

In vitro effects of β -cyclodextrin-complexed rufinamide on magnesium-free artificial cerebrospinal fluid-induced epileptiform neural activity

Előd Bomher, Zsolt-András Nagy, Ádám Szentes, Rita-Judit Kiss, Károly Orbán-Kis, Tibor Szilágyi

Department of Physiology, George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science, and Technology of Târgu Mureș,

Abstract • Temporal lobe epilepsy (TLE) is a disorder of the central nervous system characterized by abnormal neuronal synchronization. It is one of the most common forms of focal epilepsy and accounts for a substantial proportion of pharmacoresistant cases. A major limitation of many antiseizure medications (ASMs) is their poor bioavailability, which significantly reduces therapeutic efficacy. β -Cyclodextrin (BCD), by increasing the solubility of ASMs, may enhance drug bioavailability and thus represent a novel therapeutic strategy. The aim of this study was to quantify the effects of BCD and BCD-complexed rufinamide (RUF) on discharge frequency and to investigate the dose-dependent effects of RUF on hippocampal neural networks in an in vitro model of TLE. Local field potentials were recorded from the CA3 pyramidal cell layer of the rat hippocampus. Seizure-like events (SLEs) were induced by perfusing brain slices with magnesium-free artificial cerebrospinal fluid (0MgACSF). Following the recording of five stable SLEs, the perfusion solution was switched to 0MgACSF containing either BCD (control) or BCD-complexed RUF (50 and 100 μ M). The timing of spike activity during the ictal phases was identified using a semi-automated method, after which frequency-based parameters were calculated. In our experiments, BCD alone significantly altered the decay slope compared with baseline conditions (0MgACSF), and the addition of RUF did not induce any further significant changes. BCD-complexed RUF retained its network-stabilizing effect and reduced hippocampal network load at both concentrations tested. Furthermore, a dose-dependent effect was observed: while 100 μ M RUF significantly shortened the duration of intensive firing, no such effect was detected at the lower concentration. Our results demonstrate that BCD, when used as a carrier molecule, intrinsically modulates ictal dynamics. BCD-complexed RUF retains its anti-seizure properties and shortens the intensive discharge phase in a dose-dependent manner. These findings highlight the therapeutic potential of the BCD–RUF complex, which warrants further in vivo investigation.

Keywords • temporal lobe epilepsy; beta-cyclodextrins; rufinamide; drug-resistant epilepsy; in vitro epilepsy model

DOI: 10.2478/orvtudert-2025-0006

Bulletin of Medical Sciences 2025, 98(1): 74–85

Introduction

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common form of focal epilepsy and accounts for a significant proportion

of refractory epilepsies [1]. In TLE, hippocampal sclerosis and other structural abnormalities of the temporal lobe are frequently observed, together with persistent reorganization of the hippocampus and parahippocampal network, all of which contribute to increased excitability and sustained network synchronization [2]. Although an increasing number of antiseizure medications are currently available, approximately 25–40% of patients with epilepsy still fail to respond adequately to treatment. The development of pharmacoresistance is particularly common in focal epilepsies [1]. This phenomenon under-

Corresponding author

Előd Bomher

George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science, and Technology, Department of Physiology
38 Gheorghe Marinescu Str., 540142 Târgu Mureș, Romania
bomher.elod@gmail.com

scores the need for novel therapeutic approaches.

Rufinamide (RUF) is a third-generation antiseizure medication (ASM) approved as an orphan drug for adjunctive treatment of Lennox–Gastaut syndrome (LGS) [3]. In addition, the drug has shown efficacy in other treatment-resistant focal epilepsies [4]. RUF is a triazole derivative whose primary mechanism of action involves prolongation of the inactivated state of voltage-gated sodium channels. Evidence from the literature also suggests a concentration-dependent effect, whereby RUF inhibits the type 5 metabotropic glutamate receptor (mGluR5) at a concentration of 100 μ M [5]. mGluR5 is a G-protein-coupled receptor that, under conditions of pathological glutamate release, increases intracellular calcium levels and sensitizes NMDA receptors. Inhibition of this pathway may help prevent the development of a hyperexcitable network state [6]. RUF is a highly lipophilic molecule with poor water solubility, a property that markedly limits its bioavailability and therapeutic efficacy [7]. Improving bioavailability is therefore essential for enhancing the therapeutic potential of RUF, and one possible approach is its complexation with β -cyclodextrin (BCD). BCD is a cyclic oligosaccharide that increases the solubility and stability of hydrophobic drugs through the formation of inclusion complexes [8]. Previous studies have demonstrated that BCD enhances the bioavailability of RUF [9] and that BCD itself may influence neuronal activity [10]; however, the combined effects of the BCD–RUF complex remain incompletely understood. To elucidate the cellular and network-modulating effects of the BCD–RUF complex, an appropriate experimental model is required. In vitro brain-slice preparations provide a well-controlled environment for studying hippocampal network activity. The magnesium-free model induces seizure-like events (SLEs) in brain slices [11,12] that closely resemble several electrophysiological features of human TLE and is therefore widely used for evaluating the effects of antiseizure medications [13].

The aim of the present study was to investigate the effects of BCD-complexed RUF on frequency-dependent parameters in an in vitro model of temporal lobe epilepsy and to determine whether the drug exerts a dose-dependent antiseizure effect.

Materials and Methods

Experimental animals and ethical approvals

Male Wistar rats aged 7–14 days were used in this study.

All experimental procedures involving animals were approved by the Ethics and Research Committee of the George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science, and Technology of Târgu Mureș (approval number: 1621/24.02.2022).

Chemicals and solutions

All chemicals required for slice preparation and experimentation were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Three artificial cerebrospinal fluid (ACSF) solutions with different compositions were used: preparation ACSF (pACSF; 87 mM NaCl, 75 mM sucrose, 25 mM glucose, 25 mM NaHCO₃, 7 mM MgSO₄, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, and 0.5 mM CaCl₂), normal ACSF (nACSF; 129 mM NaCl, 21 mM NaHCO₃, 10 mM glucose, 3 mM KCl, 1.8 mM MgSO₄, 1.6 mM CaCl₂, and 1.23 mM NaH₂PO₄), and magnesium-free ACSF (0MgACSF), which had a composition largely identical to that of nACSF but lacked MgSO₄. To compensate for osmolarity and further increase network excitability, the KCl concentration was increased to 5 mM.

To improve the poor aqueous solubility of rufinamide (RUF), BCD was dissolved at a concentration of 1% in 0MgACSF. Two BCD-complexed RUF solutions containing 50 μ M and 100 μ M RUF were then prepared from this stock solution. According to previously described protocols, the solutions were stirred for 24 hours at room temperature to facilitate complex formation [9].

