатних рецептора за глутамат) без  $Mg^{2+}$ . Овде је и иктално и интериктално пражњење реверзибилно супримирао активатор  $K_{Ca}$  канала ЕВЮ (1-етил-2-бензимидазолинон), снажно редукујући ексцитабилност неурона, повећавањем  $I_{K(Ca)}$ . Блокирајуће ефекте ЕВЮ-а на ову епилептиформну активност брзо и реверзибилно је антагонизовао апамин, инхибитор  $I_{K(Ca)}$ .

#### **1.4. Рецијусов неурон пијавице као модел натријумског осцилатора у изучавању ћелијских механизма епилептогенезе**

Велики је број анималних модела, животињских врста и експерименталних протокола, акутних и хроничних, коришћених у базичним истраживањима епилепсије. Експериментални модели епилепсије настоје да објасне патофизиолошке, електрографске, бихејвиоралне и генетске одлике овог обољења. У студијама епилептогенезе много коришћени су и бројни препарати бескичмењака (Altrup, 2004).

Сматра се да су принципи стварања и преношења нервних импулса, тј. информација између нервних ћелија, суштински исти у читавом животињском свету, те да су у својој структури и функцији, нервне ћелије нижих и виших врста животиња међу собом веома сличне. Захваљујући релативно малом и добро изученом нервном систему, бескичмењаци представљају важне експерименталне анималне модел системе за *in vivo* студије и *in vitro* испитивања базичних механизма нормалних функција, као и поремећаја функција нервних система. Обзиром да су многе ганглије бескичмењака аваскуларне, могуће их је испрепарисати без значајног оштећења. Састав перфузионе течности у експерименталној комори је могуће строго контролисати. Ове одлике чине препарате ганглија бескичмењака погодним за ћелијске студије о дејству супстанци. Неурони бескичмењака сматрају се погодним експерименталним моделима за бројна неурофармаколошка испитивања. Неурони инвертебрата су крупни, лако доступни и препознатљиви по својим морфолошким и електрофизиолошким карактеристикама, те стога подесни за експериментални рад. Могуће их је директно пенетрирати, често са више од једне



микропипете. Стога је бројна питања у неурофизиологији могуће изучавати и на једноставним организмима, на врстама инвертебрата и њиховим неуронима. Модели бескичмењака корисни су и у базичним истраживањима епилепсије на ћелијском нивоу, обзиром да се општи принципи механизма иктогенезе и епилептогенезе могу сматрати универзалним у људи и животиња (Grone и Varaban, 2015).

Нервни систем пијавице може бити користан модел у електрофизиолошким студијама изучавања механизма епилептогенезе и испитивања нових потенцијалних антиепилептичких лекова. Обзиром да су физиолошки процеси у ЦНС-у пијавице и сисарском нервном систему веома слични, може се сматрати да је сазнања о епилептиформној активности добијена на пијавицама – могуће применити и на људе (Hahn и Burrell, 2015).

Механизми настанка ПТД-а изучавани су и на неуронима пијавица. Gerasimov и Акоев (1967) нашли су да у раствору без  $\text{Ca}^{2+}$  мембрана Рецијусових неурона деполарише, и улазни отпор мембране се смањује, да би ћелија убрзо спонтано генерисала веома продужене таласе деполаризације (трајања 5 – 10 s), што може бити последица активације проводљивости мембране за јоне  $\text{Na}^+$ . У Рецијусових неурона сегментних ганглија пијавице већи број епилептогенних агенаса (бензилпеницилин, бемегрид, фенобарбитал, стрихнин) изазива карактеристичан реверзибилни спонтани одговор у виду интермитентних деполаризација велике амплитуде (до 30 mV) и продуженог трајања, поврх којих се обично региструје високофреквентно испљивање АП-а. Велике деполаришуће пароксизме са салвама АП-а такође је могуће изазвати пресинаптичком стимулацијом Рецијусових ганглијских ћелија дражењем сегментних нерава или међуганглијских спојница. Ови ћелијски догађаји никада се нису јављали у присуству 20 mmol/l  $\text{MgSO}_4$  (Prichard, 1972a; Prichard, 1972b; Prichard и Kleinhaus, 1974). Leake (1982) налази да нагли и велики спонтани таласи деполаризације индуковани пиретроидима у Рецијусових неурона, као и прасак АП-а на њима, остају непромењени у присуству високе дозе ТТХ-а, што је могло да говори у прилог чињенице да потичу од посебних споријих улазних струја.

Упоредо са првим извештајима о  $\text{Ca}^{2+}$  – независној, односно синаптички независној епилептогенези на сисарским неуронима,  $\text{Na}^+$  – зависни платои

деполаризације виђени су и у многих неурона већег броја животињских врста бескичмењака. Бројне су и студије које наводе да Рецијусови неурони пијавице могу да развију  $\text{Na}^+$  – зависну осцилаторну активност. Тако су Yang и Lent (1983) и Angstadt и Friesen (1991) показали постојање  $\text{Na}^+$  – зависног механизма осцилација потенцијала мембране у многих типова неурона пијавице, укључујући и Рецијусове, у растворима без  $\text{Ca}^{2+}$  или у присуству бројних неорганских блокатора  $\text{Ca}^{2+}$  канала. И Johansen и Kleinhaus (1987) запазили су осцилаторну активност у Рецијусових ћелија после блокаде  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  канала у раствору са ТЕА, 4-АР,  $\text{Mn}^{2+}$  и без  $\text{Ca}^{2+}$ . Један циклус осцилација имао је облик спорог таласа деполаризације поврх кога је ћелија испалјивала шилјак потенцијале у праску; спори талас састојао се од узлазне фазе, плато фазе и силазне фазе. Dean и Leake (1988) су такође у Рецијусових ћелија индуковали дуге пароксизмалне деполаризације са високофреквентним пражњењем акционих потенцијала у раствору за перфузију који садржи  $\text{Ba}^{2+}$  или  $\text{Co}^{2+}$ , или снижењем  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  помоћу  $\text{Ca}^{2+}$  хелатора EGTA (етиленгликол тетраацетата). Sahley и сарадници (1993) показали су да FMRF-амид у Рецијусових неурона индукује ритмичко високофреквентно пражњење, док у раствору са ТЕА и 4-АР без  $\text{Na}^+$ , FMRF-амид значајно продужава трајање  $\text{Ca}^{2+}$  – зависних АП-а. Nedeljkov и сарадници (1996; 2005) на моделу Рецијусове живчане ћелије пијавице описују изазивање ритмичке појаве плато деполаризација мембранског потенцијала праћених репетитивним избијањем АП-а, након примене  $\text{Ni}^{2+}$ .

Неуронске осцилације еволутивно су очувана појава у нервном систему бескичмењака и мозгу сисара. Одлика неуронских осцилатора је могућност предвиђања дугорочног понашања на основу информација о појединачном циклусу осциловања. Осцилаторна активност представља режим електричне активности неурона, чија је динамика заснована на наизменичној активацији различитих деполаришућих и реполаришућих мембранских јонских струја. Према својој природи неуронске осцилације могу бити ексцитаторне или инхибиторне, а према пореклу – синаптичке и несинаптичке (Symbalyuk, 2011). Међутим, механизми функционисања неуронских осцилатора остају у великој мери непознати (Jasinski и сар., 2013). Неурони осцилатори и мрежни осцилатори имају свој физиолошки и патофизиолошки значај. Познати физиолошки примери су медуларни генератор

ритма дисања, као и таламокортикални осцилатори који генеришу вретена спавања. Поједини облици нервне делатности (учење, упамћивање, моторна контрола ритмичких покрета) такође подразумевају осцилаторни образац активности неурона. Осцилаторна активност неурона присутна је и у неким патофизиолошким стањима, нпр. епилептичкој активности, икталној и интерикталној. Разумевање механизма настанка неуронских осцилација у епилепсији могло би допринети постављању дијагнозе и терапије овог обољења (Buzsáki и Draguhn, 2004).

Ипак, потпуно разумевање понашања животиње на ћелијском нивоу захтева детаљне информације о интринсичким биофизичким својствима нервних и мишићних ћелија и синаптичких веза које остварују. Бројне електрофизиолошке студије неурона пијавице које су спроведене, пружиле су потребне информације о волтажно – зависним јонским проводљивостима мембране за  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , што је пијавицу додатно учинило изузетно погодним анималним моделом за бројна неурофизиолошка истраживања (Freu и сар., 1993; Kleinhaus и Angstadt, 1995). Тако је показано да Рецијусови неурони пијавице поседују две перзистентне улазне јонске струје – једну чисто натријумску, активiranу деполаризацијом:  $I_{\text{NaP}}$ , и другу мешовиту катјонску активiranу хиперполаризацијом:  $I_h$ . У Рецијусових неурона у култури  $I_{\text{NaP}}$  почиње да се активира негде између  $-40 \text{ mV}$  и  $-35 \text{ mV}$ , и достиже своју максималну амплитуду близу  $-5 \text{ mV}$ . Праг активације брзе  $I_{\text{NaT}}$  на нивоу је потенцијала мембране од  $5 - 15 \text{ mV}$  изнад прага активације  $I_{\text{NaP}}$  (Angstadt, 1999). Gerard и сарадници (2012) описали су функционална својства и специфичну ћелијску дистрибуцију  $I_h$  у Рецијусових и неких других идентификованих неурона сегментних ганглија пијавице. Хиперполаризацијом активirана катјонска струја је описана на већем броју типова ћелија великог броја врста бескичмењака и кичмењака. Ова јонска проводљивост зависи и од  $\text{Na}^+$  и од  $\text{K}^+$  јона, а може бити блокирана јонима  $\text{Cs}^+$ . У неурона је  $I_h$  укључена у стабилизацију потенцијала мембране, регулацију обрасца пражњења неурона, ритмогенезу и друге функције.

## 1.5. Магнезијум и епилепсија

Магнезијум је осми најзаступљенији елемент у Земљиној кори и биоесенцијални минерал (Jahnen – Dechent и Ketteler, 2012). Упркос сезонским и локалним варијацијама у садржају магнезијума у животној средини и живим организмима, у многим земљама биогеохемијска праћења непрекидно извештавају о дефициту магнезијума у биљака и животиња, вероватно услед његовог испирања из земљишта дејством киселих киша (Јовић, 1999). Недостатак магнезијума све чешћи је и у људи, нарочито у развијеним земљама света, где расте конзумирање прерађене хране која је магнезијумом сиромашна.

У ћелија сисара  $Mg^{2+}$  је други најзаступљенији катјон у унутарћелијској течности (после  $K^+$ ), и четврти најзаступљенији у ванћелијској течности. Његов биолошки значај је вишеструк, будући да учествује у бројним структурним и динамичким функцијама у ћелији и организму (Hanna, 1961; Wolf и Trapani, 2008). Магнезијум има важне улоге у бројним биолошким функцијама, као што су регулација мембранског јонског транспорта, укључујући и активност пумпе за  $Na^+$  и  $K^+$ , великог броја метаболичких процеса, и ћелијског циклуса (Ћерелак и сар., 2013; Котија и сар., 2014). Постоје експериментални налази који показују да ћелије сисара прецизно регулишу садржај  $Mg^{2+}$  контролним механизмима који функционишу на нивоу инфлуksа и ефлуksа  $Mg^{2+}$  кроз ћелијску мембрану, као и на нивоу унутарћелијског пуферовања  $Mg^{2+}$  и складиштења у органеле (Romani, 2007).

Опсег референтних вредности серумског магнезијума зависи од коришћене методе и лабораторије, а у општем случају уредним налазом се сматра ниво од 0.75 – 1.05 mmol/l укупног  $Mg^{2+}$  у серуму. Концентрација тоталног  $Mg^{2+}$  у серуму зависи од пола и узраста. Ниво је у просеку увек нешто виши код мушкараца, него код жена, по свим узрасним групама. Ниво постепено расте од дечјег, преко младог, до одраслог животног доба, достижући врх у узрасној групи од ~ 50. до 60. год. живота. Одређивање магнезијемие обично није укључено у рутинске јонске анализе серума. Такође, већина лабораторија које га одређују, мере ниво укупног (тоталног )  $Mg^{2+}$ , док мерење нивоа јонизоване фракције  $Mg^{2+}$  није стандардна пракса (Wu и Carter,

2007). Међутим, за многе ауторе концентрација укупног  $Mg^{2+}$  у серуму не представља довољно сензитиван показатељ поремећаја његове хомеостазе. Концентрација слободног, јонизованог  $Mg^{2+}$  валиднији је тест, обзиром да мери ниво биолошки активне форме јона. Концентрација јонизованог  $Mg^{2+}$  у ванћелијској течности физиолошки износи 0.55 – 0.75 mmol/l (Dalmas, 2007). При том се ниво јонизованог  $Mg^{2+}$  мери у узорку крвног серума, а не у крвној плазми, јер EDTA (етилендиамин тетраацетат), хепарин, цитрат и оксалат, додати као антикоагуланси, осим јона  $Ca^{2+}$ , везују и јоне  $Mg^{2+}$ , дајући као резултат лажно низак слободни  $Mg^{2+}$  у узорку (Sinert и сар., 2007).

Хипермагнезијемјом (*лат.* hypermagnesaemia) код одраслих се сматра ниво  $> 1.6$  mmol/l укупног  $Mg^{2+}$  у серуму, а хипомагнезијемјом (*лат.* hypomagnesaemia) – ниво  $< 0.6$  mmol/l укупног  $Mg^{2+}$  у серуму одраслих. При овим се нивоима поремећај (у једном или другом смислу) почне и клинички испољавати. Асимптоматска (супклиничка) хипомагнезијемја је она од 0.60 – 0.75 mmol/l укупног  $Mg^{2+}$  у серуму, док је, пак, асимптоматска хипермагнезијемја у опсегу од 1.05 – 1.60 mmol/l укупног  $Mg^{2+}$  у серуму испитаника. У клиничкој пракси, хипомагнезијемја се данас сматра најчешћим непрепознатим електролитним дисбалансом. У дефициту  $Mg^{2+}$  постоји повећана раздражљивост централних неурона; неуролошка последица овога је повећана склоност ка развоју епилептичке активности. Standley и сарадници (1997), у проспективној студији са понављаним мерењем концентрација електролита у серуму трудница, нашли су да у току уредне трудноће са порастом гестационе старости ниво јонизованог  $Mg^{2+}$  и ниво укупног  $Mg^{2+}$  у серуму значајно опадају, без промене у концентрацијама  $Na^+$ ,  $K^+$  и  $Ca^{2+}$ . При том је у  $\sim 1/3$  случајева дошло до развоја прееклампсије, услед развоја дефицита  $Mg^{2+}$  у трудноћи, бржег од уобичајеног. Почетни симптоми и знаци дефицита  $Mg^{2+}$  углавном су благи и не упозоравају довољно пред појаву опасних, потенцијално фаталних конвулзија (Dharnidharka и Carney, 2005). У електрокардиографском (ЕКГ) запису виђа се ниска волтажа таласа електричне активности срца (QRS комплекс, Т талас), услед дефицита  $Mg^{2+}$ . Неке од манифестација су болни карпопедални спазми услед повећане неуромишићне раздражљивости, конфузија, делиријум и најзад конвулзије, чак до појаве епилептичког статуса. Поремећаји нивоа серумског  $Mg^{2+}$

често су удружени са другим електролитним поремећајима и њима компликовани (Hashizume и Mori, 1990; De Feo, 2009). Упркос свему овоме, одређивање концентрације магнезијума у плазми још увек није широко уведено у рутински јонограм.

Ниво магнезијума у ликвору потврђује његову улогу важног регулатора раздражљивости нервних ћелија. Физиолошки,  $Mg^{2+}$  је једини катјон, осим јона  $H^+$ , који се налази у вишој концентрацији у ликвору, него ли у крви (Somjen, 2004). Патолошко, у бројним неуролошким стањима снижен ниво јонизоване фракције  $Mg^{2+}$  виђа се у серуму: у церебро – васкулном инсулту, кранио – церебралним траумама и мигренској главобољи, а у неким стањима и у серуму и у ликвору истовремено – нпр. у епилепсији (Miyamoto и сар., 2004; Haensch, 2010). Ово указује на то да би поремећај хомеостазе  $Mg^{2+}$  могао бити значајан фактор у механизмима настанка оштећења и дисфункције неурона. Болесницима са епилепсијом не раде се лумбална пункција и узорковање ликвора као део општег дијагностичког поступка. Одређивање  $Mg^{2+}$  у серуму је, као мање инвазивно, погодније од његовог мерења у ликвору. Међутим, тачан однос између нивоа серумског и ликворног  $Mg^{2+}$  још увек није потпуно разјашњен (Sinert и сар., 2007). Додатно, Furukawa и сарадници (2009) наводе да је потреба за  $Mg^{2+}$  у мозгу пацова виша у хипокампусу, него ли у неокортексу, што указује на постојање регионалних разлика у осетљивости неурона на ниво  $Mg^{2+}$  у ванћелијској течности.

Иако су последњих деценија порасли свест о значају  $Mg^{2+}$  у клиничкој медицини и интересовање за испитивањем нивоа овог електролита, упоредо са све већим бројем клиничких и базичних истраживања поремећаја у чијој патогенези хипо- или хипермагнезијемиија имају важну улогу, на  $Mg^{2+}$  се, у општем случају, и даље недовољно обраћа пажња (Ћерелак и Ћворићес, 1997). Ипак, из бројних новијих сазнања о улогама и механизмима деловања  $Mg^{2+}$  у здрављу и болести, као и познатих бројних његових клиничких примена, проистекла је поновна појава интересовања за физиологију и фармакологију магнезијума (Emila и Swaminathan, 2013).

Магнезијум показује и потенцијал фармаколошког агенса који се примењује у различитим клиничким индикацијама (Durlach и сар., 2004; Akhtar и сар., 2011).

Антиконвулзивно дејство магнезијума има клиничку примену у лечењу еклампсије, најозбиљнијег облика хипертензивног синдрома у току трудноће, порођаја или бабиња, компликованог развојем генерализованих конвулзивних напада (Euser и Cipolla, 2009; James, 2010). Еклампсија (*грч.*  $\acute{\epsilon}\kappa\lambda\alpha\mu\pi\iota\varsigma$  - исијавати) представља хитно стање у породилству, животно угрожавајуће за мајку и плод (Sibai и сар., 2005; Кесић, 2013). Инфузије соли  $Mg^{2+}$  користе се и у бројним другим стањима: за лечење конвулзија у порфирији (Sadeh и сар., 1991), у терапији полиморфне вентрикуларне тахикардије типа torsade de points у склопу синдрома дугог QT интервала (Fawcett и сар., 1999; Brugada 2000), и као адјуванс у анестезији (James, 2009; Do, 2013) и аналгезији (Širvinskas и Laurinaitis, 2002). Последњих година интензивно се изучавају механизми и могућности клиничке примене значајног неуропротективног дејства које  $Mg^{2+}$  показује на експерименталним анималним моделима исхемијског оштећења мозга (Westermaier, 2013).

Па ипак, упркос очигледно ефикасној и мултидисциплинарној клиничкој примени, механизми којима једноставни  $Mg^{2+}$  јон остварује сва ова здравствено корисна дејства још увек су недовољно разјашњени.

До идеје да би магнезијум могао бити користан као централни анестетик дошло се почетком XX века. У то време соли  $Mg^{2+}$  биле су коришћене за постизање експерименталне анестезије лабораторијских животиња, али је  $Mg^{2+}$  испробан и на људима у виду спровођења операција под магнезијумском анестезијом (Kato и сар., 1968). Прелиминарни извештај о првом и то успешном покушају лечења еклампсије *i.v.* давањем  $MgSO_4$  објавио је Lazard (1925). Уследиле су потом студије током '20. и '30. година прошлог века, које су показале клиничку ефикасност парентерално администрираног  $MgSO_4$  за прекидање и превенцију поновних акутних конвулзија у уремији, еклампсији и екламптичком статусу. Такође је документована његова ефикасност у смањењу матерналног морталитета од екламптичких конвулзија у дозама нижим од оних које производе неуромишићну блокаду. Нађено је и да уремијске конвулзије одговарају на непаралитичке нивое  $Mg^{2+}$  у серуму. И након каснијег увођења нових антиконвулзивних лекова за лечење идиопатских епилептичких напада,  $MgSO_4$  је остао антиконвулзив избора за екламптичке конвулзије, и задржао се у терапији уремијских конвулзија. Уследиле су

експерименталне студије на огледним животињама (од '40. до '70. година XX века) у циљу да се испитају дејства парентерално администрираног магнезијума на ЦНС и објасни како то да системско давање соли  $Mg^{2+}$  може бити делотворно, ако ови јони не прелазе хемато – енцефалну баријеру. Њихов неуспех да поуздано покажу централне ефекте  $Mg^{2+}$  покренуо је сумње и контраверзна мишљења да је антиконвулзивни ефекат магнезијума заправо његово периферно паралитичко дејство, тј. само просто маскирање конвулзија неуромишићном блокадом. Овакав закључак није био у складу са клиничким запажањима. Стога су од посебног значаја за разумевање антиконвулзивног дејства магнезијума била испитивања на анималним моделима акутне епилептиформне активности и акутних конвулзија, обзиром да су акутне конвулзије праћене значајним електролитним и метаболичким поремећајима у ЦНС-у, као и поремећајем пропустљивости крвно – моздане баријере.

Ране студије бавиле су се испитивањем дејстава  $Mg^{2+}$  на ексцитабилне мембране и на хемијску синаптичку неуротрансмисију. Дејства  $Mg^{2+}$  на неуро – мишићну спојницу (НМС) интензивно су изучавана. Нађено је да блокада неуромишићне трансмисије настала у присуству 5 – 15 mmol/l  $Mg^{2+}$  највећим делом потиче од сузбијања ослобађања неуротрансмитера. Међутим је утврђено и да при овим концентрацијама  $Mg^{2+}$  настају промене електричног прага мембране мишићног влакна (Del Castillo и Engbaek, 1954) и периферног нервног влакна (Frankenhauser и Meves, 1958). Депресија ослобађања трансмитера у НМС-и настала под дејством  $Mg^{2+}$  прекидала се повећањем концентрације  $Ca^{2+}$  на 3 – 4 mmol/l (Jenkinson, 1957). Дакле је дејство  $Mg^{2+}$  на ослобађање трансмитера антагонизовано јонима  $Ca^{2+}$ , док су ефекти ових двовалентних катјона као стабилизатора мембрана адитивни. Поједини аутори који су нашли депресију ексцитабилности мембране централних неурона дејством  $Mg^{2+}$  користили су јонтофоретску апликацију  $Mg^{2+}$ , те је концентрација примењеног  $Mg^{2+}$  у пределу мембране неурона била неодређена (Kato и сар., 1968; Kato и Somjen, 1969; Kelly и сар., 1969). Депресија ексцитабилности мембране неурона дејством  $Mg^{2+}$  нађена је у већем броју студија и на већем броју *in vitro* препарата ткива анималног ЦНС-а у опсегу концентрација  $Mg^{2+}$  од 5 – 20 mmol/l (Erulcar и сар., 1974; Wojtowicz и сар., 1977).



Испитивање дејства  $Mg^{2+}$  на централну синаптичку неуротрансмисију показало је да  $Mg^{2+}$  блокира синаптичку трансмисију на препарату изоловане кичмене мождине жабе и депримира спонтану активност изолованог мозга жабе, као и да убризгавање магнезијума у мождане коморе мачке индукује стање слично сну (Kato и сар., 1968). Richards и Sercombe (1970) испитивали су дејство јона  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  на централне неуроне и хемијску неуротрансмисију у мозгу сисара, на исечцима олфакторног кортекса заморца. Аутори су нашли да истовремена потпуна обустава јона  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  из раствора за перфузују доводи до појачања регистроване електричне активности са развојем репетитивног пражњења. Веома висока концентрација  $Mg^{2+}$  у ванћелијској течности ( $[Mg^{2+}]_o$ ) од  $\sim 10$  mmol/l  $Mg^{2+}$  практично је потпуно блокирала синаптичку трансмисију која је могла бити обновљена повећањем  $[Ca^{2+}]_o$ , а без уклањања  $Mg^{2+}$  из раствора. Слично, Wojtowicz и сарадници (1977) налазе да  $Mg^{2+}$  у концентрацијама од 5 – 10 mmol/l блокира синаптичку трансмисију у *in vitro* препаратима малог мозга миша, реверзибилно подиже ниво прага и снажно супримира ексциtabilност мембране неурона изазвану антидромном активацијом. Аутори утврђују да 3.6 mmol/l  $Ca^{2+}$  и 5 mmol/l  $Mg^{2+}$  у приближно истој мери депримирају ексциtabilност централних неурона, а у коапикацији у том смислу делују адитивно. Ови адитивни депресивни ефекти потврдили су да су у питању била превасходно дејства  $Mg^{2+}$  на ексциtabilност мембране, а не на процес ослобађања трансмитера.

Ипак, постојале су сумње о централним дејствима парентерално администрираног магнезијума код људи. Најзад су били тестирани ефекти споре интравенске инфузије високих доза  $MgSO_4$  на здравим испитаницима. Нађено је да они, и након вишеструког пораста нивоа  $Mg^{2+}$  у плазми, упркос развоју дубоке парализе скелетних мишића, остају будни и потпуно оријентисани, са очуваним осећајем за бол и малим променама концентрација  $Mg^{2+}$  у ликвору. Из ових је огледа закључено да се системским давањем  $Mg^{2+}$  не могу постићи ни анестезија, ни аналгезија, услед ефикасности крвно – мождане баријере, која, кад је интактна, спречава да системски администриран  $Mg^{2+}$  доспе у ЦНС (Somjen, 2004).

Антиепилептичко дејство магнезијума на анималном моделу пеницилином индукованог епилептичког фокуса показали су Borges и Gücer (1978) у неколико

врста сисара. Аутори су нашли да интравенски дат  $Mg^{2+}$  има способност да директно и реверзибилно супримира експерименталну епилептичну ЕЕГ активност, при чему је степен супресије интерикталног пражњења био директно сразмеран постигнутој концентрацији  $Mg^{2+}$  у серуму. Ово је потврдило клиничко искуство о антиконвулзивном деловању  $Mg^{2+}$  при нивоу магнезијемije нижем од оног који производи неуро – мишићну блокаду. Иако су мала повишења екстрацелуларне концентрације  $Mg^{2+}$  потребна и довољна за постизање његовог антиепилептичког дејства, познато је да се овоме супротставља интактна крвно – мождана баријера. Међутим, на експерименталним анималним моделима, али и код екламптичких и уремијских конвулзија код људи, показано је да постоји патолошко повећање пропустљивости крвно – мождане баријере код акутних конвулзија. Ово упућује управо на популацију епилептичких неурона као на циљно место централног антиконвулзивног дејства  $Mg^{2+}$ , до кога он доспева прошавши кроз оштећену и пропустљивију крвно – мождану баријеру. На даље, Leaver и сарадници (1987), разматрајући неуролошке последице дефицита калцијума и магнезијума у исхрани оваца, показују да је могуће изазвати конвулзије у животиња комбинованим искључивањем калцијума и магнезијума из дијете, те да овим конвулзијама претходе пад нивоа  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  у плазми, и нивоа  $Mg^{2+}$  у ликвору. Ове је конвулзије прекидало интравенско давање  $Mg^{2+}$ . Слично, Spasov и сарадници (2007) показују проконвулзивно дејство дефицита  $Mg^{2+}$ , као и антиепилептички потенцијал његове надокнаде. Дефицит  $Mg^{2+}$  изазван у огледних животиња дијетном рестрикцијом  $Mg^{2+}$ , реверзибилно је значајно снизио конвулзивни праг мозга за нападе изазване пентилен-тетразолом и скратио латенцу за њихово избијање.

На моделу несинаптичке епилептиформне активности исечака CA1 подручја хипокампуса Watson и Andrew (1995) показују да повећање  $[Mg^{2+}]_o$  и смањење  $[K^+]_o$  супримирају епилептиформну активност у вештачком ликвору са ниском концентрацијом  $Ca^{2+}$ . Li и Hatton (1996) описали су модел неурона натријумских осцилатора, на коме су показали да  $Mg^{2+}$  делује да сузбија  $I_{NaP}$ . Неурони nucl. supraopticus-а пацова при редукцији  $[Ca^{2+}]_o \leq 1.2 \text{ mmol/l}$  развијали су осцилаторно пражњење које је могло бити сузбијено додавањем ТТХ-а или  $Mg^{2+}$  у раствор, или заменом јона  $Na^+$  јонима  $Li^+$ . Овде је такође нађено да је појачање амплитуде  $I_{NaP}$

ниском  $[Ca^{2+}]_o$  било поништено додавањем  $Mg^{2+}$  у раствор. Ову су осцилаторну активност такође сузбијали и директна дифузија хелатора унутарћелијског  $Ca^{2+}$ , ВАРТА-е у неуроне, као и блокатори порозних веза, развезујући агенси: хептанол, халотан или ацидификација. Ови резултати су указивали на то да је ова интринсичка осцилаторна активност неурона супраоптичког једра у раствору са ниским  $Ca^{2+}$  или без  $Ca^{2+}$  захтевала инфлукс  $Na^+$  путем  $I_{NaP}$ , али и унутарћелијску мобилизацију  $Ca^{2+}$ , и вероватно укључивала и међућелијску комуникацију путем порозних веза. Wang и сарадници (2004) налазе да мала снижења  $[Ca^{2+}]_o$  и/или  $[Mg^{2+}]_o$  повећавају екситабилност CA1 пирамидних неурона исечака хипокампуса пацова, при том смањујући праговну  $[K^+]_o$  неопходну да у препарату индукује деполаришуће таласе са салвама АП-а.

Па ипак, упркос свим овим сазнањима из експерименталних студија и познатој клиничкој ефикасности, место антиконвулзивног дејства  $Mg^{2+}$  остало је недовољно расветљено. Међутим, све је већи број налаза који говоре о модулаторној улози  $Mg^{2+}$  у регулацији функције јонских канала и других транспортних система мембране. Велики је број јонских канала осетљивих на  $Mg^{2+}$ , укључујући волтажну – зависне и лиганд – зависне јонске канале. Бројне студије бавиле су се овим несинаптичким ефектима  $Mg^{2+}$  на екситабилне мембране. Тако Catterall (1975) налази да активација  $Na^+$  канала („ $Na^+$  јонофора АП-а“) вератридином и батрахотоксином бива инхибирана већим бројем дивалентних катјона, укључујући и  $Mg^{2+}$ . Nahin и Campbell (1983) налазе да повишене концентрације дивалентних катјона  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  мењају волтажну регулацију активности  $Na^+$  канала, мењањем потенцијала површине мембране.

Nowak и сарадници (1984) и Maueg и сарадници (1984) долазе до важног открића о постојању волтажну – зависног блока јонских канала NMDA (N-метил-D-аспарат) рецептора за глутамат јонима  $Mg^{2+}$  у физиолошким концентрацијама, при негативним потенцијалима мембране. Утврђено је да постсинаптички одговори посредовани NMDA глутаматним рецепторима показују волтажну зависност услед магнезијумског блока јонског канала овог рецептора, док снижење  $[Mg^{2+}]_o$  отпушта волтажну – зависни блок јонског канала NMDA рецептора. Убрзо је откривено да у многим деловима ЦНС-а снижење ванћелијског нивоа  $Mg^{2+}$  доводи до спонтаног

развоја епилептиформне активности, за чији се настанак сматрало да зависи од активације NMDA глутаматних рецептора. Тако је нађено да у исечцима темпоралне коре снижење  $[Mg^{2+}]_o$  спонтано индукује интензивну епилептиформну активност, која временом постаје стабилна и одржава се. Walther и сарадници (1986) показују да перфузија раствором са ниским садржајем  $Mg^{2+}$  у исечцима хипокампуса, субикулуму и енториналној кори индукује спонтано епилептиформно пражњење које бива реверзибилно супримирано након додавања антагонисте NMDA рецептора 2-APV-а (2-амино-5-фосфоновалеријанске киселине). И Dreier и Heinemann (1990) у комбинованим исечцима хипокампадно – енториналне коре снижењем  $[Mg^{2+}]_o$  индукују епилептиформну активност коју лако реверзибилно блокирају повишење  $[Mg^{2+}]_o$  и 2-APV, што доказује да њен настанак јесте зависан од активације NMDA рецептора. Међутим је овде нађено да епилептиформна активност темпоралне коре у ниском  $Mg^{2+}_o$  такође у одређеној мери бива супримирана и дејством валпроата, који, осим што појачава инхибицију посредовану GABA-ом ( $\gamma$ -аминобутират) спречавањем ензимске разградње GABA-е, такође блокира и  $Na^+$  канале.

На даље је показано да  $Mg^{2+}$  делује као модулатор више јонских транспортних система за  $Na^+$ ,  $K^+$  и  $Ca^{2+}$  у трансцелуларним и парацелуларним путевима у бројним ткивима (Вага и сар., 1993). Јони  $Mg^{2+}$  при физиолошким концентрацијама на волтажно – зависан начин блокирају јонске струје кроз већи број јонских канала. Док јони  $Mg^{2+}$  у ванћелијској течности ( $Mg^{2+}_o$ ) затварају  $Ca^{2+}$ , односно катјонски канал NMDA рецептора, дотле јони  $Mg^{2+}$  у унутарћелијској течности ( $Mg^{2+}_i$ ) затварају улазно – исправљачки  $K^+$  канал ( $K_{ir}$ , *енг.* inward rectifier), АТР – сензитивни  $K^+$  канал ( $K_{ATP}$ ),  $K^+$  канале мускаринских рецептора и волтажно – зависни  $Na^+$  канал (Matsuda и сар., 1987).

Већи број студија износи експерименталне доказе да јони  $Mg^{2+}$  имају улогу у регулацији активности волтажно – зависних  $Na^+$  канала у већег броја врста и модел система. Ране студије показале су да пад  $[Ca^{2+}]_o$  и концентрације других двовалентних катјона у ванћелијској течности смањује деполаризацију потребну и довољну да повећа проводљивост мембране за  $Na^+$  ( $g_{Na^+}$ ) у аксона сипе (Frankenhaeuser и Hodgkin, 1957), и аксона неурона сисара. Ово је објашњено модификацијом волтажне регулације  $Na^+$  канала путем неутрализације површинског

наелектрисања мембране које врше двовалентни катјони, те слабљењем овог ефекта стабилизације  $\text{Na}^+$  канала при паду  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  и  $[\text{Mg}^{2+}]_o$ .

Мерењем макроскопских јонских струја и струја кроз појединачне јонске канале неколико типова клонираних можданих  $\text{Na}^+$  канала пацова, експримираних на ооцитама жабе *Xenopus laevis*, техником наметања волтаже на делић мембране (енг. patch – clamp), Pusch и сарадници (1989) и Pusch (1990) открили су магнезијумски блок  $\text{Na}^+$  канала. Аутори су нашли да јон  $\text{Mg}^{2+}$  у унутарћелијској течности ( $\text{Mg}^{2+}_i$ ) делује као брзи блокатор отвореног стања  $\text{Na}^+$  канала да изазове волтажно – и дозно – зависну редукцију амплитуде излазне  $\text{Na}^+$  струје са полумаксималном инхибиторном концентрацијом између 3 и 4 mmol/l  $\text{Mg}^{2+}_i$ . Степен блока зависио је и од унутарћелијске концентрације  $\text{Na}^+$  ( $[\text{Na}^+]_i$ ). При том се  $\text{Mg}^{2+}_i$  са релативно великим афинитетом везује за  $\text{Na}^+$  канал, али канал остаје практично непропустан за јоне  $\text{Mg}^{2+}_i$ . Такође, у присуству физиолошког нивоа  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  симулирани натријумски АП-и били су измењеног облика, одложеног почетка и редуковане амплитуде. Закључено је да су волтажно – зависни  $\text{Na}^+$  канали осетљиви и на  $\text{Mg}^{2+}_i$ , као и на  $\text{Ca}^{2+}_o$ , те да оба двовалентна катјона, вршећи блок отвореног  $\text{Na}^+$  канала, делују као волтажни модулатори мембранске проводљивости и ћелијске ексцитабилности, смањењем  $g_{\text{Na}^+}$ . Обзиром да је  $\text{Mg}^{2+}_i$  везан у комплексу са високоенергетским фосфатима аденозин – трифосфатом (АТФ) и аденозин – дифосфатом (АДФ), то је снажно повезан и са енергетским статусом ћелије. Аутори објашњавају физиолошки значај овог магнезијумског блока  $\text{Na}^+$  канала током прекомерног утроска енергије у ћелији, као и инхибиције синтезе АТФ–а у исхемији, када пораст  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  значајно смањује  $g_{\text{Na}^+}$  и избијање АП–а. Тиме  $\text{Mg}^{2+}$  делује протективно да заштити од прекомерне деполаризације (услед метаболичке блокаде  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  пумпе) и од развоја хиперексцитабилности ћелије.

