

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar

XXXII. OTDK Biológia Szekció

**Stressz hatásának vizsgálata az epilepszia molekuláris  
szabályozásában vad típusú és Alzheimer-modell  
egértörzsekben**

Ivitz Eszter Virág  
Biológia MSc II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar  
Pszichiátriai Klinika

Témavezetők: Dr. Pákáski Magdolna  
Prof. Dr. Kálmán János

Szeged  
2014

# Tartalom

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| I. BEVEZETÉS .....                                                         | 2  |
| 1. Epilepszia .....                                                        | 3  |
| 2. Alzheimer-kór .....                                                     | 3  |
| 3. Stressz .....                                                           | 4  |
| 4. Stressz, Alzheimer-kór és epilepszia.....                               | 5  |
| 5. Alzheimer-egérmodell.....                                               | 6  |
| 6. Neuronok.....                                                           | 7  |
| 7. Glia.....                                                               | 7  |
| 8. Asztroglia .....                                                        | 9  |
| 8.1. Asztroglíózis és epilepszia .....                                     | 9  |
| 8.2. Asztroglíózis és Alzheimer-kór.....                                   | 10 |
| 8.3. Asztroglíózis .....                                                   | 10 |
| 9. ADK és GRIN1 .....                                                      | 12 |
| 9.1.1. ADK és Epilepszia .....                                             | 13 |
| 9.1.2. ADK és Alzheimer-kór .....                                          | 14 |
| 9.1.3. ADK- Adenozin-kináz .....                                           | 14 |
| 9.2.1. GRIN1 és epilepszia.....                                            | 18 |
| 9.2.3. GRIN1 .....                                                         | 20 |
| III. CÉLKITŰZÉS.....                                                       | 21 |
| IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....                                             | 22 |
| 1. Állatok.....                                                            | 22 |
| 2. Kezelés .....                                                           | 22 |
| 3. Teljes RNS izolálás és reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció ..... | 23 |
| 4. Real-Time Polimeráz láncreakció .....                                   | 24 |
| 5. Statisztikai analízis.....                                              | 25 |
| V. EREDMÉNYEK .....                                                        | 26 |
| VI. ÖSSZEFOGLALÁS .....                                                    | 31 |
| VII. IRODALOMJEGYZÉK .....                                                 | 35 |
| VIII. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS.....                                    | 48 |

## **I. BEVEZETÉS**

A stressz hozzátartozik mindennapi életünkhöz, bizonyos mértékű jelenléte szükséges az egészséges érzelmi és szellemi fejlődéshez. A stresszhelyzetek hosszantartó és túlzott mértéke a szervezet egyensúlyának felborulásához, valamint kóros adaptációs mechanizmusok beindításához vezethetnek és számos neurodegeneratív betegség kialakulásáért, mint Alzheimer-kór (AK) és epilepszia felelőssé tehetők. Dolgozatomban a stressz hatására kialakuló AK és epilepszia közötti esetleges kapcsolatot vizsgálatát tűztem ki célul. Milyen lehetséges út vezet a különböző stresszhatásoktól a betegségek kialakulásáig? Milyen közös mechanizmusok állnak ezen klinikailag élesen elkülöníthető kórképek hátterében? Dolgozatomban ezekre a kérdésekre keresem a választ.

## **II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

### **1. Epilepszia**

Az epilepszia a világ népességének mintegy 1 %-át érintő (65 millió beteg) krónikus neurodegeneratív megbetegedés. A betegek 80 %-a a fejlődő országok területén él. A teljes népesség 10 %-a élete során átélt legalább egy epilepsziás rohamot (Thurman és mtsai., 2011). Az epilepszia egymást követő, görcsaktivitással társuló rohamokban megnyilvánuló központi idegrendszeri betegség, mely bármely életkorban jelentkezhet. A neuronok szinkron működése, valamint a serkentő és gátló neuronrendszerek kóros interakcióján alapul, egyes idegsejtcsoportok túlműködése tehető felelőssé a görcstevékenység kialakulásáért, melynek alapvető ismérvei a visszatérő rohamok, átmeneti tudat-, és pszichés zavarok és a kóros EEG (elektroenkefalográfia). A legtöbb esetben a betegség oka nem ismert, de bizonyos esetekben neurodegenerációt követően is kialakulhatnak görcsrohamok. Maga a betegség gyógyíthatatlan, viszont az esetek 70 %-ában gyógyszerekkel jól kontrollálható, így megelőzhetőek a későbbi neuronpusztulással járó rohamok (Eadie, 2012). Az öregedéssel az epilepszia prevalenciája, sok más betegséghez hasonlóan növekszik, 80 év felett az emberek 5-10 %-ának már legalább egy rohama volt (Wilden, 2012), melyet 40-50 % eséllyel rövid időn belül követhet egy második (Berg, 2008).