Preparation of brain slices

Following rapid decapitation, the brains were immediately removed and placed in ice-cold pACSF. After removal of the cerebellum and frontal lobes, the brain tissue was affixed to the specimen tray of a vibrating-blade microtome (Leica VT1000S, Leica Biosystems, Deer Park, IL, USA) using ethyl 2-cyanoacrylate, and 400- μ m-thick transverse sections were prepared. During slicing, the tissue remained submerged in cold pACSF to reduce cellular metabolism and preserve tissue viability. Following sectioning, both hippocampi were isolated and transferred to an incubation chamber containing ACSF maintained at 36°C and continuously oxygenated with carbogen (95% O₂–5% CO₂).

Electrophysiological recordings

For electrophysiological recordings, slices were transferred to a perfusion chamber located within a Faraday cage. Continuous perfusion at a rate of 3 mL/min was

provided by a peristaltic pump (Minipuls 3, Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, France), and the solution temperature was maintained at 36°C using an in-line heater (TMP 5b, SuperTech, Switzerland). Microelectrodes were fabricated from borosilicate glass capillaries using a two-stage electrode puller (PUL-2, WPI, Sarasota, FL, USA) and filled with nACSF. Electrode resistance was routinely verified and maintained between 3 and 8 MΩ. The microelectrode was positioned in the pyramidal cell layer of the hippocampal CA3 region using a hydraulic micromanipulator (WR88, Narishige, Tokyo, Japan), and its final placement was confirmed under a light microscope.

Signals were acquired using a 1× preamplifier and a BioAmp SBA1-v6 amplifier (BioAmp SBA1-v6, SuperTech, Switzerland), with a bandwidth of 0.16 Hz–2 kHz and a sampling rate of 5 kHz. Data were digitized using a USB-6002 A/D converter (National Instruments, Austin, TX, USA).

The in vitro epilepsy model and drug treatments

Slices were initially perfused with nACSF for 5 minutes, during which physiological local field potentials (LFPs) were recorded. The perfusion solution (nACSF) was then switched to 0MgACSF to induce seizure activity. After the occurrence and termination of five SLEs, the perfusion medium was replaced with 0MgACSF containing BCD-complexed RUF at either 50 μM or 100 μM. Following the recording of five additional SLEs, washout was performed first with 0MgACSF and subsequently with nACSF.

Identification of seizures and definition of the parameters examined

Data processing was performed using Spike2 v8.01c (Cambridge Electronic Design) software. The periods corresponding to the application of the different solutions were marked, and the preictal, ictal, postictal, and interictal phases of each SLE were identified [14]. Ictal discharges were detected using a semi-automated procedure, and the resulting time points were subsequently processed in a MATLAB environment. Firing frequency was calculated using a sliding-window approach, whereby to each data point was assigned a value derived from five consecutive spikes. To objectively identify the stable middle phase of the seizure, the coefficient of variation (CV) was calculated over five-point windows and used to distinguish this phase from the more variable initial and terminal periods.

$$CV_{(i)} = \left(\frac{\text{standard deviation}_{i:i+4}}{\text{mean}_{i:i+4}} \right) \times 100$$

where $CV_{(i)}$ is the coefficient of variation calculated for the i -th data point, $\text{standard deviation}_{i:i+4}$ is the standard deviation of the five-point window extending from the i -th to the $(i+4)$ -th data point, and $\text{mean}_{i:i+4}$ is the corresponding mean value of the five-point window.

The stable phase was defined as the ictal interval during which $CV_{(i)}$ remained below 10%, a widely accepted threshold for low-variability datasets [15]. Outliers were subsequently excluded using the median absolute deviation (MAD) method, as this approach is less sensitive to extreme values than dispersion measures based on the mean and standard deviation [16].

To evaluate drug effects, the following parameters were determined: (1) maximum stabilized firing frequency (MSF) and average stabilized firing frequency (ASF) during the stable ictal phase; (2) decay slope, defined as the slope of a linear regression fitted between the MSF and the point at which the frequency reached half of its maximum value; (3) intensive firing duration (full width at half maximum, FWHM), defined as the period during which firing frequency exceeded 50% of the MSF. FWHM was also calculated using both individual seizure-specific MSF values and a global reference value corresponding to the mean MSF of SLEs recorded under 0MgACSF conditions (individual FWHM and global FWHM, respectively); and (4) area under the curve (AUC), which was used as an indicator of hippocampal excitatory load and calculated for the entire ictal phase using the trapezoidal rule based on instantaneous firing frequencies derived from consecutive spike intervals.

Data and statistical analysis

Prior to group comparisons (BCD control, 50 μM BCD-complexed RUF, and 100 μM BCD-complexed RUF), data were normalized to reduce inter-slice variability. For each slice, the mean value of the first five SLEs recorded under 0MgACSF conditions was defined as the 100% reference value.

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data normality was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test. Depending on the distribution of the data, either one-way analysis of variance (ANOVA) or the

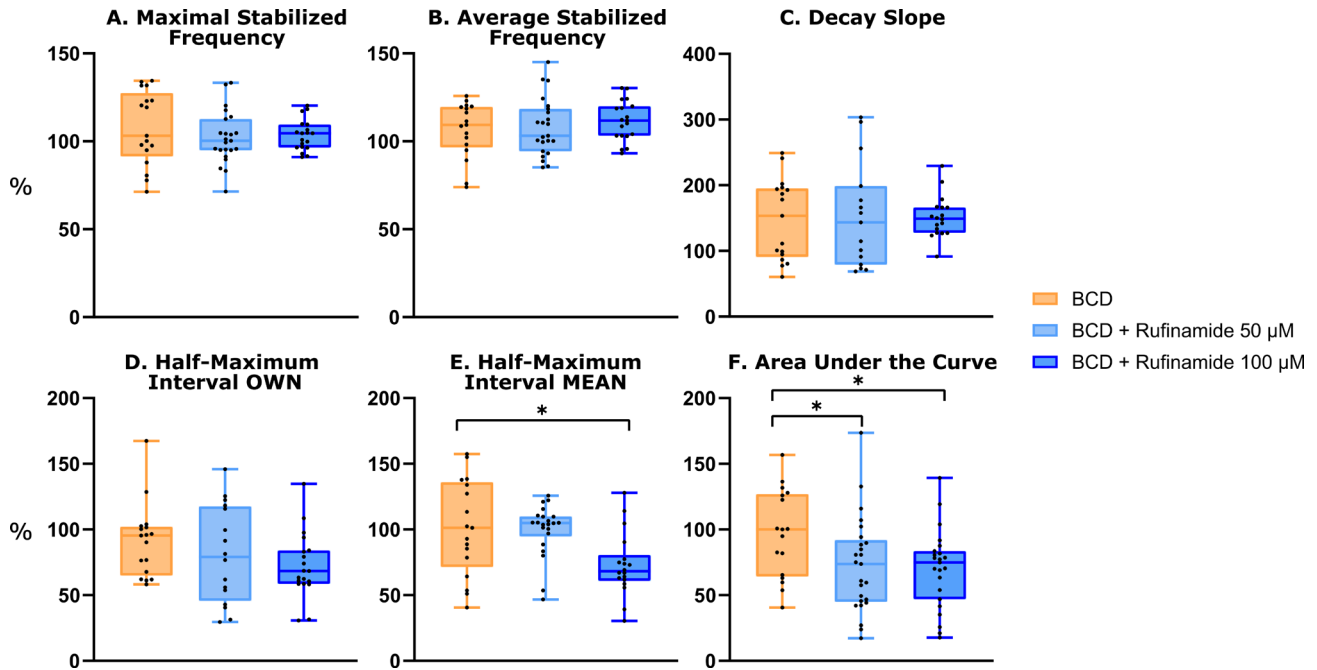


Figure 1. Parameters of the discharge frequency during the ictal phase in the presence of BCD and BCD-complexed RUF (50 and 100 µM).