Lin и сарадници (1991) такође су показали компетитивну блокаду  $\text{Na}^+$  канала јонима  $\text{Mg}^{2+}_i$  у централних неурона сисара. Ова магнезијумска блокада смањивала се при повећању  $[\text{Na}^+]_i$  или  $[\text{Na}^+]_o$ , што упућује на то да  $\text{Mg}^{2+}_i$  на пермеацију  $\text{Na}^+$  канала утиче компетитивно заузимајући  $\text{Na}^+$  канале. Волтажно – зависан блок  $\text{Na}^+$  струје већим бројем двовалентних катјона у низу релативне ефикасности  $\text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ , показали су Sheets и Hanck (1992). Најзад, у мотонеурона

можданог стабла младунчади пацова раствор са високим садржајем магнезијума ( $6 \text{ mmol/l Mg}^{2+}$ ) изазива значајан пораст улазног отпора мембране (УОМ), при чему је велики проценат кондуктанце блокиране високим  $\text{Mg}^{2+}$  такође био осетљив на ТТХ (Cameron и сар., 2000; Núñez - Abades и сар., 2000).

Један број антиепилептичких лекова делују као отварачи  $\text{K}^+$  канала (Rundfeldt, 1997; Stafstrom, 2010). Активација  $\text{Ca}^{2+}$  – активираних  $\text{K}^+$  канала има физиолошку улогу у настанку фазе реполаризације АП-а и регулацији фреквенције пражњења неурона (Sah, 1996; Sah и Faber, 2002). Бројни експериментални налази указују на значај јона  $\text{Mg}^{2+}$  и у регулацији активности  $\text{K}_{\text{Ca}}$  канала. Тако Ferguson (1991) утврђује да  $\text{Mg}^{2+}_i$  смањује проводљивост  $\text{K}_{\text{Ca}}$  канала мишићних ћелија пацова на дозно – зависан начин, вероватно услед неутрализације негативног наелектрисања унутрашње стране ћелијске мембране. При том је магнезијумски блок ове  $\text{K}^+$  струје показивао компетитивну инхибицију између  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{K}^+$  у унутарћелијској течности, а величина блока се повећавала са деполаризацијом. McLarnon и Sawyer (1993) показују да  $\text{Mg}^{2+}_i$ , као и унутарћелијски  $\text{Sr}^{2+}$  ( $\text{Sr}^{2+}_i$ ), може да потенцира  $\text{Ca}^{2+}_i$  – индуковану активацију  $\text{K}_{\text{Ca}}$  канала хипокампаљних неурона у култури. Ови резултати указују на то да  $\text{Mg}^{2+}_i$  може имати улогу унутрашњег модулятора  $\text{K}_{\text{Ca}}$  канала у  $\text{Ca}^{2+}$  – зависној регулацији ексцитабилности мембране неурона. Слично томе, Morales и сарадници (1996) налазе да јони  $\text{Mg}^{2+}_i$  у опсегу концентрација од  $0 - 15 \text{ mmol/l}$  на дозно – зависан начин редукују пермеацију кроз  $\text{K}_{\text{Ca}}$  канале васкулних миоцита зеца. Shi и Cui (2001) показују да су експримирани  $\text{Ca}^{2+}$  – активирани  $\text{K}^+$  канали велике проводљивости (ВК канали) осетљиви на  $\text{Mg}^{2+}_i$ , при чему је  $\text{Mg}^{2+}$  у стању да модулира ове канале на више начина, у зависности од  $\text{Mg}^{2+}$  – везујућег места, са супротним ефектима на функцију канала (активација или инхибиција компетитивна са јонима  $\text{Ca}^{2+}$ ). Под физиолошким условима нето – ефекат  $\text{Mg}^{2+}$  ипак је био да појача функцију ВК канала. И други аутори потврђују налаз да  $\text{Mg}^{2+}_i$  у физиолошким концентрацијама активира ВК канале (Yang и сар., 2006).

Експерименталне студије о  $\text{Mg}^{2+}$  и даље су у фокусу истраживања. Разумевање антиепилептичког потенцијала  $\text{Mg}^{2+}$  могло би проширити његову клиничку примену на терапијски слабо контролисане или фармакорезистентне епилептичке нападе, и такође продубити досадашња знања о етиопатогенези

епилепсије. Студије механизма антиепилептичког деловања  $Mg^{2+}$  на ћелијском и молекулском нивоу могуће је изводити на моделу Рецијусовог неурона пијавице који развија епилептиформно пражњење.

О хомеостази  $Mg^{2+}$  у Рецијусових неурона постоји више сазнања. Јон – селективне микроелектроде су, од њиховог открића, постале непроцењиво средство за истраживање регулације и транспорта интрацелуларних јона. Развој и појава доступних селективних сензора за двовалентне, као и моновалентне катјоне пре тога, дозволили су мерења њихове интрацелуларне активности. Резултати мерења унутарћелијске концентрације слободног  $Mg^{2+}$  и  $Na^+$  применом јон – селективних микроелектрода у Рецијусових неурона медицинске пијавице ( $[Mg^{2+}]_i$  у опсегу од 0.1 – 1.2 mmol/l и  $[Na^+]_i$  у опсегу од 5.1 – 15.5 mmol/l, при средњој вредности мировног потенцијала мембране од  $-35.6 \pm 6.1$  mV), указују на постојање електрогеног  $1Na^+/1Mg^{2+}$  антипорта (Günzel и Schlue, 1996; Günzel и Schlue, 2002). И други видови транспорта за јоне  $Mg^{2+}$  описани су у ових неурона. Müller и сарадници (2003) применом мултибарелних јон – селективних микроелектрода показују да каинат узрокује додатно повећање концентрације слободног интрацелуларног  $Mg^{2+}$ . Резултати су указали на то да каинатом – индукован пораст  $[Mg^{2+}]_i$  у Рецијусових ћелија настаје услед инфлуksа екстрацелуларног  $Mg^{2+}$  кроз катјонски канал спрегнут са AMPA/каинатним рецепторима. Екструзија  $Mg^{2+}$  из  $Mg^{2+}$  – напуњених неурона пијавице углавном је посредована  $Na^+/Mg^{2+}$  антипортом, али је могућа и механизмом  $Na^+$  – независне екструзије  $Mg^{2+}$  котранспортом са малатом (Günzel и сар., 2005).

Епилепсија је једно од најчешћих неуролошких обољења људи. Висока инциденција епилепсије, непозната етиопатогенеза и честа рефрактарност на медикаментозну терапију захтевају нове приступе у лечењу ове болести. Показано је да важну улогу у настанку, одржавању и пропагацији епилептичких напада могу имати и механизми независни од хемијске синаптичке трансмисије. Антиконвулзивно дејство магнезијума има потенцијал већи од његове тренутне клиничке примене, али су његови механизми недовољно познати. Стога је од великог значаја испитивање механизма антиепилептичког дејства магнезијума на експерименталним анималним моделима несинаптичке епилептогенезе.

## 2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Циљ ове студије био је да се испита механизам супресивног дејства јона магнезијума на моделу експерименталне епилептиформне активности Рецијусових неурона пијавице *Haemopsis sanguisuga*, индуковане применом никла. Постављени су следећи циљеви истраживања:

- Описати и окарактерисати никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона пијавице
- Испитати супресивно дејство магнезијума на параметре никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона пијавице анализом дозне зависности дејства
- Испитати ефекат магнезијума на мировни мембрански потенцијал, спонтану електричну активност и активност Рецијусових неурона изазвану дражењем деполаришућим струјним импулсима, као и на улазни отпор слободне мембране Рецијусовог неурона у стандардним јонским условима
- Испитати ефекат магнезијума на улазни отпор слободне мембране Рецијусовог неурона у току никлом индуковане епилептиформне активности

Ефекти магнезијума били су испитивани методама класичне електрофизиологије: интраћелијским регистровањем потенцијала мембране и електричне активности ћелије, директном електричном стимулацијом мембране и израчунавањем улазног отпора слободне мембране Рецијусовог неурона.



### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. Препарат

Као експериментални препарат, пијавица се користи у неуронаукама још од краја XIX века (Kristan и сар., 2005). Основна предност пијавице као огледне животиње потиче од једноставности њене телесне грађе која се одражава и на грађу нервног система. Тело пијавице састоји се од већег броја сегмената. Централни нервни систем пијавице пружа се целом дужином тела животиње ближе вентралној површини. Представљен је нервном врпцом сачињеном од низа ганглија (главених, слободних и репних). На крајевима тела по неколико ганглија је фузионисано у главени и репни мозак. Свака слободна ганглија инервише по један добро дефинисани део тела – један сегмент, путем својих парних бочних коренова сачињених од снопова аксона ганглијских неурона, док аференце из блиских и удаљених делова нервног система прима путем међуганглијских спојница, предњих и задњих. Нервну врпцу обавија слој ендотела, испод кога се налази транспарентно везивно ткиво које дели ганглију на 6 дискретних група ћелија у виду глијалних пакета (непарни: медијални предњи и задњи, и парни: антеролатерални и постеролатерални). Експериментални препарат изолованих ганглија пијавице добро преживљава *in vitro* у физиолошком сланом раствору, чак и дуже од 12 h.

Свака ганглија садржи око 400 нервних ћелија карактеристичног положаја, облика, величине и гранања (Sawyer, 1986). Нервне ћелије у ганглији груписане су у глијалне пакете. Положај неурона у ганглији је константан. Неуроне у ганглији могуће је препознати на основу морфолошких критеријума (облика и величине ћелије, и положаја у ганглији), а идентификација се може потврдити регистравањем електрофизиолошких својстава мембране (Nicholls и Van Essen, 1974).

Рецијусов неурон је најкрупнија ганглијска ћелија пијавице (50 – 80  $\mu\text{m}$  у пречнику). Назив носи у част научника Gustav von Retzius-a, који ју је први описао 1891. год. Од тог времена су Рецијусови неурони веома темељно изучени, будући крупни и лако препознатљиви. Пар Рецијусових неурона смештен је при средишту

ганглије, у предњем медијалном ћелијском пакету, ближе вентралној површини (Sawyer, 1986). Један на према другом су дијагонално орјентисани (Слика 1.).



**Слика 1.** Микрофотографија слободне сегментне ганглије пијавице *Haemoris sanguisuga* – вентрални аспект. Стрелицама је приказан положај Рецијусових неурона. Љубазношћу доц. др Александра Мирчића, Институт за хистологију и ембриологију Медицинског факултета у Београду

Као и друге моноаминергичке неуроне, Рецијусове неуроне је могуће селективно витално обојити бојом неутрално црвено, будући да стварају серотонин (Lent и Frazer, 1977). Ово су једини пројекциони серотонергички неурони пијавице. У ганглији пијавице постоје и други серотонергички неурони, осим Рецијусових, који се сматрају интернеуронима. При том су сви серотонергички неурони унутар ганглије међусобно електротонички спрегнути. Интраћелијска бојења флуоресцентним бојама показују образац гранања аксона Рецијусовог неурона, који је сличан у свим слободним сегментним ганглијама, изузев V и VI, које су задужене за инервацију репродуктивних органа. Рецијусов неурон је униполаран, аксон му се пружа постериорно и дорзално кроз неуропил, скреће пут упоље и грана се на два

огранка. Своје аксоне ове ћелије шаљу на периферију путем истостраног пара бочних сегментних коренова ганглије (Bagnoli и Magni, 1975), а 2 мања аксонска огранка пружају се ипсилатерално преко међуганглијских спојница, један напред, други назад, кроз суседне ганглије (Carretta, 1988). Дендритско гранање Рецијусових неурона је опсежно, и није искључиво једнострано.

Рецијусови неурони су лако доступни, а њихова активност стабилна, те представљају погодан експериментални модел за електрофизиолошка испитивања неурофизиолошких процеса на ћелијском нивоу. Прве интрацелуларне регистрације са Рецијусових неурона направили су Nagiwaru и Morita 1962. и Eckert 1963. год., и описали њихова електрофизиолошка својства (Carretta, 1988). Мировни мембрански потенцијал (ММП) Рецијусовог неурона варира у опсегу од  $-30$  до  $-60$  mV, у зависности од величине и активности ћелије, осмоларности и др. Амплитуда AP-а регистровног са неуронске коме је реда величине  $10 - 60$  mV, те не долази до пребачаја, а трајања је од  $6 - 8$  ms (Gerasimov и Akoev, 1967; Leake, 1986). У физиолошким условима Рецијусове ћелије показују нискофреквентну тоничку електричну активност просечне учесталости од  $0.2 - 3$  AP-а у секунди (Beck и сар., 2001), улазни отпор мембране од  $5 - 18$  M $\Omega$ , и укупну капацитативност мембране од  $2 - 2.5$  nF (Sawyer, 1986). Учесталост спонтане активности варира, од периода потпуног мира, преко неправилне активности, чак до спонтаног ритмичког високофреквентног пражњења током епизода пливања и храњења (Sahley и сар., 1993). Недовољно су познати механизми који модулирају образац спонтаног пражњења ћелије.

Акциони потенцијал Рецијусовог неурона има брзу узлазну и брзу силазну фазу. Узлазна фаза AP-а (фаза деполаризације) зависна је од јона  $\text{Na}^+$  (бива потпуно блокирана заменом јона  $\text{Na}^+$  јонима  $\text{Li}^+$ ), и посредована двема волтажно – зависним улазним струјама: брзом, ТТХ – сензитивном  $\text{Na}^+$  струјом и спором, ТТХ – резистентном  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  струјом. Силазна је фаза (фаза реполаризације)  $\text{K}^+$  – зависна, и посредована двема излазним струјама: волтажно – зависном  $\text{K}^+$  струјом и  $\text{Ca}^{2+}$  – зависном  $\text{K}^+$  струјом (Carretta, 1988). Излагање блокаторима  $\text{K}^+$  канала тетраетиламонијуму (ТЕА) или 4-аминопиридину (4-AP) продужава трајање AP-а. У

раствору без  $\text{Na}^+$  и са ТЕА и 4-АР, Рецијусов неурон одржава активност у виду АП-а продуженог трајања зависних од инфлукса  $\text{Ca}^{2+}$  (Sahley и сар., 1993).

На ћелијској мембрани Рецијусовог неурона идентификована су два типа  $\text{Na}^+$  канала, и најмање три типа  $\text{K}^+$  канала. Излазне реполаришуће  $\text{K}^+$  струје главне су детерминанте ексцитабилности мембране и окидања АП-а Рецијусових ћелија. Калцијум – зависни  $\text{K}^+$  канали отварају се јонима  $\text{Ca}^{2+}$  који улазе у ћелију кроз волтажно – зависне  $\text{Ca}^{2+}$  канале, и, у мањој мери, јонима  $\text{Ca}^{2+}$  ослобођеним из унутарћелијских депоа. Калцијум – зависна  $\text{K}^+$  струја је главна излазна струја Рецијусових неурона; не блокирају је харибдотоксин, ни апамин. Блокада  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  струја разоткрива улазну  $\text{Ca}^{2+}$  струју коју блокирају јони  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  (Stewart и сар., 1989).

Свака сегментна ганглија коњске пијавице садржи по две крупне Рецијусове нервне ћелије које су међусобно електротонички повезане у свим слободним ганглијама, изузев пете и шесте (Beleslin, 1977). Претпоставља се да се овај спој остварује на нивоу специфичних дендрита у неуропилу ганглије. Електротоничко повезивање Рецијусових неурона у пару дозвољава директан и слободан пролазак јона у оба смера (бидирекциона електрична синапса). Ово обезбеђује једнакост мировног мембранског потенцијала два неурона, као и синхронизовање њихових активности, тако да пар Рецијусових неурона у ганглији функционише као једна целина. Ово такође омогућава и синхронизованост и симетричност одговора циљних структура које су њима инервисане. Поред електричних, Рецијусов неурон остварује и бројне хемијске синапсе. Познато је да реагује на ацетилхолин, серотонин, допамин и неке аминокиселине (GABA, глутамат, аспартат) (Sawyer, 1986). Рецијусове ћелије су мултифункционални моторно – модулаторни неурони који имају улоге у пливању и храњењу животиње, и секрецији мукуса из коже.

### 3.2. Метода

Идентификоване пијавице врсте *Haemopsis sanguisuga* набављане од овлашћеног добављача у околини Котежа, чуване су у фрижидеру на температури од

+4°C, у дехлорисаној водоводској води која је редовно мењана. Анестетисање је вршено у 10%-тном раствору етанола у Рингеровом (Ringer) раствору за пијавице. Дејство анестезије је било реверзибилно, јер је примећиван потпун опоравак животиња по вађењу из раствора за анестезију. Анестетисање и препарација вршени су у Петри (Petri) шољи за чије су дно воском фиксирани комади плуте. Пијавице су чиодама биле причвршћиване за ове комаде плуте ветралном страном навише. Почетна фаза препарације вршена је у раствору за анестезију под стереомикроскопом за препарацију (MBS-9, USSR), под увеличањем од 16х. По исецању коже и мишићног слоја телесног зида пијавице, указивао се нервни ланац у крвном синусу. Исецан је сегмент нервног ланца у крвном синусу у дужини од 3 – 5 ганглија, који је одмах пребациван у експерименталну коморицу од плексигласа запремине 2.5 ml, испуњену Рингеровим раствором за пијавице.

Следећа фаза препарације настављана је у експерименталној коморици под стереомикроскопом (MBS-9, USSR) под увеличањем од 32х, са осветљењем одоздо. Изоловани сегмент нервног ланца, затегнут и фиксиран држачима од нерђајућег челика, чишћен је од крвног синуса помоћу маказица за иридектомију, након чега је поново био растегнут вентралном страном навише на ~125% своје мировне дужине, како би се спречиле контракције препарата у току огледа.

По завршеној препарацији, експериментална коморица је пребацивана у уземљен Фарадејев (Faraday) кавез постављен тако да се спречи деловање вибрација. Идентификација и пенетрација Рецијусових неурона вршене су под стереомикроскопом (MBS-9, USSR) под увеличањем од 42х. Пре почетка експеримента мењан је садржај коморице свежим Рингеровим раствором за пијавице, и препарат остављан да одстоји 20 – 30 min ради еквилибрације. Препарација и експерименти су вршени на собној температури (18 – 25 °C).

Мењање раствора је вршено заменом бар троструком запремином коморице у току 10 – 15 s. Измена је вршена континуираним протоком истовременим усисавањем течности помоћу водене вакуум пумпе и убацивањем новог раствора помоћу шприца запремине 10 ml.

Рецијусови неурони су идентификовани на основу морфолошких својстава и електрофизиолошких критеријума (ниво мировног мембранског потенцијала,

амплитуда и облик акционих потенцијала, присуство и учесталост спонтане активности). У обзир су узимани резултати огледа на ћелијама које нису показивале знаке оштећења ни после вишечасовног регистровања.

### 3.3. Електрични уређаји за регистровање и дражење

За регистровање електричног потенцијала и активности мембране ћелије коришћена је стандардна електрофизиолошка техника унутарћелијског регистровања помоћу микроелектроде.

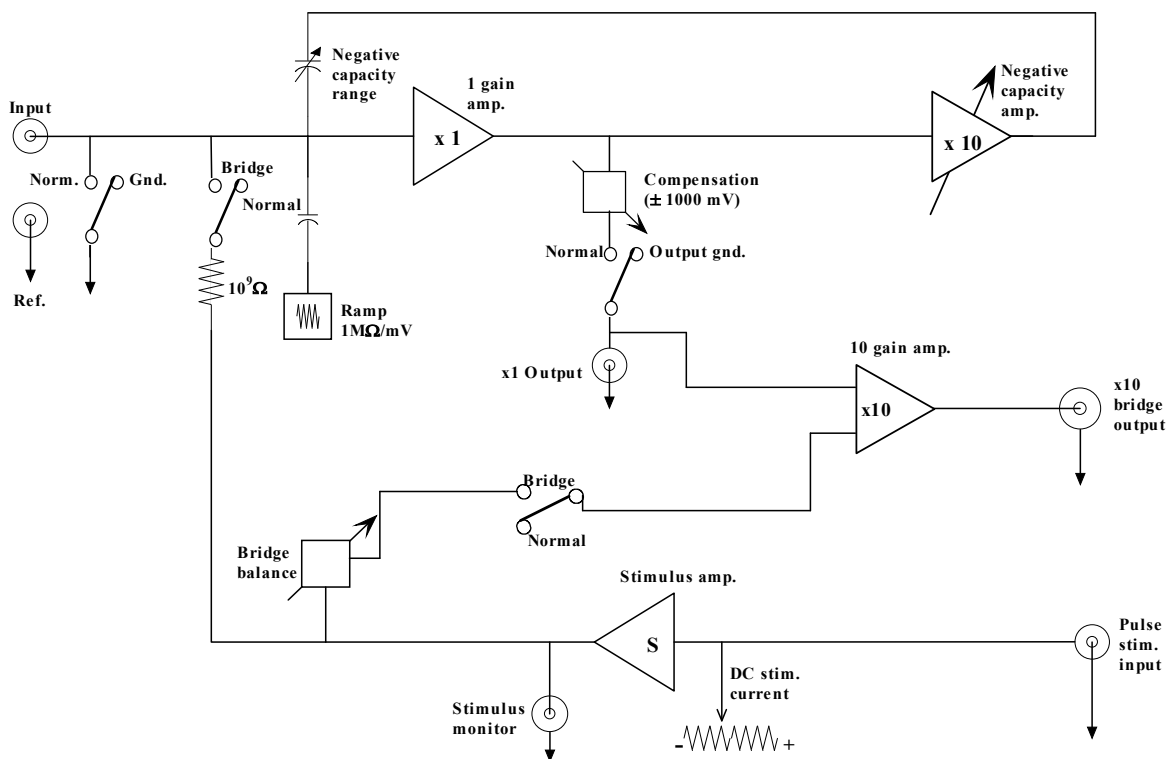
Микроелектроде су прављене извлачењем од финих стаклених капиларних цевчица са уграђеним унутрашњим микрофиламентом (Harvard Apparatus GC150F-10, УК). Извлачење микроелектрода је вршено на вертикалном извлакачу са подесивим грејањем и силом извачења (Narishige, Japan), што је омогућавало добијање микроелектрода потребних карактеристика.

За огледе су коришћене микроелектроде електричног отпора 20 – 35 МΩ, пречника врха мањег од 1 μm, са потенцијалом врха до 5 mV. Потенцијал врха одређиван је пре и после пенетрације неурона. Могући утицај замене раствора на вредност потенцијала врха микроелектроде искључиван је контролном заменом раствора са екстрацелуларно постављеном микроелектродом на крају сваког огледа. Извучене микроелектроде испуњаване су тромоларним раствором калијум хлорида (3 mol/l KCl). По пуњењу се приступало микроскопској контроли пуњења, квалитета и особина врха микроелектроде, и мерењу њеног отпора. За огледе су коришћене свеже извучене и свеже испуњене микроелектроде. Увођење микроелектроде у ћелију вршено је помоћу механичког микроманипулатора (Leitz, Немачка).

Референтна макроелектрода од сребро – сребро хлорид жице (Ag - AgCl) налазила се у засебној коморици испуњеној стандардним Рингеровим раствором за пијавице. Вежа између коморице са препаратом и коморице са референтном макроелектродом остваривана је преко стакленог моста испуњеног агаром

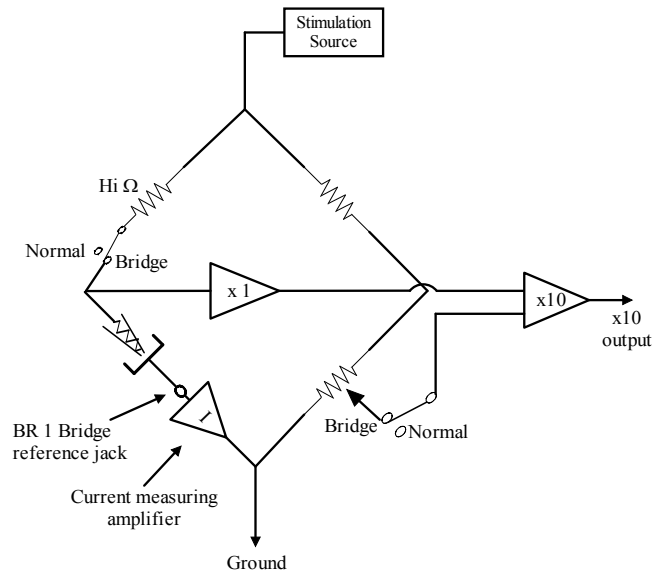
раствореним у 3 mol/l KCl. У експериментима са стимулацијом ћелије кабл за референтну електроду био је додатно изолован због велике осетљивости апаратуре.

Регистровање мировног мембранског потенцијала и акционих потенцијала, као и волтажног одговора при електростимулацији ћелије вршено је на двоканалном осцилоскопу (Nameg НМ 205-3, Немачка). Бележење је вршено на механичком писачу (Linseis, Немачка), као и на графичком штампачу осцилоскопа (Nameg НМ 8148-2, Немачка). Веза између микроелектроде и осцилоскопа, односно микроелектроде и писача је остваривана и појачање сигнала вршено преко појачавача са негативним капацитетом и великим улазним отпором (Winston Electronics Co., модел 1090, САД;  $R=10^9 \Omega$ ), чије је електрично коло приказано на Схеми 1.



**Схема 1.** Схема уређаја Winston Electronics Co. модел 1090, коришћеног у нашим експериментима.

У огледима одређивања улазног отпора мембране ћелије, дражење ћелије и регистравање одговора вршени су преко исте микроелектроде. Ово је омогућено коришћењем засебне јединице са Витстоновим (Wheatstone) мостом (Winston Electronics Co., модел BR-1, САД). Електрично коло Витстоновог моста садржаног у јединици BR-1 приказано је на Схеми 2.



**Схема 2.** Електрично коло Витстоновог моста из јединице BR-1, Winston Electronics Co., коришћене у нашим експериментима. Сви прекидачи су у положајима за коришћење моста.

За дражење ћелија коришћен је стимулатор S 48 са изолационом јединицом SIU 5 (оба уређаја произведена од стране Grass Instruments, САД). Дражење је вршено правоугаоним деполаришућим или хиперполаришућим импулсима трајања 500 ms, јачине 0.3 – 2.0 nA, фреквенцијом од 0.1 – 0.2 Hz. Број акционих потенцијала изазваних деполаришућим дражима коришћен је као мера ексцитабилности ћелијске мембране. Праг за избијање АП-а мерен је у нивоу почетка брзе узлазне фазе АП-а. Амплитуде електротоничких потенцијала изазваних хиперполаришућим струјним пулсевима мерене су ради израчунавања улазног отпора мембране ћелије.



Схема 3. приказује апаратуру коришћену у експериментима ове студије.

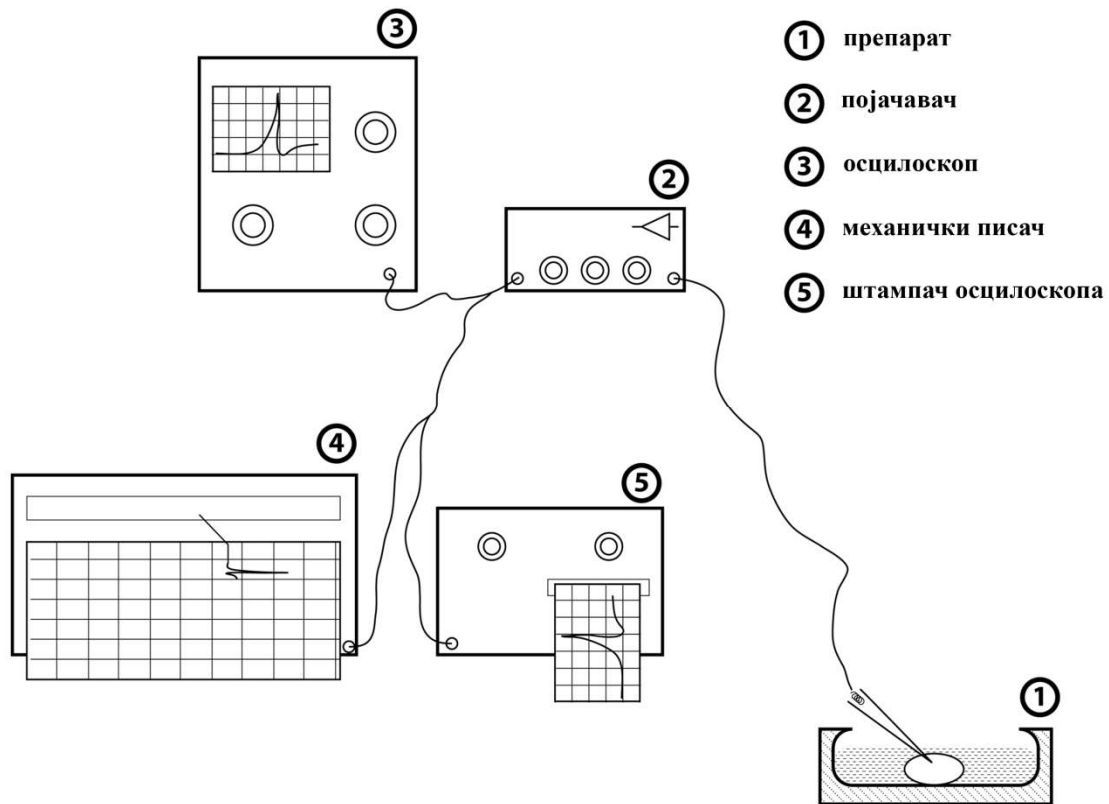


Схема 3. Схематски приказ апаратуре коришћене у нашим експериментима.

### 3.4. Одређивање улазног отпора мембране

У овим огледима ћелија је стимулирана константном једносмерном струјом хиперполаришућим дражима познате јачине. У исто време је регистрован волтажни одговор мембране неурона. Мерена је напонска разлика између цитоплазматске и екстраћелијске стране мембране. Очитавање вредности амплитуде изазваних електротоничких потенцијала мембране вршено је директно са записа са штампача осцилоскопа. Улазни отпор мембране израчунаван је према формули:

$$\text{IMR} = \frac{U_{\text{reg}}}{I_{\text{dr}}} \quad (1)$$

где је IMR (*енг.* input membrane resistance) – улазни отпор мембране,  $U_{\text{reg}}$  – регистрована промена напона, а  $I_{\text{dr}}$  – јачина струје дражења. Јачина струје дражења израчунавана је по обрасцу:

$$I_{\text{dr}} = \frac{U_{\text{dr}}}{10^9 \Omega} \quad (2)$$

где је  $U_{\text{dr}}$  напон дражења који се подешава на стимулатору, а  $10^9 \Omega$  је отпор инструмента који представља константу.

### 3.5. Коришћени раствори

У огледима су коришћени следећи раствори:

- стандардни Рингеров раствор за пијавице ( $R_i$ , све концентрације наведене у mmol/l): NaCl 115.5, KCl 4.0, CaCl<sub>2</sub> 2.0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 (pH=7.2),
- Рингеров раствор са никлом, прављен додавањем 3 mmol/l NiCl<sub>2</sub> у  $R_i$  (Ni<sup>2+</sup>  $R_i$ ),
- Рингеров раствор са магнезијумом, прављен додавањем 20 mmol/l MgCl<sub>2</sub> у  $R_i$  (Mg<sup>2+</sup>  $R_i$ ), и
- серија Рингерових раствора са никлом у концентрацији од 3 mmol/l NiCl<sub>2</sub>, и магнезијумом у растућим концентрацијама MgCl<sub>2</sub> (1 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup>  $R_i$ , 3 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup>  $R_i$ , 7 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup>  $R_i$ , 10 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup>  $R_i$  и 20 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup>  $R_i$ ).

Модификовани  $R_i$  раствори прављени су одговарајућом редукцијом концентрације NaCl, ради осмотске корекције.

### 3.6. Анализа резултата

Мерења са оригиналних записа обављана су након првих 5 min после одговарајуће измене раствора за перфузију, по излагању супстанци, односно након њеног уклањања испирањем.

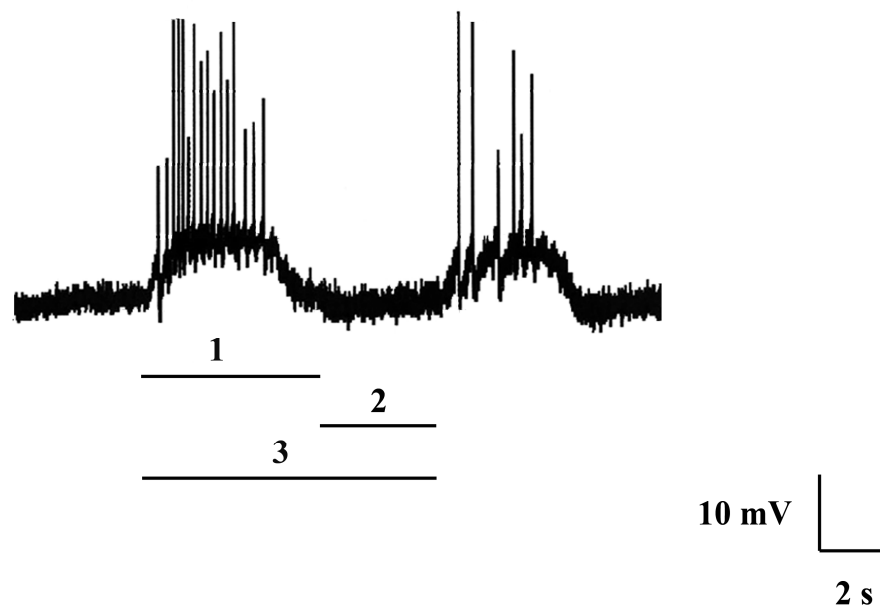
Резултати су приказани бројчано и графички. Бројчане вредности су приказане као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.

Стабилизовано епилептиформно пражњење Рецијусових неурона пијавице индуковано никлом представља правилну осцилаторну електричну активност мембране. Ова активност састоји се из репетитивног избијања пароксизмалних таласа деполаризације (ПТД). Никлом индуковани ПТД-и понављају се ритмички у правилним циклусима осцилација. За сваким ПТД-ом следи интер-ПТД интервал. При том, интер-ПТД интервал временски одговара споро деполаришућој промени потенцијала мембране која, након претходног ПТД-а, спонтано и постепено поново води мембрану у нови циклус осцилација. Један циклус осцилација траје од почетка датог ПТД-а до почетка првог наредног ПТД-а. Време трајања једне осцилације обухвата сâм ПТД и интер-ПТД интервал који временски за њим следи, и означено је као ПТД период (Слика 2.).

Регистрована осцилаторна активност и сâм ПТД као њен елементарни догађај квантитативно су анализирани у циљу описивања њихове природе и разумевања механизма њиховог настанка. Мерено је неколико основних квантитативних параметара никлом индуковане епилептиформне активности, односно насталих ПТД-а.