### **2. Alzheimer-kór**

Az Alzheimer-kór (AK) a demenciák leggyakoribb formája, a világon 2006-ban 26,6 milliós betegszámot becsültek, míg feltételezések szerint 2050-re minden 85. ember AK-ban fog szenvedni (Brookmeyer és mtsai., 2007). Diagnosztikája máig nem megoldott, a vélt diagnózis megerősítése csupán post mortem mintákból történik. Főbb tünetei: a memória veszteség, szociális kapcsolatok romlása, beszédképességbeli deficit, számos kognitív károsodás a rövidtávú- illetve a hosszútávú memóriában. Az AK fő patológiai jellemzője az amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) aggregációja által a szenilis plakkok kialakulása, valamint a tau proteinek hiperfoszforilációja, melyek később neurofibrilláris kötegeket alkothatnak, ezáltal károsítják az idegsejteket, végül neuronpusztuláshoz vezetnek. A káros események, melyek az extracelluláris  $A\beta$  peptidek felhalmozódásához vezetnek még nem teljesen ismertek. Az AK két típusát különíthetjük el: a sporadikus, mely a gyakoribb, valamint a

familiáris AK-t, mely a betegek hozzávetőlegesen 5 %-át érinti (Cheng és mtsai., 2013). A familiáris formáit kialakító mutációkat illetően már konkrét adatok is rendelkezésre állnak (Xiong, 2005; Sleegers és mtsai., 2006) (1. táblázat). Az AK-s betegeknél klinikai adatok támasztják alá, hogy az epilepszia rizikója 6-10-szer nagyobb, mint más megbetegedések esetében.

|                                        | <b>Familiáris Alzheimer-kór mutációi</b> |       |       |                            |
|----------------------------------------|------------------------------------------|-------|-------|----------------------------|
|                                        | PSEN1                                    | PSEN2 | APP   | Down-kór (21-es triszómia) |
| Familiáris Alzheimer-kór prevalenciája | 6 %                                      | 1 %   | 0,5 % | < 2%                       |

1. táblázat. Familiáris Alzheimer-kórban szerepet játszó mutációk és a betegség prevalenciája. **PSEN1**-presenilin-1, **PSEN2**-presenilin-2, **APP**-amyloid prekursor protein. Xiong, 2005; Sleegers és mtsai., 2006 alapján.

### 3. Stressz

Kétféle stresszt különböztetünk meg az eustresszt és a distresszt. Az eustressz esetében pozitív hatásokat tapasztalunk, míg a distressz káros hatásokat gyakorol a szervezetre. Kutatások alapján elmondható, hogy a stressz számos neurodegeneratív betegség rizikófaktor, mind az AK-nak és az epilepsiának is (Maguire & Salpekar, 2013). A krónikus stressz bizonyítottan jelentős kockázati tényezője a depresszió, kognitív zavaroknak (McEwen és mtsai., 1999) és memória funkciók károsodásának (de Quervain és mtsai., 2009), gátolja az agyi strukturális és funkcionális plaszticitást, ezáltal szerepe lehet a demencia, depresszió, epilepszia és stroke kialakulásában is. Stressz hormonok, mint a kortizol (humán) és a kortikoszteron (rágcsálók) képesek megváltoztatni a szinaptikus funkciókat. Kutatások szerint a glükokortikoidok modulálják a serkentő szinaptikus transzmissziót (Karst és mtsai., 2005), szabályozzák a glutamát receptorokat, melyek a kogníció kialakulásában kiemelkedő jelentőségűek (Groc és mtsai., 2008; Yuen és mtsai., 2011). A serkentő glutamát válasznak elengedhetetlen szerepe van a hosszú távú

szinaptikus plaszticitás, tanulás és memória kialakításában (Bliss és Collingridge, 1993, Neves és mtsai., 2008). A glükokortikoidok által szabályozott mechanizmus kapcsolatot jelenthet a glükokortikoidok és a memória folyamatok modulálásában stressz során, így fontos szerepet játszhat az AK kialakításában. A szervezet fiziológias válasza a stresszre a HPA-tengely (hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg-tengely) által érvényesül. A mellékvesekéregből felszabaduló stresszhormonok számos agyterületen képesek hatásukat kifejteni az ott található glükokortikoid receptorokon keresztül.

#### **4. Stressz, Alzheimer-kór és epilepszia**

A káros distressz bizonyítottan szerepet játszik AK és epilepszia kialakításában. A stressz citoskeletonra gyakorolt hatásának időkinetikájával kapcsolatosan vannak már irodalmi adatok Sprague-Dawley patkányok esetében. Ezen eredmények szerint az ismételt immobilizációs stressz jelentősen befolyásolta a citoskeletális elemek expresszióját, mely dendrituske denzitás csökkenéséhez vezethet, ami az AK egyik patofiziológiai okaként is ismert (Sántha és mtsai., 2012).

A klinikumból származó számos adat megerősíti a feltételezést, hogy a stressz befolyással bír az epileptikus görcsaktivitás kialakulására (Maguire & Salpekar, 2013). A betegeknél az alap stresszhormon szint magasabb, mely nemcsak a rohamok előtt és alatt figyelhető meg, hanem a posztiktális szakaszokban is (Culebras és mtsai., 1987). A beszámolók szerint a betegek 30-64 %-a valamilyen stresszel teli eseményhez kötötte rohamának kialakulását (Lai & Trimble, 1997), míg EEG (elektroenkefalográfia) vizsgálatok során a betegek 70 %-ánál stressz stimulusra patológiás EEG regisztrátumot rögzítettek (Maguire & Salpekar, 2013). A stresszel teli élethelyzetek a betegek 58 %-ánál növelték a rohamok frekvenciáját (Temkin & Davis, 1984). Az irodalomban egyelőre még vita tárgya, hogy a stresszhormonok milyen hatással is bírnak ezen folyamatokban, mert míg a deoxikortikoszteron antikonvulzív hatású, addig a CRH (corticotrop releasing hormone) és a kortikoszteron prokonvulzív hatású, így egyelőre egy bimodális hatást feltételeznek (O'Toole és mtsai., 2014).