Kruskal–Wallis test was applied. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Results

A total of 124 SLEs were identified in 18 hippocampal slices (six BCD, five 50 µM RUF, and seven 100 µM RUF slices), corresponding to 34, 38, and 52 SLEs in the BCD, 50 µM RUF, and 100 µM RUF groups, respectively.

Quantitative analyses were performed on the stabilized firing intervals defined in the Methods section, comparing the BCD and BCD-complexed RUF (50 and 100 µM) groups. One-way ANOVA revealed no statistically significant differences among the groups for MSF, ASF, decay slope, or individual FWHM (Figure 1A–D).

In contrast, one-way ANOVA demonstrated a significant group effect for AUC ($F = 3.639$, $p = 0.032$). Holm–Šidák post hoc analysis showed that AUC values were significantly reduced in both the 50 µM ($p = 0.050$) and 100 µM ($p = 0.045$) RUF groups compared with the BCD control group (Figure 1F).

For global FWHM, group differences were assessed using the non-parametric Kruskal–Wallis test, which revealed a significant effect ($p = 0.005$). Post hoc analysis demonstrated that only the 100 µM RUF group exhibited

a significant reduction compared with the BCD control group ($p = 0.028$) (Figure 1E).

Although no significant differences in decay slope were observed between the BCD control and BCD–RUF groups according to one-way ANOVA ($F = 0.04228$, $p = 0.959$), both BCD alone ($p = 0.004$) and BCD-complexed RUF at both concentrations produced significantly higher values ($p < 0.001$) than those measured under baseline 0MgACSF conditions (Figure 2A–B).

Discussion

This study investigated the concentration-dependent network effects of BCD-complexed RUF. Previous reports have indicated that BCD itself may influence SLEs in vitro [17]; therefore, the effects of the BCD–RUF complex were evaluated relative to a BCD control condition.

Our results demonstrated that RUF significantly reduced AUC at both concentrations tested, indicating that the drug retains its ability to reduce the excitatory load of neuronal networks even when administered as a BCD complex. At the same time, RUF exhibited a selective profile of action. It did not significantly alter the frequency characteristics of the active ictal phase (MSF and ASF) or the intensive firing duration defined relative

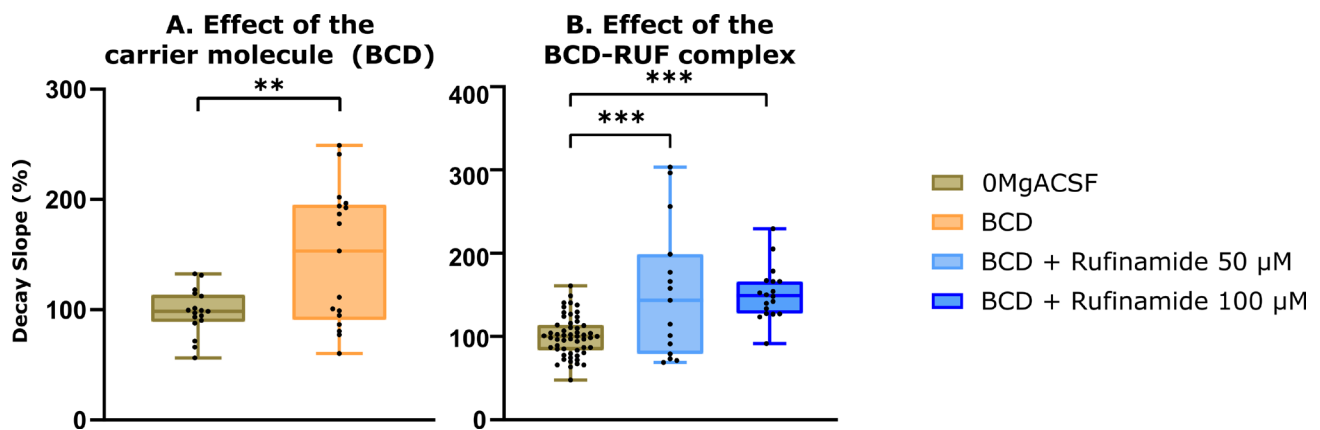


Figure 2. Comparison of the decay slope between baseline values (0Mg ACSF) and the BCD and BCD–RUF groups.

to the maximum frequency of each individual SLE. This selective effect is likely attributable to the specific pharmacodynamic properties of RUF, which exerts its antiseizure action primarily through prolongation of the inactivated state of voltage-gated sodium channels, thereby suppressing sustained repetitive neuronal firing [5].

A dose-dependent effect was also observed. While 100 μM RUF significantly reduced intensive firing duration compared with BCD alone, no such effect was detected at 50 μM. This finding may reflect the secondary pharmacological action of RUF that emerges at higher concentrations, namely inhibition of metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) [5].

Our findings further suggest that, whereas certain characteristics of the active firing phase are primarily determined by the specific mechanisms of action of RUF, the dynamics of ictal termination are influenced predominantly by the carrier molecule BCD. This observation supports the notion that BCD itself can modify seizure dynamics, potentially through modulation of GABA-A receptors [10]. Such ASM-independent effects may simultaneously facilitate the induction of SLEs while accelerating their subsequent decay.

One of the principal limitations of this study is that the experiments were conducted on isolated hippocampal slices, which do not reproduce the complex interregional connectivity that modulates epileptic network activity under physiological conditions [13]. Furthermore, acute brain slices obtained from healthy animals do not exhibit the chronic structural and functional alterations characteristic of epilepsy [2], nor do they reproduce the long-term neuroplasticity [18,19].

In addition, the *in vitro* model did not permit investigation of BCD transport across the blood–brain barrier

or its role in drug delivery, despite evidence suggesting such properties [8]. *In vivo*, rufinamide displays dose-dependent pharmacokinetics and a relatively low brain-to-plasma partition coefficient ($K_p \approx 0.5$) [20]. As these measurements were obtained using rufinamide dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) [20], future studies should investigate how BCD–RUF complexation influences brain exposure to rufinamide and whether it affects transport across the blood–brain barrier.