Важан параметар који описује ову осцилаторну активност јесте фреквенција осциловања која представља број осцилација у јединици времена. Фреквенција регистроване епилептиформне активности мембране мерена је са записа на механичком писачу као фреквенција ПТД-а, и изражавана као број ПТД-а у минути. При том ПТД фреквенција и трајање ПТД периода стоје у реципрочној зависности. Величина узорка (n) при мерењу ПТД фреквенције одговарала је броју апликација супстанце у огледима.

У циљу описивања дате индуковане епилептиформне активности мембране Рецијусових неурона, уочено је и праћено још неколико ПТД параметара: трајање ПТД-а, амплитуда ПТД-а и број акционих потенцијала по ПТД-у. Трајање ПТД-а мерено је од почетка до завршетка пароксизмалног таласа деполаризације, ПТД амплитуда од његове базе па до врха фазе платоа, док су појединачни акциони потенцијали поврх ПТД-а једноставно пребројавани. Сва ова три параметра епилептиформне активности одређивани су са записа направљених штампачем осцилоскопа, те је при њиховом мерењу величина узорка (n) означавала број премерених ПТД-а, као јединица посматрања.



**Слика 2.** Никлом индукована осцилаторна активност Рецијусовог неурона пијавице – регистрација са графичког штампача осцилоскопа. Један пароксизмални талас деполаризације (ПТД, 1) и пратећи временски интервал споро деполаришуће промене потенцијала мембране до почетка новог ПТД-а (интер-ПТД интервал, 2), заједно сачињавају један циклус осцилација, означен као један ПТД период (3).

Пети посматрани параметар индуковане епилептиформне активности био је интензитет епилептиформне активности. Ово је изведен параметар који представља однос трајања ПТД-а и трајања припадајућег ПТД периода, и може се изразити у процентима. Интензитет епилептиформне активности могуће је добити као количник ове две вредности, након њиховог узастопног мерења на континуираном запису непрекидне ПТД активности по њеној индукцији и стабилизацији, током временског периода од неколико минута. Интензитет („снага“) епилептиформног пражњења може бити користан и као показатељ за процену ефикасности примењене концентрације никла као епилептогеног агенса. Међутим, обзиром да је у питању ритмична активност мембране, трајање једног ПТД периода директно је зависно од учесталости ПТД-а, и њој обрнуто сразмерно. Стога је овај изведени параметер у датог неурона било могуће израчунати и као функцију два претходно директно мерена параметра, ПТД трајања и ПТД фреквенције, према следећој формули:

$$\text{интензитет епилептиформне активности (\%)} = 100 \cdot \frac{\text{ПТД фреквенција (min}^{-1}\text{)} \cdot \text{ПТД трајање (s)}}{60 \frac{\text{s}}{\text{min}}} \quad (3)$$

Број јединица посматрања ( $n$ ) при одређивању интензитета епилептиформне активности представљао је број понављања, као и при мерењу њене фреквенције.

Промена вредности ПТД параметара при перфузији раствором који садржи јоне магнезијума коришћена је као мера ефекта  $\text{Mg}^{2+}$  на експерименталну епилептиформну активност Рецијусових неурона индуковану никлом. У циљу испитивања дозне зависности супресивног дејства магнезијума на изазвану епилептиформну активност, урађена је математичка анализа добијених резултата коришћењем следеће једначине:

$$y = A1 + \frac{A2 - A1}{1 + 10^{(\log x_0 - x)p}} \quad (4)$$

У овој једначини  $A1$  представља ниво доње хоризонталне асимптоте која одговара минимуму одговора,  $A2$  је ниво горње хоризонталне асимптоте која одговара максимуму одговора, док су параметри криве дозне зависности дејства

магнезијума:  $\log x_0$  и  $p$  – превојна тачка и нагиб сигмоидне криве (Хилов (Hill) коефицијент), респективно. Најзад,  $IC_{50}$  (енг. half maximal inhibitory concentration) је средња инхибиторна концентрација магнезијума, односно она вредност концентрације  $Mg^{2+}$  која остварује полумаксимални инхибиторни ефекат (одговор на половини између минимума и максимума).

Применом ове једначине на резултате огледа, добијене су криве дозне зависности ефеката магнезијума на параметре никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона. Апроксимација у поступку подешавања (фитовања) доза – дејство кривих према експерименталним резултатима заснивала се на методу најмањих квадрата. Као почетне вредности за подешавање кривих коришћени су парови координата (концентрација, одговор) добијени из експеримената. За сâмо подешавање (фитовање) кривих, коришћен је програм који је давао вредности параметара дозно – зависних кривих:  $A1$ ,  $A2$ ,  $\log x_0$ ,  $p$  и  $IC_{50}$ .

У циљу оптималног праћења односа примењене дозе, односно концентрације магнезијума и постигнутог дејства, као и предвиђања јачине ефекта после примене одређене дозе, прибегава се једноставној математичкој трансформацији – логаритмовању (за основу 10) појединачних вредности примењених концентрација. Овиме графички приказ зависности дејства од дозе добија облик сигмоидне криве. Добијене сигмоидне криве приказују ступњевит однос између примењене дозе магнезијума и датог постигнутог ефекта.

За статистичку анализу коришћен је Студентов (Student) t-тест. Статистички значајном сматрана је вероватноћа нулте хипотезе  $p < 0.05$ , а високо статистички значајном – вероватноћа  $p < 0.01$ .

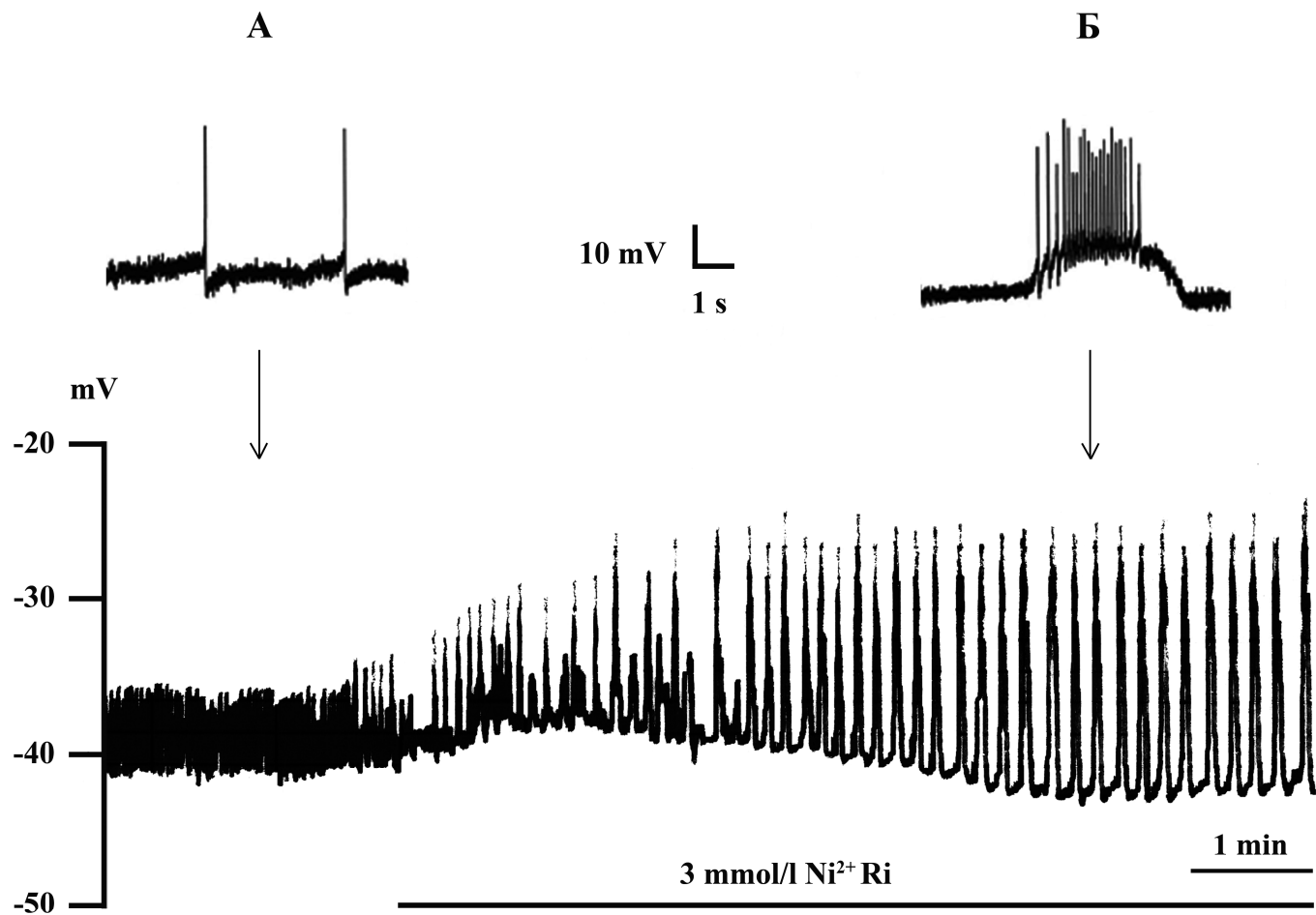
## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Индукција епилептиформне активности у Рецијусових неурона применом никла

Излагање препарата изолованих ганглија медицинске пијавице и неколико других врста пијавице растворима са солима прелазних метала индукује у неурона пијавице развој епилептиформне активности (Yang и Lent, 1983; Dean и Leake, 1988; Angstadt и Friesen, 1991; Opdyke и Calabrese, 1994; Angstadt и Choo, 1996; Angstadt и сар., 1998; Angstadt, 1999; Beck и сар., 2001). Ова студија изведена је коришћењем експерименталног модела епилептиформне активности индуковане никлом у Рецијусових неурона пијавице *Haemopsis sanguisuga* (Stanojević и сар., 2015а; Stanojević и сар., 2015б).

У стандардном Рингеровом раствору Рецијусови неурони пенетрирани интраћелијском микроелектродом показивали су мировни мембрански потенцијал од  $-41.74 \pm 0.63$  mV ( $n=35$ ) и спонтано окидали појединачне акционе потенцијале. Суперфузија препарата изолованих ганглија пијавице Рингеровим раствором са 3 mmol/l  $\text{NiCl}_2$  доводила је до постепене индукције епилептиформне активности. Феномен развоја епилептиформног пражњења током перфузије препарата раствором соли никла, уочен приликом интрацелуларног регистровања са Рецијусових неурона пијавице, детаљно је описан у даљем тексту.

Образац пражњења Рецијусовог неурона током ове експерименталне епилептиформне активности по правилу је стереотипан, како се то показује на запису интраћелијских регистрација. Слика 3. показује типичан одговор Рецијусовог неурона на перфузију раствором соли никла. При том, активност Рецијусових неурона обично постаје епилептиформна већ у првим минутима по увођењу раствора са никлом, а њена индукција јасно пролази кроз неколико фаза. Почетак епилептиформне активности Рецијусових неурона приказивао се најпре као рани пораст учесталости пражњења појединачних АП-а, удружен са стабилном и значајном двофазном променом базалног нивоа потенцијала



**Слика 3.** Ефекат 3 mmol/l NiCl<sub>2</sub> на потенцијал мембране и активност Рецијусовог неурона пијавице. Индукција епилептиформне активности. *горе* – записи са штампача осцилоскопа, *доле* – запис са механичког писача, **А** – тоничка активност у стандардном Рингеровом (Ri) раствору, и **Б** – спонтани развој епилептиформне активности по увођењу Ni<sup>2+</sup>



мембране. Под дејством  $\text{Ni}^{2+}$  потенцијал мембране је најпре деполарисао, па убрзо потом реполарисао. Рана фаза индукције се састојала од иницијалне постепене деполаризације потенцијала мембране, праћене учесталим пражњењем са развојем првих пароксизмалних таласа продужене деполаризације. Убрзо је следила друга фаза периода индукције коју је одликовала постепена блага реполаризација мембране, праћена спонтаним развојем пароксизмалног пражњења у виду правилне осцилаторне активности мембране. При пуном развоју дејства  $\text{Ni}^{2+}$ , потенцијал мембране износио је  $-40.18 \pm 0.79$  mV ( $n=35$ ), што је представљало малу, али статистички високо значајну нето-деполаризацију мембране Рецијусових неурона у односу на мировну вредност потенцијала ( $p < 0.01$ ) (Табела 1.).

**Табела 1.** Ефекат 3 mmol/l  $\text{NiCl}_2$  на мембрански потенцијал Рецијусовог неурона

ММП (mV)	МП у $\text{Ni}^{2+}$ Ri (mV)	деполаризација (mV)	p	n
$-41.74 \pm 0.63$	$-40.18 \pm 0.79$	$1.56 \pm 0.44$	$< 0.01$	35

подаци приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка. ММП – мировни мембрански потенцијал, МП – мембрански потенцијал, Ri – Рингеров раствор, p – ниво вероватноће t-теста (МП у  $\text{Ni}^{2+}$  Ri vs. ММП), n – број понављања

Осцилације мембранског потенцијала у присуству никла састојале су се од ритмичних пароксизмалних таласа деполаризације (ПТД) у форми платоа, истовремено са којима су репетитивно избијали шиљак потенцијали у виду праска (*eng. bursting*). Затим је долазило до устаљивања индуковане осцилаторне активности која се дуго потом на ритмичан и стереотипан начин могла одржавати уједначеном, како је приказано на Слици 3Б.

Тако током експозиције никлу спонтана активност Рецијусових неурона постепено бива замењена епилептиформном активношћу, односно, окидање појединачних акционих потенцијала (Слика 3А.) бива замењено ритмичном појавом пароксизмалних осцилација потенцијала мембране у виду великих спорих таласа деполаризације (Слика 3Б.). Оваква електрична активност Рецијусових неурона

интраћелијски регистрована у току перфузије препарата раствором соли  $Ni^{2+}$ , управо је због свог пароксизмалног, експлозивног и осцилаторног карактера и изузетне стабилности сматрана епилептиформном. Изражене ритмичке осцилације мембранског потенцијала удружене са високофреквентним пражњењем сматране су ћелијским изразом изазване експерименталне епилептиформне активности. Стога су и означене као пароксизмални таласи деполаризације, какви леже у основи ћелијских збивања током епилептичких напада. Са развојем епилептиформног пражњења индукованог помоћу  $Ni^{2+}$ , смањује се, и најзад у већине неурона потпуно престаје окидање изолованих појединачних шилџак потенцијала између ПТД-а. Феномен ПТД-а представљао је основни израз интраћелијски регистроване  $Ni^{2+}$  – индуковане осцилаторне активности Рецијусових неурона пијавице. Елементарни циклус осцилација сачињавао је један ПТД заједно са пратећим интер-ПТД интервалом (Слика 2.).

Пароксизми продужене деполаризације суперпонирани праском АП-а – типични су ПТД-и. Убрзо по појави, ПТД-и постепено су постајали већи, дуготрајнији и са израженијим праском АП-а на врху, дакле – по многим параметрима проминентнији. При том је, ипак, активност постепено успоравала, тј. њена фреквенција опадала до устаљења. Овај прелаз је био постепен. Тачан тренутак преласка једне у другу фазу индукције ретко је било могуће јасно одредити. Арбитрарно је то време које обележава смањење вршне деполаризације базалног нивоа потенцијала мембране неурона, изражене у првој фази индукције, што је било праћено развојем ритмичких осцилација потенцијала мембране све већих у амплитуди и дужих у трајању. Две јасно изражене фазе индукције могу се сматрати изразом тока једног те истог континуираног основног процеса иктогенезе на овом моделу.

Једном успостављено  $Ni^{2+}$  – индуковано епилептиформно пражњење Рецијусовог неурона најзад је достигало веома стабилну фреквенцију. Једном стабилизовано, дуго се одржавало непромењеним. По стабилизацији, ПТД-и избијали су са сличним одликама, тј. стабилном формом и стабилним вредностима параметара током дугог периода посматрања. Образац тако развијене експерименталне епилептиформне активности Рецијусових неурона пијавице

показивао је изузетну конзистентност са којом се репетитивно генерисање ПТД-а могло одржавати ритмички током више сати стабилног пражњења и регистравања. Општа својства ПТД-а била су стереотипна у већине, ако не у свих испитиваних неурона.

Треба, међутим, навести да у једног малог броја експеримената индукција епилептиформне активности Рецијусових неурона перфузијом раствором са 3 mmol/l NiCl<sub>2</sub> ипак није била могућа. Такође, иако се по излагању раствору са јонима Ni<sup>2+</sup> преобладајно манифестује епилептиформни ћелијски феномен ПТД-а као стереотипан одговор Рецијусовог неурона, повремено су били регистровани и неки атипични обрасци ПТД-а.

У фази развијеног Ni<sup>2+</sup> – индукованог пражњења, ПТД-и појављивали су се спонтано, репетитивно и правилно својим интринсичким ритмом, ниском интринсичком учесталости од 5.92±0.28 min<sup>-1</sup> (n=57). Најчешће запажен тип ПТД-а имао је типичну форму пароксизмалног деполаризујућег помака, односно споре плато деполаризације мембране, која се састојала од три фазе: узлазне фазе, платоа са серијом акционих потенцијала на њему, и силазне фазе ПТД-а (Слика 2. и Слика 3Б.). Дакле, ПТД је почињао пароксизмалним позитивним помаком потенцијала мембране (фаза деполаризације), који је, након овог стрмог нагиба узлазне фазе, прелазило убрзо у следствену фазу плато деполаризације амплитуде од 12.35±0.43 mV (n=43), да би се завршио силазном фазом, тј. фазом реполаризације која је, у општем случају била мање стрмог нагиба од узлазне фазе ПТД-а, и најзад могла бити праћена малом и краткотрајном накнадном хиперполаризацијом мембране.

Поврх ПТД-а, током узлазне фазе и типично у фази платоа, избијала је салва високофреквентних АП-а (прасак репетитивних шиљака потенцијала), у просечном броју од 7.17±0.50 АП / ПТД (n=48). По правилу је деполаризација у ПТД-у значајно превазилазила праг за окидање импулса, а после праска шиљака убрзо је долазило до инактивације механизма њиховог генерисања. Трајање ових ПТД-а у просеку је износило 4.81±0.14 s (n=50). Табела 2. показује просечне вредности посматраних параметара Ni<sup>2+</sup> – индукованих ПТД-а у фази стабилизоване епилептиформне активности Рецијусових неурона пијавице.

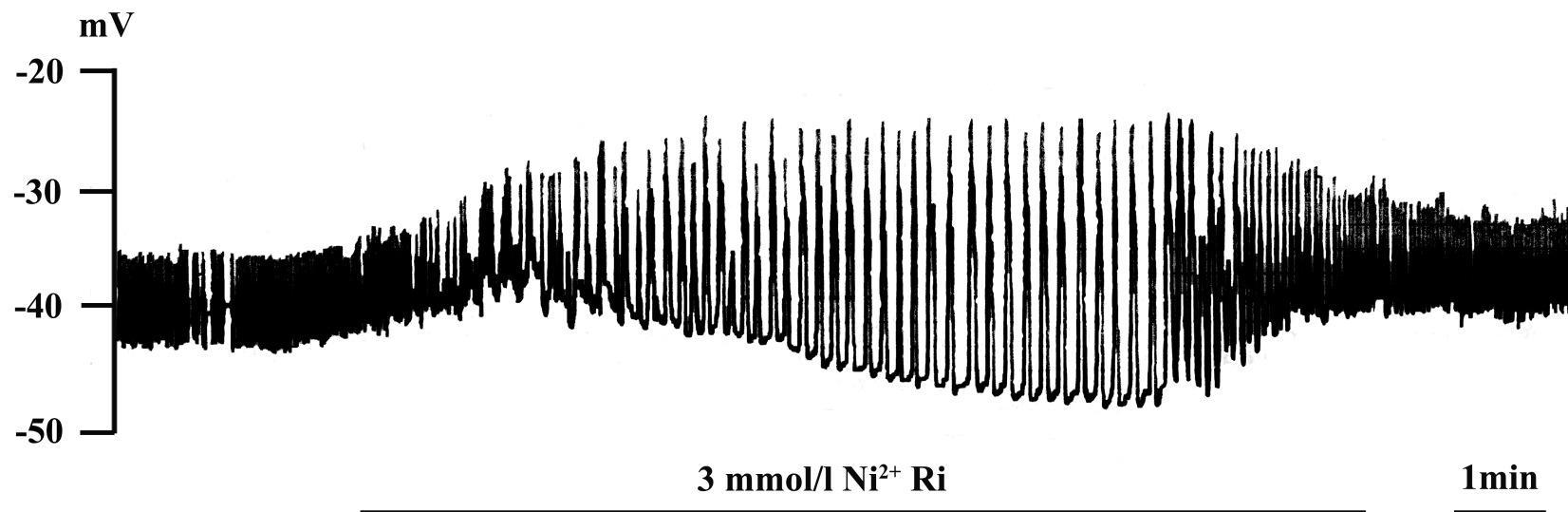
**Табела 2.** Вредности параметара развијене епилептиформне активности индуковане никлом у Рецијусових неурона пијавице

	ПТД фреквенција ( $\text{min}^{-1}$ )	ПТД трајање (s)	ПТД амплитуда (mV)	број АП/ПТД	интензитет епилептиформне активности (%)
ПТД параметар	5.92±0.28	4.81±0.14	12.35±0.43	7.17±0.50	49.66±2.95
n	57	50	43	48	39

подаци приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка. ПТД – пароксизмални талас деполаризације, АП – акциони потенцијал, n – број јединица посматрања

Ипак, запажања указују на то да су у појединим огледима неурони показивали нешто измењену ПТД активност. Ретко су биле могуће атипичне форме ПТД-а, некад са првим акционим потенцијалима који избијају само поврх узлазне фазе а пре плато фазе, или као ПТД-и који уопште не носе суперпониране акционе потенцијале („голи“ платои деполаризације, а без придружених шиљак потенцијала), или је фаза реполаризације била веома спора и дуготрајна, или је у интер-ПТД интервалу постојао изражен негативни помак потенцијала мембране – накнадна хиперполаризација (*енг. afterhyperpolarization*), или слично. Такође је било могуће и да се у истог неурона спорадично јаве ПТД-и донекле различите форме, амплитуде и трајања.

Никлом индукована епилептиформна активност Рецијусових неурона била је у потпуности реверзибилна. При испирању никла стандардним Рингеровим раствором виђају се промене потенцијала и активности мембране ћелије које означавају завршетак индуковане епилептиформне активности, како је приказано на Слици 4. Терминацију индуковане епилептиформне активности обележавају промене потенцијала мембране које, кроз пролазну деполаризацију, па потом реполаризацију мембране, споро али стабилно прогредирају ка мировном нивоу



**Слика 4.** Никлом индукована експериментална епилептиформна активност Рецијусовог неурона пијавице је реверзибилна. Након реперфундовања основним сланим раствором (Рингер, Ri) долази до брзог прекида индукованог епилептиформног пражњења и опорављања спонтане активности неурона – регистрација са механичког писача.

потенцијала мембране. Упоредо, током овог прелазног периода осцилаторна активност неурона видно слаби, амплитуда и трајање мембранских осцилација опадају, да би оне на сâмом крају најзад потпуно ишчезле. Након тога спонтано се опоравља неуронска активност налик на контролну. Тако су и индукција и терминација ове експерименталне епилептиформне активности, како их бележи интрацелуларна регистрација, праћене суштински сличним пролазним ћелијским феноменима, само обрнутог следа збивања. Опоравак потенцијала мембране и спонтане активности Рецијусових неурона након испирања  $\text{Ni}^{2+}$  били су задовољавајући. Није било видних разлика у карактеристикама контролног записа и записа опоравка, премда статистичка поређења значајности разлике нису била вршена. Реверзибилна природа акутне епилептиформне активности индуковане никлом у Рецијусовог неурона представља значајну предност овог експерименталног модела за студије механизма епилептогенезе на ћелијском нивоу.

#### **4.2. Дејство магнезијума на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона**

Детаљна анализа дејства магнезијума на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусовог неурона пијавице *Haemopsis sanguisuga* раније није рађена. Прелиминарно испитивање је показало да концентрација од 10 mmol/l  $\text{Mg}^{2+}$  остварује супресивни ефекат на овом моделу (Pathak и сар., 2009). Стога је спроведена посебна студија са тестирањем дозне зависности овог супресивног дејства магнезијума (Stanojević и сар., 2015б). Циљ је био да се утврди да ли би и концентрације ниже од ове показале делотворност у супресији индуковане епилептиформне активности, као и да ли би концентрације више од ове показале сличне или другачије ефекте на овом моделу. Тестирано је пет различитих концентрација магнезијума свега: 1 mmol/l, 3 mmol/l, 7 mmol/l, 10 mmol/l и 20 mmol/l  $\text{Mg}^{2+}$ . За сваку од њих је испитиван ефекат магнезијума на мембрански потенцијал Рецијусовог неурона у току никлом индуковане епилептиформне активности, на

саму посматрану епилептиформну активност, као и на вредности њених параметара од интереса.

#### *4.2.1. Дејство 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона*

Најнижа одабрана концентрација магнезијума чије дејство је испитивано била је 1 mmol/l Mg<sup>2+</sup>. Ова концентрација одговара физиолошком нивоу укупног Mg<sup>2+</sup> у ванћелијској течности, како код човека (Hashizume и Mori, 1990; Fawcett и сар., 1999), тако и код дате експерименталне животиње (Sawyer, 1986; Günzel и Schlue, 1996). У саставу, пак, стандардног Рингеровог раствора за пијавице, рутински коришћеног у нашим огледима, нема MgCl<sub>2</sub>.

Мировни мембрански потенцијал Рецијусових неурона износио је -42.33±2.38 mV (n=5). После индукције и пуног развоја епилептиформне активности вршено је испирање 1 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri раствором. Табела 3. приказује дејство 1 mmol/l Mg<sup>2+</sup> на мембрански потенцијал Рецијусове ћелије у току Ni<sup>2+</sup> – индукованог епилептиформног пражњења, у виду благе, али статистички значајне деполаризације мембране.

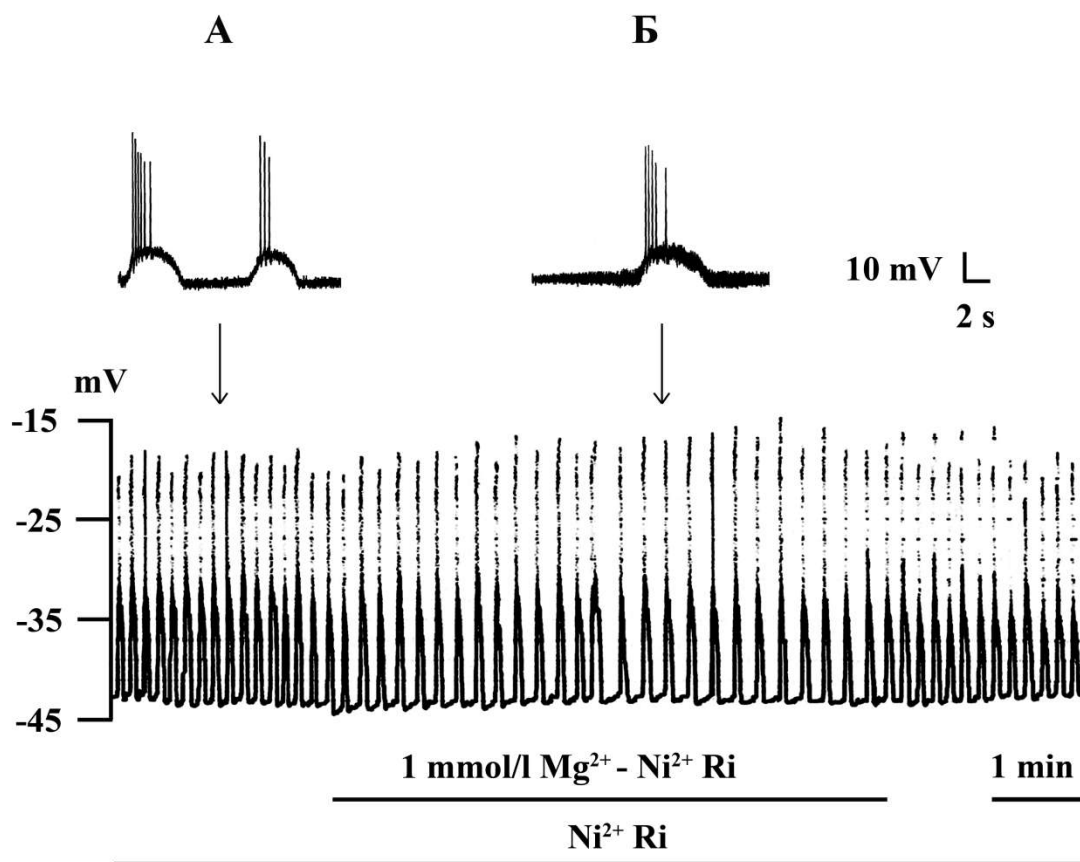
По индукцији и стабилизацији епилептиформне активности, увођење 1 mmol/l Mg<sup>2+</sup> благо деполарише мембрану Рецијусовог неурона.

Дејство 1 mmol/l Mg<sup>2+</sup> на дату епилептиформну активност, као и вредности њених параметара приказано је на Слици 5. и Табели 4., респективно. Уочава се да на развијену Ni<sup>2+</sup> – индуковану епилептиформну активност Рецијусовог неурона (Слика 5А.) увођење 1 mmol/l Mg<sup>2+</sup> у систем делује да изазове њену благу, али јасну супресију (Слика 5Б.), у виду статистички значајног смањења вредности мерених параметара активности. Након испирања Mg<sup>2+</sup>, долазило је до опоравка епилептиформне активности, на шта указује и тенденција поновног пораста вредности датих параметара (Табела 4.).

**Табела 3.** Ефекат 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на потенцијал мембране Рецијусовог неурона у току никлом индуковане епилептиформне активности

МП у Ni <sup>2+</sup> Ri	МП у 1 mmol/l Mg <sup>2+</sup> - Ni <sup>2+</sup> Ri	разлика	p	n
(mV)	(mV)	(mV)		
-42.53±2.31	-41.07±2.63	1.47±0.56	<0.05	5

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка. МП – мембрански потенцијал, Ri – Рингеров раствор, p – ниво вероватноће t-теста (МП у 1 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri vs. МП у Ni<sup>2+</sup> Ri), n – број понављања



**Слика 5.** Ефекат 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусовог неурона. *горе* – записи са штампача осцилоскопа, *доле* – запис са механичког писача, **А** – епилептиформна активност (контрола), **Б** – ефекат 1 mmol/l Mg<sup>2+</sup>, Ri – Рингеров раствор



**Табела 4.** Ефекат 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на параметре никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона

ПТД параметар	Ni <sup>2+</sup> Ri	1 mmol/l Mg <sup>2+</sup> - Ni <sup>2+</sup> Ri	Ni <sup>2+</sup> Ri по испирању Mg <sup>2+</sup>	p	n
ПТД фреквенција (min <sup>-1</sup> )	6.40±0.49	4.51±0.38	5.24±0.12	<0.05	5
ПТД трајање (s)	5.30±0.38	4.60±0.17	4.71±0.12	<0.05	8
ПТД амплитуда (mV)	12.38±0.56	10.38±0.78	12.00±0.68	<0.05	8
број АП / ПТД интензитет	6.12±0.99	4.88±0.72	4.12±0.44	<0.05	8
епилептиформне активности (%)	54.45±6.12	33.94±4.53	40.18±2.12	<0.05	5

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка. ПТД – пароксизмални талас деполаризације, АП – акциони потенцијал, Ri – Рингеров раствор, p – ниво вероватноће t-теста (1 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri vs. Ni<sup>2+</sup> Ri), n – број јединица посматрања

И ова најнижа тестирана концентрација Mg<sup>2+</sup> која одговара његовом физиолошком нивоу екстрацелуларно, јесте показала јасно супресивно дејство на нашем експерименталном моделу епилептиформне активности на ћелијском нивоу. Ови налази доприносе сагледавању антиепилептичког потенцијала магнезијума, а такође посредно указују и на значај нормомагнезијемije и одржавања хомеостазе Mg<sup>2+</sup> уопште за одржавање нормалне ексцитабилности неурона.

#### 4.2.2. Дејство 3 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона

Следећа је одабрана да буде тестирана у нашим огледима концентрација Mg<sup>2+</sup> од 3 mmol/l. Ова концентрација одговара терапијској концентрацији Mg<sup>2+</sup> у серуму човека која је ефикасна у прекидању напада у прееклампсији – еклампсији (James, 2010), установљених и важећих клиничких индикација за употребу магнезијума као антиепилептика. У овој серији рађен је већи број експеримената, управо са циљем да се на већем узорку испита какве би ефекте на нашем експерименталном моделу епилептиформне активности имала управо концентрација Mg<sup>2+</sup> која одговара циљној магнезијемии у збрињавању датих епилептичких напада у људи.

Мировни мембрански потенцијал Рецијусових неурона у овој групи огледа износио је  $-39.50 \pm 0.77$  mV (n=5). После развоја Ni<sup>2+</sup> – индуковане епилептиформне активности вршено је испирање 3 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri раствором. Табела 5. приказује благо деполаришуће дејство 3 mmol/l Mg<sup>2+</sup> на потенцијал мембране Рецијусове ћелије у току Ni<sup>2+</sup> – индукованог епилептиформног пражњења.

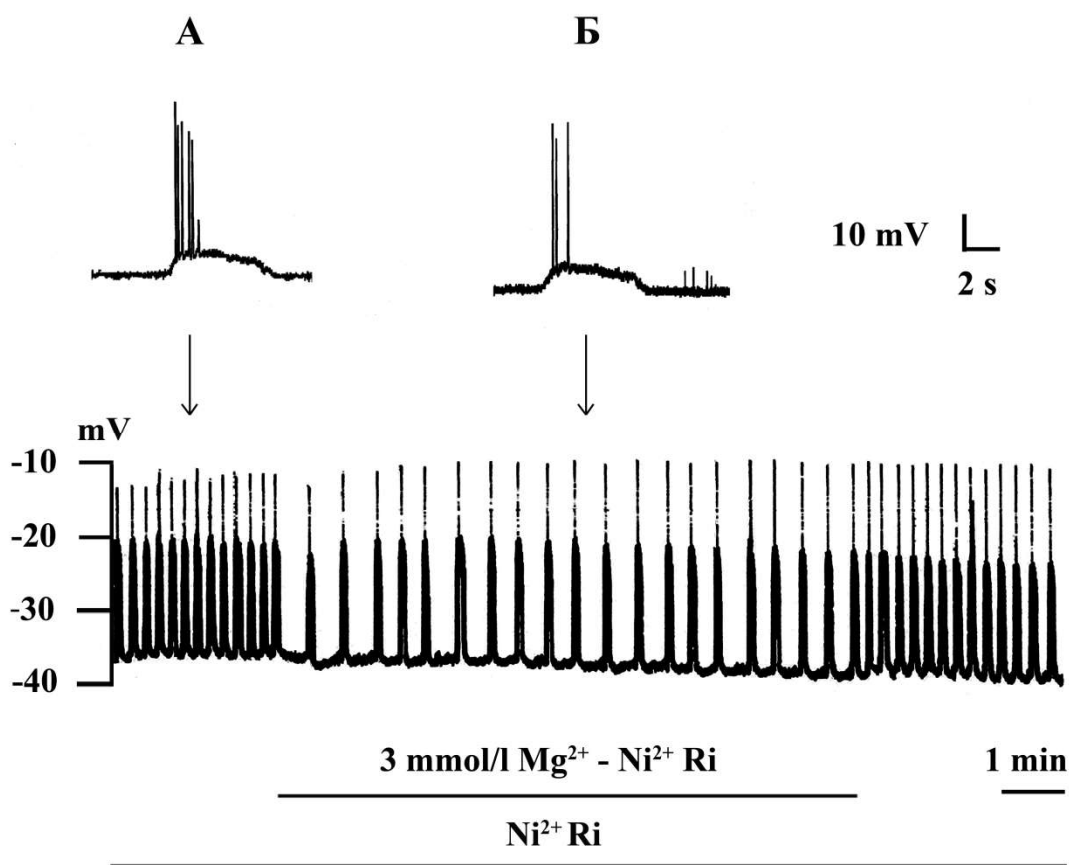
**Табела 5.** Ефекат 3 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на потенцијал мембране Рецијусовог неурона у току никлом индуковане епилептиформне активности

МП у Ni <sup>2+</sup> Ri (mV)	МП у 3 mmol/l Mg <sup>2+</sup> - Ni <sup>2+</sup> Ri (mV)	разлика (mV)	p	n
$-36.76 \pm 4.11$	$-34.72 \pm 4.28$	$2.04 \pm 0.40$	<0.01	5

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка. МП – мембрански потенцијал, Ri – Рингеров раствор, p – ниво вероватноће t-теста (МП у 3 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri vs. МП у Ni<sup>2+</sup> Ri), n – број понављања

И доза од 3 mmol/l  $Mg^{2+}$  показала је ефекат благе деполаризације мембранског потенцијала у току  $Ni^{2+}$  – индукованог епилептиформног пражњења Рецијусовог неурона.