Irodalomból származó adatok megerősítik, hogy a stressz időtartam is jelentősséggel bír, mivel az akut stressz, állatvizsgálatok során, antikonvulzív (tónikus) gamma-amino-vajsav (GABAerg) gátlás növelése révén, míg a krónikus stressz

prokonvulzívnek mutatkozott (tónikus GABAerg gátlás nő, de egyúttal a neuroszteroidok koncentrációja csökken) (Maguire & Salpekar, 2013). Ez utóbbi esetben még számos kérdés felmerülhet a potenciális mechanizmust illetően, mivel egy feltehetően multifaktoriális komplex folyamatról beszélhetünk.

Az exogén stressz hatása főként a hippocampus és a prefrontalis cortex területén mutatkozik meg (Mozhui és mtsai., 2010). A hippocampus negatív feedback-et küld a HPA-rendszernek. A stressz hatására a hippocampus károsodik, ennek eredményeképpen a szabályzás felborul, a HPA-tengely hiperexcitábilissá válik, mely alapja lehet a később kialakuló további, mind epilepsziához, mind AK-hoz köthető neuronális károsodásoknak, valamint az azt követő asztrogliózisnak (Maguire & Salpekar, 2013).

## **5. Alzheimer-egérmodell**

A transzgén technika fejlődésével lehetőségünk nyílt eddig nehezen vizsgálható betegségek genetikai módszerek segítségével történő modellezésére. Ennek megfelelően egyre több transzgén állatmodellt állítottak elő AK vizsgálata céljából. A technika további fejlődése révén már nem csupán egy gént lehet beültetni, hanem akár két-három gént is, mely megnyitotta a lehetőségeket a nem monogénes betegségek vizsgálatai előtt is. Az egyik legelterjedtebb modell az APP (amyloid precursor protein) svéd mutációját és presenilin-1 funkcióvesztéses mutációját hordozó kettős transzgén egértörzs (<http://jaxmice.jax.org/strain/005864.html>). A humán APP-t expresszáló egerek esetében a degradáló mechanizmusok kevésbé tudnak az akkumuláció ellen hatni, így a betegség progresszió gyorsabb ezen állatoknál. A presenilin-1 mutáció következtében az enzim részlegesen elveszti hasító képességét, így a neuroprotekcióban betöltött szerepét sem tudja maradéktalanul ellátni. A kettős transzgén állatok molekuláris, viselkedési és hisztológiai karakterizációja az irodalomban jól ismert. Az állatok plakk képződése 6-8 hónapos korukban éri el a plateau-fázist, melyet egy intenzív beépülési fázis előz meg. A beépülés a subiculum területén kezdődik, majd fokozatosan a temporális kéregre terjed, végül az egész kérgi régiót érinti. A progresszió hamarabb elindul és gyorsabb lefolyású, mint monogénes transzgén modellek esetében, a hímek esetében ugyan később mutatkoznak az első hisztológiai jelek, a késői fázis tekintetében azonban nem találtak nemi dimorfizmust. Esetünkben különösen fontos, hogy az általunk használt kettős transzgén állatoknál

jelentős görcstevékenységet is leírtak. Az állatok 25 %-ának 3 hónapos kora előtt legalább egy görcsroham volt, míg ez az arány 4,5 hónapos korukra már 55 % (Minkeviciene és mtsai., 2009). A 4,5-5 hónapos korú transzgén egerek 33 %-ánál elhullást írtak le, az ezen állatoknál kialakuló nagyobb görcsaktivitás következtében (Ziyatdinova és mtsai., 2011).

## **6. Neuronok**

A neuronok, ektodermális eredetű sejtek, melyek elektro-kémiai szignalizáció segítségével serkenthetőek, így képesek a külvilág jeleire a köztük kialakuló szinapszisok révén választ generálni az idegrendszerben. Funkcionálisan 3 fő csoportba oszthatók: motoros-, érző és interneuronok csoportjára. Az általuk expresszált neurotranszmitterek alapján is csoportosíthatjuk, így megfigyelhetünk serkentő és gátló neuronokat. A neuronok sokfélesége maga után vonja az idegrendszer komplexitását, melyet egy finoman szabályzó rendszer tart egyensúlyban. Amennyien ez a rendszer felborul, teret ad különböző idegrendszert érintő betegségek kialakulásának. A neuronok alapvetően nem osztódnak, az élet során elpusztuló neuronokat két területen (hippocampus és szaglógumó) képződő neuronok pótolják (Waxman, 2005). Az öregedés fiziológia velejárója, hogy a neuronális pusztulás felgyorsul, a korlátozott mértékű neuronpótlás már nem képes az egyensúlyt fenntartani. Ennek következménye, hogy különböző kognitív problémák léphetnek fel, melyek az AK esetében különösen fontos szerepet kapnak.