Conclusion

Our results demonstrate that the BCD carrier molecule itself modulates ictal dynamics relative to baseline 0MgACSF conditions. Compared with this control, BCD-complexed rufinamide at concentrations of 50 and 100 μM exerted a clear, selective, and significant additional antiseizure effect. Although RUF did not alter the fundamental frequency characteristics of the active ictal phase, it significantly reduced hippocampal network load, as reflected by decreased AUC values. Furthermore, the reduction in intensive firing duration (global FWHM) observed at 100 μM supports the existence of a dose-dependent dual inhibitory mechanism. Taken together, these findings indicate that the BCD–RUF complex possesses a promising pharmacological profile and merits further evaluation in *in vivo* studies.

List of abbreviations

- 0MgACSF: magnesium-free artificial cerebrospinal fluid
- ACSF: artificial cerebrospinal fluid
- ASF: average stabilized firing frequency

- ASM: antiseizure medication
- AUC: area under the curve
- BCD: β -cyclodextrin
- CV: coefficient of variation
- DMSO: dimethyl sulfoxide
- FWHM: full width at half maximum
- LFP: local field potential
- LGS: Lennox–Gastaut syndrome
- MAD: median absolute deviation
- mGluR5: type 5 metabotropic glutamate receptor
- MSF: maximum stabilized firing frequency
- nACSF: normal artificial cerebrospinal fluid
- pACSF: preparation artificial cerebrospinal fluid
- RUF: rufinamide
- SLE: seizure-like event
- TLE: temporal lobe epilepsy

References

- Brandon M K. Common Substrates of Medication-Resistant Temporal Lobe Epilepsy: Hippocampal Sclerosis, Focal Cortical Dysplasia, and Combined Pathologies. *Transl Neurosci Res Rev* 2019;2. <https://doi.org/10.36959/817/522>.
- Thom M, Eriksson S, Martinian L, et al. Temporal Lobe Sclerosis Associated With Hippocampal Sclerosis in Temporal Lobe Epilepsy: Neuropathological Features. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:928–38. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181b05d67>.
- Perucca E, Cloyd J, Critchley D, et al. Rufinamide: Clinical pharmacokinetics and concentration–response relationships in patients with epilepsy. *Epilepsia* 2008;49:1123–41. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01665.x>.
- Kim JY, Lee CG, Yu HJ, et al. The Efficacy and Tolerability of Rufinamide in Intractable Pediatric Epilepsy. *J Epilepsy Res* 2012;2:33–7. <https://doi.org/10.14581/jer.12009>.
- Arroyo S. Rufinamide. *Neurotherapeutics* 2007;4:155–62. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2006.11.006>.
- Huang L, Xiao W, Wang Y, et al. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) in epileptogenesis: an update on abnormal mGluRs signaling and its therapeutic implications. *Neural Regen Res* 2023;19:360–8. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.379018>.
- Mazzucchelli I, Rapetti M, Fattore C, et al. Development and validation of an HPLC–UV detection assay for the determination of rufinamide in human plasma and saliva. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011;401:1013–21. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5126-9>.
- Vecsernyés M, Fenyvesi F, Bácskay I, et al. Cyclodextrins, Blood–Brain Barrier, and Treatment of Neurological Diseases. *Archives of Medical Research* 2014;45:711–29. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.11.020>.
- Szabó Z-I, Gál R, Gall Z, et al. Cyclodextrin complexation improves aqueous solubility of the antiepileptic drug, rufinamide: solution and solid state characterization of compound-cyclodextrin binary systems. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2017;88:1–10. <https://doi.org/10.1007/s10847-017-0710-z>.
- Pytel M, Mercik K, Mozzrymas JW. Interaction between cyclodextrin and neuronal membrane results in modulation of GABAA receptor conformational transitions. *British J Pharmacology* 2006;148:413–22. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706747>.
- Anderson WW, Lewis DV, Swartzwelder HS. BRE 21901 Magnesium-free medium activates seizure-like events in the rat hippocampal slice n.d.
- Mody I, Lambert JD, Heinemann U. Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology* 1987;57:869–88. <https://doi.org/10.1152/jn.1987.57.3.869>.
- Dulla CG, Janigro D, Jiruska P, et al. How do we use in vitro models to understand epileptiform and ictal activity? A report of the TASK1–WG4 group of the ILAE/AES Joint Translational Task Force. *Epilepsia Open* 2018;3:460–73. <https://doi.org/10.1002/epi4.12277>.
- Zhang ZJ, Koifman J, Shin DS, et al. Transition to Seizure: Ictal Discharge Is Preceded by Exhausted Presynaptic GABA Release in the Hippocampal CA3 Region. *J Neurosci* 2012;32:2499–512. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4247-11.2012>.
- Carlson HL, Laliberté C, Brooks BL, et al. Reliability and variability of diffusion tensor imaging (DTI) tractography in pediatric epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 2014;37:116–22. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2014.06.020>.
- Leys C, Ley C, Klein O, et al. Detecting outliers: Do not use standard deviation around the mean, use absolute deviation around the median. *Journal of Experimental Social Psychology* 2013;49:764–6. <https://doi.org/10.1016/j.jesp.2013.03.013>.
- Kiss RJ, Nagy ZA, Szentes Á, et al. In vitro modulation of seizure-like activity with β -Cyclodextrin-complexed Rufinamide. *Acta Marisiensis - Seria Medica* 2024;70. <https://doi.org/10.2478/amma-2024-0020>.
- Huusko N, Römer C, Nnode-Ekane XE, et al. Loss of hippocampal interneurons and epileptogenesis: a comparison of two animal models of acquired epilepsy. *Brain Struct Funct* 2015;220:153–91. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0644-1>.
- Cameron MC, Zhan R, Nadler JV. Morphologic integration of hilar ectopic granule cells into dentate gyrus circuitry in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J of Comparative Neurology* 2011;519:2175–92. <https://doi.org/10.1002/cne.22623>.
- Gáll Z, Vancea S, Szilágyi T, et al. Dose-dependent pharmacokinetics and brain penetration of rufinamide following intravenous and oral administration to rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015;68:106–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.12.012>.

β -ciklodextrinnel komplexált rufinamid in vitro hatása magnéziummentes agy-gerincvelői folyadék által indukált epileptiform idegi tevékenységre

Bomher Előd, Nagy Zsolt-András, Szentes Ádám, Kiss Rita-Judit, Orbán-Kis Károly, Szilágyi Tibor

Marosvásárhelyi George Emil Palade Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány és Technológiai Egyetem, Élettani Tanszék