Дејство 3 mmol/l  $Mg^{2+}$  на сâму експерименталну епилептиформну активност на нашем моделу, као и на вредности њених параметара приказано је на Слици 6. и Табели 6., респективно.



**Слика 6.** Ефекат 3 mmol/l  $MgCl_2$  на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусовог неурона. *горе* – записи са штампача осцилоскопа, *доле* – запис са механичког писача, **А** – епилептиформна активност (контрола), **Б** – ефекат 3 mmol/l  $Mg^{2+}$ , Ri – Рингеров раствор

**Табела 6.** Ефекат 3 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на параметре никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона

ПТД параметар	Ni <sup>2+</sup> Ri	3 mmol/l Mg <sup>2+</sup> - Ni <sup>2+</sup> Ri	Ni <sup>2+</sup> Ri по испирању Mg <sup>2+</sup>	p	n
ПТД фреквенција (min <sup>-1</sup> )	6.08±0.62	3.52±0.32	4.64±0.44	<0.01	21
ПТД трајање (s)	4.42±0.28	3.81±0.23	4.50±0.25	<0.05	9
ПТД амплитуда (mV)	13.43±1.74	10.00±2.05	12.71±3.24	<0.05	7
број АП / ПТД	6.62±1.03	4.88±0.83	5.00±1.26	<0.05	8
интензитет епилептиформне активности (%)	59.70±8.07	21.97±1.91	39.43±2.08	<0.01	9

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка. ПТД – пароксизмални талас деполаризације, АП – акциони потенцијал, Ri – Рингеров раствор, p – ниво вероватноће t-теста (3 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri vs. Ni<sup>2+</sup> Ri), n – број јединица посматрања

Добијени резултати указују на антиепилептички потенцијал дозе од 3 mmol/l Mg<sup>2+</sup> и на нашем ћелијском моделу.

#### 4.2.3. Дејство 7 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона

Обзиром да је студија рађена на моделу неурона бескичмењака, који су, у општем случају мање осетљиви од сисарских на различите факторе спољне средине, при тестирању је у наредним огледима настављено са повећањем концентрација

$Mg^{2+}$ , иако ове превазилазе оквири терапијских нивоа магнезијума у људи, па чак залазе у опсег токсичних концентрација  $Mg^{2+}$  у екстрацелуларној течности. За следећу серију експеримената одабрано је 7 mmol/l  $Mg^{2+}$ , као још једна од концентрација  $Mg^{2+}$  нижа од раније тестиране. Мировни потенцијал мембране је износио  $-42.17 \pm 1.98$  mV (n=5). После развоја  $Ni^{2+}$  – индуковане епилептиформне активности у Рецијусових неурона, апликован је 7 mmol/l  $Mg^{2+}$  -  $Ni^{2+}$  Ri раствор.

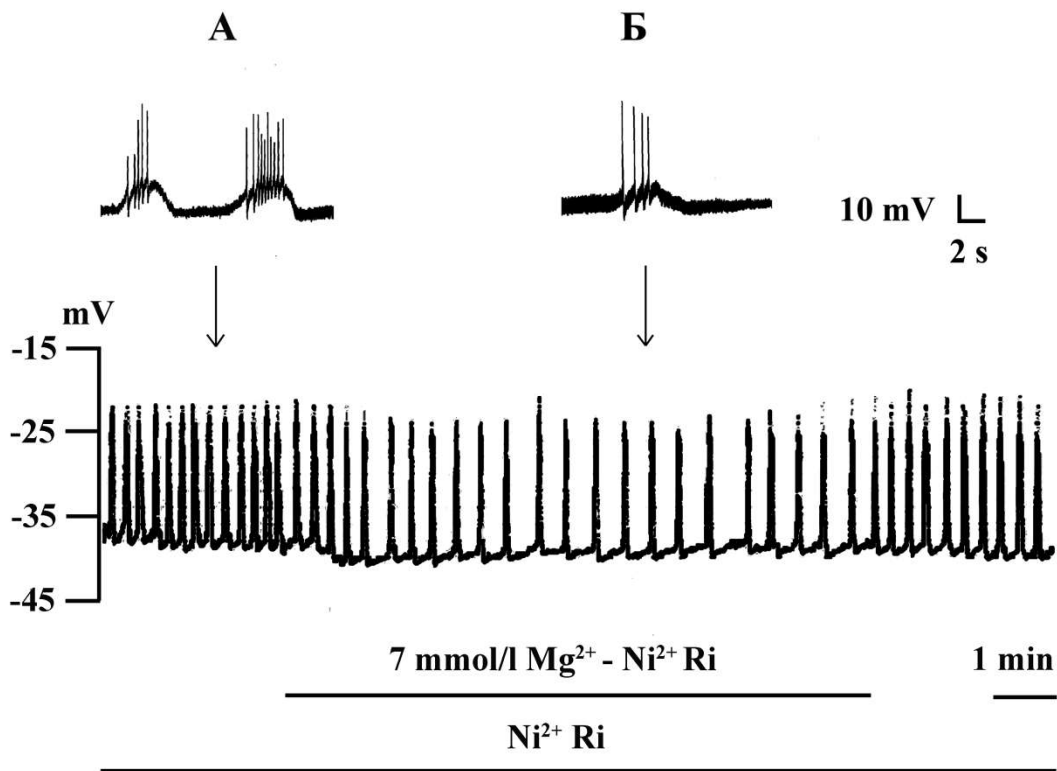
Добијени резултати о дејству 7 mmol/l  $Mg^{2+}$  на  $Ni^{2+}$  – индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона, потенцијал мембране током епилептиформног пражњења, као и параметре ПТД-а приказани су у Табели 7., на Слици 7., као и у Табели 8.

**Табела 7.** Ефекат 7 mmol/l  $MgCl_2$  на потенцијал мембране Рецијусовог неурона у току никлом индуковане епилептиформне активности

МП у $Ni^{2+}$ Ri (mV)	МП у 7 mmol/l $Mg^{2+}$ - $Ni^{2+}$ Ri (mV)	разлика (mV)	p	n
$-41.60 \pm 1.82$	$-39.44 \pm 1.50$	$2.16 \pm 0.51$	$<0.01$	5

подаци приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка. МП – мембрански потенцијал, Ri – Рингеров раствор, p – ниво вероватноће t-теста (МП у 7 mmol/l  $Mg^{2+}$  -  $Ni^{2+}$  Ri vs. МП у  $Ni^{2+}$  Ri), n – број понављања

И са концентрацијом од 7 mmol/l  $Mg^{2+}$  виђена је промена у виду мале деполаризације потенцијала мембране Рецијусовог неурона по испирању препарата  $Mg^{2+}$  -  $Ni^{2+}$  Ri раствором у односу на ниво пре увођења  $Mg^{2+}$  у раствор.



**Слика 7.** Ефекат 7 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусовог неурона. *горе* – записи са штампача осцилоскопа, *доле* – запис са механичког писача, **А** – епилептиформна активност (контрола), **Б** – ефекат 7 mmol/l Mg<sup>2+</sup>, Ri – Рингеров раствор

Ови налази указују на то да и концентрација Mg<sup>2+</sup> од 7 mmol/l такође делује да сузбије епилептиформно пражњење неурона на нашем моделу, и то у већој мери од претходно тестираних нижих доза Mg<sup>2+</sup>.

**Табела 8.** Ефекат 7 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на параметре никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона

ПТД параметар	Ni <sup>2+</sup> Ri	7 mmol/l Mg <sup>2+</sup> - Ni <sup>2+</sup> Ri	Ni <sup>2+</sup> Ri по испирању Mg <sup>2+</sup>	p	n
ПТД фреквенција (min <sup>-1</sup> )	5.32±0.42	2.57±0.45	4.88±0.44	<0.01	11
ПТД трајање (s)	4.84±0.18	3.66±0.29	4.51±0.13	<0.01	9
ПТД амплитуда (mV)	13.00±0.50	9.75±0.70	10.60±0.83	<0.01	8
број АП / ПТД интензитет	7.71±0.61	4.86±0.86	7.31±1.47	<0.05	7
епилептиформне активности (%)	42.07±3.52	14.73±2.94	37.64±3.29	<0.01	9

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка. ПТД – пароксизмални талас деполаризације, АП – акциони потенцијал, Ri – Рингеров раствор, p – ниво вероватноће t-теста (7 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri vs. Ni<sup>2+</sup> Ri), n – број јединица посматрања

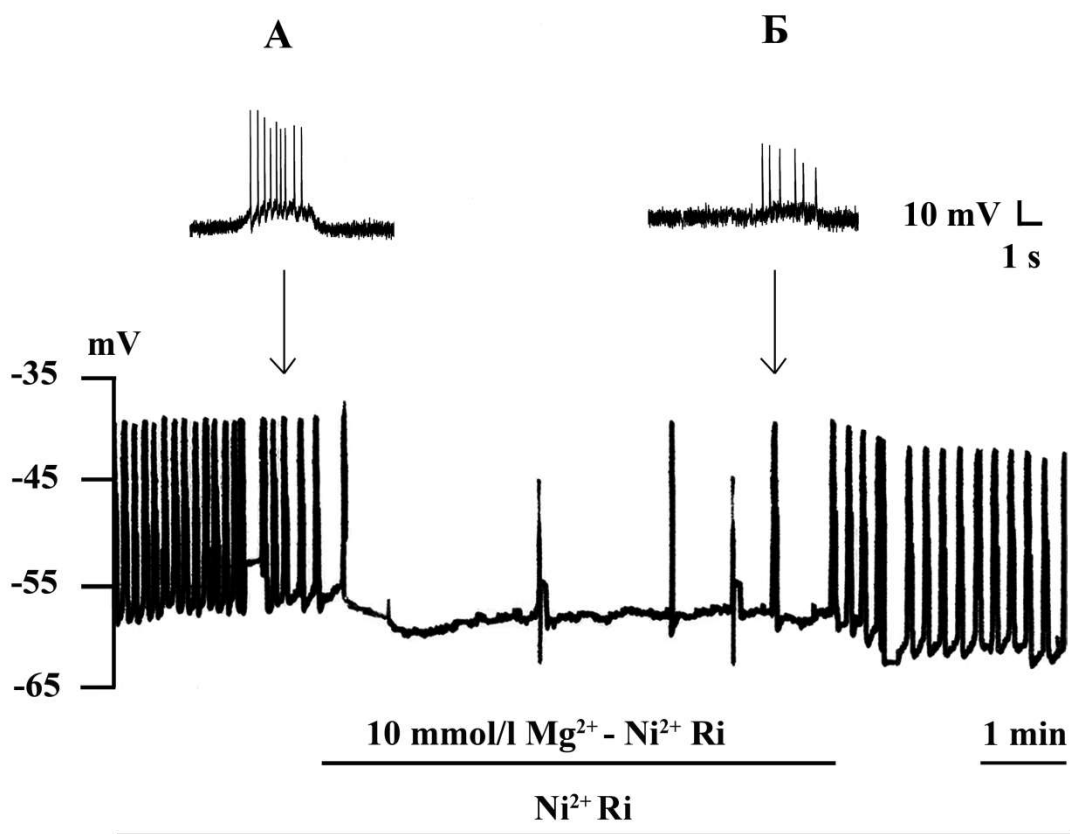
#### 4.2.4. Дејство 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона

У овој групи огледа мировни мембрански потенцијал Рецијусових неурона је износио -43.34±1.84 mV (n=6). После развоја епилептиформне активности апликован је 10 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri раствор. Табела 9., Слика 7. и Табела 10. приказују дејство 10 mmol/l Mg<sup>2+</sup> на Ni<sup>2+</sup> – индуковану епилептиформну активност на нашем моделу.

**Табела 9.** Ефекат 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на потенцијал мембране Рецијусовог неурона у току никлом индуковане епилептиформне активности

МП у Ni <sup>2+</sup> Ri	МП у 10 mmol/l Mg <sup>2+</sup> - Ni <sup>2+</sup> Ri	разлика	p	n
(mV)	(mV)	(mV)		
-41.47±1.36	-38.33±1.71	3.13±0.84	<0.05	6

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка. МП – мембрански потенцијал, Ri – Рингеров раствор, p – ниво вероватноће t-теста (МП у 10 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri vs. МП у Ni<sup>2+</sup> Ri), n – број понављања



**Слика 8.** Ефекат 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусовог неурона. *горе* – записи са штампача осцилоскопа, *доле* – запис са механичког писача, **А** – епилептиформна активност (контрола), **Б** – ефекат 10 mmol/l Mg<sup>2+</sup>, Ri – Рингеров раствор



**Табела 10.** Ефекат 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на параметре никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона

ПТД параметар	Ni <sup>2+</sup> Ri	10 mmol/l Mg <sup>2+</sup> - Ni <sup>2+</sup> Ri	Ni <sup>2+</sup> Ri по испирању Mg <sup>2+</sup>	p	n
ПТД фреквенција (min <sup>-1</sup> )	5.88±0.56	1.15±0.45	5.26±0.52	<0.01	12
ПТД трајање (s)	5.01±0.51	3.27±0.55	3.54±0.42	<0.01	8
ПТД амплитуда (mV)	12.56±0.82	6.22±1.30	7.56±1.62	<0.01	9
број AP / ПТД	7.56±0.97	3.44±0.75	4.67±0.47	<0.05	9
интензитет епилептиформне активности (%)	44.59±7.32	10.54±4.13	39.61±5.84	<0.01	8

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка. ПТД – пароксизмални талас деполаризације, AP – акциони потенцијал, Ri – Рингеров раствор, p – ниво вероватноће t-теста (10 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri vs. Ni<sup>2+</sup> Ri), n – број јединица посматрања

Као и раније тестиране ниже концентрације Mg<sup>2+</sup>, и 10 mmol/l Mg<sup>2+</sup> показује тенденцију да изазове малу, али значајну деполаризацију ћелијске мембране у току никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусовог неурона (Табела 9.). Такође је у највећем броју понављања огледа ове групе виђен и још већи степен супресије епилептиформног пражњења (Слика 8.), и добијено још значајније редуковање вредности ПТД параметара у поређењу са нижим дозама Mg<sup>2+</sup> (Табела 10.), премда овде са нешто већом варијабилношћу одговора.

Ови резултати указују на то да је концентрација Mg<sup>2+</sup> од 10 mmol/l још ефикаснија од нижих, претходно тестираних, те да је у стању да у значајној мери, а некад и готово потпуно сузбије дато експериментално епилептиформно пражњење.

#### 4.2.5. Дејство 20 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона

Најзад, последња група огледа у серији испитивања дозне зависности антиепилептичког дејства магнезијума на нашем моделу рађена је са концентрацијом од 20 mmol/l Mg<sup>2+</sup>. Циљ је био да се испита да ли је магнезијум у стању да никлом индуковано епилептиформно пражњење Рецијусових неурона пијавице прекине у потпуности. Ово је била највиша концентрација Mg<sup>2+</sup> коришћена у експериментима ове студије.

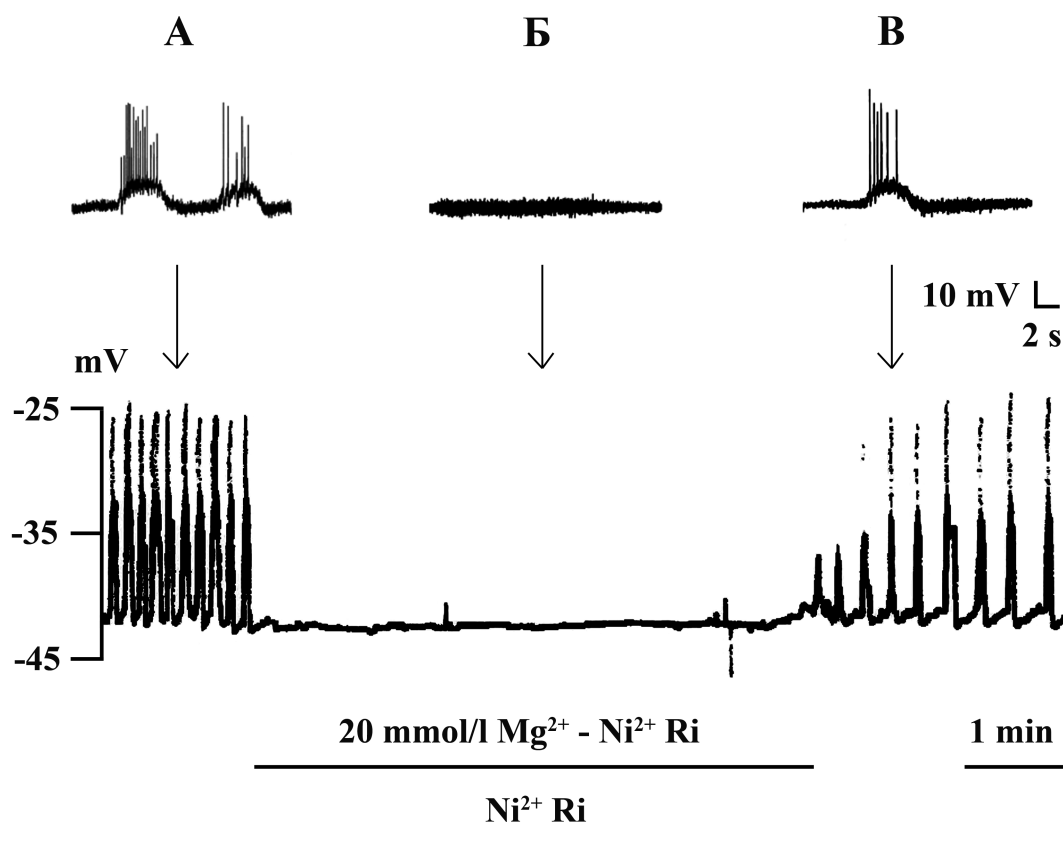
Мировни мембрански потенцијал Рецијусових неурона у овој серији огледа износио је  $-42.50 \pm 1.04$  mV (n=7). После развоја Ni<sup>2+</sup> – индуковане епилептиформне активности апликован је 20 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri раствор. Табела 11., Слика 9. и Табела 12. приказују дејство концентрације од 20 mmol/l Mg<sup>2+</sup> на Ni<sup>2+</sup> – индуковану епилептиформну активност на нашем моделу. Види се да је ова доза Mg<sup>2+</sup> успевала комплетно да сузбије дато епилептиформно пражњење Рецијусових неурона, упркос присуству Ni<sup>2+</sup> које је све време одржавано у систему. За разлику од нижих тестираних концентрација Mg<sup>2+</sup>, концентрација од 20 mmol/l Mg<sup>2+</sup> испољавала је потпун антиепилептогени ефекат на нашем моделу.

И концентрација од 20 mmol/l Mg<sup>2+</sup> такође је показала ефекат мале деполаризације потенцијала мембране Рецијусовог неурона, у односу на ниво претходне никлом изазване деполаризације током индукције епилептиформне активности неурона. По апликовању Mg<sup>2+</sup>, у свим испитиваним дозама Mg<sup>2+</sup> појединачно, нађен је деполаришући ефекат. Тестирањем по групама (ефекат vs. контрола) посматрано за све дозе Mg<sup>2+</sup> збирно, показано је да је присуство Mg<sup>2+</sup> изазивало благу, али значајну деполаризацију потенцијала мембране Рецијусовог неурона са контролног нивоа од  $-41.18 \pm 1.00$  mV на  $-38.69 \pm 1.03$  mV (n=28, p<0.01). Дакле је ова Mg<sup>2+</sup> – индукована деполаризација у току епилептиформне активности, иако слаба, била ипак увек присутна, и сама по себи такође представљала дозно зависно дејство Mg<sup>2+</sup>, како то показују Табеле 3., 5., 7., 9. и 11. редом.

**Табела 11.** Ефекат 20 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на потенцијал мембране Рецијусовог неурона у току никлом индуковане епилептиформне активности

МП у Ni <sup>2+</sup> Ri	МП у 20 mmol/l Mg <sup>2+</sup> - Ni <sup>2+</sup> Ri	разлика	p	n
(mV)	(mV)	(mV)		
-42.63±1.33	-39.26±0.87	3.37±0.66	<0.05	7

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка. МП – мембрански потенцијал, Ri – Рингеров раствор, p – ниво вероватноће t-теста (МП у 20 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri vs. МП у Ni<sup>2+</sup> Ri), n – број понављања



**Слика 9.** Ефекат 20 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусовог неурона. *горе* – записи са штампача осцилоскопа, *доле* – запис са механичког писача, **А** – епилептиформна активност (контрола), **Б** – ефекат 20 mmol/l Mg<sup>2+</sup>, **В** – опоравак епилептиформне активности после испирања Mg<sup>2+</sup>, Ri – Рингеров раствор

**Табела 12.** Ефекат 20 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на параметре никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона

ПТД параметар	Ni <sup>2+</sup> Ri	20 mmol/l Mg <sup>2+</sup> - Ni <sup>2+</sup> Ri	Ni <sup>2+</sup> Ri по испирању Mg <sup>2+</sup>	p	n
ПТД фреквенција (min <sup>-1</sup> )	6.10±0.63	0.00±0.00	4.13±0.77	<0.01	8
ПТД трајање (s)	4.68±0.20	0.00±0.00	4.40±0.13	<0.01	16
ПТД амплитуда (mV)	11.00±0.92	0.00±0.00	8.50±0.67	<0.01	11
број АП / ПТД	7.50±1.20	0.00±0.00	2.50±1.02	<0.01	16
интензитет епилептиформне активности (%)	49.01±5.70	0.00±0.00	26.73±5.17	<0.01	8

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка. ПТД – пароксизмални талас деполаризације, АП – акциони потенцијал, Ri – Рингеров раствор, p – ниво вероватноће t-теста (20 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri vs. Ni<sup>2+</sup> Ri), n – број јединица посматрања

Нађено је да је Mg<sup>2+</sup> у дози од 20 mmol/l у стању у потпуности да сузбије дато експериментално епилептиформно пражњење Рецијусових неурона, практично свдећи вредности свих његових параметара на нулу. Обзиром на то да је ова концентрација Mg<sup>2+</sup> показала максималну ефикасност инхибиције епилептогенезе на овом моделу (Слика 9А и Б.), било је од значаја испитати и реверзбилност оваквог дејства Mg<sup>2+</sup>. Нађен је делимичан опоравак епилептиформне активности након испирања 20 mmol/l Mg<sup>2+</sup> (Слика 9В.). Наиме, када се, након успостављене потпуне инхибиције епилептиформног пражњења Рецијусових неурона, изврши

реперфундовање раствором  $\text{Ni}^{2+}$  Ri, и овде убрзо заиста долази до поновног развоја ПТД-а (налик на опоравак после апликовања нижих доза  $\text{Mg}^{2+}$ ), премда са нижим вредностима параметара активности, како то приказује Табела 12.

Овде, међутим, напомињемо и то да је спорадично било могуће да се потпуно сузбијање епилептиформне активности у једном броју огледа постигне и са концентрацијама магнезијума нижим од  $20 \text{ mmol/l Mg}^{2+}$ . Нађено је при том на нашим узорцима да је вероватноћа са којом дата концентрација  $\text{Mg}^{2+}$ , у неком броју понављања, у потпуности сузбија индуковано епилептиформно пражњење – директно сразмерна датој концентрацији, како то приказује Табела 13. Тако, за најнижу од свих испитиваних концентрација магнезијума ( $1 \text{ mmol/l Mg}^{2+}$ , што одговара физиолошком нивоу  $\text{Mg}^{2+}$  у ванћелијској течности) – није нађено ни у једном од понављања у датој серији огледа да је у стању да у потпуности сузбије ову епилептиформну активност. Пак, за концентрацију магнезијума од  $3 \text{ mmol/l Mg}^{2+}$  у малом проценту огледа јесте добијен ефекат потпуне супресије индукованог епилептиформног пражњења, и то у 1 од 13 огледа дате серије, односно са вероватноћом од приближно 7.69%. Са применом концентрације магнезијума од  $7 \text{ mmol/l Mg}^{2+}$  нађен је исход потпуне супресије епилептиформне активности Рецијусовог неурона у 2 од 9 експеримената, тј. у око 22.22% случајева. Испитивање ефекта дозе од  $10 \text{ mmol/l Mg}^{2+}$  на дату епилептиформну активност показало је њено сузбијање у 5 од укупно 12 експеримената ове серије (41.67% случајева). Најзад, иако је највиша тестирана концентрација од  $20 \text{ mmol/l Mg}^{2+}$  показала високу ефикасност супресивног дејства на нашем експерименталном моделу епилептиформног пражњења, овде ипак наводимо да је у једном од укупно 8 понављања огледа ове серије нађено да до потпуне супресије није дошло, већ се је индуковано епилептиформно пражњење одржавало чак и у присуству овако високе концентрације  $\text{Mg}^{2+}$  у раствору за перфузију. Дакле,  $\text{Mg}^{2+}$  у општем случају по увођењу у систем остварује одређени степен антиепилептичког дејства на датом моделу, и у одређеном проценту огледа, а све у зависности од његове дозе. При том вероватноћа да  $\text{Mg}^{2+}$  у потпуности супримира  $\text{Ni}^{2+}$  – индуковано епилептиформно пражњење Рецијусовог неурона расте директно сразмерно самој примењеној концентрацији  $\text{Mg}^{2+}$  присутној у  $\text{Ni}^{2+}$  Ri раствору.

**Табела 13.** Вероватноћа потпуног сузбијања никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона магнезијумом у испитиваним концентрацијама

$[Mg^{2+}]$ у $Ni^{2+}$ Ri (mmol/l)	1	3	7	10	20
вероватноћа сузбијања епилептиформне активности (процент огледа у серији)	0.00%	7.69%	22.22%	41.67%	87.50%

подаци приказани као средња вредност.  $[Mg^{2+}]$  – концентрација  $Mg^{2+}$

Овакав пораст вероватноће потпуног сузбијања  $Ni^{2+}$  – индукованог епилептиформног пражњења дејством јона  $Mg^{2+}$ , управо директно сразмерне њиховој концентрацији у перфузионом раствору – сâм по себи већ говори у прилог дозно – зависне природе нађене магнезијумске супресије епилептогенезе на нашем моделу.

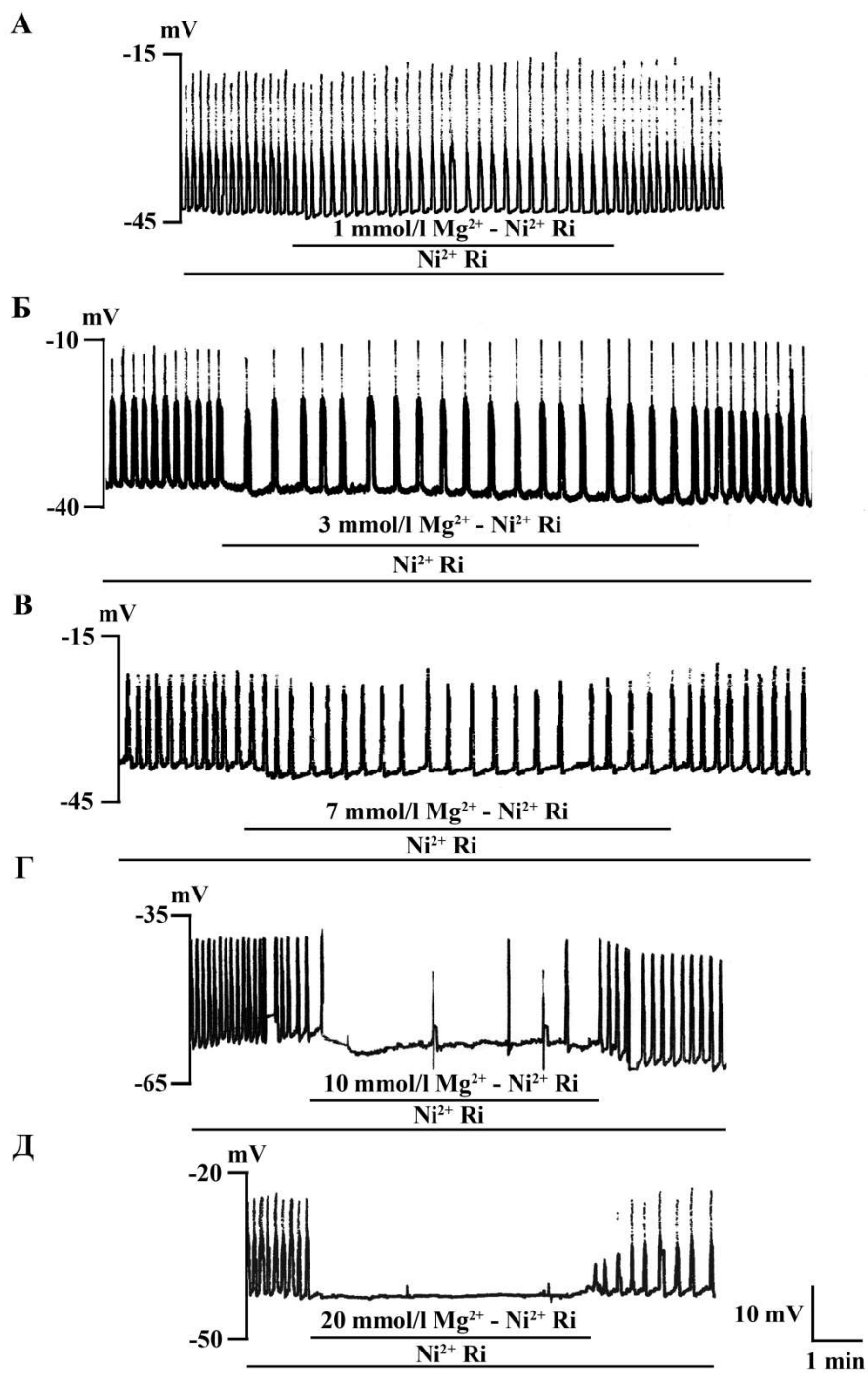
#### **4.3. Одлике магнезијумске супресије никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона**

##### *4.3.1. Дозна зависност магнезијумске супресије никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона*

У нашим огледима све испитиване концентрације  $Mg^{2+}$  показале су се делотворним у сузбијању никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона. При том је нађен различит степен супресије епилептиформног пражњења у зависности од примењене концентрације магнезијума. Супресивно

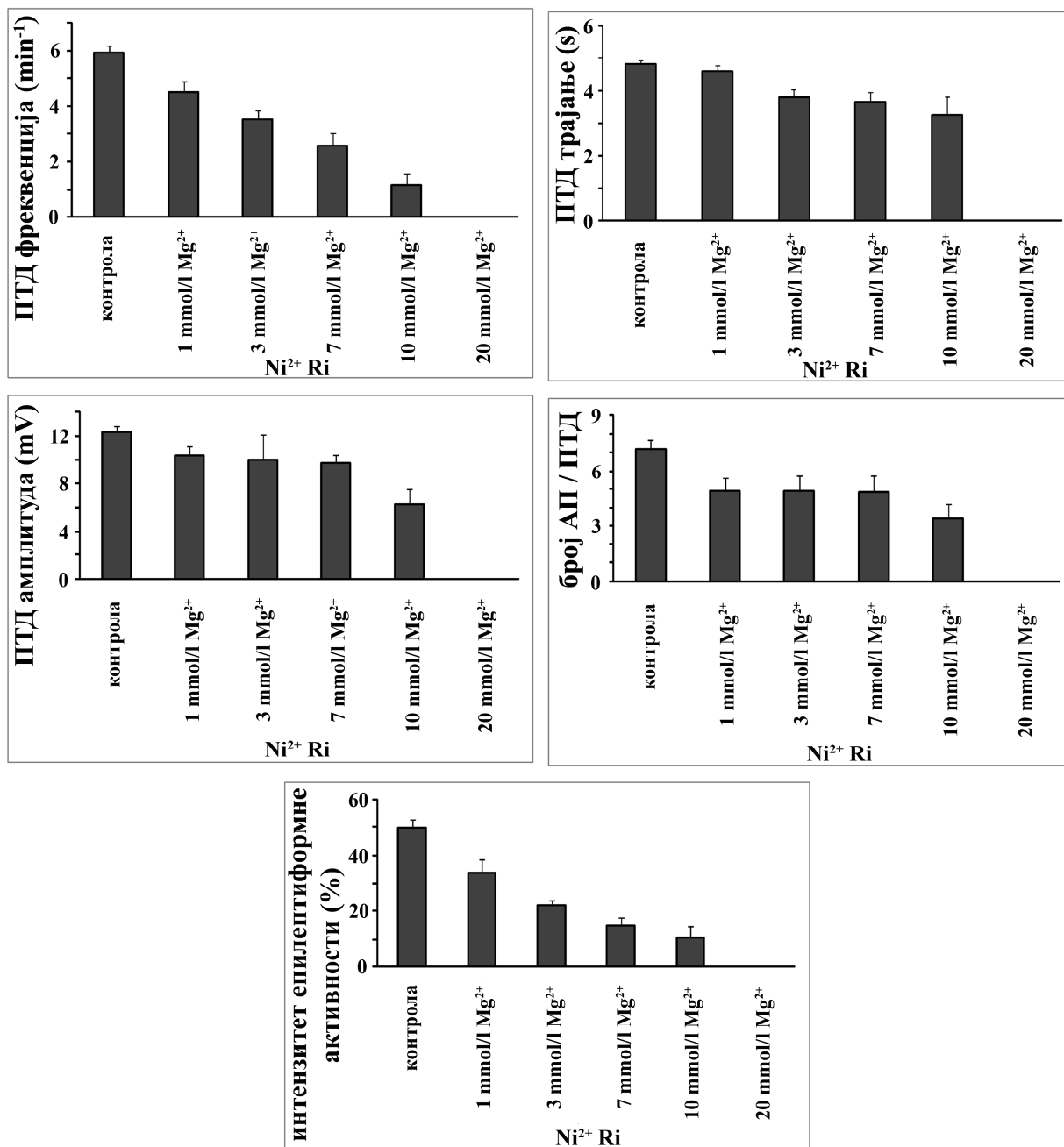
дејство тестираних концентрација  $Mg^{2+}$  на експерименталну епилептиформну активност на нашем моделу збирно је приказано на серији записа на Слици 10. Јасно је уочљива дозна зависност ефекта магнезијумске супресије. Ово потврђује и приказ дозно – зависног смањења самих нумеричких вредности свих посматраних параметара епилептиформне активности у присуству растућих концентрација  $Mg^{2+}$ , илустрован на Графику 1.