Mind az AK, mind pedig az epilepszia szempontjából kiemelkedőek a glutamáterg rendszer idegsejtjei, melyek esszenciálisak a memória és a tanulás folyamataiban, de a gátló-serkentő egyensúly felborulása során kulcsfontosságúak lehetnek az excitotoxicitásban is, mely a neuronok további degenerációjával jár.

## **7. Glia**

A glia sejtek mezenhimális eredetű sejtek, melyek strukturális és metabolikus támaszt biztosítanak a neuronok számára, elengedhetetlenek a homeosztázishoz, a mielinhüvely kialakításában kulcsfontosságúak, valamint védik a neuronokat a külső károsító hatásoktól az agyban és a perifériás idegrendszerben egyaránt. A glia sejtek szerepet játszanak a migrációban a fejlődés alatt, modulálják a szinaptikus funkciókat és a plaszticitást. Regulálják az extracelluláris mikrokörnyezetet neurotranszmitterek, ionok és

víz koncentrációjának szabályozásával. Szigetelik az axonokat, szabályozzák a lokális véráramlást, hozzájárulnak a vér-agy gát kialakításához, celluláris immunitáshoz, regeneráló folyamatokhoz, valamint energiát szolgáltatnak az agyban (Devinsky és mtsai., 2013). A 2. táblázatban feltüntettem a fontosabb glia típusokat, és azok funkcióját.

| <b>Sejtek lokalizációja</b> | <b>Gliat típusai</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>Funkciója</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Központi idegrendszer       | <b>Asztrocita:</b><br>- <u>Fibrózus</u><br>(Fehér állomány)<br><br>- <u>Protoplazmikus</u><br>(Szürke állomány)<br><br>- <u>Radiális glia</u><br>(fejlődő idegszövet, epithelium, retina, kisagy)<br><br>-Müller sejtek (Retina)<br><br>-Bergmann glia (kisagy)<br><br>-Tanicita<br>(agykamrák endotélje) | -támasztás<br>-külső környezet szabályozása: ionok, kálium, neurotranszmitterek visszavétele a szinaptikus transzmisszióban<br>-kálcium szignalizáció<br>-purinerg receptorok aktivációja<br>-extracelluláris ATP felszabadítása<br><br>-neuronok migrációja a fejlődő idegrendszerben<br><br>-retina fejlődésében fontos<br>-szinaptikus plasticitás regulálása<br><br>-kisagy fejlődésében van szerepe<br><br>-periventrikuláris szervek kapillárisaival kapcsolat, cerebrospinális folyadék-központi idegrendszer közötti kommunikáció |
|                             | <b>Oligodendrocita</b><br>- <u>Perineuronális szatellita</u><br>(szürkeállomány)<br><br>- <u>Interfaszikuláris oligodendroglia</u><br>(fehérállomány)                                                                                                                                                     | -támasztás, neuronok metabolizmusának befolyásolása, elektromos szigetelés,<br><br>-mielin hüvely kialakítása                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|                             | <b>Mikroglia</b><br>(egész agyban)                                                                                                                                                                                                                                                                        | makrofák aktivitás,<br>neuronok metabolizmusának befolyásolása                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|                             | <b>Ependima sejtek</b><br>(belső üregek falában, plexus choroideus felszínén)                                                                                                                                                                                                                             | -epitheliális határfelület<br>-cerebrospinális folyadék szekréciója,<br>-vér-agy-gát rendszer kialakítása                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                             | <b>Schwann sejtek</b><br>(perifériás axonok)                                                                                                                                                                                                                                                              | -mielin hüvely kialakítása<br>-fagocitikus aktivitás                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Perifériás idegrendszer     | <b>Szatellita sejtek</b><br>(ganglionokban)                                                                                                                                                                                                                                                               | -funkcionális barrier<br>-kémiai környezet regulálása<br>-intracelluláris kalcium koncentráció szabályozása                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                             | <b>Enterális glia</b><br>(bél fal)                                                                                                                                                                                                                                                                        | -homeosztázisban                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

2. táblázat. A gliatípusok lokalizációja és funkciójuk. Boron & Boulpaep: Medical Physiology és Gulya Károly (2000): Neurocitológia felhasználásával.

## 8. Asztrogliia

Az asztrociták specializált gliasejtek, melyek a központi idegrendszerben (KIR) számos eszenciális funkciót ellátnak fiziológias körülmények között (2. táblázat). Kapcsolatban állnak a neuronokkal, vérerekkel és más asztrocitákkal. Nem excitábilis sejtek, a neuronokkal ellentétben nem képesek akciós potenciálok kialakítására, viszont serkentő glutamát hatására képesek változtatni az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációját, mely továbbterjed a szomszédos asztrocitákra is (Scemes & Giaume, 2006), ezáltal neuroaktív szubsztátok, gliotranszmitterek felszabadulását idézik elő. Ez a mechanizmus segít kontrollálni az agyi folyamatokat, vaszkuláris tónust, és neuronális aktivitást (Iadecola & Nedergaard, 2007, Halassa & Haydon, 2010). Asztrociták válaszul a KIR-t érintő károsodásokra reaktív asztroglizissal válaszolnak, mely patológiai jele a KIR-t érintő strukturális károsodásoknak. Asztroglizis során megváltozik metabolikus enzimeik expressziós mintázata, befolyásolva a neuronális működéseket (Haydon., 2012).