Összefoglaló • A temporális lebeny epilepszia (TLE) az idegsejtek kóros szinkronizációjával járó központi idegrendszeri kórkép. A fokális epilepsziák egyik leggyakoribb formája, mely a farmakorezisztens esetek jelentős hányadáért felelős. Számos antikonvulzív szer (ASM) hátránya a csökkent biodisponibilitás, ami jelentősen csökkenti a terápiás hatékonyságot. A β -ciklodextrin (BCD), mely növeli az ASM-ek oldékonyságát, javíthatja a gyógyszer biodisponibilitását és ezáltal egy új, terápiás megközelítést biztosíthat. Jelen tanulmányunk célja a BCD, illetve BCD-vel komplexált rufinamid (RUF) kisülési frekvenciára gyakorolt hatásának számszerűsítése, valamint a gyógyszer hippocampalis ideghálózatokat érintő dóziszfüggő befolyásának vizsgálata egy in vitro TLE modellben. Helyi mezőpotenciálokat regisztráltunk patkány hippocampus CA3 piramissejtrétegéből. A rohamszerű eseményeket (SLE) az agyszeletek magnéziummentes mesterséges agy-gerincvelői folyadékkal (OMgACSF) történő perfúziójával váltottuk ki. Öt stabil SLE regisztrálását követően a perfúziós oldatot BCD-t (kontroll), vagy BCD-vel komplexált RUF-ot (50 és 100 μ M) tartalmazó OMgACSF-re cseréltük. Az ictalis fázisokban regisztrált tüske-aktivitás (spike) időpontjait félautomata módszerrel azonosítottuk, majd ezekből frekvenciaalapú paramétereket számítottunk, amelyekkel számszerűsíthetővé tettük a BCD, valamint a RUF különböző koncentrációinak hálózatmoduláló hatását. Vizsgálataink során a BCD hordozómolekula az alapállapothoz (OMgACSF) képest szignifikánsan modulálta a lecsengési meredekséget, amelyben a RUF hozzáadása már nem okozott további szignifikáns változást. A BCD-vel komplexált RUF megőrizte hálózatstabilizáló hatását, és mindkét koncentrációban csökkentette a hippocampalis hálózati terhelést. Mindemellett egy dóziszfüggő hatást is azonosítottunk: míg a 100 μ M-os RUF szignifikánsan csökkentette az intenzív tüzelési időtartamot, ez a kisebb dózishoz nem volt megfigyelhető. Eredményeink rámutatnak, hogy a hordozómolekulaként alkalmazott BCD önmagában is modulálja az ictalis dinamikát. A BCD-vel komplexált RUF megőrzi rohamcsökkentő tulajdonságait, valamint dóziszfüggő módon lerövidíti az intenzív kisülési fázist. Mindezek alapján a BCD-RUF komplex szelektív farmakológiai profilja ígéretes terápiás potenciált vetít előre, amelynek in vivo modellekben történő validálása további vizsgálatokat igényel.

Kulcsszavak • temporális lebeny epilepszia, beta-ciklodextrin, rufinamid, farmakorezisztens epilepszia, in vitro epilepszia modell

DOI: 10.2478/orvtudert-2025-0006

Orvostudományi Értesítő 2025, 98(1): 74–85

Bevezetés

A temporális lebeny epilepszia (TLE) a leggyakoribb fokális epilepszia forma és a refrakter epilepsziák jelentős hányadáért felelős [1]. A TLE-ben gyakran észlelhető hippocampalis sclerosis és más temporális lebenyi strukturális eltérések, illetve a hippocampus és a parahippocampalis hálózat tartós átszerveződése, mindezek fokozott excitabilitáshoz és tartós hálózati szinkronizációhoz vezetnek

[2]. Bár napjainkban egyre több antikonvulzív szer áll rendelkezésre, az epilepsziás betegek mintegy 25-40%-a továbbra sem reagál megfelelően a kezelésekre [1]. A farmakorezisztencia kialakulásának aránya a fokális epilepsziák esetében különösen magas [1]. Ez utóbbi jelenség új terápiás megközelítések felkutatását teszi szükségessé.

A rufinamid (RUF) egy harmadik generációs rohamcsökkentő szer (*anti-seizure medication*, ASM) amelyet árva gyógyszerként (*orphan drug*) tartanak számon a

Lennox-Gastaut szindróma (LGS) kiegészítő kezeléseként [3]. Ezek mellett a gyógyszer hasznosnak bizonyult más terápia-rezisztens fokális epilepsziák esetében is [4]. A RUF egy triazol-származék, fő hatásmechanizmusa a feszültségfüggő nátriumcsatornák inaktivált állapotának megnyújtása, valamint a szakirodalom alapján vélhetőleg megjelenik egy koncentráció-dependens hatás is, ahol a RUF 100 μM -os koncentrációban gátolja az 5-ös típusú metabotróp glutamát-receptort (mGluR5) [5]. Az mGluR5 egy G-fehérjéhez kapcsolt receptor, amely kóros glutamát-felszabadulás esetén növeli az intracelluláris kalciumszintet, és túlérzékenyíti az NMDA-receptorokat [6]. Ennek a mechanizmusnak a gátlása hozzásegíthet a neuronhálózatok hiperexcitábilis állapotának elkerüléséhez [6]. A RUF egy erősen lipofil, vízben alig oldódó molekula, ez a tulajdonsága jelentős mértékben rontja a hatóanyag biohasznosulását és terápiás hatékonyságát [7]. A biodisponibilitás javítása elengedhetetlen a RUF terápiás potenciáljának növeléséhez, erre egy lehetséges megoldás a RUF β -cyclodextrinnel (BCD) történő komplexálása. A BCD egy ciklikus oligoszacharid, amely növeli a hidrofób gyógyszerek oldékonyságát és stabilitását zárványkomplexek képzése révén [8]. Előző kutatások igazolták, hogy a BCD valóban növeli a RUF biodisponibilitását [9], illetve, hogy BCD önmagában is befolyásolhatja az idegi aktivitást [10], de jelenleg nem teljesen tisztázott a BCD-RUF komplex hatáseggyüttese. A BCD-RUF komplex sejtszintű és hálózatmoduláló hatásainak pontosításához elengedhetetlen a megfelelő kísérletes környezet alkalmazása. Az *in vitro* agyszelet-preparátumok lehetőséget teremtenek a hippocampalis hálózatok aktivitásának vizsgálatára, jól kontrollálható mesterséges közegben. A magnéziumion eltávolításán alapuló modell az agyszeleteken olyan rohamszerű-eseményeket (*seizure-like events*, SLE) hoz létre [11,12], amelyek számos tekintetben emlékeztetnek a humán TLE-ben megfigyelhető elektrofiziológiai jelenségekre, ezért ez a modell széles körben alkalmazott a rohamcsökkentő szerek hatásának vizsgálatára [13].

Kutatásunk célja a BCD-vel komplexált RUF frekvenciafüggő paraméterekre kiváltott hatásának vizsgálata *in vitro* temporális lebeny epilepszia modellben, valamint egy lehetséges dózisfüggő rohammoduláló effektus kimutatása.

Anyag és módszer

Kísérleti állatok és etikai engedélyek

Kísérletünkben 7 és 14 nap közötti hím Wistar patkányo-

kat használtunk. Az állatokkal kapcsolatos összes beavatkozást a Marosvásárhelyi George Emil Palade Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány és Technológiai Egyetem Etikai és Kutatási Bizottsága előzetesen jóváhagyta (engedélyszám: 1621/24.02.2022).