Пошто је показано је да се супресивни ефекат  $Mg^{2+}$  на  $Ni^{2+}$  – индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона пијавице *Haemaphysalis sanguisuga* појачава са повећањем концентрације  $Mg^{2+}$  (Stanojević и сар., 2015б), у даљем поступку, ради лакшег вршења анализе зависности дејства  $Mg^{2+}$  од примењене дозе  $Mg^{2+}$ , коришћене су релативне вредности основних параметара епилептиформне активности: релативна ПТД фреквенција, релативно ПТД трајање, релативна ПТД амплитуда и релативан број АП / ПТД. Релативне вредности посматраних параметара добијене су као проценат од припадајуће контроле. Табела 14. приказује да релативне вредности ових параметара у присуству  $Mg^{2+}$  стоје у обрнутој сразмери са примењеном концентрацијом  $Mg^{2+}$ . Ове вредности параметара, нормализоване свака на према својој сопственој контроли, такође су узете у обзир и у поступку конструисања доза – дејство кривих.



**Слика 10.** Упоредни приказ ефаката растућих концентрација магнезијума (А: 1 mmol/l  $Mg^{2+}$ , Б: 3 mmol/l  $Mg^{2+}$ , В: 7 mmol/l  $Mg^{2+}$ , Г: 10 mmol/l  $Mg^{2+}$ , Д: 20 mmol/l  $Mg^{2+}$ ) у  $Ni^{2+}$  Рингер (Ri) раствору, на никлом индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона – записи са механичког писача





**График 1.** Упоредни приказ ефеката присуства магнезијума у растућим концентрацијама на апсолутне вредности посматраних параметара индуковане епилептиформне активности. У свим огледима никл је све време био присутан у Рингеровом раствору (контрола: Ni<sup>2+</sup> Ri). Параметри приказани као средња вредност + стандардна грешка. ПТД – пароксизмални талас деполаризације, AP – акциони потенцијал. За бројне вредности параметара видети Табеле 2., 4., 6., 8., 10. и 12.

4.3.1.1. *Анализа ефеката растућих концентрација магнезијума на параметре никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона*

Обзиром на виђено све израженије сузбијање настанка  $\text{Ni}^{2+}$  – индукованих ПТД-а у присуству растућих концентрација примењеног  $\text{Mg}^{2+}$ , у овој студији испитана је дозна зависност дејства  $\text{Mg}^{2+}$  на параметре дате епилептиформне активности применом једначине (4). Циљ је био да се појачање антиепилептичког дејства  $\text{Mg}^{2+}$  са повећањем дозе  $\text{Mg}^{2+}$  нађено на овом моделу, потпуније опише поступком квантитативне анализе дозне зависности. Анализа је вршена конструисањем одговарајућих доза – дејство кривих за ефекте тестираних концентрација  $\text{Mg}^{2+}$  на релативне вредности посматраних параметара епилептиформне активности, приказане у Табели 14.

**Табела 14.** Ефекти растућих концентрација магнезијума на релативне вредности параметара никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона

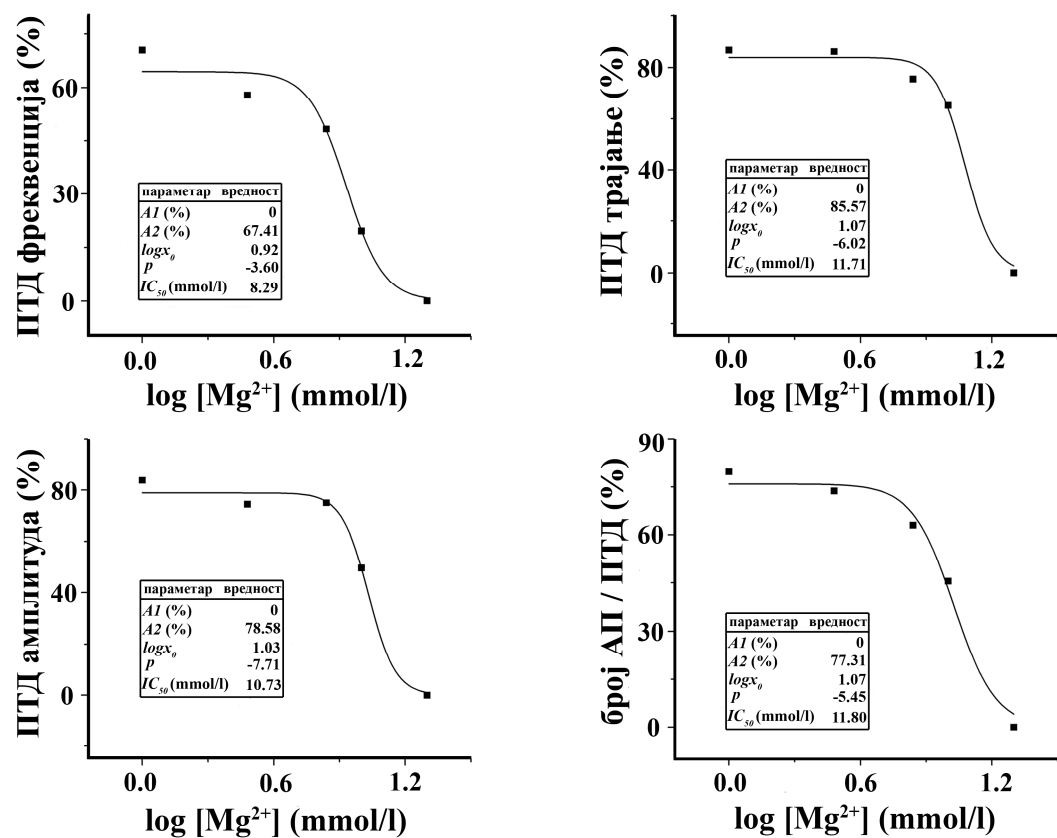
$[\text{Mg}^{2+}]$ (mmol/l)	релативна ПТД фреквенција (%)	релативно ПТД трајање (%)	релативна ПТД амплитуда (%)	релативан број АП / ПТД (%)
1	71.95±7.52	88.56±4.14	84.67±6.38	83.57±8.83
3	60.43±6.15	87.21±4.54	72.73±8.70	76.82±6.90
7	45.25±6.70	76.04±6.46	75.72±6.35	65.18±12.16
10	22.83±10.34	63.49±10.37	49.79±10.38	57.96±14.70
20	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка.  $[\text{Mg}^{2+}]$  – концентрација  $\text{Mg}^{2+}$  у  $\text{Ni}^{2+}$  Ри раствору, ПТД – пароксизмални талас деполаризације, АП – акциони потенцијал

Дозно – зависне криве омогућиле су прецизнију квантификацију јачине магнезијумске супресије параметара од значаја, укључујући и одређивање оне концентрације  $Mg^{2+}$  која са половином максималног ефекта сузбија дато епилептиформно пражњење (средња инхибиторна концентрација,  $IC_{50}$ ). Графички приказ резултата анализе и нумеричке вредности параметара самих доза – дејство кривих налазе се на Графику 2.

График 2. потврђује закључке донете на основу Сlike 10., Графика 1., као и Табеле 14. Са Графика 2. може се уочити да  $Mg^{2+}$  у распону примењених концентрација редукује вредности свих параметара епилептиформног пражњења на дозно – зависан начин. Показано је да су по апликовању магнезијума вредности параметара  $Ni^{2+}$  – индуковане епилептиформне активности – директна функција концентрације  $Mg^{2+}$  присутне у раствору, да са њом стоје у обрнутој сразмери, те да се ова зависност може описати функцијом сигмоидне криве нисходног тока. Обзиром на изнете резултате квантитативне анализе и добијено добро слагање конструисаних доза – дејство кривих са експерименталним подацима, закључује се да је ефекат  $Mg^{2+}$  на све параметре ове експерименталне епилептиформне активности супресиван и дозно – зависан. При том је такође могуће проценити и упоредити карактеристике овог дозно – зависног супресивног дејства  $Mg^{2+}$ : његову ефикасност, јачину и ширину дејства на појединачне ПТД параметре. О овим одликама инхибиторног дејства  $Mg^{2+}$  на дату епилептиформну активност говоре бројчане вредности параметара конструисаних доза – дејство кривих, добијене фитовањем или израчунавањем.

Тако,  $A2$  параметар говори за ефикасност дејства супстанце. На основу вредности  $A2$  параметра датих кривих видимо да је, у тестираном опсегу концентрација, дејство  $Mg^{2+}$  најефикасније на трајање ПТД-а (85.57%), потом на њихову амплитуду (78.58%) и број АП / ПТД (77.31%), а у нешто мањој мери на њихову фреквенцију (67.41% – опадајући максимум супресивног одговора на  $Mg^{2+}$ ). Апсолутна вредност коефицијента нагиба средњег дела сигмоидне криве (параметар  $p$ , односно Хиллов коефицијент) говори за опсег ефикасних концентрација  $Mg^{2+}$ , тј. ширину његовог дејства. Због инхибиторне природе дејства  $Mg^{2+}$  параметар  $p$  овде



**График 2.** Доза – дејство криве ефекта магнезијума на нормализоване вредности параметара никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона. Логаритамско – линеарне осе.  $[\text{Mg}^{2+}]$  – концентрација  $\text{Mg}^{2+}$  у  $\text{Ni}^{2+}$  Ри раствору, ПТД – пароксизмални талас деполаризације, АП – акциони потенцијал,  $A1$  – теоретски минимум ефекта,  $A2$  – теоретски максимум ефекта,  $\log x_0$  – превојна тачка,  $p$  – коефицијент нагиба криве,  $IC_{50}$  – средња инхибиторна концентрација. Контролне вредности добијене у присуству  $\text{Ni}^{2+}$  и одсуству  $\text{Mg}^{2+}$ . Експерименталне вредности представљене као % од одговарајуће контроле. За бројне вредности параметара видети Табелу 14.

носи негативан предзнак. За све дате конструисане криве нађено је да се вредност параметра  $p$  налази у опсегу од  $-3.60$  (за ПТД фреквенцију – најмањи нагиб криве, те тиме и највећа терапијска ширина дејства  $Mg^{2+}$ ), до  $-7.71$  (за ПТД амплитуду – највећи нагиб криве, односно најмања ширина дејства  $Mg^{2+}$ ).

Даље,  $Mg^{2+}$  показује сличну јачину инхибиторног дејства на све ПТД параметре, судећи на основу вредности  $\log x_0$  параметра добијених кривих (од  $0.92$  за ПТД фреквенцију, до  $1.07$  за ПТД трајање и за број АП / ПТД). Вредност параметра  $\log x_0$  одговара превојној тачки сигмоидне криве (координата центра криве на  $x$ -оси), при оној концентрацији  $Mg^{2+}$  која изазива половину максималног ефекта  $Mg^{2+}$  на дати параметар епилептиформне активности; ова је концентрација означена као средња инхибиторна концентрација ( $IC_{50}$ ). Средња инхибиторна концентрација или полумаксимална инхибиторна вредност  $IC_{50}$  – кључна је вредност у квантитативној анализи ове дозне зависности. Нађено је да је полумаксимално инхибиторно дејство  $Mg^{2+}$  на све посматране ПТД параметре у опсегу концентрација  $Mg^{2+}$  од  $8.29$  mmol/l (за ПТД фреквенцију коју  $Mg^{2+}$  најјаче сузбија), до  $11.80$  mmol/l (за број АП / ПТД, на који  $Mg^{2+}$  најслабије делује), односно  $IC_{50} = 10.04 \pm 1.75$  mmol/l.

Све конструисане доза – дејство криве збирно су приказане на Графику 3. Суперпонирање кривих на истом дијаграму урађено је ради лакшег поређења. Наведени графички и нумерички резултати анализе дозне зависности указују на сличну ширину инхибиторног дејства  $Mg^{2+}$  на све параметре ове епилептиформне активности (сличан нагиб кривих на Графику 3.). Ефикасност, пак, магнезијумске супресије ПТД параметара у одређеној мери варира у следећем опадајућем низу: ПТД трајање > ПТД амплитуда > број АП / ПТД > ПТД фреквенција (опадајући ниво горње асимптоте). График 3. показује и разлике у јачини дејства  $Mg^{2+}$  на дате параметре (положај сигмоидне криве дуж  $x$ -осе).

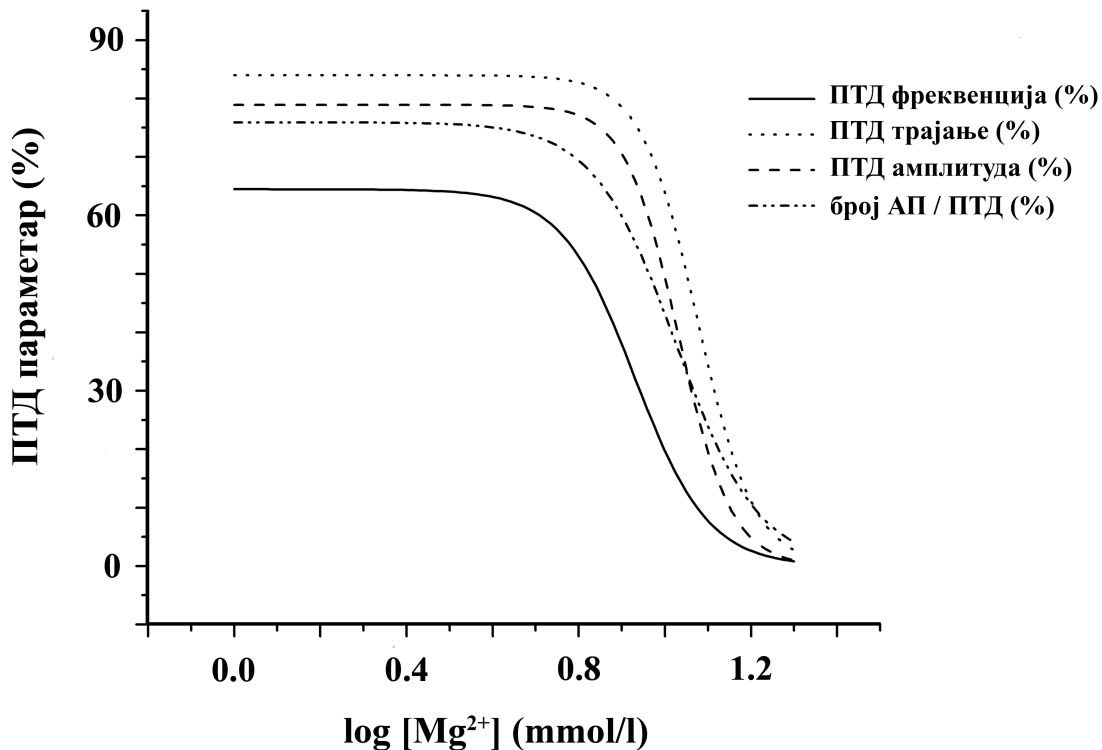


График 3. Збирни приказ доза – дејство кривих за ефекте  $Mg^{2+}$  на параметре  $Ni^{2+}$  – индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона. Логаритамско – линеарна оса. Тачке које одговарају експерименталним подацима и цртице које одговарају грешкама мерења изостављене ради јаснијег графичког приказа.  $[Mg^{2+}]$  – концентрација  $Mg^{2+}$  у  $Ni^{2+}$  Ri раствору, ПТД – пароксизмални талас деполаризације, АП – акциони потенцијал. За бројне вредности параметара видети Табелу 14.

#### 4.3.2. Реверзibilност магнeзијумске супресије никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона

При испитивању ефеката  $Mg^{2+}$  на датом успостављеном експерименталном моделу синаптички независне епилептиформне активности Рецијусових неурона пијавице, за сваку од појединачних тестираних концентрација магнeзијума у опсегу од 1 mmol/l  $Mg^{2+}$  до 20 mmol/l  $Mg^{2+}$ , нађено је да је дејство магнeзијума било

реверзибилно. По испирању  $Mg^{2+}$  из система, епилептиформно пражњење неурона индуковано никлом убрзо се спонтано обнављало. У циљу да се потпуније испита природа овог антиепилептичког ефекта  $Mg^{2+}$ , све серије огледа групе дозне зависности посматране су заједно. Табела 15. приказује да средње вредности свих посматраних параметара епилептиформне активности нађене као просек дате групе за све дозе  $Mg^{2+}$  збирно – у присуству  $Mg^{2+}$  значајно опадају, како је и очекивано, да би по испирању  $Mg^{2+}$  поново порасле, међутим, не достижући у опоравку свој контролни ниво.

**Табела 15.** Ефекат присуства  $MgCl_2$  на апсолутне вредности параметара никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона – збирни приказ за све тестиране концентрације магнезијума заједно

ПТД параметар	$Ni^{2+}$ Ri	$Mg^{2+}$ - $Ni^{2+}$ Ri	$Ni^{2+}$ Ri по испирању $Mg^{2+}$
ПТД фреквенција ( $min^{-1}$ )	5.92±0.28, n=57	2.43±0.25, n=57	4.79±0.25, n=49
ПТД трајање (s)	4.81±0.14, n=50	2.60±0.28, n=50	4.45±0.09, n=39
ПТД амплитуда (mV)	12.35±0.43, n=43	6.67±0.78, n=43	10.41±0.70, n=44
број АП / ПТД	7.17±0.50, n=48	2.98±0.40, n=48	5.12±0.57, n=42
интензитет епилептиформне активности (%)	49.66±2.95, n=39	14.98±2.08, n=39	36.62±1.85, n=31

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка. ПТД – пароксизмални талас деполаризације, АП – акциони потенцијал, Ri – Рингеров раствор, n – број јединица посматрања

Из Табеле 15. се види да су вредности ПТД параметара после примене  $Mg^{2+}$  биле у просеку значајно ниже од одговарајућих вредности пре примене  $Mg^{2+}$ , а обзира на апликовану концентрацију  $Mg^{2+}$ . Табела 16. прегледно приказује

вредности параметара епилептиформне активности збирно за све дозе по групама (контрола, ефекат и опоравак), нормализоване на према припадајућој контроли. Овде је такође тестирана и статистичка значајност разлике вредности параметара у раном опоравку у односу на контролу.

**Табела 16.** Ефекат присуства  $MgCl_2$  на нормализоване вредности параметара никлом индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона – збирни приказ за све тестиране концентрације магнезијума заједно

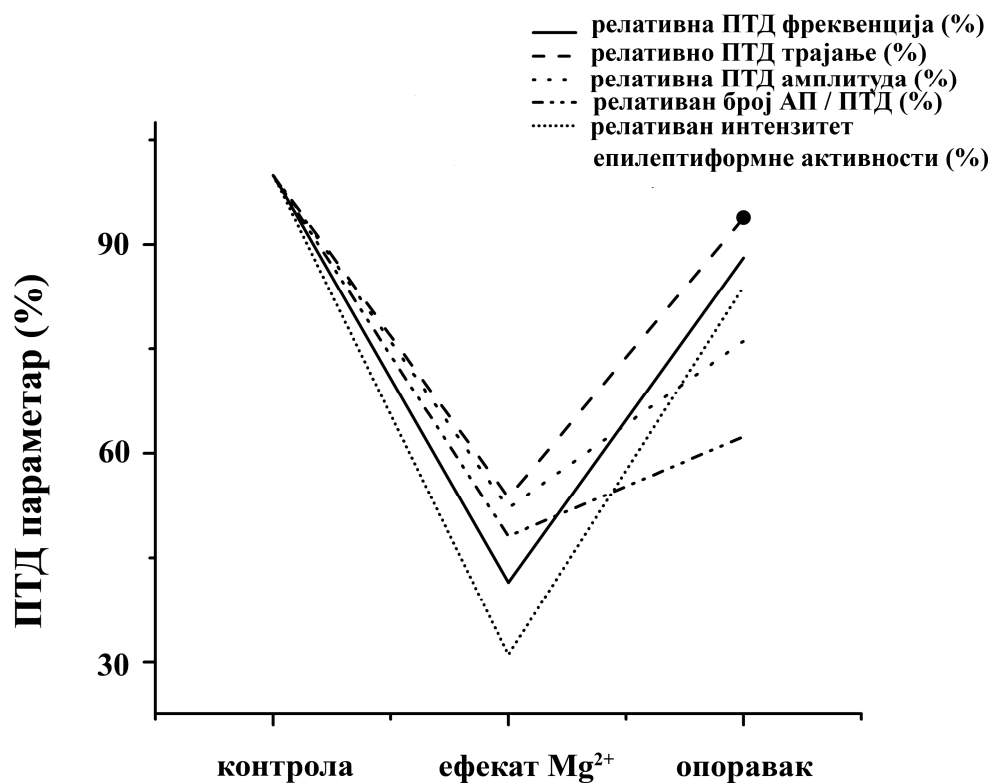
релативан ПТД параметар (%)	$Ni^{2+}$ Ri	$Mg^{2+}$ - $Ni^{2+}$ Ri	$Ni^{2+}$ Ri по испирању $Mg^{2+}$	p
релативна ПТД фреквенција (%)	100	41.45±4.59	88.08±7.72	<0.01
релативно ПТД трајање (%)	100	53.71±5.81	93.80±3.25	<0.05
релативна ПТД амплитуда (%)	100	52.10±5.83	76.13±5.00	<0.01
релативан број АП / ПТД (%)	100	48.10±6.20	62.40±7.05	<0.01
релативан интензитет епилептиформне активности (%)	100	31.08±4.30	83.90±7.97	<0.01

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка. ПТД – пароксизмални талас деполаризације, АП – акциони потенцијал, Ri – Рингеров раствор, p – ниво вероватноће t-теста ( $Ni^{2+}$  Ri по испирању  $Mg^{2+}$  vs.  $Ni^{2+}$  Ri), n – број јединица посматрања

Како се може видети из Табеле 16., само присуство магнезијума у раствору за перфузију (без обзира на дозу  $Mg^{2+}$ ) вредности параметара епилептиформне активности преполовљује или обара у још већој мери. При том је пад релативног интензитета епилептиформне активности у присуству  $Mg^{2+}$  био сразмерно највећи, што је и разумљиво будући да он зависи од производа фреквенције и трајања ПТД-а, како се и види из формуле (1). Уклањање  $Mg^{2+}$  дозвољавало је врло брзо опоравак



эпилептиформне активности по свим вредностима датих параметара, али до нивоа ипак статистички значајно нижих од контролних. Дакле је нађени опоравак овог епилептиформног пражњења од магнезијумске супресије рано по обустави  $Mg^{2+}$  био непотпун, што јасно приказује График 4.



**График 4.** Ефекти присуства магнезијума на посматране параметре индуковане епилептиформне активности – збирни приказ за све испитиване концентрације  $Mg^{2+}$  заједно. Ri – Рингеров раствор. **контрола:**  $Ni^{2+}$  Ri пре апликовања  $Mg^{2+}$ , **ефекат  $Mg^{2+}$ :**  $Mg^{2+}$  -  $Ni^{2+}$  Ri, **опоравак:**  $Ni^{2+}$  Ri по испирању  $Mg^{2+}$ . ПТД – пароксизмални талас деполаризације, АП – акциони потенцијал. Експерименталне вредности представљене као % од одговарајуће контроле. Грешке мерења изостављене ради јаснијег графичког приказа. За бројне вредности параметара видети Табелу 16.

Ова поређења показују одлике антиепилептичког ефекта магнезијума на нашем моделу да је у општем случају значајан и реверзибилан, али продужен. Када

су појединачне дозе  $Mg^{2+}$  у питању, није тестирана статистичка значајност разлике вредности параметара по испирању  $Mg^{2+}$  у односу на контролу. Па ипак, да је опоравак од дејства  $Mg^{2+}$  парцијалан, јасно се уочава нарочито после примене виших концентрација, тј. 7 mmol/l  $Mg^{2+}$ , 10 mmol/l  $Mg^{2+}$  и 20 mmol/l  $Mg^{2+}$ , како то показују Сlike 7., 8. и 9. Сви ови налази могли би да говоре у прилог магнeзијумске неуропротекције од несинаптичке епилептогенезе.

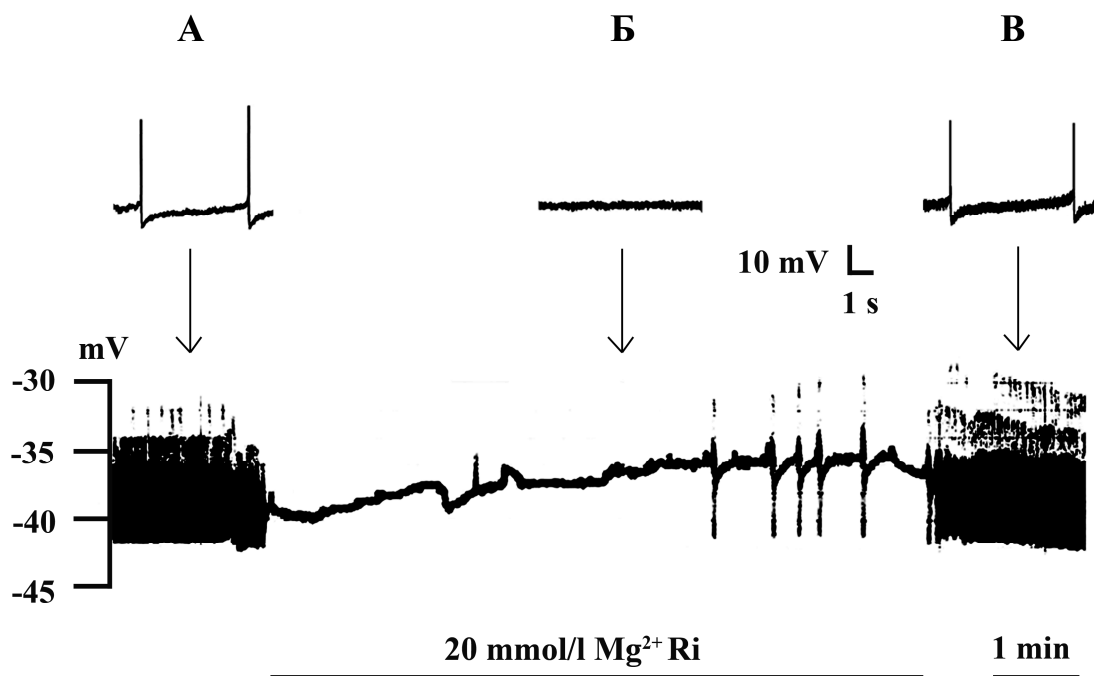
У циљу да се испита механизам супресије дате епилептиформне активности дејством  $Mg^{2+}$  на нашем моделу, осмишљено је неколико наредних серија огледа. Испитиван је најпре ефекат самог магнeзијума на својства мембране и спонтану активност Рецијусових неурона. Потом је испитивано и дејство магнeзијума на УОМ Рецијусовог неурона током сâме  $Ni^{2+}$  – индуковане епилептиформне активности. Обзиром да је у присуству 20 mmol/l  $Mg^{2+}$  виђена брза и потпуна супресија генерисања ПТД-а као целуларног израза епилептиформне активности неурона, у циљу испитивања механизма дејства магнeзијума у свим наредним огледима коришћена је управо ова концентрација  $Mg^{2+}$ .

#### **4.4. Ефекат магнeзијума на електрофизиолошка својства мембране и спонтану активност Рецијусових неурона**

##### *4.4.1. Дејство 20 mmol/l $MgCl_2$ на потенцијал мембране и спонтану активност Рецијусових неурона*

У овој групи огледа испитивано је дејство магнeзијума на мировни мембрански потенцијал и образац спонтаног пражњења Рецијусових неурона пијавице. У стандардном  $Ri$  раствору Рецијусови неурони су имали ММП од  $-42.76 \pm 1.24$  mV ( $n=10$ ) и спонтано испаливали појединачне АП-е ниском фреквенцијом од  $0.30 \pm 0.07$  Hz ( $n=7$ ). Суперфузија  $Ri$  раствором који садржи 20 mmol/l  $Mg^{2+}$  узроковала је благу иницијалну хиперполаризацију убрзо праћену деполаризацијом потенцијала мембране од  $4.20 \pm 0.49$  mV, до нивоа од  $-38.56 \pm 1.19$

mV ( $p < 0.01$ ). Истовремено са деполаризацијом, фреквенција спонтаног пражњења била је редукована на  $0.03 \pm 0.01$  Hz ( $p < 0.01$ ). Слика 11. показује  $Mg^{2+}$  – индуковану деполаризацију мембране и значајно смањење учесталости спонтаног окидања АП-а. Након испирања магнезијума, Рецијусови неурони убрзо су опорављали претходне нивое потенцијала мембране и учесталости спонтане активности (Табела 17.).



**Слика 11.** Ефекат 20 mmol/l  $MgCl_2$  на мембрански потенцијал и спонтану активност Рецијусовог неурона. *горе* – записи са штампача осцилоскопа, *доле* – запис са механичког писача, **А** – нискофреквентна тоничка активност у стандардним јонским условима, **Б** – деполаризација мембране и инхибиција спонтаног пражњења у присуству 20 mmol/l  $Mg^{2+}$  и **В** – опоравак мембранског потенцијала и фреквенције спонтане активности по испирању  $Mg^{2+}$ . Ri – Рингеров раствор

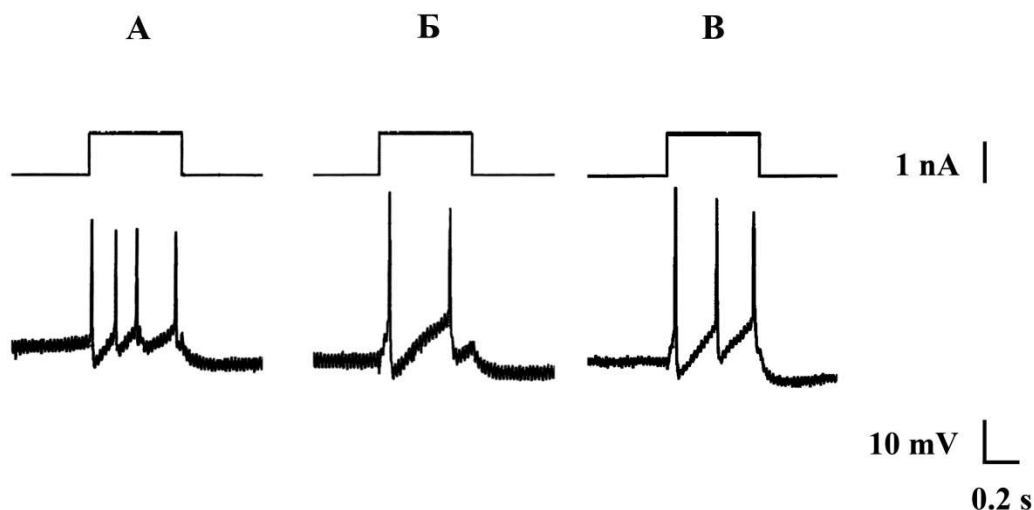
**Табела 17.** Ефекат 20 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на потенцијал мембране и фреквенцију спонтане активности Рецијусових неурона.

параметар	Ri	Mg <sup>2+</sup> Ri	разлика	Ri по испирању Mg <sup>2+</sup>	p	n
МП (mV)	-42.76±1.24	-38.56±1.19	4.20±0.49	-41.60±1.54	<0.01	10
фреквенција АП (Hz)	0.30±0.07	0.03±0.01	-0.27±0.07	0.40±0.20	<0.01	7

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка. МП – мембрански потенцијал, Ri – Рингеров раствор, АП – акциони потенцијал, p – ниво вероватноће t-теста (МП у Mg<sup>2+</sup> Ri vs. МП у Ri, односно фреквенција АП у Mg<sup>2+</sup> Ri vs. фреквенција АП у Ri), n – број понављања

#### 4.4.2. Дејство 20 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на ексцитабилност мембране Рецијусовог неурона

Овде је испитивано дејство магнезијума на праговни потенцијал и изазвану активност мембране Рецијусових неурона пијавице. Убризгавање пулсева константне деполаришуће струје у ћелију изазивало је серије акционих потенцијала. Одређиване су разлике у потенцијалу прага за избијање АП-а и броју изазваних АП-а пре и после примене раствора који садржи 20 mmol/l Mg<sup>2+</sup> (Слика 12.). У стандардном Ri раствору праговни потенцијал у Рецијусових неурона износио је -31.96±1.40 mV (n=5). Испирање Mg<sup>2+</sup> Ri раствором довело је до повишења праговог потенцијала на -28.30±2.45 mV (p<0.05). Директна деполаризација ћелије струјним пулсевима изазивала је у просеку 4.29±0.53 АП-а у стандардном Ri раствору, односно 1.57±0.52 АП-а у Mg<sup>2+</sup> Ri раствору (n=7, p<0.01). Међу њима је у две ћелије ова супресија иницијације шилјак потенцијала у присуству Mg<sup>2+</sup> била толико јака да није било могуће изазвати АП-е дражима дате јачине. По испирању стандардним раствором долазило је до опоравка (Табела 18.).



**Слика 12.** Ефекат 20 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на изазвану активност Рецијусових неурона. *горе* – примењена деполаришућа драж, *доле* – изазвани потенцијали мембране неурона. **А** – у контролним условима, **Б** – у присуству 20 mmol/l Mg<sup>2+</sup> у Рингеровом раствору, **В** – по испирању Mg<sup>2+</sup> стандардним Рингеровим раствором – регистрације са штампача осцилоскопа

**Табела 18.** Ефекат 20 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на ексцитабилност мембране Рецијусовог неурона

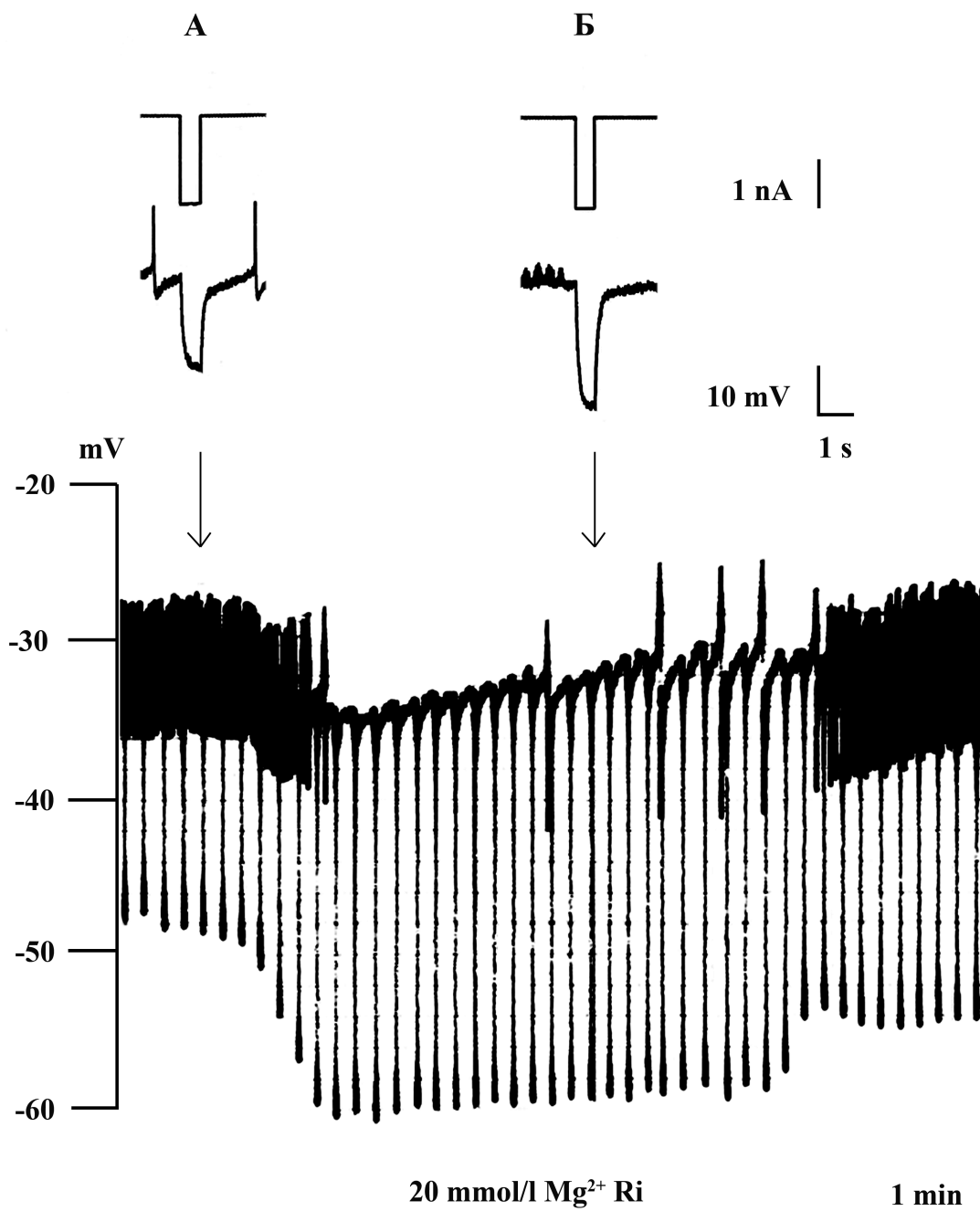
параметар	Ri	Mg <sup>2+</sup> Ri	разлика	Ri по испирању Mg <sup>2+</sup>	p	n
праговни потенцијал (mV)	-31.96±1.40	-28.30±2.45	3.66±1.29	-33.35±2.25	<0.05	5
број изазваних АП	4.29±0.53	1.57±0.52	2.71±0.47	3.33±0.25	<0.01	7

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка. Ri – Рингеров раствор, АП – акциони потенцијал, / – нема података, p – ниво вероватноће t-теста (праговни потенцијал у Mg<sup>2+</sup> Ri vs. праговни потенцијал у Ri, односно број изазваних АП у Mg<sup>2+</sup> Ri vs. број изазваних АП у Ri), n – број понављања

У присуству 20 mmol/l  $Mg^{2+}$  долазило је до значајног и реверзибилног смањења ексцитабилности Рецијусових неурона пијавице (Слика 12Б.). При испирању  $Mg^{2+}$  долазило је до брзог, али непотпуног опоравка (Слика 12В).