### 8.1. Asztroglizis és epilepszia

Temporális lebeny epilepsziában szenvedő betegek hippocampusában, valamint az epilepszia állatmodelljeiben is leírták a reaktív asztroglizis változásait (Cohen-Gadol és mtsai, 2004; Borges és mtsai, 2003; Shapiro és mtsai., 2008). Neuronveszteséget követően, reaktív asztroglizis során megnő az asztrociták mérete és mennyisége (Borges és mtsai, 2003; Shapiro és mtsai., 2008; Kron és mtsai., 2010), megváltozik ezen sejtek metabolikus enzimjeinek expresziója, mely érinti az adenosin kináz (ADK) expresszióját, ami a neuronális excitabilitás megváltozásához vezethet. Az extra- és intracelluláris adenosin szint egyensúlyáért a nukleozid transzporterek felelnek (Boison, 2009). Az intracelluláris adenosint az asztroglialis ADK adenosin-monofoszfáttá (AMP) foszforilálja (Boison, 2008). Az adenosin szerepet játszik a rohamok regulálásában, gátló neuromodulátoros hatása révén. Klinikumból származó adatok alapján emelkedett szint mutatható ki epilepsziás betegekben a rohamok után (During és mtsai., 2004). Az  $A_1$  adenosin receptor kiemelkedő szereppel bír, mivel csökkentheti a neuronális excitabilitást és a szinaptikus transzmissziót a posztzinaptikus membrán hiperpolarizációján keresztül, valamint gátolja a preszinaptikus transzmitter felszabadulást (Fredholm, 2005). Az adenosint csökkentő változások az asztrocita függő adenosin ciklus homeosztázisában epilepsziás görcsaktivitás

kialakulásának kedveznek. Az ADK epileptogenezis hipotézise szerint molekuláris kapcsolat áll fenn a reaktív asztrocitózis és neuronális diszfunkció között epilepszia esetén. A reaktív asztrogliózis ADK overexpresszióhoz vezet, mely görcsaktivitás kialakulását idézi elő az adenozin hatásának csökkentésével.

## **8.2. Asztrogliózis és Alzheimer-kór**

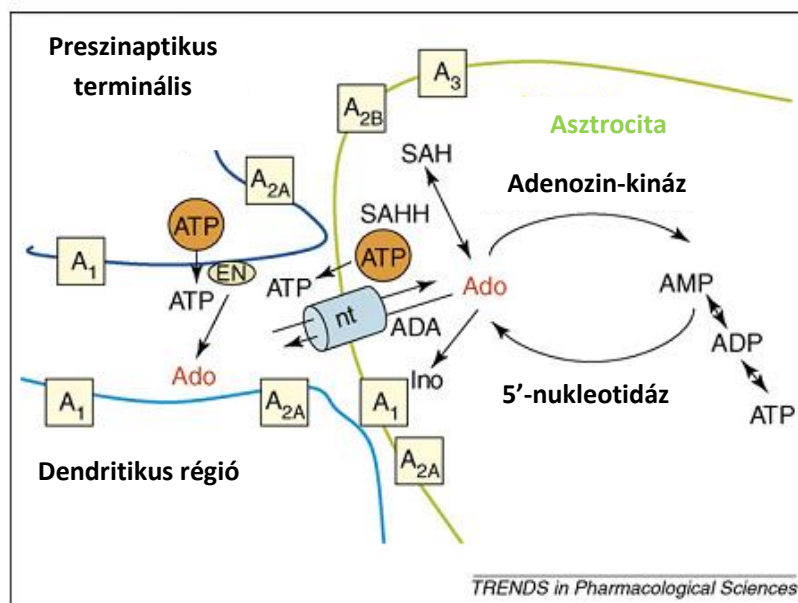
Az asztrogliózist mind AK-os betegek szövetében, mind Alzheimer-modell állatok agy izolátumaiban is megfigyelték (Nagele és mtsai., 2003; Olabarria és mtsai., 2010). Tanulmányok szerint korreláció áll fenn az asztrogliózis és a kognitív hanyatlás között (Simpson és mtsai., 2010). A reaktív asztrogliózist AK esetén számos faktor beindíthatja, mint a károsodott neuronok, gliák szignalizációja, valamint az extracelluláris A $\beta$  (DeWitt és mtsai., 1998). A betegség során fellépő korai szinaptikus károsodás mechanizmusa még nem teljesen ismert. Az asztrociták szerepe a szinaptogenezisben és a szinaptikus folyamatok fenntartásában alapvető. Az asztrogliális transzporterek szabályozzák az extraszinaptikus környezetet és védik a neuronokat a glutamát okozta toxicitástól vagy a lokális depolarizációtól, melyet a rendkívül magas mértékű K<sup>+</sup> akkumulációja okozhat. Fontos szerepük van a neurotranszmissziós folyamatokban (Alle és mtsai., 2009; Magistretti és mtsai., 2009). Az asztrociták korai disztrofiás változásai fontos lépést jelenthetnek az AK kialakulásában és progressziójában.