Vegyszerek és oldatok

A szeletek megfelelő előkészítéséhez és a kísérlet véghezviteléhez szükséges vegyszereket a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) szereztük be. Kísérletünkben három különböző összetételű mesterséges agy-gerincvelői folyadékot (*artificial cerebro-spinal fluid*, ACSF) használtunk: preparáló ACSF (pACSF, összetétel 87 mM NaCl, 75 mM szacharóz, 25 mM glükóz, 25 mM NaHCO_3 , 7 mM MgSO_4 , 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH_2PO_4 és 0,5 mM CaCl_2), normál ACSF (nACSF, összetétel 129 mM NaCl, 21 mM NaHCO_3 , 10 mM glükóz, 3 mM KCl, 1,8 mM MgSO_4 , 1,6 mM CaCl_2 és 1,23 mM NaH_2PO_4), magnéziummentes ACSF (0MgACSF, összetétel azonos nagyrészt az nACSF oldattal, de nem tartalmazott MgSO_4 -ot, illetve a az ozmolaritás kompenzálása céljából a KCl koncentrációját 5 mM-ra változtattuk, ezáltal is növelve a hálózati ingerlékenységet.

A rufinamid (RUF) alacsony vízzoldékonyságának növelése érdekében 0MgACSF-ben 1%-os koncentrációban oldottunk fel BCD-t, majd ebből az alapoldatból készítettük el a két különböző (50 és 100 μM) RUF-koncentrációjú, komplexált oldatot, melyeket előzőleg vizsgált módszerek szerint 24 órán keresztül kevertünk, szobahőmérsékleten [9].

Az agyszeletek preparálása

A kísérleti állatok gyors dekapitációját követően az agyat késlekedés nélkül eltávolítottuk, majd azonnal jéghideg pACSF-be tettük. A kisagy és a frontális lebeny leválasztása után az agyat etil-2-cianoakriláttal egy rezgőkéses mikrotom tálcájára (Leica VT1000S, Leica Biosystems, Deer Park, IL, USA) ragasztottuk és 400 μm vastagságú transzverzális metszeteket készítettünk. A szeletelés közben az agy hideg pACSF oldatba volt merítve, ezzel lassítva a sejtek metabolizmusát és megtartva a szövetek életképességét. A szeletelést követően mindkét oldali hippocampust leválasztottuk és egy inkubációs kamrába helyeztük, 36°C, folyamatosan karbogénnel (95% O_2 – 5% CO_2) buborékolgatott ACSF-be.

Elektrofiziológiai mérések

Az elektrofiziológiai mérésekhez a szeleteket egy

Faraday-kalitrkába helyezett perfúziós kamrába tettük. A 3 ml/perc sebességű perfúziót egy perisztaltikus pumpával (Minipuls 3, Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, Franciaország) biztosítottuk, illetve a folyadék 36°C-ra történő melegítéséhez egy in-line melegítőt (TMP 5b, SuperTech, Svájc) használtunk. A regisztrációhoz boroszilikát kapillárisból készítettünk mikroelektrodát egy kétlépcsős elektródhúzó (PUL-2, WPI, Sarasota, FL, USA) készülékkel majd ezt nACSF-fel töltöttük fel. Minden alkalommal ellenőriztük, hogy a mikroelektroda ellenállása 3-8 MΩ között legyen. A mikroelektrodát a hippocampus CA3 régiójának piramissejtrétegébe egy hidraulikus mikromanipulátor segítségével (WR88, Narishige, Tokyo, Japan) helyeztük el, a végső pozíciót fénymikroszkóppal ellenőriztük.

A jelet egy 1x-es előerősítő, illetve egy BioAmp SBA1-v6 típusú erősítő (BioAmp SBA1-v6, SuperTech, Svájc) segítségével vezettük el, 0,16 Hz – 2 kHz sávszélesség és 5 kHz-es mintavételezés mellett. A jelek digitalizálását USB-6002 A/D kártyával végeztük (National Instruments, Austin, TX, USA).

Az in vitro epilepsziamodellel és a hatóanyag-kezelések

A szeleteket először 5 percen keresztül nACSF-fel perfundáltuk, regisztrálva a fiziológias körülmények mellett jelen lévő mezőpotenciálokat (*local field potential*, LFP). Ezután az nACSF-et 0MgACSF-re cseréltük és regisztráltuk a megjelenő rohamtevékenységet; 5 SLE lecsengése után a perfundáló oldatot olyan 0MgACSF-re változtattuk, amelyhez előzőleg BCD-vel komplexált RUF-ot adtunk különböző koncentrációkban (50 μM és 100 μM). Újabb 5 SLE regisztrálása után a kimosás következett, először 0MgACSF, majd nACSF oldattal.

A rohamok azonosítása és a vizsgált paraméterek definíciója

Az adatfeldolgozást Spike 2 v8.01c (Cambridge Electronic Design) szoftverrel végeztük, jelölve a különböző oldatok hatásának periódusát, valamint minden SLE esetében a preictalis, ictalis, postictalis és interictalis szakaszokat [14]. Az ictalis kisüléseket félautomata detekcióval azonosítottuk, az időpontokat pedig MATLAB környezetben dolgoztuk fel. A frekvenciaszámításhoz csúszóablakos módszert alkalmaztunk: minden adatponthoz az öt egymást követő spike-ból számított értéket rendeltük. Az így kapott idő-frekvencia adatsorokból a stabil középszakaszt objektív azonosítására az ötös ablakokon számított varianciaegyütthatót (*coefficient of variation*, CV) hasz-

náltuk, elkülönítve azt a fluktuáló kezdeti és terminális fázisoktól.

$$CV_{(i)} = \left(\frac{\text{szórás}_{i:i+4}}{\text{átlag}_{i:i+4}} \right) \times 100$$