#### *4.4.3. Утицај Рингеровог раствора са 20 mmol/l $MgCl_2$ на улазни отпор мембране Рецијусовог неурона*

Најзад, да бисмо потпуније испитали природу дејства  $Mg^{2+}$  на мембрану Рецијусовог неурона, испитивали смо дејство магнезијума на њен улазни отпор. У стандардном  $R_i$  раствору ММП Рецијусових неурона био је  $-41.88 \pm 1.25$  mV (n=10). Испирање  $R_i$  раствором са 20 mmol/l  $Mg^{2+}$  узроковало је високо значајан пораст улазног отпора директно поларизованих мембрана од  $13.05 \pm 1.84$  M $\Omega$  у стандардном  $R_i$ , до  $20.14 \pm 2.54$  M $\Omega$  у 20 mmol/l  $Mg^{2+}$   $R_i$  (p<0.01). Ово је дејство било реверзибилно, опоравак би следио по испирању  $Mg^{2+}$  из раствора. Слика 13. показује да је испирање  $Mg^{2+}$   $R_i$  раствором изазвало деполаризацију ћелијске мембране са  $-34.40$  mV за  $2.40$  mV, смањење учесталости спонтаног пражњења са 0.70 Hz на 0.03 Hz, као и повећање УОМ-а са 8.42 M $\Omega$  на 14.21 M $\Omega$ . Резултати ове групе огледа наведени су у Табели 19.



**Слика 13.** Ефекат 20 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на улазни отпор мембране Рецијусовог неурона. *горе* – записи са штампача осцилоскопа: примењена хиперполаришућа струјна драж и испод ње припадајући изазвани електротонички потенцијал, *доле* – запис са механичког писача. **А** – у стандардном Рингеровом (Ri) раствору, **Б** – у присуству 20 mmol/l Mg<sup>2+</sup>

Слика 13. показује да излагање препарата раствору који садржи 20 mmol/l  $Mg^{2+}$ , упоредо са благом нето-деполаризацијом мембране и сузбијањем спонтане активности Рецијусовог неурона – доводи до повећања волтажног одговора мембране неурона на хиперполаризацију. Ово одговара повећању улазног отпора, односно смањењу кондуктивности мембране неурона под дејством јона  $Mg^{2+}$ .

**Табела 19.** Утицај 20 mmol/l  $MgCl_2$  на улазни отпор мембране Рецијусовог неурона

УОМ у Ri (MΩ)	УОМ у $Mg^{2+}$ Ri (MΩ)	разлика (MΩ)	УОМ по испирању $Mg^{2+}$ (MΩ)	p	n
13.05±1.84	20.14±2.54	7.09±0.84	18.72±3.40	<0.01	10

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка. УОМ – улазни отпор мембране, Ri – Рингеров раствор, p – ниво вероватноће t-теста (УОМ у  $Mg^{2+}$  Ri vs. УОМ у Ri), n – број понављања

Магнезијумом – индуковано повећање УОМ-а Рецијусовог неурона било је високо статистички значајно и реверзибилно, али је рани опоравак од дејства  $Mg^{2+}$  био непотпун. Наиме, убрзо по уклањању  $Mg^{2+}$  испирањем стандардним сланим раствором, амплитуда електротоничких потенцијала изазваних директном хиперполаризацијом мембране неурона лагано је опадала, како то илуструје Слика 13., што је одговарало постепеном смањењу вредности УОМ-а. Ова тенденција поновног смањења УОМ-а, претходно повишеног дејством  $Mg^{2+}$ , показала је реверзибилну природу овог ефекта  $Mg^{2+}$ , при чему, међутим, није био могућ тренутни опоравак до контролног нивоа. Нађено је да су вредности УОМ-а рано током опоравка, у првим минутима по обустави  $Mg^{2+}$ , биле у просеку веће од контролних (Табела 19.), али статистичка значајност ове разлике није тестирана.



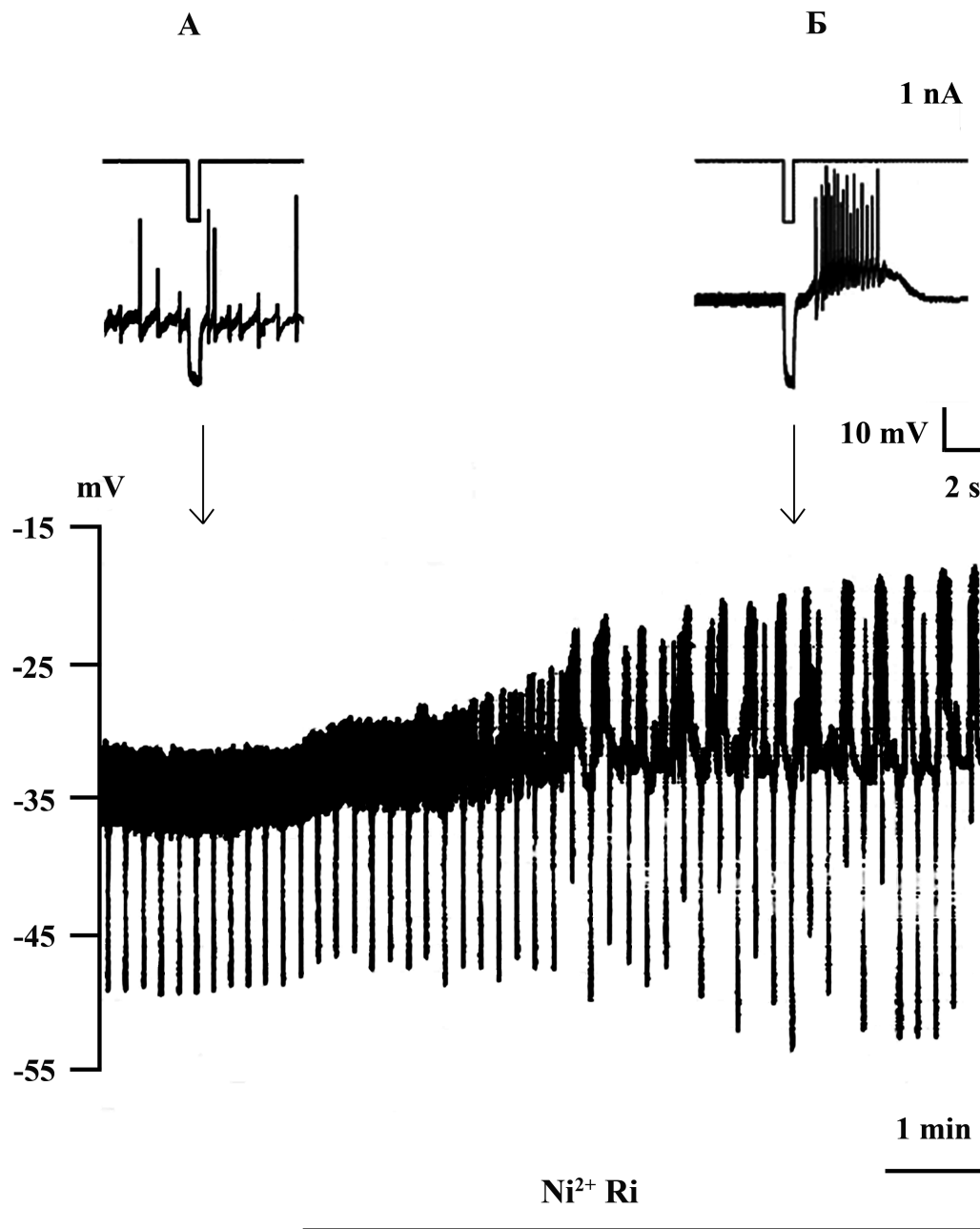
Збирно посматрано, ових неколико серија огледа показале су да магнезијум испољава свеукупно супресивно дејство на основна електрофизиолошка својства и тоничку активност Рецијусових неурона, изазивајући снажну инхибицију спонтаног пражњења, повишење прага окидања, смањење ексцитабилности ћелије, као и повећање УОМ-а неурона.

#### **4.5. Дејство магнезијума на улазни отпор мембране Рецијусовог неурона у току никлом индуковане епилептиформне активности**

У циљу испитивања јонске природе промене кондуктивности мембране одговорне за нађене супресивне ефекте магнезијума на нашем моделу, механизам супресивног дејства  $Mg^{2+}$  на експериментално изазвану епилептиформну активност Рецијусових неурона испитивали смо мерењем промене улазног отпора мембране настале при индукцији епилептиформне активности применом никла, а потом и током њене супресије настале дејством  $Mg^{2+}$ .

##### *4.5.1. Утицај Рингеровог раствора са 3 mmol/l $NiCl_2$ на улазни отпор мембране Рецијусовог неурона*

У овој групи огледа УОМ одређиван је најпре у стандардном Ri раствору између појединачних AP-а током нормалне активности Рецијусових неурона пијавице (Слика 14А.). Потом је апликован  $Ni^{2+}$  Ri раствор и УОМ одређиван током осцилаторне активности Рецијусових неурона, и то између ПТД-а, тј. у интер-ПТД интервалу (интер-ПТД, Слика 14Б.), као и током самог ПТД-а у његовој плато фази (интра-ПТД).



**Слика 14.** Ефекат 3 mmol/l NiCl<sub>2</sub> на улазни отпор мембране Рецијусовог неурона. *горе* – записи са штампача осцилоскопа: примењена хиперполаришућа струјна драж и испод ње припадајући изазвани електротонички потенцијал, *доле* – запис са механичког писача. **А** – у стандардном Рингеровом (Ri) раствору, **Б** – у присуству 3 mmol/l Ni<sup>2+</sup>

У стандардним јонским условима УОМ Рецијусовог неурона износио је  $9.89 \pm 0.65 \text{ M}\Omega$  ( $n=8$ , Табела 20.). Примена  $\text{Ni}^{2+}$   $\text{Ri}$  довела је до високо значајног пораста УОМ-а између ПТД-а за  $2.89 \pm 0.66 \text{ M}\Omega$  на  $12.78 \pm 0.72 \text{ M}\Omega$  ( $p_1 < 0.01$ ), указујући на то да  $\text{Ni}^{2+}$  делује да значајно смањи проводљивост мембране неурона у интер-ПТД интервалима за време епилептиформног пражњења у поређењу са контролом. Улазни отпор је у току плато фазе ПТД-а опадао у просеку за  $3.91 \pm 0.64 \text{ M}\Omega$  до нивоа од  $8.88 \pm 1.00 \text{ M}\Omega$  (УОМ интра-ПТД), што говори за значајно повећање проводљивости мембране Рецијусовог неурона у току пароксизмалне деполаризације у поређењу са интер-ПТД интервалом ( $p_2 < 0.01$ ). Најзад, последње поређење показује да се вредности УОМ-а у току сâмих ПТД-а не разликују значајно од оних у контролним условима ( $p_3 > 0.05$ ), указујући на то да  $\text{Ni}^{2+}$  – индуковано смањење проводљивости мембране током епилептиформне активности, са једне стране, и њено повећање у току сâмих таласа пароксизмалне деполаризације, са друге – сразмерно међусобно потиру.

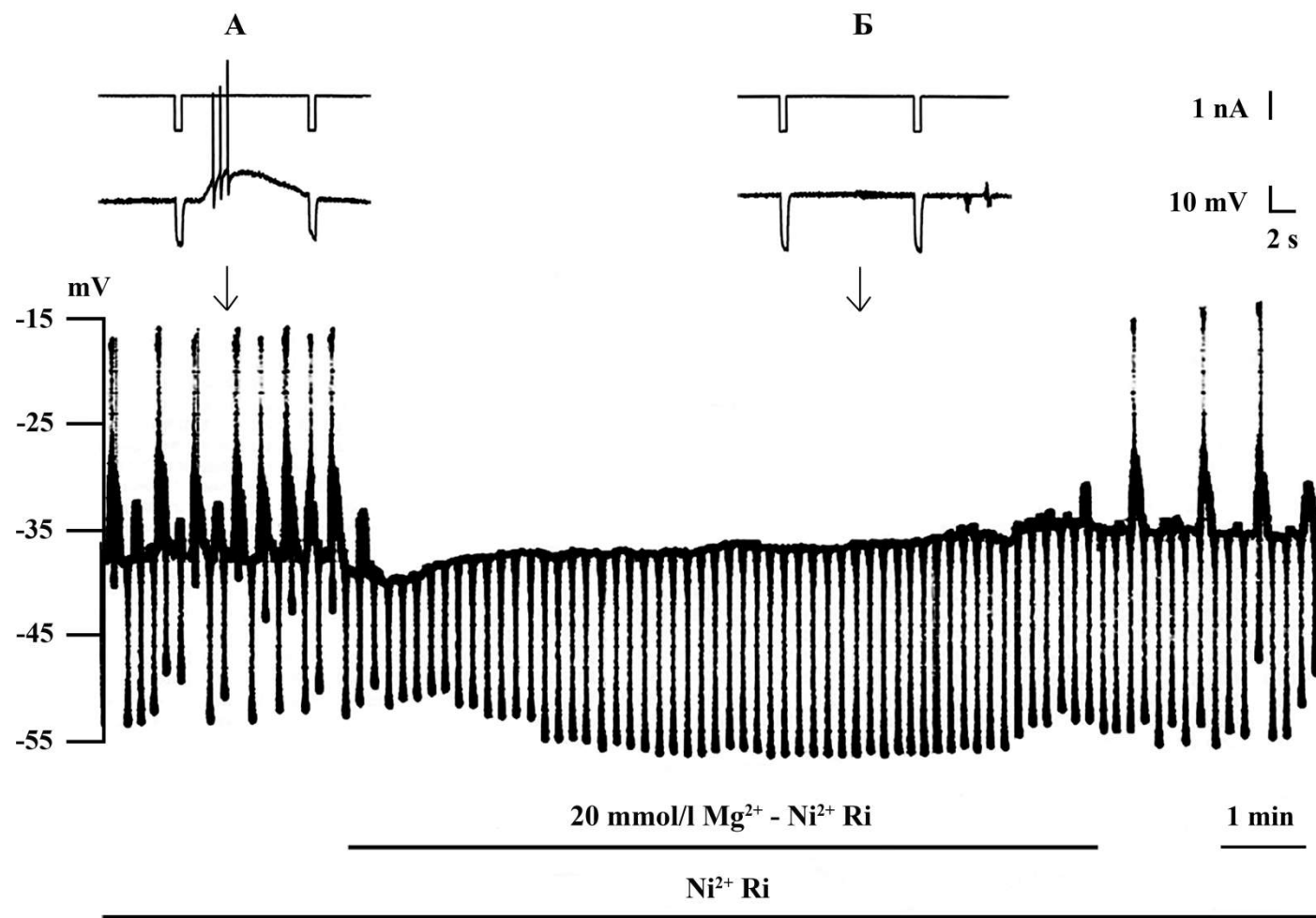
**Табела 20.** Утицај  $3 \text{ mmol/l NiCl}_2$  на улазни отпор мембране Рецијусовог неурона

УОМ у $\text{Ri}$ ( $\text{M}\Omega$ )	УОМ у $\text{Ni}^{2+}$ $\text{Ri}$ интер-ПТД ( $\text{M}\Omega$ )	УОМ у $\text{Ni}^{2+}$ $\text{Ri}$ интра-ПТД ( $\text{M}\Omega$ )	$p_1$	$p_2$	$p_3$	$n$
$9.89 \pm 0.65$	$12.78 \pm 0.72$	$8.88 \pm 1.00$	$< 0.01$	$< 0.01$	$> 0.05$	8

подаци приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка. УОМ – улазни отпор мембране,  $\text{Ri}$  – Рингеров раствор,  $p$  – ниво вероватноће  $t$ -теста ( $p_1$  – УОМ у  $\text{Ni}^{2+}$   $\text{Ri}$  интер-ПТД vs. УОМ у  $\text{Ri}$ ,  $p_2$  – УОМ у  $\text{Ni}^{2+}$   $\text{Ri}$  интра-ПТД vs. УОМ у  $\text{Ni}^{2+}$   $\text{Ri}$  интер-ПТД,  $p_3$  – УОМ у  $\text{Ni}^{2+}$   $\text{Ri}$  интра-ПТД vs. УОМ у  $\text{Ri}$ ),  $n$  – број понављања

#### 4.5.2. Дејство 20 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на улазни отпор мембране Рецијусовог неурона у току никлом индуковане епилептиформне активности

Обзиром да је концентрација Mg<sup>2+</sup> од 20 mmol/l изазвала потпуну блокаду епилептиформне активности, изведени су експерименти у циљу одређивања и поређења улазног отпора слободне мембране Рецијусовог неурона у Ni<sup>2+</sup> Ri и у 20 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri (Слика 15.). У овим огледима ММП је био -38.96±1.55 mV (n=6). Никлом индукована епилептиформна активност (Слика 15А.) сузбијена је применом магнезијума (Слика 15 Б.), што је било праћено истовременим порастом вредности УОМ-а током дејства магнезијума. У Ni<sup>2+</sup> Ri раствору УОМ био је 13.00±1.57 MΩ. Суперфузија раствором 20 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri довела је до статистички значајног повећања УОМ за 2.38±0.89 MΩ на 15.38±0.84 MΩ (p<0.05). Табела 21. приказује резултате ове групе огледа. Дакле је у присуству Mg<sup>2+</sup> наступило значајно повећање отпора, односно значајно смањење проводљивости мембране неурона у току ове епилептиформне активности. При том, по испирању Mg<sup>2+</sup> заменом са Ni<sup>2+</sup> Ri раствором није долазило до опоравка. Напротив, чак је нађено да је вредност УОМ-а после излагања магнезијуму од 16.44±1.17 MΩ била статистички значајно виша од контроле (p<0.05).

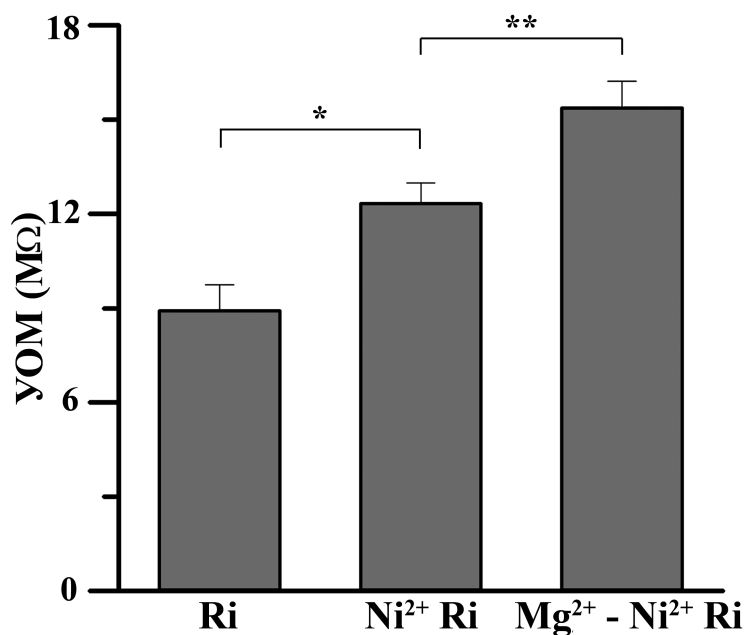


Слика 15. Ефекат  $20 \text{ mmol/l MgCl}_2$  на улазни отпор мембране Рецијусовог неурона у току никлом индиковане епилептиформне активности. *горе* – записи са штампача осцилоскопа: примењена хиперполаришућа струјна драж и испод ње припадајући изазвани електротонички потенцијал, *доле* – запис са механичког писача. Ri – Рингеров раствор. А – у  $\text{Ni}^{2+}$  Ri раствору, Б – у  $20 \text{ mmol/l Mg}^{2+} - \text{Ni}^{2+}$  Ri раствору

**Табела 21.** Утицај 20 mmol/l MgCl<sub>2</sub> на улазни отпор мембране Рецијусовог неурона у току никлом индуковане епилептиформне активности

УОМ у Ni <sup>2+</sup> Ri (MΩ)	УОМ у 20 mmol/l Mg <sup>2+</sup> - Ni <sup>2+</sup> Ri (MΩ)	УОМ у Ni <sup>2+</sup> Ri по испирању Mg <sup>2+</sup> (MΩ)	разлика (MΩ)	p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	n
13.00±1.57	15.38±0.84	16.44±1.17	2.38±0.89	<0.05	<0.05	6

подаци приказани као средња вредност ± стандардна грешка. УОМ – улазни отпор мембране, Ri – Рингеров раствор, p<sub>1</sub> – ниво вероватноће t-теста (УОМ у 20 mmol/l Mg<sup>2+</sup> - Ni<sup>2+</sup> Ri vs. УОМ у Ni<sup>2+</sup> Ri), p<sub>2</sub> – ниво вероватноће t-теста (УОМ у Ni<sup>2+</sup> Ri по испирању Mg<sup>2+</sup> vs. УОМ у Ni<sup>2+</sup> Ri), n – број понављања



**График 5.** Упоредни приказ ефеката 3 mmol/l NiCl<sub>2</sub> и 20 mmol/l MgCl<sub>2</sub> у никл Рингер (Ri) раствору на улазни отпор мембране Рецијусовог неурона; апсолутне вредности параметара видети у Табелама 20. и 21. (значајност разлике: \* p < 0.01; \*\* p < 0.05).

График 5. показује да присуство  $Mg^{2+}$  у раствору додатно повећава УОМ Рецијусовог неурона у поређењу са ефектом самог  $Ni^{2+}$ .

## 5. ДИСКУСИЈА

Магнезијум је биоесенцијални минерал са вишеструким клиничким применама. Овај елемент се враћа у фокус интересовања биомедицинских наука, између осталог и због недовољно искоришћеног антиепилептичког потенцијала магнезијума. Обзиром да је неопходан потпунији увид у механизме деловања  $Mg^{2+}$  на ексцитабилне мембране, овде су изведени огледи у циљу да се испитају ефекти  $Mg^{2+}$  на основна електрофизиолошка својства, као и интринсичку спонтану и изазвану активност мембране неурона, на моделу Рецијусове нервне ћелије слободних ганглија пијавице *Haemaphysalis sanguisuga*. Нађено је да  $Mg^{2+}$  значајно смањује ексцитабилност мембране, повећава УОМ Рецијусових неурона пијавице и супримира њихову спонтану активност и деполаризацијом изазвану активност. У овој студији на експерименталном моделу несинаптичке  $Ni^{2+}$  – индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона,  $Mg^{2+}$  је показао дозно – зависно реверзибилно супресивно дејство. У току магнезијумске супресије ове епилептиформне активности дошло је до значајног повећања улазног отпора мембране Рецијусовог неурона.

Антиконвулзивни ефекти магнезијума клинички су добро познати, обзиром да се инфузије  $MgSO_4$  користе као лек првог избора у контроли епилептичких напада у прееклампсији и еклампсији (Sibai, 2005). *In vitro* и *in vivo* огледи пружили су додатне доказе о антиепилептичком дејству  $Mg^{2+}$  (Standley и сар., 1995; Wang и сар., 2004), укључујући и инхибиторно дејство  $Mg^{2+}$  на  $Ni^{2+}$  – индуковану  $Na^+$  – зависну епилептиформну активност Рецијусових неурона (Pathak и сар., 2009). Ова студија је спроведена у циљу да се детаљно испитају антиепилептичка својства  $Mg^{2+}$  и механизам његовог супресивног дејства на нашем моделу. Приказани су резултати о дозној зависности магнезијумске супресије  $Ni^{2+}$  – индукованог епилептиформног пражњења Рецијусових неурона пијавице *H. sanguisuga*. Испитивањем механизма овог дејства  $Mg^{2+}$  нађен је пораст УОМ-а неурона током супресије епилептиформне активности, што је указало на смањење проводљивости мембране неурона у присуству  $Mg^{2+}$ .



Раније објављивани налази који се тичу ефеката  $Mg^{2+}$  на мировни потенцијал мембране неурона се разликују. Још су Del Castillo и Engbaek (1954) запазили да Рингеров раствор који садржи 15 mmol/l  $Mg^{2+}$  није значајно изменио мировни мембрански потенцијал мишићног влакна. Слично томе, Kato и сарадници (1968) и Kelly и сарадници (1969) нашли су малу промену која није од значаја, у потенцијалу мембране кортикалних неурона мачке при јонтофоретском апликовању  $Mg^{2+}$ . Насупрот њима, пак, Dribben и сарадници (2010) наводе да су у присуству 11 mmol/l  $Mg^{2+}$  нашли мању деполаризацију дисосованих неурона хипокампуса пацова од приближно +5.2 mV у просеку. Rose и сарадници (2006) налазе да је у условима изолације хемијске синаптичке неуротрансмисије у раствору са високим садржајем  $Mg^{2+}$  (20 mmol/l), спонтана активност Рецијусових неурона пијавице *Hirudo medicinalis* супримирана, упркос малој деполаризацији мембране од 5 – 10 mV. Ми смо у нашим огледима запазили да у Рецијусових неурона пијавице *Haemopsis sanguisuga*  $Mg^{2+}$  у концентрацији од 20 mmol/l изазива промену потенцијала мембране која се типично састоји из две фазе: пролазне благе иницијалне хиперполаризације која настаје непосредно по излагању  $Mg^{2+}$ , и убрзо прелази у спору мању деполаризацију мембране која се потом одржава стабилном све време у присуству  $Mg^{2+}$  (Stanojević и сар., 2016). Висока концентрација  $Mg^{2+}$  у перфузионој течности овде је примењена у циљу ефикасне блокаде хемијске синаптичке трансмисије (Erulgar и сар., 1974; Somjen, 2004), како бисмо могли да испитамо несинаптичке ефекте  $Mg^{2+}$ .

У Рецијусових неурона пијавице *Hirudo medicinalis* унутарћелијска концентрација  $Mg^{2+}$  ( $[Mg^{2+}]_i$ ), регулисана је функцијом  $Na^+/Mg^{2+}$  антипорт система. Истовремена мерења потенцијала ћелијске мембране, и  $[Mg^{2+}]_i$  и унутарћелијске концентрације  $Na^+$  ( $[Na^+]_i$ ) помоћу јон – селективних микроелектрода, показала су да пораст ванћелијске концентрације  $Mg^{2+}$  резултује порастом  $[Mg^{2+}]_i$ , те паралелним смањењем  $[Na^+]_i$ , што је праћено и благом деполаризацијом мембране неурона. Наведени ефекти се сматрају последицом активације  $1Na^+/1Mg^{2+}$  измењивача и електрогеном природом овог транспорта (Günzel и Schlue, 1996). Ово је у складу са нашим резултатима о мањој деполаризацији мембране Рецијусовог неурона пијавице

*H. sanguisuga*, индукованом магнезијумом, како у стандардним јонским условима (Stanojević и сар., 2016), тако и у присуству  $Ni^{2+}$  у раствору за перфузију.

Када је у питању дејство  $Mg^{2+}$  на изазвану активност, многи аутори су приметили да  $Mg^{2+}$  сузбија пражњење неурона на бројним *in vitro* моделима: кортикалним и спиналним неуронима мачке (Kato и сар., 1968; Somjen и Kato, 1968), изолованој кичменој моздини жабе (Erulkar и сар., 1974), неуронима мозданог стабла миша (Wojtowicz и сар., 1977) и хипокампаалним неуронима пацова (Dribben и сар., 2010). У складу са овима су и наши налази готово потпуног сузбијања активности и депресије ексцитабилности Рецијусових неурона у присуству  $Mg^{2+}$  (Stanojević и сар., 2016). Значајна супресија и спонтаног и изазваног пражњења неурона, као и повишење потенцијала прага за избијање АП-а, претпоставља се да настају услед смањења активације волтажне – зависних  $Na^+$  канала путем ефекта неутрализације површног потенцијала мембране јонима  $Mg^{2+}$  (Somjen, 2004). Такође је нађено да јони  $Mg^{2+}$  производе компетитивну и реверзибилну блокаду  $Na^+$  канала у централних неурона сисара (Lin и сар., 1991; Sang и Meng, 2002).

Док се већина аутора слаже око тога да  $Mg^{2+}$  смањује неуронску ексцитабилност када му се повећа ванћелијска концентрација, што се ефекта  $Mg^{2+}$  на отпор слободне мембране неурона тиче – запажања се разликују. Тако су Kato и сарадници (1968) запазили малу тенденцију ка порасту УОМ-а неурона коре великог мозга мачке након микројонтофоретског апликовања  $Mg^{2+}$ , док је у мотонеурона кичмене моздине жабе УОМ остао непромењен по излагању магнезијуму у опсегу концентрација од 0 – 11 mmol/l  $Mg^{2+}$  (Erulkar и сар., 1974). На супрот томе, Cameron и сарадници (2000) и Núñez - Abades и сарадници (2000) наводе да 6 mmol/l  $Mg^{2+}$  значајно и реверзибилно повећава УОМ мотонеурона мозданог стабла пацова у развоју. Најзад, Dribben и сарадници (2010) налазе смањење проводљивости мембране хипокампаалних неурона пацова у присуству 11 mmol/l  $Mg^{2+}$ . Са овом групом налаза у складу је и наш резултат о  $Mg^{2+}$  – индукованом порасту УОМ-а Рецијусових неурона пијавице, како у контролном сланом раствору (Stanojević и сар., 2016), тако и у раствору са  $Ni^{2+}$  у току индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона (Stanojević и сар., 2015б).

У овој студији нађено је свеукупно инхибиторно дејство високе ванћелијске концентрације  $Mg^{2+}$  на електрофизиолошка својства и електричну активност мембране Рецијусових неурона пијавице. Збирно неуродепресивна дејства  $Mg^{2+}$  састојала су се од снажне и готово потпуне супресије спонтане активности, повишења праговог потенцијала, смањења екситабилности ћелије и повећања улазног отпора мембране које одговара смањењу мембранске проводљивости. У свим аспектима блокирајуће дејство  $Mg^{2+}$  било је брзог почетка, значајно и реверзибилно. Такође је било праћено мањом деполаризацијом мембране која би могла бити последица инфлукса  $Mg^{2+}$  у ћелију.

Међутим, наши резултати јасно указују на то да је преобладајуће дејство  $Mg^{2+}$  на Рецијусове неуроне пијавице било инхибиторно. Нађена инхибиција неурона дејством  $Mg^{2+}$  била је функционално доминантна над његовим истовременим мањим екситаторним ефектом на потенцијал мембране, премда се ипак може поставити питање која би од ових мешовитих дејстава магнезијума преобладавала у других типова неурона и условима *in vivo*. Обзиром да би инхибиторно дејство  $Mg^{2+}$  на нашем моделу могло да буде резултат депресије тоничких екситаторних синаптичких утицаја на Рецијусове неуроне, применили смо  $Mg^{2+}$  у високој концентрацији да бисмо блокирали хемијску синаптичку трансмисију. Под оваквим експерименталним условима највероватније је да је природа супресије изазване високом концентрацијом  $Mg^{2+}$  у Рингеровом раствору била интринсичка, тј. порекла неурона сâмог, као последица модулаторних дејстава  $Mg^{2+}$  на функцију јонских канала и транспортних система мембране неурона.

Блокада јонских канала дејством  $Mg^{2+}$  требало би да доведе до пораста УОМ-а, као што то наши резултати и потврђују. Нађени магнезијумом индукован пораст УОМ-а Рецијусових неурона био је брз, значајан и стабилан за све време изложености  $Mg^{2+}$ . Ово би могло да потврди претходно предложени механизам дејства путем блокаде  $Na^+$  канала јонима  $Mg^{2+}$ . Иницијални ефекат пролазне хиперполаризације потенцијала мембране, као и ослабљено тоничко пражњење Рецијусових неурона, заједно са смањењем екситабилности и кондуктивности мембране по излагању  $Mg^{2+}$ , могу се сви повезати са слабљењем улазне струје  $Na^+$  дејством  $Mg^{2+}$ , како је претходно речено.

Обзиром да јони  $Mg^{2+}$  и у ванћелијској и у унутарћелијској течности могу деловати као важни физиолошки регулатори трансмембранског транспорта јона  $Na^+$  и  $K^+$  (Bara и сар., 1993; Guet-Bara и сар., 2007), неопходно је такође размотрити и могуће ефекте јона  $Mg^{2+}$  на јонске канале за  $K^+$  у Рецијусових неурона.