## **8.3. Asztrogliózis**

Az asztrogliákról korábban úgy gondolták, hogy csupán hely kitöltő szereppel bírnak az idegrendszerben. A tudomány fejlődésével az asztrogliák szerepéről való elképzeléseink megváltoztak. Mára már úgy gondoljuk, hogy az asztrociták strukturális és funkcionális kapcsolatban állnak a neuronokkal. Az asztrociták pre- és posztzinaptikus idegi terminálshoz kapcsolódva, harmadik szignalizációs elemként, a triparciális szinapszist kialakítva, fontos szerepet töltenek be szinapszis fiziológiai funkcióinak szabályozásában, elengedhetetlenek az információ szállításért az agyban (Halassa & Haydon, 2010; Haydon & Carmignoto, 2006). Az információszállítás esetükben más mechanizmusok révén történik, mint a neuronban, mivel ezek a sejtek nem képesek

depolarizálódni, így az információt funkcionális gap junction (réskapcsolat) kapcsolatok révén továbbítják.

A gliasejtek számos neurológiai betegség patogenezisében, mint epilepszia és AK esetén is, jelentős szerepet játszanak (Halassa és mtsai., 2007; Seifert és mtsai., 2006; Wetherington és mtsai., 2008 ). A neuronokból felszabaduló neurotranszmitterek, képesek bekötődni a gliák által expresszált receptorokhoz, így feedback hurkot alakítanak ki (Halassa & Haydon., 2010; Haydon & Carmignoto, 2006; Iadecola & Nedergaard, 2007). A serkentő neurotranszmitterek, mint a glutamát, kiváltja a  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulását az asztrocitákban, így létrejöhet a hosszú távú kommunikáció (Guthrie és mtsai., 1999; Schemes & Giaume, 2006), mely diffúzió révén valósul meg (Verkhratsky és mtsai, 1998). Számos gliotranszmitter, mint a glutamát, adenosin-trifoszfát (ATP), adenosin és D-szerin, képes  $\text{Ca}^{2+}$  függő módon felszabadulni. A glutamát képes aktiválni a preszinaptikus terminális receptorait, aktiválva a metabotróp glutamát receptor 1 (mGluR1) vagy N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorokat, ezáltal képesek spontán, excitátoros szinaptikus áramlás kiváltására (Fiacco & McCarthy, 2004; Jourdain és mtsai., 2007). Az asztrogliális ATP az extracelluláris adenosin legjelentősebb forrása (Pascual és mtsai, 2005; Serrano és mtsai, 2006; Zhang és mtsai., 2003), mely felelős az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  hullám propagációjáért (Guthrie és mtsai., 1999; Bowser & Khakh, 2007) . Az ATP extracelluláris térbe történő felszabadulása után az ektonukleotidáz AMP-vé hidrolizálja, majd 5'-nukleotidáz az AMP-t adenosinná alakítja (Zimmermann & Braun, 1996), mely a szinaptikus aktivitás modulátora, G-protein kapcsolt adenosin receptor típusokat aktiválja ( $\text{A}_1$ ,  $\text{A}_2$  és  $\text{A}_3$ ) (Fredholm és mtsai., 2005) (1. ábra). Az  $\text{A}_1$  receptorok  $\text{K}^+$  csatornákkal állnak kapcsolatban, ezáltal szerepe van a neuronok hiperpolarizációjában és excitabilitásuk csökkenésében (Newman, 2003). Az ATP felszabadulása excitátoros aktivációhoz vezethet, mind a  $\text{P}_2\text{X}$  receptorok stimulálásával a szomszédos neuronokon, vagy gátló folyamatokhoz az  $\text{A}_1$  receptorok aktiválásával, ATP adenosinná történő extracelluláris hidrolízise után. Zhang és munkatársai tanulmánya alapján hippocampális kultúrában az ATP felszabadulása a stimulált asztrocitákból elnyomja a neuronális glutamaterg transzmissziót a  $\text{P}_2\text{Y}$  receptorok direkt aktivációján keresztül (Zhang és mtsai, 2003).



1. ábra. Az adenosin metabolizmusának útvonalai. **AMP**-adenozin-monofoszfát; **ADP**-adenozin-difoszfát; **ATP**-adenozin-5'-trifoszfát; **SAH**-S-Adenozil-homocisztein; **SAHH**- S-Adenozil-homocisztein-hidroláz; **ADA**-Adenosin-deamináz; **Ino**-Inozin; **EN**-ektonukleotidáz; **Ado**-Adenosin; **nt**-nukleozid transzporter; **A<sub>1</sub>**, **A<sub>2A</sub>**, **A<sub>2B</sub>**, **A<sub>3</sub>**- Adenosin receptorok. Boison (2006) alapján.

## 9. ADK és GRIN1

Az ADK-t az asztrociták termelik, fő funkciója az intracelluláris adenosin foszforilációja, mely egy gátló neuromodulátoros molekula, negatív feedback kör része. A triparciális szinapszisban az asztrociták a glutamát hatására ATP-t szabadítanak fel, melyek gátlóan hatnak a neuronokra (Mota és mtsai., 2014). Az asztrociták adenosint vesznek fel és az ADK segítségével visszaalakítanak több lépésen keresztül ATP-vé (1. ábra) (Aronica és mtsai., 2013). Stressz alatt az adenosin extracelluláris koncentrációja jelentősen megemelkedik, mely potenciális protektív szerepére utal.