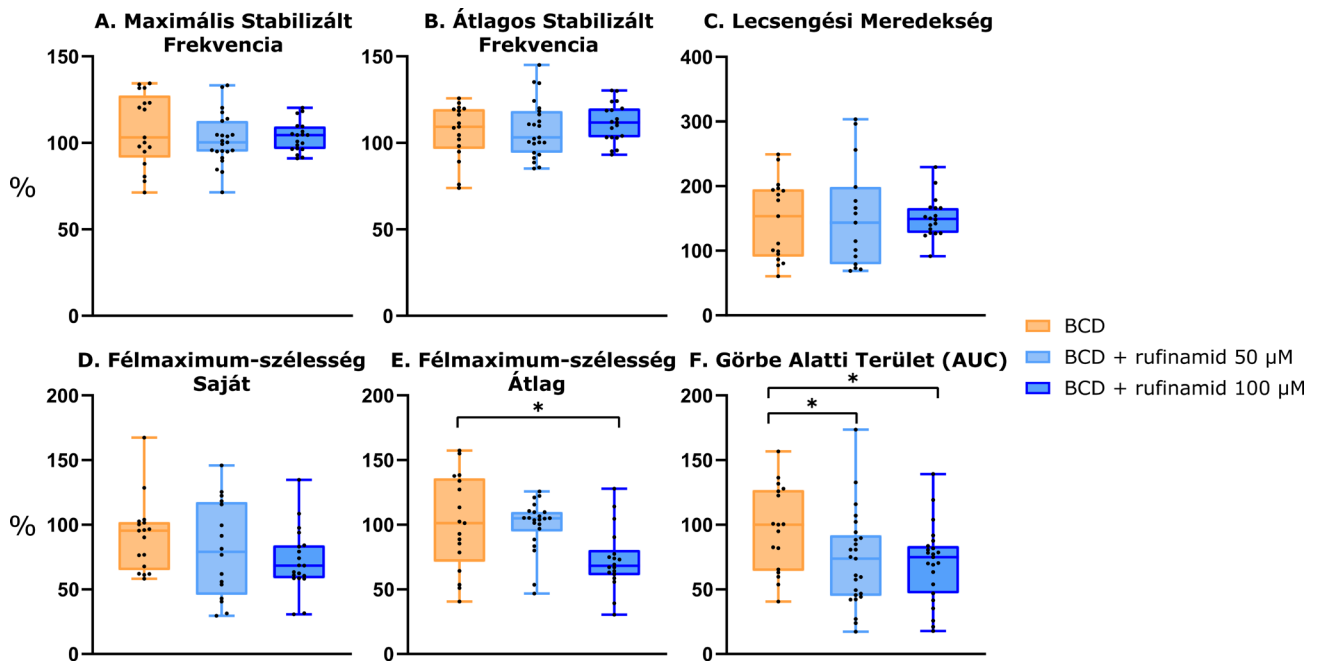
Ahol, $CV_{(i)}$ az i . adatponthoz tartozó varianciaegyüttható, $\text{szórás}_{i:i+4}$ az i . és $i+4$. adatponthoz tartozó 5 elemű ablak szórása, illetve $\text{átlag}_{i:i+4}$ az i . és $i+4$. adatponthoz tartozó 5 elemű ablak átlaga.

Stabil szakasznak tekintettük azt az ictalis intervallumot, melyben a $CV_{(i)}$ értéke 10% alatt volt, ez széles körben elfogadott standard az alacsony variabilitású adatok jellemzésére [15]. A kiugró értékeket a továbbiakban a medián abszolút eltérés (*median absolute deviation*, MAD) alapján szűrtük, mivel ez kevésbé torzul az extrém értékektől, mint az átlag és a standard deviáció szerinti szórásbecslések [16].

A farmakonhatás összehasonlításához az alábbi paramétereket határoztuk meg: (1) kiszámítottuk a stabilizált szakasz maximális (MSF) és átlagos tüzelési frekvenciáját (ASF); (2) lecsengési meredekség: a tüzelési frekvencia dekurzusát az MSF és annak félértékpontja közé illesztett lineáris regresszió meredekségével jellemeztük; (3) intenzív tüzelési időtartam (félmaximum-szélesség, FMSZ): meghatároztuk azt az intervallumot, amelyben a frekvencia meghaladta az MSF 50%-át; a számítást egyedi (roham-specifikus MSF) és globális (0MgACSF-ben regisztrált SLE-k átlagos MSF-je) referenciaértékek alapján is elvégeztük (FMSZ-saját illetve FMSZ-átlag); (4) AUC (görbe alatti terület): a hippocampalis excitatorikus terhelés kvantifikálásához az AUC értéket trapézszabály alkalmazásával, az egymást követő spike-intervallumokból számított pillanatnyi frekvenciák alapján határoztuk meg, a teljes ictalis szakaszra.

Adat- és statisztikai elemzés

A csoportok (BCD kontroll, 50 és 100 μM BCD-komplexált RUF) összehasonlítása előtt az adatokat normalizáltuk: az agyszeletek közötti variabilitás csökkentése érdekében, szeletenként az első 5 0MgACSF-ban regisztrált SLE átlagértékét tekintettük 100%-os referenciaértéknek. A statisztikai feldolgozást GraphPad Prism 8.0.2 szoftverrel (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) végeztük. Az adatok eloszlásának normalitását Kolmogorov-Smirnov teszttel ellenőriztük, és az eredmény függvényében egyutas ANOVA illetőleg Kruskal-



1. ábra. Az ictalis fázis kisülési frekvenciájának paramétereit: A-F BCD és BCD-komplexált RUF (50 és 100 μ M) jelenlétében

Wallis tesztet alkalmaztunk. A különbségeket $p < 0,05$ érték esetében tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Eredmények

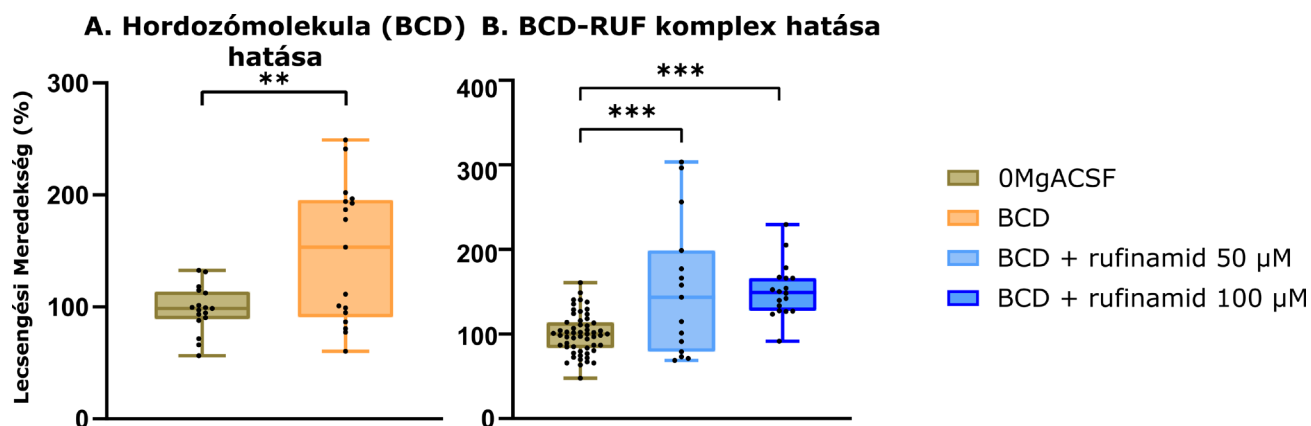
Összesen 18 szeleten (hat BCD, öt 50 μ M RUF, valamint hét 100 μ M RUF) 124 SLE-t azonosítottunk (34-et BCD, 38-at 50 μ M RUF, 52-t a 100 μ M RUF csoportban). A kvantitatív elemzéseket a módszertanban leírt stabilizálódott tüzelési intervallumokban végeztünk, összehasonlítva a BCD és BCD-vel komplexált RUF (50 és 100 μ M) csoportokat. Az MSF, ASF, lecsengési meredekség és FMSZ-saját paraméterek esetén egyutas ANOVA vizsgálatot végeztünk, ami nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget a csoportok között (**1. ábra A-D**). Ezzel szemben az AUC esetében az egyutas ANOVA szignifikáns eltérést mutatott ($f = 3.639$, $p = 0.032$), a Holm-Sidak féle post-hoc teszt alapján mind az 50 μ M ($p = 0.05$), mind pedig a 100 μ M ($p = 0.045$) RUF csoportok AUC értékei szignifikánsan csökkentek a BCD-hez viszonyítva (**1. ábra F**). Az FMSZ-átlag értékeinél a három csoport összehasonlítására Kruskal-Wallis non-parametrikus tesztet végeztünk ($p = 0.005$); a post-hoc analízis alapján a 100 μ M RUF mutatott egyedül szignifikáns csökkenést a BCD-hez képest ($p = 0.028$) (**1. ábra E**).