Тонички активна  $Ca^{2+}$  – активирана  $K^+$  струја главна је излазна струја у ових ћелија, и важан регулатор екситабилности ћелијске мембране и обрасца активности Рецијусових неурона (Dean и Leake, 1988; Stewart и сар., 1989; Kleinhaus и Angstadt, 1995). Стога би се наши налази ефеката примене раствора са високим садржајем  $Mg^{2+}$  у виду конзистентног пораста улазног отпора мембране заједно са супротстављеним ефектом на потенцијал мембране, могли приписати вишеструким механизмима дејства  $Mg^{2+}$  у одређеном временском следу. Најпре, пролазни ефекат хиперполаризације мембране непосредно по излагању магнезијуму могао би настати услед блокаде  $Na^+$  струје цурења јонима  $Mg^{2+}$  у ванћелијској течности, како је раније дискутовано. Потом би  $Mg^{2+}$  – индукованој деполаризацији која следи могао допринети инфлукс  $Mg^{2+}$  у ћелију, услед активације електрогеног  $Na^+/Mg^{2+}$  антипорт система. Резултујући пораст  $[Mg^{2+}]_i$  могао би, међутим, различито да модулира функцију  $Ca^{2+}$  – активираних  $K^+$  канала, потенцирајући или инхибирајући  $I_{K(Ca)}$ . Нађено је да  $Mg^{2+}_i$  потенцира активацију  $K_{Ca}$  канала у неурона хипокампуса у култури (McLarnon и Sawyer, 1993). Потенцијација  $I_{K(Ca)}$  јонима  $Mg^{2+}_i$  у Рецијусових неурона пијавице могла би да допринесе супресији њихове спонтане и изазване активности, каква и јесте нађена у нашим огледима, али би такође истовремено остваривала и ефекте хиперполаризације потенцијала и смањења улазног отпора мембране неурона. Стога, иако овакву потенцијалну улогу јона  $Mg^{2+}$  као активатора  $K_{Ca}$  канала Рецијусових неурона није у потпуности могуће одбацити, она се не може сматрати јединим одговорним, нити доминантним механизмом дејства  $Mg^{2+}$  на нашем ћелијском моделу, обзиром да се показало да испирање раствором са  $Mg^{2+}$  резултује порастом, а не смањењем улазног отпора мембране, док је у дејству на потенцијал мембране деполаризација преовладала над иницијалном хиперполаризацијом. Друга једнако вероватна интерпретација био би супротан механизам, односно дејство  $Mg^{2+}_i$  да инхибира  $I_{K(Ca)}$ . У скелетних мишићних ћелија пацова у култури (Ferguson, 1991) и васкулних миоцита (Morales и сар., 1996) нађено

је да  $Mg^{2+}$  смањује проводљивост  $K_{Ca}$  канала. Одсуство комплетног блока спонтане, као и изазване активности Рецијусових неурона под дејством  $Mg^{2+}$  које смо ми нашли, могли би чак говорити у прилог таквог магнезијумског блока  $K_{Ca}$  канала. Дакле би  $Mg^{2+}$  могао да има извесну улогу у регулацији ексцитабилности мембране Рецијусових неурона као модулатор  $I_{K(Ca)}$ .

Познато је да  $Mg^{2+}$  има мноштво различитих дејстава у ћелији, од којих многа нису у вези са јонским каналима и транспортним системима ћелијске мембране. Међутим, у овој студији њихов потенцијални значај није узиман у обзир. Овде би се на крају могло закључити да је вероватан механизам одговоран за сва супресивна дејства  $Mg^{2+}$  на електрофизиолошка својства мембране и спонтану активност Рецијусових неурона пијавице – блокада  $Na^+$  канала јонима  $Mg^{2+}$ . Могући су ипак и мултипли ефекти  $Mg^{2+}$  на друге различите јонске канале и транспортере, укључујући ту и модулацију активности  $K_{Ca}$  канала, као што је дискутовано, али би додатна испитивања била неопходна да разјасне ово питање.

Сматра се да су у општем случају базични механизми настанка епилептичких напада идентични без обзира да ли настају у нервном систему, односно мозгу човека или животиње. За многа епилептична стања сматра се да су идиопатска. При том је вероватно и то да су различити типови епилептичких напада узроковани различитим механизмима. Главни ћелијски догађај у основи процеса иктогенезе и епилептогенезе јесте патофизиолошки повећана ексцитабилност неурона која се манифестује ритмичким настанком ПТД-а. Па ипак, основни механизми настанка ПТД-а још увек нису у потпуности објашњени.

Већина до сад описаних типова осцилаторне активности мембране неурона, епилептиформних пражњења и епилептичке активности зависни су од  $Ca^{2+}$  и захтевају инфлукс  $Ca^{2+}$  кроз волтажно – зависне  $Ca^{2+}$  канале. У овим експерименталним моделима  $Ca^{2+}$  је неопходан за настанак и одржавање ритмичке активности неурона. Међутим се у неким случајевима ритмичко пражњење и епилептички напади развијају у средини са ниским садржајем  $Ca^{2+}$  или без  $Ca^{2+}$ . Све већи број студија налази да развој хиперексцитабилности неурона и индукција епилептиформне активности могу бити синаптички независни и  $Ca^{2+}$  – независни процеси на моделима неурона бескичмењака, као и на сисарским неуронима. Тако је

на пример показано да појединачни механички изолован В3 неурон букалних ганглија пужа генерише ПТД-е по излагању епилептогеним супстанцама (Speckmann и Caspers, 1973). Фазичко високофреквентно пражњење магноцелуларних неуропептидергичких ћелија пацова није зависно од синаптички посредоване ексцитације (Hatton, 1982). На даље, уклањање екстрацелуларног  $\text{Ca}^{2+}$  повећава фреквенцију избијања АП-а у неурона птичјег једра nucl. Edinger – Westphal који се репетитивно празне (Fujii, 1992). Раствори са ниским садржајем  $\text{Ca}^{2+}$  или без  $\text{Ca}^{2+}$  такође узрокују настанак спонтаног, ритмичког и синхронизованог пражњења у неуронима супраоптичког једра пацова (Li и Hatton, 1996). Показано је да механизам несинаптичке епилептогенезе у ниском  $\text{Ca}^{2+}$  или потпуном одсуству  $\text{Ca}^{2+}$  постоји и у хипокампаљних неурона пацова (Watson и Andrew, 1995; Wang и сар., 2004). У исечцима хипокампуса пацова повећана ексцитабилност и ритмично и синхроно епилептиформно пражњење неурона који се развијају у растворима са ниским  $\text{Ca}^{2+}$ , приписују се променама  $\text{Ca}^{2+}$  – зависне  $\text{K}^+$  проводљивости (Martin и сар., 2001). Најзад, низак ниво  $\text{Ca}^{2+}$  у крви може узроковати или бар допринети настанку миоклоничких напада у људи, инфантилних спазма, као и напада који се виђају у Дауновом (Down) синдрому (Thiel, 2006).

Слично томе, блокатори  $\text{Ca}^{2+}$  канала у појединачних изолованих Рецијусових неурона пијавице *H. medicinalis* индукују  $\text{Na}^+$  – зависне плато потенцијале (Angstadt и Choo, 1996). Епилептиформна активност се такође може индуковати у Рецијусових неурона блокадом  $\text{Ca}^{2+}$  струја јонима прелазних метала, као што су  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и други, међу којима је  $\text{Ni}^{2+}$  најпотентнији (Angstadt и сар., 1998). И у пијавице врсте *H. sanguisuga* Рецијусови неурони у присуству  $\text{Ni}^{2+}$  у раствору за перфузију спонтано развијају ендегену осцилаторну активност са ритмичким високофреквентним пражњењем (Pathak и сар., 2009; Pathak и сар., 2010; Stanojević и сар., 2015a; Stanojević и сар., 2015b). Параметри епилептиформне активности на нашем моделу (фреквенција, трајање и амплитуда ПТД-а) у складу су са резултатима Angstadt-а и Friesen-а (1991) на медицинској пијавици *Hirudo medicinalis*. При том се ова епилептиформна активност може сматрати суштински несинаптичким процесом, јер бива индукована у условима супресије хемијске синаптичке трансмисије, те

представља експериментални модел сопственог ћелијског ритма епилептиформног пражњења.

Осцилаторни образац ове активности вероватно одржава активација деполаришућих јонских струја одговорних за индукцију осцилаторног циклуса, са једне, и активација реполаришућих јонских струја одговорних за терминацију циклуса, са друге стране, које се смењују на синхронизован начин и тиме успостављају правилан и стабилан неуронски осцилатор. У Рецијусових неурона тонички су активне две волтажне – зависне деполаришуће јонске струје: перзистентна  $\text{Na}^+$  струја и хиперполаризацијом активирана катјонска струја (Angstadt и Choo, 1996; Angstadt 1999). Ефектима ових улазних струја супротставља се главна излазна јонска струја Рецијусових неурона:  $\text{Ca}^{2+}$  – зависна  $\text{K}^+$  струја која је значајна у регулацији електричне активности ћелијске мембране (Stewart и сар., 1989).

Предложен је следећи механизам иницијације ове  $\text{Na}^+$  – зависне  $\text{Ni}^{2+}$  – индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона медицинске пијавице. Блокада волтажне – зависног инфлуksа  $\text{Ca}^{2+}$  помоћу  $\text{Ni}^{2+}$ , супримира  $\text{Ca}^{2+}$  – активирану тоничку излазну струју  $\text{K}^+$ , чиме изазива деполаризацију мембране. Ово демаскира ефекат супротстављене перзистентне улазне струје  $\text{Na}^+$ , што резултује брзом деполаризацијом и њеним одржавањем у фази платоа (Angstadt и Friesen, 1991; Angstadt, 1999). Сматра се, дакле, да управо преовладавање активације  $I_{\text{NaP}}$  након елиминације  $I_{\text{K(Ca)}}$  доводи до иницијације ПТД-а, тј. генерише његову узлазну и плато фазу, при чему и  $I_h$  такође доприноси настанку ове ритмичке осцилаторне активности током споро – деполаришуће промене потенцијала у интер-ПТД интервалима.

И у Рецијусових неурона пијавице врсте *H. sanguisuga* нађено је да је  $\text{Ni}^{2+}$  – индукована епилептиформна активност била  $\text{Na}^+$  – зависна, обзиром да ју је у потпуности елиминисало испирање раствором без  $\text{Na}^+$ , а поновно увођење  $\text{Na}^+$  је обнављало (Pathak и сар., 2009). Пароксизмални таласи деполаризације који су настајали блокадом  $\text{Ca}^{2+}$  канала помоћу  $\text{Ni}^{2+}$ , бивали су потпуно сузбијени у одсуству  $\text{Na}^+$ , при чему је образац промена које су настајале са обуставом  $\text{Na}^+$  био идентичан оном који је показао Angstadt (1999). У нашим огледима је такође у

почетној фази индукције епилептиформне активности деполаризација мембране претходила пуном развоју осцилаторне активности, што представља резултат конзистентан са блокадом  $I_{K(Ca)}$ . Стога смо закључили да је исти механизам који је овај аутор описао на медицинској пијавици такође одговоран за иницијацију  $Na^+$  – зависне епилептиформне активности и у врсте пијавице на којој смо ми радили огледе.

Механизам одговоран за фазу реполаризације ових  $Na^+$  – индукованих  $Na^+$  – зависних ПТД-а слабије је испитан. Yang и Lent (1983) су навели да строфантин продужава реполаризацију плато потенцијала Рецијусових неурона у раствору без  $Ca^{2+}$ . Angstadt и Friesen (1991) изнели су концептуални модел којим предлажу да пораст интрацелуларне концентрације  $Na^+$  након продуженог инфлукса  $Na^+$  током узлазне и плато фазе ПТД-а, последично активира струју  $Na^+/K^+$  пумпе ( $I_{Na/K}$ ), која најзад посредује терминацију ПТД-а. Ови аутори су нашли да у Рецијусових неурона врсте *H. medicinalis* гликозид убаин у ниским концентрацијама смањује учесталост ове епилептиформне активности, док је у високим концентрацијама потпуно прекида. Међутим је касније показано да у Рецијусових неурона пијавице убаин индукује пораст интрацелуларне концентрације  $Ca^{2+}$  услед активације волтажно – зависних  $Ca^{2+}$  канала (Hochstrate и Schlue, 2001), као и отицање ћелије услед накупљања  $Na^+$  и  $Cl^-$  (Dierkes и сар., 2006). То ограничава примену овог агенса као специфичног инхибитора  $Na^+/K^+$  пумпе у изучавању механизма окончања датих ПТД-а и сâме епилептиформне активности. Стога је овде могуће смањити концентрацију  $K^+$  у ванћелијској течности у циљу да се експериментално постигне инхибиција активности  $Na^+/K^+$  пумпе без утицаја на друге могуће механизме реполаризације мембране (Skou, 1990). Раствор са сниженим садржајем  $K^+$  продужава трајање индукованих ПТД-а (Angstadt, 1998; Nedeljkov и сар., 2009), што говори у прилог улоге активираних  $Na^+/K^+$  пумпе у терминацији ових ПТД-а. Обзиром да на нашем моделу није била вршена обустава  $Ca^{2+}$  из перфузионе течности, нити је било блокирано ослобађање  $Ca^{2+}$  из унутрашњих ћелијских депоа, можемо сматрати да би  $I_{K(Ca)}$  и даље могла бити активна у модулацији ове активности. Такође је могућа улога и других излазних  $K^+$  струја у току силазне фазе



ПТД-а. Даља истраживања су неопходна да расветле питање механизма у основи фазе реполаризације  $\text{Ni}^{2+}$  – индукованих ПТД-а Рецијусових неурона.

Може се закључити да је механизам  $\text{Na}^+$  – зависне  $\text{Ni}^{2+}$  – индуковане епилептиформне активности на нашем моделу вероватно блиско повезан са супресијом  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$  и последичним преовладавањем  $I_{\text{NaP}}$ . Ми претпостављамо да ову епилептиформну активност вероватно генеришу деполаришуће струје  $I_{\text{NaP}}$  и  $I_{\text{h}}$ , повезане са супротстављеним реполаришућим струјама  $I_{\text{K}(\text{Ca})}$  и  $I_{\text{Na/K}}$ . Рецијусов неурон пијавице који развија синаптички независне ПТД-е представља вредан модел за испитивање базичних механизма патогенезе епилептичких напада на ћелијском нивоу. Истраживање епилепсије на овом експерименталном анималном моделу може помоћи у разјашњавању општих интринсичких епилептогених, али и антиепилептичких фактора неурона. Модел је такође погодан за тестирање нових потенцијалних антиепилептичких лекова, али и супстанци са већ познатим, али недовољно испитаним анитепилептичким деловањем, као што је то магнезијум.

Карактеристичне клиничке одлике хипомагнезијемije и хипокалцијемije обухватају и епилептичке нападе (Baker и Worthley, 2002). Концентрација јонизоване фракције  $\text{Mg}^{2+}$  у ликвору конвулзивне деце значајно је нижа него у неконвулзивне деце, и повезана је са узрасно зависним променама екстрацелуларног нивоа јонизованог  $\text{Ca}^{2+}$ , као и снижењем нивоа јонизованог  $\text{Mg}^{2+}$  у мозгу током развоја (Miyamoto и сар., 2004). Такође, епилептичка активност индукована у CA1 неурона интактног хипокампуса миша ниским садржајем  $\text{Mg}^{2+}$  бива појачана дејством блокатора  $\text{Ca}^{2+}$  канала нифедипина (Derchansky и сар., 2004). Са друге стране, пораст нивоа  $\text{Mg}^{2+}$  супримира епилептиформну активност индуковану ниским садржајем  $\text{Ca}^{2+}$  у исечцима хипокампуса миша (Wang и сар., 2004). У прелиминарном испитивању Pathak и сарадници (2009) налазе да је  $\text{Mg}^{2+}$  у концентрацији од 10 mmol/l у стању да парцијално блокира  $\text{Ni}^{2+}$  – индуковано епилептиформно пражњење Рецијусових неурона пијавице.

У овој студији је коришћен успостављени експериментални модел  $\text{Na}^+$  – зависног  $\text{Ni}^{2+}$  – индукованог епилептиформног пражњења Рецијусових неурона пијавице *H. sanguisuga*, за које су прелиминарни огледи показали да је  $\text{Mg}^{2+}$  – сензитивно. Циљ је био да се спроведе детаљна анализа о дејству  $\text{Mg}^{2+}$  на дату

эпилептиформну активност. Овде је описан дозно – зависни супресивни ефекат  $Mg^{2+}$  на нашем моделу и испитиван његов механизам. Обзиром да је механизам епилептиформне активности на нашем моделу директно повезан са блокадом  $I_{K(Ca)}$  и инфлуксом  $Na^+$  како је описано раније, било је претпостављено да би ефекат магнезијумске супресије ове активности могли имати активација  $Ca^{2+}$  – зависних  $K^+$  канала, са једне, и/или блокада волтажно – зависних  $Na^+$  канала, са друге стране. Одређивању механизма антиепилептичког дејства  $Mg^{2+}$  на овом моделу допринели су тестирање ефекта  $Mg^{2+}$  на улазни отпор мембране неурона у току овог епилептиформног пражњења (Stanojević и сар., 2015б), као и налази супресивних ефеката  $Mg^{2+}$  на електрофизиолошка својства мембране Рецијусовог неурона пијавице у стандардним јонским условима, који су претходно описани (Stanojević и сар., 2016).

Проконвулзивна и антиконвулзивна дејства  $Mg^{2+}$  углавном су приписана његовом модулаторном дејству на NMDA рецепторе (Gean и Shinnick - Gallagher, 1988). У физиолошким концентрацијама  $Mg^{2+}$ , регулише проводљивост јонских канала NMDA рецептора на волтажно – зависан начин. Деполаризација мембране уклања јон  $Mg^{2+}$  из поре канала, дозвољавајући проток глутаматом индуковане деполаришуће струје. Такође, смањење  $[Mg^{2+}]_o$  испод физиолошког нивоа снажно потенцира дејство NMDA (Zito и Scheuss, 2009). Међутим, показано је да блокада NMDA рецептора не спречава све облике епилептиформне активности индуковане у пацова обустановом  $Mg^{2+}$ , упућујући на постојање несинаптичког механизма антиепилептичког дејства  $Mg^{2+}$  (Thomson и West, 1986). Такође је показано да блокатор non-NMDA рецептора за глутамат CNQX нема никакво дејство на епилептиформну активност индуковану на исечцима хипокампуса пацова снижењем екстрацелуларне концентрације  $Mg^{2+}$  (Wang и сар., 2004). Додатно, раствори са ниским садржајем  $Ca^{2+}$  и високим садржајем  $Mg^{2+}$  ефикасно блокирају хемијску синаптичку трансмисију, премда хемијска синаптичка трансмисија и нема значаја у иницијацији епилептиформне активности на нашем моделу. Сходно томе, изгледа да дејство  $Mg^{2+}$  на хемијску синаптичку трансмисију не представља механизам одговоран за сузбијање ове епилептиформне активности Рецијусових неурона

пијавице. Вероватније је да ефекат  $Mg^{2+}$  настаје услед модулације  $Na^+$  или  $K_{Ca}$  канала.

Проводљивост  $Na^+$  канала неурона хипокампуса волтажно – и дозно – зависно редукују и интрацелуларни (Lin и сар., 1991) и екстрацелуларни јони  $Mg^{2+}$  (Sang и Meng, 2002). Механизам овог дејства је двострук, јер  $Mg^{2+}$  мења потенцијал површине мембране и утиче на проводљивост за  $Na^+$  компетитивно заузимајући  $Na^+$  канале (Lin и сар., 1991). Са друге стране, претходне студије су показале значајну потенцијацију  $Ca^{2+}$  – индуковане излазне струје  $K^+$  (кроз  $K_{Ca}$  канале) након додавања  $Mg^{2+}$  у раствор (McLarnon и Sawyer, 1993). Ова је потенцијација била видљива само уколико је у ћелији било  $Ca^{2+}$ , што јесте у складу са нашим резултатима, обзиром да ми нисмо вршили супституцију јона  $Ca^{2+}$  јонима  $Ni^{2+}$ , већ смо само додали  $Ni^{2+}$  у раствор који садржи  $Ca^{2+}$ . Стога је и закључено да постоје два могућа механизма супресивног дејства  $Mg^{2+}$  на моделу  $Na^+$  – зависне  $Ni^{2+}$  – индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона: један посредством  $Na^+$  канала, а други посредством  $K_{Ca}$  канала (Pathak и сар., 2009). У циљу да ово испитамо, тестирали смо ефекат  $Mg^{2+}$  на проводљивост мембране у току епилептиформног пражњења посредством мерења УОМ-а.

У овој студији по први пут је испитивана и показана дозна зависност супресивног ефекта  $Mg^{2+}$  на епилептиформну активност индуковану блокадом  $Ca^{2+}$  канала помоћу  $Ni^{2+}$ . Такође је по први пут испитиван и ефекат  $Mg^{2+}$  на УОМ неурона у току епилептиформне активности на ћелијском моделу (Stanojević и сар., 2015б). Нађено је да је примена раствора са  $Mg^{2+}$  на нашем моделу довела до значајне редукције свих параметара епилептиформне активности у свим тестираним концентрацијама  $Mg^{2+}$ , у распону од 1 mmol/l до 20 mmol/l  $Mg^{2+}$ . Магнезијумска супресија датог епилептиформног пражњења била је дозно – зависна и реверзибилна. Дозно – зависна природа антиепилептичког ефекта  $Mg^{2+}$  на овом моделу потврђује његову ефикасност. Дакле је  $Mg^{2+}$  на овом моделу несинаптичке епилептогенезе у бескичмењака показао да делује антиепилептички, и то на дозно – зависан начин, при чему је највиша примењена концентрација од 20 mmol/l  $Mg^{2+}$  довела до брзе и потпуне елиминације дате епилептиформне активности.

Такође је за све испитиване концентрације  $Mg^{2+}$  више од физиолошких нађено да за једну те исту дозу  $Mg^{2+}$  њено дејство на ову епилептиформну активност није по типу „све или ништа“, већ да ефекат ове магнезијумске супресије показује одређену варијабилност, односно стохастичку природу. Вероватноћа са којом је нека концентрација  $Mg^{2+}$  у стању да комплетно супримира ову експерименталну епилептиформну активност расте сразмерно самој концентрацији  $Mg^{2+}$ . Сâм налаз да растуће концентрације  $Mg^{2+}$  са растућом вероватноћом потпуно сузбијају ово епилептиформно пражњење говори у прилог молекулског, пре него ли ћелијског механизма дејства  $Mg^{2+}$ , односно дејства  $Mg^{2+}$  на нивоу јонских канала неурона, пре него ли на целуларном нивоу или још вишем нивоу неуронских мрежа.

Наши резултати у складу су са наводима других аутора о антиепилептичком потенцијалу магнезијума на различитим експерименталним моделима. Тако су Borges и Gücer (1978) нашли да је  $MgSO_4$  у стању да сузбије епилептичку активност неурона индуковану топикалном применом пеницилина на моторну кору у мачака, паса и примата. Standley и сарадници (1995) такође су нашли да интраперитонеална инјекција  $MgSO_4$  значајно скраћује трајање епилептичких напада изазваних разбуктавањем (*енг.* kindling) у хипокампуса пацова. Са друге стране, снижење екстрацелуларне концентрације  $Mg^{2+}$  у многим деловима ЦНС-а доводи до епилептиформне активности (Walther и сар., 1986). Сви ови резултати указују на то да се  $Mg^{2+}$  може користити у лечењу неких облика епилепсије (James, 2010).

Међутим, упркос све већем броју и експерименталних и клиничких доказа антиепилептичког потенцијала магнезијума, прецизни механизми и места дејства још увек су већином само хипотетички (Hunter и Gibbins, 2011). Стога смо ми испитивали ефекат високе концентрације  $Mg^{2+}$  на проводљивост мембране у току експерименталне епилептиформне активности индуковане никлом, у огледима са мерењем УОМ-а (Stanojević и сар., 2015б). Ми овде по први пут наводимо да  $Mg^{2+}$  значајно повећава УОМ неурона, тј. значајно редукује проводљивост мембране у току епилептиформне активности. Смањење мембранске проводљивости могло би бити резултат мултиплих механизма. Неке од могућности ће бити детаљније продискутоване.

Један могући механизам повећања YOM-а под дејством магнезијума јесте блокада NMDA рецептора јонима  $Mg^{2+}$ . Међутим,  $Ni^{2+}$  који се користи да индукује епилептиформну активност на нашем моделу – брзо и потпуно блокира хемијску синаптичку трансмисију блокадом  $Ca^{2+}$  канала (Angstadt и Friesen, 1991; Angstadt и сар., 1998). Стога је овде мало вероватно да је магнезијумска блокада NMDA рецептора узрок смањења проводљивости мембране и супресије епилептиформне активности магнезијумом на нашем моделу. Вероватнији механизам дејства  $Mg^{2+}$  јесу директни ефекти  $Mg^{2+}$  на јонске канале и јонске струје укључене у механизам  $Ni^{2+}$  – индуковане епилептиформне активности Рецијусових неурона.

Никлом индуковано епилептиформно пражњење Рецијусових неурона пијавице у врста *H. medicinalis* и *H. sanguisuga* је  $Na^+$  – зависно и у свом механизму блиско повезано са супресијом тоничке  $I_{K(Ca)}$  и последичном превагом  $I_{NaP}$  (Angstadt и Friesen, 1991; Pathak и сар., 2009). Зависност епилептиформног пражњења од  $Na^+$  показана раније, смањење проводљивости мембране неурона у току магнезијумске супресије овог пражњења (Stanojević и сар., 2015б), као и смањење проводљивости мембране под дејством  $Mg^{2+}$  у току спонтане активности неурона (Stanojević и сар., 2016), показани овде, сви заједно узети у обзир доводе до могућег закључка о дејству  $Mg^{2+}$  на  $Na^+$  канале. Ово је у складу са налазом да у дисосованих CA1 неурона хипокампуса пацова екстраћелијски примењен  $MgSO_4$  узрокује дозно – зависно и волтажно – зависно реверзибилно слабљење  $Na^+$  струја (Sang и Meng, 2002). Значајно је и то да је дозна зависност у нашим резултатима у складу са дозно – зависним смањењем  $Na^+$  струја јонима  $Mg^{2+}$  које наводе Sang и Meng.

Редукција  $Na^+$  струје дејством  $Mg^{2+}$  такође се може бар делимично приписати стабилизујућем ефекту  $Mg^{2+}$  јона на мембрану (Frankenhaeuser и Hodgkin, 1957). Стабилизујућа својства  $Mg^{2+}$  углавном су последица неутрализације површног наелектрисања које утиче на волтажни сензор волтажно – зависних  $Na^+$  канала, а тиме и на регулацију њиховог отварања (Somjen, 2004а). Показано је да пораст ванћелијске концентрације  $Mg^{2+}$  доводи до померања криве активације  $Na^+$  канала ка позитивним потенцијалима, и инхибира процес активације у акутно изолованих CA1 неурона и церебеларних грануларних ћелија (Lin и сар., 1991; Sang и Meng, 2002). Занимљиво је да Lin и сарадници (1991) наводе да  $Mg^{2+}$  није имао ефекта на

кинетику активације у дозама мањим или једнаким 7 mmol/l. Наше доза – дејство криве такође показују да је 7 mmol/l изгледа преломна тачка иза које крива постаје много стрмија.

Са друге стране,  $\text{Ca}^{2+}$  – активирана  $\text{K}^+$  проводљивост кључна је у процесу епилептогенезе на нашем моделу, како је то раније описано (Pathak и сар., 2009). Међутим се зна да  $\text{Mg}^{2+}$  блокира већину познатих  $\text{K}^+$  канала (Вага и сар., 1993), али су резултати који се тичу ефекта  $\text{Mg}^{2+}$  на проводљивост  $\text{K}_{\text{Ca}}$  канала – контрадикторни (Ferguson, 1991). Осим тога би активација  $\text{K}_{\text{Ca}}$  канала довела до смањења УОМ-а током епилептиформног пражњења, док смо ми показали пораст УОМ-а под дејством  $\text{Mg}^{2+}$ . Стога је закључено да је највероватнији механизам којим магнезијум супримира  $\text{Ni}^{2+}$  – индуковану епилептиформну активност Рецијусових неурона пијавице на дозно – зависан начин, при том повећавајући њихов УОМ – управо блокада  $\text{Na}^+$  канала јонима  $\text{Mg}^{2+}$ .

И код сисара су описани епилептогенеза независна од хемијске неуротрансмисије и неурони натријумски осцилатори, и познати антиепилептички ефекти блокаде  $\text{Na}^+$  канала. Супстанца YWI192, блокатор  $\text{Na}^+$  канала, инхибира епилептиформну активност CA1 неурона у животиња са епилепсијом слепоочног режња (Jones и сар., 2009). Такође многи антиепилептички лекови циљано делују на волтажно – зависне  $\text{Na}^+$  канале. Па ипак, ефикасност ових лекова може бити измењена у хроничној епилептогенези, а редукована фармакосензитивност  $\text{Na}^+$  канала у хроничној епилепсији може допринети настанку рефрактарности на лек (Remy и сар., 2003). Стога би предложени механизам магнезијумске супресије ове синаптички независне епилептиформне активности Рецијусових неурона дејством на  $\text{Na}^+$  канале могао имати и шири значај не само за неуроне пијавице, већ и за неуроне сисара.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

1. У овој студији коришћене су класичне електрофизиолошке методе: интраћелијско регистровање потенцијала мембране и електричне активности ћелије, директна електростимулација мембране и одређивање улазног отпора слободне мембране Рецијусових неурона слободних ганглија пијавице *Haemoris sanguisuga*. Коришћен је експериментални модел епилептиформне активности Рецијусових неурона индуковане блокадом  $\text{Ca}^{2+}$  канала применом  $3 \text{ mmol/l NiCl}_2$ . Циљ истраживања је био да се испитају ефекти, јачина дејства и механизам дејства магнезијума на експерименталну епилептиформну активност Рецијусових неурона пијавице, индуковану никлом. Антиепилептичко дејство магнезијума на овом моделу испитивано је у опсегу концентрација од  $1 \text{ mmol/l}$  до  $20 \text{ mmol/l MgCl}_2$ .
2. На ћелијском нивоу  $\text{Ni}^{2+}$  – индукована епилептиформна активност Рецијусових неурона испољава се ритмичким осцилацијама потенцијала мембране у виду пароксизмалних продужених таласа деполаризације (ПТД, *енг.* paroxysmal depolarization shift, PDS). Ова епилептиформна активност је квантитативно описана мерењем параметара ПТД-â (фреквенција, трајање, амплитуда, број акционих потенцијала по ПТД), као и израчунавањем интензитета епилептиформне активности.
3. Епилептиформна активност Рецијусових неурона индукована никлом може се сматрати експерименталним моделом несинаптичке епилептогенезе, погодним за испитивање дејства антиепилептичких супстанци. Од раније је познато да се ради о моделу  $\text{Na}^+$  – зависне епилептиформне активности.
4. Никлом индукована епилептиформна активност Рецијусових неурона бива реверзибилно потпуно сузбијена у присуству  $20 \text{ mmol/l Mg}^{2+}$ . Студија дозне зависности дејства магнезијума показала је да и ниже концентрације  $\text{Mg}^{2+}$  статистички значајно супримирају дату епилептиформну активност, сразмерно смањујући вредности свих посматраних параметара ПТД-â. Нађено

је да се полумаксимално инхибиторно дејство магнезијума на све параметре од интереса постиже са приближно 10 mmol/l  $Mg^{2+}$ .

5. У стандардним јонским условима  $Mg^{2+}$  показује статистички значајне супресивне ефекте на спонтану активност, високо статистички значајно смањујући учесталост спонтаног окидања акционих потенцијала (АП).
6. Магнезијум такође значајно сузбија деполаризацијом изазвану активност Рецијусових неурона. Магнезијум статистички значајно подиже ниво прага за избијање АП-а и високо статистички значајно смањује фреквенцију изазваних АП-а. Према истовремено изазива и малу деполаризацију мировног потенцијала мембране,  $Mg^{2+}$  испољава нето-стабилизујуће дејство на мембрану Рецијусовог неурона, значајно смањујући њену ексцитабилност.
7. Додавање 20 mmol/l  $Mg^{2+}$  физиолошком сланом раствору високо статистички значајно повећава улазни отпор слободне мембране Рецијусовог неурона. Ово указује на то да  $Mg^{2+}$  делује на мембрану Рецијусовог неурона да изазове затварање јонских канала и смањење проводљивости мембране.
8. Током  $Ni^{2+}$  – индуковане епилептиформне активности, 20 mmol/l  $Mg^{2+}$  статистички значајно повећава улазни отпор мембране Рецијусових неурона. Ово указује на то да је механизам супресивног дејства  $Mg^{2+}$  на ову експерименталну епилептиформну активност посредован затварањем јонских канала и смањењем проводљивости мембране Рецијусовог неурона.
9. Највероватнији механизам доминантно одговоран за описана дејства  $Mg^{2+}$ , укључујући и магнезијумом изазвану супресију  $Ni^{2+}$  – индуковане епилептиформне активности, јесте блокада волтажно – зависних  $Na^{+}$  канала јонима  $Mg^{2+}$ .
10. Испитивање механизма супресивног деловања магнезијума на индуковану епилептиформну активност на овом моделу може допринети сагледавању значаја који хомеостаза магнезијума има за нормалну електричну активност нервних ћелија, спознавању улоге магнезијума у ћелијским механизмима епилептогенезе, те расветљавању механизма антиепилептичког дејства магнезијума, и побољшању терапије бар неких типова епилептичких напада код људи.



## 7. ЛІТЕРАТУРА

1. Akhtar MI, Ullah H, Hamid M. Magnesium, a drug of diverse use. *J Pak Med Assoc* 2011;61 (12):1220-1225.
2. Alarcón G, Martínez J, Kerai SV, Lacruz ME, Quiroga RQ, Selway RP, Richardson MP, García Seoane JJ, Valentín A. In vivo neuronal firing patterns during human epileptiform discharges replicated by electrical stimulation. *Clin Neurophysiol* 2012;123(9):1736-1744.
3. Altrup U. Epileptogenicity and epileptic activity: mechanisms in an invertebrate model nervous system. *Curr Drug Targets* 2004;5(5):473-484.
4. Angstadt JD. Persistent inward currents in cultured Retzius cells of the medicinal leech. *J Comp Physiol A* 1999;184:49-61.
5. Angstadt JD, Choo JJ. Sodium-dependent plateau potentials in cultured Retzius cells of the medicinal leech. *J Neurophysiol* 1996;76:1491-1502.
6. Angstadt JD, Friesen OW. Synchronized oscillatory activity in leech neurons induced by calcium channel blockers. *J Neurophysiol* 1991;66:1858-1873.
7. Angstadt JD, Choo JJ, Saran AM. Effects of transition metal ions on spontaneous electrical activity and chemical synaptic transmission of neurons in the medicinal leech. *J Comp Physiol A* 1998;182:389-401.
8. Avanzini G, Franceschetti, S. Cellular biology of epileptogenesis. *Lancet Neurol* 2003;2(1):33-42.
9. Ayala GF, Dichter M, Gumnit RJ, Matsumoto H, Spencer WA. Genesis of epileptic interictal spikes. New knowledge of cortical feedback systems suggests a neurophysiological explanation of brief paroxysms. *Brain Res* 1973;52:1-17.
10. Bagnoli P, Magni F. Synaptic inputs to Retzius' cells in the leech. *Brain Res* 1975;96(1):147-152.
11. Baker SB, Worthley LI. The essentials of calcium, magnesium and phosphate metabolism: part II. *Disorders Crit Care Resusc* 2002;4(4):307-315.
12. Bara M, Guiet-Bara A, Durlach J. Regulation of sodium and potassium pathways by magnesium in cell membranes. *Magnes Res* 1993;6(2):167-177.