Az NMDA (N-metil-D-aszpartát) receptor két alegységből áll, egyes alegysége a GRIN1 által kódolt fehérje, amely nélkül a receptor nem képes működni. Az NMDA receptor központi szerepet játszik mind az epilepsziához köthető sejthalálban, mind pedig az A $\beta$  okozta szinapszis vesztésben. Kutatások szerint az NMDA receptor képes receptorként megkötni az A $\beta$ -t, amely excitotoxikus sejthalált eredményez. A fibrilláris A $\beta$  gátolja a glutamát reuptake-t, ami a hiperexcitabilitáshoz vezet, ami az epilepszia patomechanizmusának alapját is adja (Paula-Lima és mtsai., 2013). A neuronpusztulás

következtében csökken NMDA receptorok mennyisége, így a késői AK-ban NMDA receptor hipoaktivitás jellemző, mely korrelációt mutat a kognitív képességek hanyatlásával is (Lakhan és mtsai., 2013; Paula-Lima és mtsai., 2013; Mota és mtsai., 2014). Mind az AK-t, mind az epilepsziás rohamokat a neuronpusztulás jellemzi, melyet aztán reaktív asztroglíózis követ. Ezzel párhuzamosan az ADK expresszió is megemelkedik, ami végül az adenosin rendszer összeomlását eredményezi. Az ADK overexpresszió önmagában is elegendő hiperszikron tevékenység kialakításához (Boison, 2012). Fontos kihangsúlyoznunk, hogy az adenosin rendszer fokális összeomlása önmagában nem elegendő a klinikai tünetek kialakulásához. Ezek alapján potenciálisan a GRIN1 (és így az NMDA receptor) lehet másik molekula, mely elősegíti az adenosin rendszer összeomlását követő görcsaktivitás terjedését.

### **9.1.1. ADK és Epilepszia**

Epilepszia esetén az adenosin koncentrációjának az agyban döntő szerepe van a görcstevékenységre való fogékonyságban (Boison, 2006). Transzgén kísérletek bizonyították, hogy az ADK túltermelése csökkenti az extracelluláris adenosin szintjét, ezáltal epilepsziás görcsaktivitást idéz elő. Az ADK overexpresszióját hipertrófiás asztrocitákban elsőként meziális temporális lebeny epilepszia egérmodelljében azonosították (Gouder és mtsai., 2004). Kainát injekcióval kiváltott epilepszia egérmodelljében, kezelést követő nyolcadik héten 177 %-os ADK enzimatisz aktivitás növekedést tapasztaltak hippocampusban, mely a görcsaktivitást segítheti elő (Gouder és mtsai., 2004). Ezt a lehetséges kapcsolat az asztroglíózis és az iktogenezis között, melyet humán meziális temporális lebeny epilepszia esetén is tapasztaltak, amit számos hisztopatológiai változás is alátámaszt. Temporális lebeny epilepszia esetén a hippocampális szklerózis intenzív gliózissal társul, mely szelektív glutamáterg neuronpusztulással jár a hippocampus területén. A neuronvesztés, különösen a GABAerg interneuronok pusztulása és a gliózis hozzájárul a hippocampális epileptikus excitabilitás kialakulásához (Thompson és mtsai., 1998). Krónikus temporális lebeny epilepszia és poszttraumás rohamok kiindulópontja lehet egyes feltételezések szerint a gliális hegszövet.

Epilepszia állatmodelljeiben szinaptikus A<sub>1</sub> receptor denzitasz csökkenést figyeltek meg, mely rohamtevékenységet, konvulzív aktivitást indukált (Boison, 2008; Rebola és mtsai., 2003, Rebola és mtsai., 2005). Kutatások szerint az A<sub>1</sub> receptor expressziója humán

temporális lebeny epilepsziában még vitatott, a receptor down- illetve upregulációját egyaránt leírták (Angelatou és mtsai., 1993). Epilepsziás roham után az asztrocitákban az ADK fokozottan indukálódik, amely ezáltal molekuláris kapcsolatot jelenthet az asztroglíózis és epilepszia esetén fellépő neuronális diszfunkció között (Li és mtsai., 2008).

### **9.1.2. ADK és Alzheimer-kór**

Az asztroglia szerepe az A $\beta$  hasításában és metabolizmusában még vitatott, feltételezhetően az A $\beta$  degradálásában és fagocitózisában van szerepe (Rossner és mtsai., 2005; Nicoll & Weller, 2003). AK esetén leírták, hogy megváltozik az A<sub>1</sub> receptorok lokalizációs mintázata, illetve denzitása (Cunha és mtsai., 2010), mennyisége megnövekszik a hippocampusban, valamint a frontális kéregben előrehaladott stádiumú Alzheimer-kórban (Angulo és mtsai., 2003). A $\beta$  kitettség esetén az asztrociták és mikroglia aktiválódhatnak, hipertrófiás állapotban képesek elszeparálni a neuronokat az A $\beta$  fibrillumoktól, ezáltal betöltve neuroprotektív szerepüket. Asztrociták képesek megkötni és felvenni az A $\beta$ , így szerepük lehet az A $\beta$  akkumulálódásában (Mohamed & Posse, 2011). Az asztroglíózis következtében feltehetően az ADK expresszió is változik, mely teret adhat az görcsaktivitás kialakulásának.