Bár a lecsengési meredekség nem mutatott szignifikáns eltérést a BCD-kontroll és a BCD-RUF csoportok között egyutas ANOVA vizsgálat során ($f = 0.04228$, $p = 0.959$), mind a BCD magában ($p = 0.004$), mind a két RUF csoport értékei ($p < 0.001$) szignifikánsan meghaladták a 0MgACSF közegben mért értékeket (**2. ábra A-B**).

Megbeszélés

Vizsgálatunk a BCD-vel komplexált RUF koncentrációfüggő hálózati hatásaira fókuszált. Korábbi irodalmi adatok alapján a BCD önmagában is befolyásolhatja az *in vitro* SLE-ket [17], ezért a BCD-vel komplexált hatóanyag hatását a BCD kontrollhoz viszonyítva értékeltük.

Eredményeink szerint a RUF mindkét koncentrációban szignifikánsan csökkentette az AUC értékét, ami igazolja, hogy a hatóanyag BCD-vel komplexálva is csökkenti a neuronhálózatok excitatorikus terhelését. Ugyanakkor a RUF szelektív hatásspektrumot mutatott, nem modulálta számottevően az aktív fázis frekvencia-jellemzőit (MSF, ASF) és az adott SLE maximumához mérten meghatározott intenzív kisülési időtartamot sem. Ez a szelektív profil vélhetőleg a gyógyszer specifikus farmakodinámiájával magyarázható, a RUF elsődlegesen a feszültségfüggő nátriumcsatornák inaktivált állapotának



2. ábra. A lecsengési meredekség összehasonlítása a bázisvonal értékei (0MgACSF), valamint BCD és BCD-RUF csoportok között.

megnyújtásával fejt ki rohamellenes hatását, gátolva az idegsejtek tartós, repetitív kisüléseit [5].

Megfigyeltünk továbbá egy dózisfüggő különbséget: míg a 100 µM-os RUF szignifikánsan csökkentette az intenzív tüzelési időtartamot a BCD-hez képest, az 50 µM-os dózisonál ez a hatás elmaradt. Ez a jelenség lehetséges, hogy megfelel a RUF magasabb koncentrációjánál fellépő másodlagos farmakológiai hatásnak, vagyis a metabotróp glutamát 5 (mGluR5) receptorok gátlásának tulajdonítható [5].

Eredményeink arra utalnak, hogy míg az aktív tüzelési fázis egyes paramétereit a RUF specifikus hatásmechanizmusai alakították, az ictalis lecsengés (lassulás) dinamikáját döntően a hordozómolekula BCD határozta meg. Ez arra utal, hogy a BCD önmagában is képes módosítani a rohamdinamikát, feltételezhetően a GABA_A receptorok modulációja révén [10]. Ez az ASM-független hatás egyszerre könnyítheti meg az SLE-k kiváltását és gyorsíthatja azok lecsengését.

Tanulmányunk egyik fő limitációja, hogy a kísérleteket izolált hippocampalis szeleteken végeztük, melyek nem tükrözik azokat a komplex interregionális kapcsolatokat, amelyek élettani körülmények között modulálják az epilepsziás hálózati aktivitást [13]. Továbbá, az egészséges állatokból nyert akut szeletek nem hordozzák magukkal az epilepsziára jellemző krónikus strukturális és funkcionális elváltozásokat [2] és a hosszú távú idegi plaszticitást [18,19].

In vitro modellünk nem tette lehetővé a BCD vér-agy gáton történő átjutásának és transzport-folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatát, jóllehet korábbi tanulmányok utalnak ezen tulajdonságára [8]. *In vivo* a rufinamid dózisfüggő farmakokinetikát mutat, és alacsony az

agy/plazma megoszlási hányadosa ($K_p \sim 0,5$) [20]. Ezeket a méréseket [20] dimetil-szulfoxiddal (DMSO) szolubilizált rufinamiddal végezték, ezért fontos lenne a továbbiakban meghatározni, hogy a BCD-RUF komplexálás hogyan befolyásolja a rufinamid agyi expozícióját és milyen szerepet játszik a vér-agy gáton történő átjutáson.

Következtetés

Eredményeink igazolják, hogy a BCD hordozómolekula önmagában is modulálja az ictalis dinamikát a 0MgACSF alapállapothoz képest. Ehhez a kontrollhoz viszonyítva a komplexált rufinamid (50 és 100 µM-os koncentrációkban) egyértelmű, szelektív és szignifikáns rohamcsökkentő többlethatást mutatott, bár az aktív fázis alapvető frekvencia-jellemzőit a hatóanyag nem módosította, a hippocampalis hálózati terhelést (AUC) szignifikánsan csökkentette. A 100 µM-os koncentrációnál megfigyelt intenzív tüzelési időtartam (FMSZ-átlag) rövidülése, alátámasztja a hatóanyag dózisfüggő, kettős gátló mechanizmusát. Mindezek alapján a BCD-RUF komplex szelektív farmakológiai profilja ígéretes terápiás potenciálra utal, melynek *in vivo* megerősítése további vizsgálatokat igényel.

Rövidítések jegyzéke

- 0MgACSF: magnéziummentes mesterséges agy-gerincvelői folyadék (magnesium-free artificial cerebrospinal fluid)
- ACSF: mesterséges agy-gerincvelői folyadék (artificial cerebrospinal fluid)
- ASF: átlagos stabilizált tüzelési frekvencia

- ASM: rohamcsökkentő szer (anti-seizure medication)
- AUC: görbe alatti terület (area under the curve)
- BCD: β -ciklodextrin
- CV: varianciaegyüttható (coefficient of variation)
- DMSO: dimetil-szulfoxid
- FMSZ: félmaximum-szélesség
- LFP: helyi mezőpotenciál (local field potential)
- LGS: Lennox-Gastaut szindróma
- MAD: medián abszolút eltérés (median absolute deviation)
- mGluR5: 5-ös típusú metabotróp glutamátreceptor
- MSF: maximális stabilizált tüzelési frekvencia
- nACSF: normál mesterséges agy-gerincvelői folyadék
- pACSF: preparáló mesterséges agy-gerincvelői folyadék
- RUF: rufinamid
- SLE: rohamszerű esemény (seizure-like event)
- TLE: temporális lebeny epilepszia

Irodalom

(Lásd az angol nyelvű cikk végén.)