13. Barreto E, Cressman JR. Ion concentration dynamics as a mechanism for neuronal bursting. *J Biol Phys* 2011;37(3):361-373.
14. Beck A, Lohr C, Nett W, Deitmer JW. Bursting activity in leech Retzius neurons induced by low external chloride. *Pflügers Arch* 2001;442(2):263-272.
15. Beleslin BB. Lack of electrotonic transmission between Retzius nerve cells in the fifth and sixth free ganglion of horse leech *Haemopsis sanguisuga*. *Comp Biochem Physiol A* 1977; (56):509-512.
16. Bezanilla F. Voltage-gated ion channels. *IEEE Trans Nanobioscience* 2005;4(1):34-48.
17. Book D. Disorders of brain function, U: Porth C.M. (ed). *Pathophysiology: concepts of altered health states*. Lippincott Williams & Wilkins 2004;1257-1263.
18. Borges LF, Gücer G. Effect of magnesium on epileptic foci. *Epilepsia* 1978;19(1):81-91.
19. Brugada P. Magnesium: an antiarrhythmic drug, but only against very specific arrhythmias. *Eur Heart J* 2000;21(14):1116.
20. Buzsáki G, Draguhn A. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 2004;304(5679):1926-1929.
21. Cameron WE, Núñez-Abades PA, Kerman IA, Hodgson TM. Role of potassium conductances in determining input resistance of developing brain stem motoneurons. *J Neurophysiol* 2000;84(5):2330-2339.
22. Carretta M. The Retzius cells in the leech: a review of their properties and synaptic connections. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1988;91(3):405-413.
23. Catterall WA. Activation of the action potential  $\text{Na}^+$  ionophore of cultured neuroblastoma cells by veratridine and batrachotoxin. *J Biol Chem* 1975;250:4053-4059.
24. Chen S, Su H, Yue C, Remy S, Royeck M, Sochivko D, Opitz T, Beck H, Yaari Y. An increase in persistent sodium current contributes to intrinsic neuronal bursting after status epilepticus. *J Neurophysiol* 2011;105(1):117-129.
25. Crill WE. Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annu Rev Physiol* 1996;58:349-362.
26. Cymbalyuk GS. Dynamics of neuronal bursting. *J Biol Phys* 2011;37(3):239-240.

27. Čepelak I, Čvorišćec D. Magnezij: ponovo u središtu zanimanja. *Biochemia Medica* 1997;3-4:93-105.
28. Čepelak I, Dodig S, Čulić O. Magnesium – more than a common cation. *Med Sci* 2013;39:47-68.
29. Dalmas O. Magnesium selective ion channels. *Biophys J* 2007;93(11):3729-3730.
30. De Feo ML. Magnesium disorders: clinical experience and review of the literature. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2009;6(3):220-222.
31. Dean JA, Leake LD. Pharmacological control of the pattern of activity in leech Retzius neurones. *Comp Biochem Physiol C* 1988;89(1):31-38.
32. Del Castillo J, Engbaek L. The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. *J Physiol* 1954;124(2):370-384.
33. Derchansky M, Shahar E, Wennberg RA, Samoilova M, Jahromi SS, Abdelmalik PA, Zhang L, Carlen PL. Model of frequent, recurrent, and spontaneous seizures in the intact mouse hippocampus. *Hippocampus* 2004;14(8):935-947.
34. Dharnidharka VR, Carney PR. Isolated idiopathic hypomagnesemia presenting as aphasia and seizures. *Pediatr Neurol* 2005;33(1):61-65.
35. Dierkes PW, Wüsten HJ, Klees G, Müller A, Hochstrate P. Ionic mechanism of ouabain-induced swelling of leech Retzius neurons. *Pflügers Arch* 2006;452(1):25-35.
36. Do SH. Magnesium: a versatile drug for anesthesiologists. *Korean J Anesthesiol* 2013;65(1):4-8.
37. Dreier JP, Heinemann U. Late low magnesium-induced epileptiform activity in rat entorhinal cortex slices becomes insensitive to the anticonvulsant valproic acid. *Neurosci Lett* 1990;119(1):68-70.
38. Dribben WH, Eisenman LN, Mennerick S. Magnesium induces neuronal apoptosis by suppressing excitability. *Cell Death & Disease* 2010;1(8): e63-. doi:10.1038/cddis.2010.39.
39. Dudek FE, Yasumura T, Rash JE. 'Non-synaptic' mechanisms in seizures and epileptogenesis. *Cell Biol Int* 1998;22(11-12):793-805.
40. Durlach J, Pagès N, Bac P, Bara M, Guiet-Bara A. Magnesium research: from the beginnings to today. *Magnes Res* 2004;17(3):163-168.

41. Emila S, Swaminathan S. Role of magnesium in health and disease. *J Exp Sci* 2013;4(2):32-43.
42. Erulkar SD, Dambach GE, Mender D. The effect of magnesium at motoneurons of the isolated spinal cord of the frog. *Brain Research* 1974;66:413-424.
43. Euser AG, Cipolla MJ. Magnesium sulfate for the treatment of eclampsia: a brief review. *Stroke* 2009;40(4):1169-1175.
44. Fawcett WJ, Haxby EJ, Male DA. Magnesium: physiology and pharmacology. *Br J Anaesth* 1999;83(2):302-320.
45. Ferguson WB. Competitive  $Mg^{2+}$  block of a large-conductance,  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel in rat skeletal muscle.  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ , and  $Ni^{2+}$  also block. *J Gen Physiol* 1991;98(1):163-181.
46. Frankenhaeuser B, Meves H. The effect of magnesium and calcium on the frog myelinated nerve fibre. *J Physiol* 1958;142(2):360-365.
47. Frankenhaeuser B, Hodgkin AL. The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J Physiol* 1957;137(2):218-244.
48. Frey G, Hanke W, Schlue WR. ATP-inhibited and  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^{+}$  channels in the soma membrane of cultured leech Retzius neurons. *J Membr Biol* 1993;134(2):131-142.
49. Fujii JT. Repetitive firing properties in subpopulations of the chick Edinger Westphal nucleus. *J Comp Neurol* 1992;316(3):279-286.
50. Furukawa Y, Kasai N, Torimitsu K. Effect of  $Mg^{2+}$  on neural activity of rat cortical and hippocampal neurons in vitro. *Magnes Res* 2009;22(3):174S-181S.
51. Garduño J, Galván E, Fernández de Sevilla D, Buño W. 1-Ethyl-2-benzimidazolinone (EBIO) suppresses epileptiform activity in in vitro hippocampus. *Neuropharmacology* 2005;49(3):376-388.
52. Gean PW, Shinnick-Gallagher P. Epileptiform activity induced by magnesium-free solution in slices of rat amygdala: antagonism by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Neuropharmacology* 1988;27(6):557-562.
53. Gerard E, Hochstrate P, Dierkes PW, Coulon P. Functional properties and cell type specific distribution of I(h) channels in leech neurons. *J Exp Biol* 2012;215(2):227-238.

54. Gerasimov VD, Akoev GN. Effects of various ions on the resting and action potentials of the giant nerve cells of the leech *Hirudo medicinalis*. *Nature* 1967;214(5095):1351-1352.
55. Goldensohn ES, Purpura DP. Intracellular potentials of cortical neurons during focal epileptogenic discharges. *Sciences* 1963;139:840–842.
56. Golomb D, Yue C, Yaari Y. Contribution of persistent  $\text{Na}^+$  current and M-type  $\text{K}^+$  current to somatic bursting in CA1 pyramidal cells: combined experimental and modeling study. *J Neurophysiol* 2006;96(4):1912-1926.
57. Grone BP, Baraban SC. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. *Nat Neurosci* 2015;18(3):339-343.
58. Guiet-Bara A, Durlach J, Bara M. Magnesium ions and ionic channels: activation, inhibition or block - a hypothesis. *Magnes Res* 2007;20(2):100-106.
59. Günzel D, Schlue WR. Sodium-magnesium antiport in Retzius neurones of the leech *Hirudo medicinalis*. *J Physiol* 1996;491.3:595-608.
60. Günzel D, Hintz K, Durry S, Schlue WR.  $\text{Mg}^{2+}$ -malate co-transport, a mechanism for  $\text{Na}^+$ -independent  $\text{Mg}^{2+}$  transport in neurons of the leech *Hirudo medicinalis*. *J Neurophysiol* 2005;94(1):441-453.
61. Günzel D, Schlue WR. Determination of  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  - an update on the use of  $\text{Mg}^{2+}$ -selective electrodes. *Biometals* 2002;15(3):237-249.
62. Haensch CA. Cerebrospinal fluid magnesium level in different neurological disorders. *Neurosci Med* 2010;1:60–63.
63. Hahn R, Campbell DT. Simple shifts in the voltage dependence of sodium channel gating caused by divalent cations. *J Gen Physiol* 1983;82(6):785-805.
64. Hahn E, Burrell B. Pentylentetrazol-induced seizure-like behavior and neural hyperactivity in the medicinal leech. *Invert Neurosci* 2015;15(1):1-9.
65. Hanna S. Plasma magnesium in health and disease. *J Clin Pathol* 1961;14:410-414.
66. Hashizume N, Mori M. An analysis of hypermagnesemia and hypomagnesemia. *Jpn J Med* 1990;29(4):368-372.
67. Hatton GI. Phasic bursting activity of rat paraventricular neurones in the absence of synaptic transmission. *J Physiol* 1982;327:273–284.2.

68. Heilman AD, Quattrochi J. Computational models of epileptiform activity in single neurons. *Biosystems* 2004;78(1-3):1-21.
69. Hochstrate P, Schlue WR. The ouabain-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase in leech Retzius neurones is mediated by voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels. *Brain Res* 2001;892(2):248-254.
70. Hunter LA, Gibbins KJ. Magnesium sulfate: past, present, and future. *J Midwifery Womens Health* 2011;56(6):566-574.
71. Jahnke-Dechent W, Ketteler M. Magnesium basics. *Clin Kidney J* 2012;5 [Suppl 1]:i3 - i14.
72. James MF. Magnesium: an emerging drug in anaesthesia. *Br J Anaesth* 2009;103(4):465-467.
73. James MF. Magnesium in obstetrics. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2010;24(3):327-337.
74. Jasinski PE, Molkov YI, Shevtsova NA, Smith JC, Rybak IA. Sodium and calcium mechanisms of rhythmic bursting in excitatory neural networks of the pre-Bötzinger complex: a computational modelling study. *Eur J Neurosci* 2013;37(2):212-230.
75. Jefferys JG, Haas HL. Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature* 1982;300(5891):448-450.
76. Jenkinson DH. The nature of the antagonism between calcium and magnesium ions at the neuromuscular junction. *J Physiol* 1957;138(3):434-444.
77. Jensen MS, Yaari Y. Role of intrinsic burst firing, potassium accumulation, and electrical coupling in the elevated potassium model of hippocampal epilepsy. *J Neurophysiol* 1997;77(3):1224-1233.
78. Jin MM, Chen Z. Role of gap junctions in epilepsy. *Neurosci Bull* 2011;27(6):389-406.
79. Johansen J, Kleinhaus AL. Saxitoxin differentiates between two types of  $Na^+$ -dependent potentials in the Retzius cell of hirudinid leeches. *J Exp Biol* 1987;131:351-363.
80. Jones PJ, Merrick EC, Batts TW, Hargus NJ, Wang Y, Stables JP, Bertram EH, Brown ML, Patel MK. Modulation of sodium channel inactivation gating by a novel lactam: implications for seizure suppression in chronic limbic epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;328(1):201-212.

81. Jović V. Environmental geochemistry of magnesium. V: Magnesium in the environment and in organisms. Belgrade: Serbian Academy of Sciences and Arts; 1999. vol. XCII, Book 1, p. 3-12.
82. Kass RS. The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease. *J Clin Invest* 2005;115(8):1986–1989.
83. Kato G, Somjen GG. Effects of micro-iontophoretic administration of magnesium and calcium on neurones in the central nervous system of cats. *J Neurobiol* 1969;1(2):181-195.
84. Kato G, Kelly JS, Krnjević K, Somjen G. Anaesthetic action of magnesium ions. *Can Anaesth Soc J* 1968;15(6):539-544.
85. Kelly JS, Krnjević K, Somjen G. Divalent cations and electrical properties of cortical cells. *J Neurobiol* 1969;1(2):197-208.
86. Кесић В. Ургентна стања у гинекологији и акушерству. У: Национални водич добре клиничке праксе за прехоспитално збрињавање хитних стања. Београд: Министарство здравља Републике Србије; 2013. стр. 90-93.
87. Kleinhaus AL, Angstadt JD. Diversity and modulation of ionic conductances in leech neurons. *J Neurobiol* 1995;27(3):419-433.
88. Komiya Y, Su LT, Chen HC, Habas R, Runnels LW. Magnesium and embryonic development. *Magnes Res* 2014;27(1):1-8.
89. Konnerth A, Heinemann U, Yaari Y. Nonsynaptic epileptogenesis in the mammalian hippocampus in vitro. I. Development of seizurelike activity in low extracellular calcium. *J Neurophysiol* 1986;56(2):409-423.
90. Kostić V. Neurologija za studente medicine. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2007;165-183.
91. Kristan WBJr, Calabrese RL, Friesen WO. Neuronal control of leech behavior. *Prog Neurobiol* 2005;76(5):279-327.
92. Lazard EM. A preliminary report on the intravenous use of magnesium sulphate in puerperal eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1925;178–188.
93. Leake LD. Do pyrethroids activate neurotransmitter receptors? *Comp Biochem Physiol C* 1982;72:317-323.

94. Leake LD. Leech Retzius cells and 5-hydroxytryptamine. *Comp Biochem Physiol C* 1986;83(2):229-239.
95. Leaver DD, Parkinson GB, Schneider KM. Neurological consequences of magnesium deficiency: correlations with epilepsy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1987;14(5):361-370.
96. Lent CM, Frazer BM. Connectivity of the monoamine-containing neurons in central nervous system of the leech. *Nature* 1977;266:844-847.
97. Leung LS, Wu K. Epilepsy-based changes in hippocampal excitability: causes and effects. *Adv Neurol* 2006;97:63-68.
98. Li Z, Hatton GI. Oscillatory bursting of phasically firing rat supraoptic neurones in low-Ca<sup>2+</sup> medium: Na<sup>+</sup> influx, cytosolic Ca<sup>2+</sup> and gap junctions. *J Physiol* 1996;496(Pt 2):379-394.
99. Lin F, Conti F, Moran O. Competitive blockage of the sodium channel by intracellular magnesium ions in central mammalian neurones. *Eur Biophys J* 1991;19(3):109-118.
100. Mantegazza M. Voltage-gated Na<sup>+</sup> channels: structure, function and pathophysiology. *V: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, eds. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, IV ed., Oxford University Press; 2012.*
101. Mantegazza M, Catterall WA. Voltage-gated Na<sup>+</sup> channels and epilepsy. *Epilepsia* 2010;51(Suppl.5):9.
102. Mantegazza M, Curia G, Biagini G, Ragsdale DS, Avoli M. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol* 2010;9(4):413-424.
103. Martín ED, Araque A, Buño W. Synaptic regulation of the slow Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: implication in epileptogenesis. *J Neurophysiol* 2001;86(6):2878-2886.
104. Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel and blocking by internal Mg<sup>2+</sup>. *Nature* 1987;325(7000):156-159.
105. Matsumoto H. Intracellular events during the activation of cortical epileptiform discharges. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1964;17:294-307.



106. Matsumoto H, Ajmone Marsan C. Cortical Cellular Phenomena in Experimental Epilepsy: Ictal Manifestations. *Exp Neurol* 1964a;9:305-326.
107. Matsumoto H, Ajmone Marsan C. Cortical Cellular Phenomena in Experimental Epilepsy: Interictal Manifestations, *Exp Neurol* 1964b;9:286-304.
108. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by  $Mg^{2+}$  of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 1984;309(5965):261-263.
109. McLarnon JG, Sawyer D. Effects of divalent cations on the activation of a calcium-dependent potassium channel in hippocampal neurons. *Pflügers Arch* 1993;424(1):1-8.
110. Miyamoto Y, Yamamoto H, Murakami H, Kamiyama N, Fukuda M. Studies on cerebrospinal fluid ionized calcium and magnesium concentrations in convulsive children. *Pediatr Int* 2004;46(4):394-397.
111. Morales E, Cole WC, Remillard CV, Leblanc N. Block of large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in rabbit vascular myocytes by internal  $Mg^{2+}$  and  $Na^+$ . *J Physiol* 1996;495(Pt 3):701-716.
112. Müller A, Günzel D, Schlue WR. Activation of AMPA/kainate receptors but not acetylcholine receptors causes  $Mg^{2+}$  influx into Retzius neurones of the leech *Hirudo medicinalis*. *J Gen Physiol* 2003;122(6):727-739.
113. Mylvaganam S, Ramani M, Krawczyk M, Carlen PL. Roles of gap junctions, connexins, and pannexins in epilepsy. *Front Physiol* 2014;5:172.
114. Nedeljkov V, Cemerikic D, Grgurović M, Dragović S, Pavlović D. The effect of  $Ni^{2+}$  on Retzius nerve cells of the leech. XV Yugoslav symposium of epileptology with international participation, Proceedings, Belgrade, 1996.
115. Nedeljkov V, Lopicic S, Nenadovic N, Cemerikic D. Effect of change of calcium concentration on bursting activity induced by nickel and cobalt. The 8<sup>th</sup> Congress of Clinical Neurophysiology of Serbia and Montenegro with international participation, Proceedings, Belgrade, 2005; p. 53.
116. Nedeljkov V, Pathak D, Lopicic S, Stanojevic M, Andjus P. The effects of sodium/potassium ATP-ase block on characteristics of nickel induced bursting of leech Retzius cells. *Current trends in physiological sciences, Abstract Book, Kragujevac, 2009;55.*

117. Nicholls JG, Van Essen D. The nervous system of the leech. *Sci Am* 1974;230(1):38-48.
118. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 1984;307(5950):462-465.
119. Núñez-Abades PA, Pattillo JM, Hodgson TM, Cameron WE. Role of synaptic inputs in determining input resistance of developing brain stem motoneurons. *J Neurophysiol* 2000;84(5):2317-2329.
120. Opdyke CA, Calabrese RL. A persistent sodium current contributes to oscillatory activity in heart interneurons of the medicinal leech. *J Comp Physiol* 1994;175:781-789.
121. Pathak D, Lopicic S, Bratic – Stanojevic M, Pavlovic D, Andjus PR, Nedeljkov V. Modulation of nickel – induced bursting with 4-aminopyridine in leech Retzius nerve cells. *Arch Biol Sci* 2010;62(4):1035-1045.
122. Pathak D, Lopicic S, Stanojevic M, Nedeljkov A, Pavlovic D, Cemerikic D, Nedeljkov V. Ethanol and magnesium suppress nickel-induced bursting activity in leech Retzius nerve cells. *Gen Physiol Biophys* 2009;28:9-17.
123. Perez Velazquez JL, Carlen PL. Gap junctions, synchrony and seizures. *Trends Neurosci* 2000;23(2):68-74.
124. Петровић ММ. Волтажно зависни канали. У: Петровић ММ, уредник. Основи неурофизиологије. Јонски канали. Београд 2006;9-25.
125. Pitkänen A, Lukasiuk K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav* 2009;14 Suppl 1:16-25.
126. Prichard JW. Effect of Phenobarbital on a leech neuron. *Neuropharmacology* 1972a;11(4):585-590.
127. Prichard JW. Events in leech Retzius neurons resembling the “paroxysmal depolarizing shift”, *Neurology* 1972b;22:439.
128. Prichard JW, Kleinhaus AL. Dual action of phenobarbital on leech ganglia. *Comp Gen Pharmac* 1974;5:239-249.
129. Prince DA. Neurophysiology of epilepsy, *Ann Rev Neurosci* 1978;1:395-415.
130. Prince DA, Wong RK. Human epileptic neurons studied in vitro. *Brain Res* 1981;210(1-2):323-333.

131. Pusch M. Open-channel block of Na<sup>+</sup> channels by intracellular Mg<sup>2+</sup>. *Eur Biophys J* 1990;18(6):317-326.
132. Pusch M, Conti F, Stühmer W. Intracellular magnesium blocks sodium outward currents in a voltage- and dose-dependent manner. *Biophys J* 1989;55(6):1267-1271.
133. Remy S, Urban BW, Elger CE, Beck H. Anticonvulsant pharmacology of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in hippocampal neurons of control and chronically epileptic rats. *Eur J Neurosci* 2003;17(12):2648-2658.
134. Richards CD, Sercombe R. Calcium, magnesium and the electrical activity of guinea-pig olfactory cortex in vitro. *J Physiol* 1970;211(3):571-584.
135. Romani A. Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 2007;458(1):90-102.
136. Rose T, Gras H, Hörner M. Activity-dependent suppression of spontaneous spike generation in the Retzius neurons of the leech *Hirudo medicinalis* L. *Invert Neurosci* 2006;6(4):169-176.
137. Rundfeldt C. The new anticonvulsant retigabine (D-23129) acts as an opener of K<sup>+</sup> channels in neuronal cells. *Eur J Pharmacol* 1997;336(2-3):243-249.
138. Sadeh M, Blatt I, Martinovits G, Karni A, Goldhammer Y. Treatment of porphyric convulsions with magnesium sulfate. *Epilepsia* 1991;32(5):712-715.
139. Sah P. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* 1996;19(4):150–154.
140. Sah P, Faber ES. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol* 2002;66(5):345-353.
141. Sahley CL, Strong JA, Kleinhaus AL. FMRF-amide modulates the electrical activity of the leech Retzius cell. *Neurosci Lett* 1993;164:37-40.
142. Sang N, Meng Z. Blockade by magnesium of sodium currents in acutely isolated hippocampal CA1 neurons of rat. *Brain Res* 2002;952(2):218-221.
143. Sawyer RT. Nervous system. V: Sawyer RT, уредник. *Leech biology and behaviour*. 1. ed. Oxford: Clarendon press; 1986;163-222.
144. Sheets MF, Hanck DA. Mechanisms of extracellular divalent and trivalent cation block of the sodium current in canine cardiac Purkinje cells. *J Physiol* 1992;454:299-320.

145. Shi J, Cui J. Intracellular  $Mg^{2+}$  enhances the function of BK-type  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels. *J Gen Physiol* 2001;118(5):589-606.
146. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005;365(9461):785-799.
147. Sibai BM. Magnesium sulfate prophylaxis in preeclampsia: evidence from randomized trials. *Clin Obstet Gynecol* 2005;48(2):478-488.
148. Sinert R, Zehtabchi S, Desai S, Peacock P, Altura BT, Altura BM. Serum ionized magnesium and calcium levels in adult patients with seizures. *Scan J Clin Lab Invest* 2007;67(3):317-326.
149. Skou JC. The fourth Datta lecture. The energy coupled exchange of  $Na^+$  for  $K^+$  across the cell membrane. The  $Na^+$ ,  $K^+$ -pump. *FEBS Lett* 1990;268(2):314-324.
150. Somjen GG, Kato G. Effects of magnesium and calcium on neurones in the central nervous system. *Brain Res* 1968;9(1):161-164.
151. Somjen GG. The regulation of brain ions. У: Somjen GG, уредник. Ions in the brain: normal function, seizures and stroke. New York: Oxford University Press; 2004.
152. Spasov AA, Iezhitsa IN, Kharitonova MV, Kravchenko MS. Effect of magnesium chloride and magnesium L-aspartate on seizure threshold in rats under conditions of dietary magnesium deficiency. *Bull Exp Biol Med* 2007;144(2):214-216.
153. Speckmann EJ, Caspers H. Paroxysmal depolarization and changes in action potentials induced by pentylentetrazol in isolated neurons of *Helix pomatia*. *Epilepsia* 1973;14(4):397-408.
154. Stafstrom CE. Mechanisms of action of antiepileptic drugs: the search for synergy. *Curr Opin Neurol* 2010;23(2):157-163.
155. Stafstrom C. Persistent sodium current and its role in epilepsy. *Epilepsy Curr* 2007;7(1):15-22.
156. Stafstrom CE. A persistent little current with a big impact on epileptic firing. *Epilepsy Curr* 2011;11(2):64-65.
157. Standley CA, Irtenkauf SM, Cotton DB. Anticonvulsant effects of magnesium sulfate in hippocampal-kindled rats. *J Biomed Sci* 1995;2:57-62.
158. Standley CA, Whitty JE, Mason BA, Cotton DB. Serum ionized magnesium levels in normal and preeclamptic gestation. *Obstet Gynecol* 1997;89(1):24-27.

159. Stanojević M, Lopicic S, Djurovic B, Mihaljev I, Spasic S, Aleksic I, Nedeljkov V, Prostran M. An animal model of experimental epilepsy research at the cellular level. International Symposium "New frontiers in epilepsy. Functional and peripheral nerve surgery", Proceedings, Podgorica, 2015a;69-75.
160. Stanojević M, Lopicic S, Jovanovic Z, Pathak D, Pavlovic DV, Spasic S, Nedeljkov V, Prostran M. Magnesium effects on nonsynaptic epileptiform activity in leech Retzius neurons. *Folia Biol Kraków* 2015;63(4):301-306.
161. Stanojević M, Lopicic S, Spasic S, Aleksic I, Nedeljkov V, Prostran M. Effects of high extracellular magnesium on electrophysiological properties of membranes of Retzius neurons in leech *Haemaphysalis sanguisuga*. *J Elem* 2016;21(1):221-230.
162. Stewart RR, Nicholls JG, Adams WB.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  currents in identified leech neurones in culture. *J Exp Biol* 1989;141:1-20.
163. Su H, Alroy G, Kirson ED, Yaari Y. Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 2001;21(12):4173-4182.
164. Širvinskas E, Laurinaitis R. Use of magnesium sulfate in anesthesiology. *Medicina (Kaunas)* 2002;38(7):695-698.
165. Taylor CP, Dudek FE. Synchronous neural afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. *Science* 1982;218(4574):810-812.
166. Thiel R. Might calcium disorders cause or contribute to myoclonic seizures in epileptics? *Med Hypotheses* 2006;66(5):969-974.
167. Thomson AM, West DC. N-methylaspartate receptors mediate epileptiform activity evoked in some, but not all, conditions in rat neocortical slices. *Neuroscience* 1986;19(4):1161-1177.
168. Timofeev I, Grenier F, Steriade M. Contribution of intrinsic neuronal factors in the generation of cortically driven electrographic seizures. *J Neurophysiol* 2004;92(2):1133-1143.
169. Üre A, Altrup U. Block of spontaneous termination of paroxysmal depolarizations by forskolin (buccal ganglia, *Helix pomatia*). *Neurosci Lett* 2006;392(1-2):10-15.

170. Voss LJ, Jacobson G, Sleigh JW, Steyn-Ross A, Steyn-Ross M. Excitatory effects of gap junction blockers on cerebral cortex seizure-like activity in rats and mice. *Epilepsia* 2009;50(8):1971-1978.
171. Walther H, Lambert JD, Jones RS, Heinemann U, Hamon B. Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion with low magnesium medium. *Neurosci Lett* 1986;69(2):156-161.
172. Wang T, Wang J, Cottrell JE, Kass IS. Small physiologic changes in calcium and magnesium alter excitability and burst firing CA1 pyramidal cells in rat hippocampal slices. *J Neurosurg Anesthesiol* 2004;16:201-209.
173. Watson PL, Andrew RD. Effects of micromolar and nanomolar calcium concentrations on non-synaptic bursting in the hippocampal slice. *Brain Res* 1995;700(1-2):227-234.
174. Westermaier T, Stetter C, Kunze E, Willner N, Raslan F, Vince GH, Ernestus RI. Magnesium treatment for neuroprotection in ischemic diseases of the brain. *Exp Transl Stroke Med* 2013;5(1):6.
175. Wojtowicz JM, Marshall KC, Hendelman WJ. Depression by magnesium ion of neuronal excitability in tissue cultures of central nervous system. *Can J Physiol Pharmacol* 1977;55(3):367-372.
176. Wolf FI, Trapani V. Cell (patho)physiology of magnesium. *Clin Sci (Lond)* 2008;114(1):27-35.
177. Wu J, Carter A. Magnesium: the forgotten electrolyte. *Aust Prescr* 2007;30:102-105.
178. Xie R-G, Zheng D-W, Xing J-L, Zhang X-J, Song Y, et al. Blockade of persistent sodium currents contributes to the riluzole-induced inhibition of spontaneous activity and oscillations in injured DRG neurons. *PLoS ONE* 2011;6(4):e18681. doi:10.1371/journal.pone.0018681
179. Yaari Y, Beck H. "Epileptic neurons" in temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol* 2002;12(2):234-239.
180. Yaari Y, Konnerth A, Heinemann U. Spontaneous epileptiform activity of CA1 hippocampal neurons in low extracellular calcium solutions. *Exp Brain Res* 1983;51(1):153-156.

181. Yang H, Hu L, Shi J, Cui J. Tuning magnesium sensitivity of BK channels by mutations. *Biophys J* 2006;91(8):2892-2900.
182. Yang J, Lent CM. Calcium depletion produces Na<sup>+</sup>-dependent, sustained depolarizations of Retzius cell membranes in leech CNS. *J Comp Physiol* 1983;150:499-507.
183. Yue C, Remy S, Su H, Beck H, Yaari Y. Proximal persistent Na<sup>+</sup> channels drive spike afterdepolarizations and associated bursting in adult CA1 pyramidal cells. *J Neurosci* 2005;25(42):9704-9720.
184. Zito K, Scheuss V. *NMDA Receptor Function and Physiological Modulation*. Elsevier 2009;1157-1164.

## СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

ЕЕГ	електроенцефалограм
ЦНС	централни нервни систем
ПТД	пароксизмални талас деполаризације
АП	акциони потенцијал
PDS	<i>енг.</i> paroxysmal depolarization shift
СА (СА1 – СА4)	<i>лат.</i> cornu Ammonis
ЕПСП	ексцитаторни постсинаптички потенцијал
$[K^+]_o$	концентрација $K^+$ у ванћелијској течности
$[K^+]_i$	концентрација $K^+$
$[Ca^{2+}]_o$	концентрација $Ca^{2+}$ у ванћелијској течности
$[Na^+]_o$	концентрација $Na^+$ у ванћелијској течности
VGSC	<i>енг.</i> voltage – gated sodium channel
$Na_v$	волтажно – зависни $Na^+$ канал
pH	<i>лат.</i> potentio Hydrogenii
$I_{NaT}$	транзијентна $Na^+$ струја
$I_{NaP}$	перзистентна $Na^+$ струја
TTX	тетродотоксин
TEA	тетраетиламонијум
$I_h$	хиперполаризацијом – активирана катјонска струја
$I_{K(Ca)}$	$Ca^{2+}$ – активирана $K^+$ струја
$K_{Ca}$	$Ca^{2+}$ – активирани $K^+$ канал
4-AP	4-аминопиридин
EBIO	1-етил-2-бензимидазолинон
EGTA	етиленгликол тетраацетат
FMRF-амид	неуропептид Phe-Met-Arg-Phe
EDTA	етилендиамин тетраацетат
ЕКГ	електрокардиограм
НМС	неуро – мишићна спојница



$[Mg^{2+}]_o$	концентрација $Mg^{2+}$ у ванћелијској течности
ВАРТА	1,2-bis( <i>o</i> -аминофеноксид)етан-N,N,N',N'-тетраацетат
NMDA	N-метил-D-аспартат
2 – APV	2-амино-5-фосфоновалеријанска киселина
GABA	$\gamma$ -аминобутерна киселина
$Mg^{2+}_o$	$Mg^{2+}$ у ванћелијској течности
$Mg^{2+}_i$	$Mg^{2+}$ у унутарћелијској течности
$K_{ir}$	улазно – исправљачки $K^+$ канал ( <i>енг.</i> inward rectifier)
$K_{ATP}$	АТР – сензитивни $K^+$ канал
$g_{Na^+}$	проводљивост мембране за $Na^+$
$[Na^+]_i$	концентрација $Na^+$ у унутарћелијској течности
$[Mg^{2+}]_i$	концентрација $Mg^{2+}$ у унутарћелијској течности
АТР	аденозин – трифосфат
ADP	аденозин – дифосфат
УОМ	улазни отпор мембране
$Sr^{2+}_i$	$Sr^{2+}$ у унутарћелијској течности
АМРА	$\alpha$ -амино-3-хидроксил-5-метил-4-изоксазол-пропионат
ВК	$Ca^{2+}$ – активиран $K^+$ канал велике проводљивости ( <i>енг.</i> big conductance)
ММП	мировни мембрански потенцијал
ИМР	<i>енг.</i> input membrane resistance
IC <sub>50</sub>	средња инхибиторна концентрација
МП	мембрански потенцијал
Ri	Рингеров раствор
$[Mg^{2+}]$	концентрација $Mg^{2+}$ у раствору
$I_{Na/K}$	струја пумпе за $Na^+$ и $K^+$
CNQX	6-цијано-7-нитроквиноксалин-2,3-дион

## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Марија Б. Станојевић, рођена је 07.12.1979. год. у Смедеревској Паланци. Медицински факултет Универзитета у Београду уписала је школске 1998/99. године. Током основних студија била је стипендиста Републичке фондације Министарства просвете за научни и уметнички подмладак. Дипломирала је 2007. год. са просечном оценом током студирања 9.37. Лекарски стаж је обавила у Дому здравља „Вождовац“ у Београду. Положила је државни испит и стекла звање доктора медицине 2008. год. Школске 2007/08. год. др Марија Станојевић уписала је специјалистичке академске студије из балнеоклиматологије и положила све испите предвиђене планом и програмом студија. Школске 2008/09. год. уписала је докторске академске студије из молекуларне медицине под менторством проф. др Владимира Недељкова, и положила све испите предвиђене планом и програмом. Од школске 2008/09. год. запослена је на Институту за патолошку физиологију „Љубодраг Буба Михаиловић“ Медицинског факултета Универзитета у Београду. Од 2010. год. ради у звању асистента на Катедри за патолошку физиологију. Др Марија Станојевић је од 2011. год. ангажована као истраживач сарадник на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, под називом „Базична и клиничко – фармаколошка истраживања механизма дејства и интеракција лекова у нервном и кардиоваскуларном систему“, чији је руководилац проф. др Милица Простран. Резултате свог истраживачког рада током пројектног циклуса од 2011 – 2015. год. презентовала је на бројним научним скуповима у земљи и иностранству. Добитница је више стипендија домаћих и страних научних друштава у области биофизике, неуронаука и електрофизиологије. На основу резултата истраживања спроведених у оквиру своје докторске дисертације до сада је објавила 17 публикација свега, од тога 4 чланка у целини у међународним часописима и 13 саопштења са међународних скупова. Др Марија Станојевић члан је Српског лекарског друштва, Лекарске коморе Србије, Друштва биофизичара Србије, Друштва неуронаука Србије и Друштва физиолога Србије.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Марија Б. Станојевић \_\_\_\_\_

број уписа \_\_\_\_\_ 08-DS-MM-15 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

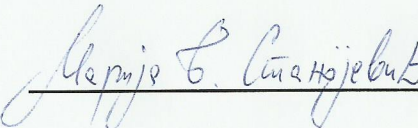
да је докторска дисертација под насловом

ИСПИТИВАЊЕ МЕХАНИЗМА СУПРЕСИВНОГ ДЕЈСТВА МАГНЕЗИЈУМА НА  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ИЗАЗВАНУ ЕПИЛЕПТИФОРМНУ АКТИВНОСТ  
РЕЦИЈУСОВИХ НЕУРОНА ПИЈАВИЦЕ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_ 25.05.2016. \_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Б. Станојевић

Број уписа 08-DS-MM-15

Студијски програм молекуларна медицина

Наслов рада ИСПИТИВАЊЕ МЕХАНИЗМА СУПРЕСИВНОГ ДЕЈСТВА МАГНЕЗИЈУМА НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО  
ИЗАЗВАНУ ЕПИЛЕПТИФОРМНУ АКТИВНОСТ РЕЦИЈУСОВИХ НЕУРОНА ПИЈАВИЦЕ

Ментор проф. др Владимир Недељков

Потписани Марија Б. Станојевић

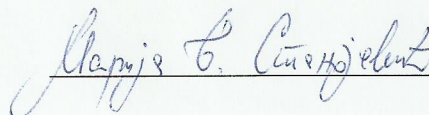
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 25.05.2016.





Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ИСПИТИВАЊЕ МЕХАНИЗМА СУПРЕСИВНОГ ДЕЈСТВА МАГНЕЗИЈУМА НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО  
ИЗАЗВАНУ ЕПИЛЕПТИФОРМНУ АКТИВНОСТ РЕЦИЈУСОВИХ НЕУРОНА ПИЈАВИЦЕ

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 25.05.2016.