### **9.1.3. ADK- Adenozin-kináz**

Az ADK patológiás mennyiségű növekedése az adenozin protektív hatásának károsodásához vezethet, mivel a gátló hatás csökkenésének következtében hiperexcitabilitás léphet fel (Shen és mtsai., 2011).

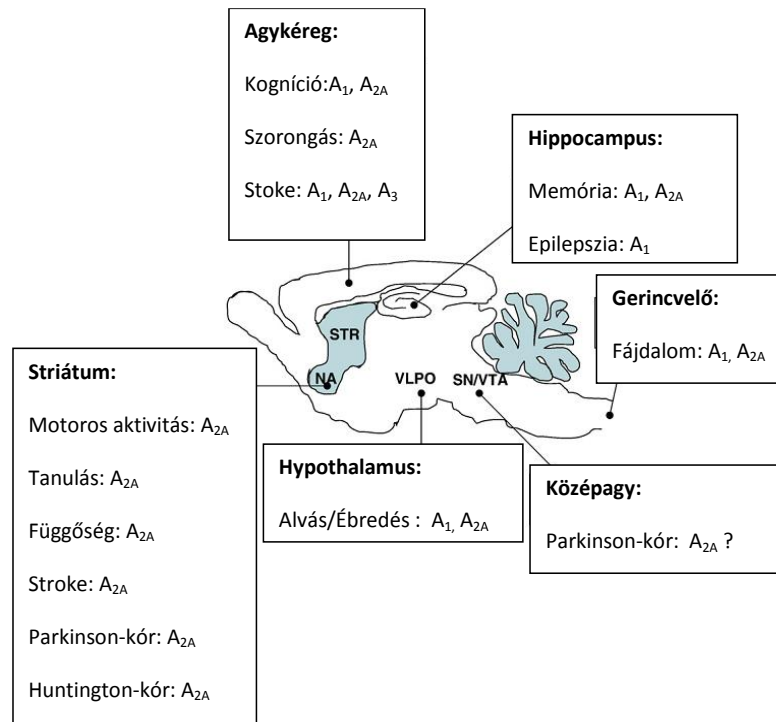
Az adenozin minden sejtben megtalálható, a purin nukleotid metabolizmus és más folyamatok termékeként (Cunha, 2001). Az adenozinnak szerepe van központi idegrendszer energia homeosztázisában, így neuroprotektív funkciókat lát el (Cunha, 2005; Ribeiro, 2005), illetve antikonvulzív (Boison, 2005; Fredholm mtsai., 2005) tulajdonságokkal bír. Részt vesz a neuronális excitabilitás szabályozásában számos neurotranszmitter felszabadulására hatva, mint a glutamát, a GABA, acetilkolin és dopamin, ezáltal a szinaptikus plaszticitást is befolyásolja. Az adenozin receptor négy típusa ismert (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub>), melyek különböző affinitásúak az adenozin megkötése szempontjából. A receptorok specifikus eloszlást mutatnak az agyban (Fredholm és mtsai., 2005) (3. táblázat). Az adenozin receptorok számos normális, illetve abnormális agyi

funkció modulálásában szerepet játszanak: neuronális plaszticitás, motiváció, alvás-ébrenlét ciklus, kognitív és emóciós folyamatok károsodásában, gyulladásos folyamatokban, illetve neuropszichiátriai betegségekben és patológiás agyi folyamatokban (3. táblázat. és 2. ábra).

| Adenozin receptorok            | Receptorok lokalizációja (agyban)                                                                                                            | Receptorok feladata                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A<sub>1</sub> receptor</b>  | (fokozott expresszió):<br>-hippocampusban<br>-cerebrális kéreg<br>-cerebelláris kéreg<br>-thalamikus magok                                   | -K <sup>+</sup> áramlás szabályozása → neuronális hiperpolarizáció                                                                                                                                                                                          |
| <b>A<sub>2A</sub> receptor</b> | Dopamin gazdag régiókban (nagyobb mennyiségben):<br>-striátum<br>-nucleus accumbens<br>(kevesebb mennyiségben):<br>-hippocampus<br>-agykéreg | -szinaptikus transzmisszió szabályozása<br>-szinaptikus plaszticitás kontrollálása<br>-glutamát felszabadulás szabályozása<br>-NMDA receptorok kontrollálása<br>-gyulladásos folyamatok<br><br>-növeli a transzmissziót a dopamin D2 receptorokon keresztül |
| <b>A<sub>2B</sub> receptor</b> | -alacsony mennyisége az agyban                                                                                                               | -Gs protein kapcsolt Adenilát-cikláz, cAMP, protein-kináz-A útvonal kapcsolat<br>-arachidonsav útvonallal kapcsolat                                                                                                                                         |
| <b>A<sub>3</sub> receptor</b>  | (fokozott expresszió)<br>-hippocampus<br>-cerebellum                                                                                         | -csökkenti az intracelluláris cAMP koncentrációját<br>-Ca <sup>2+</sup> mennyiségét szabályozza                                                                                                                                                             |

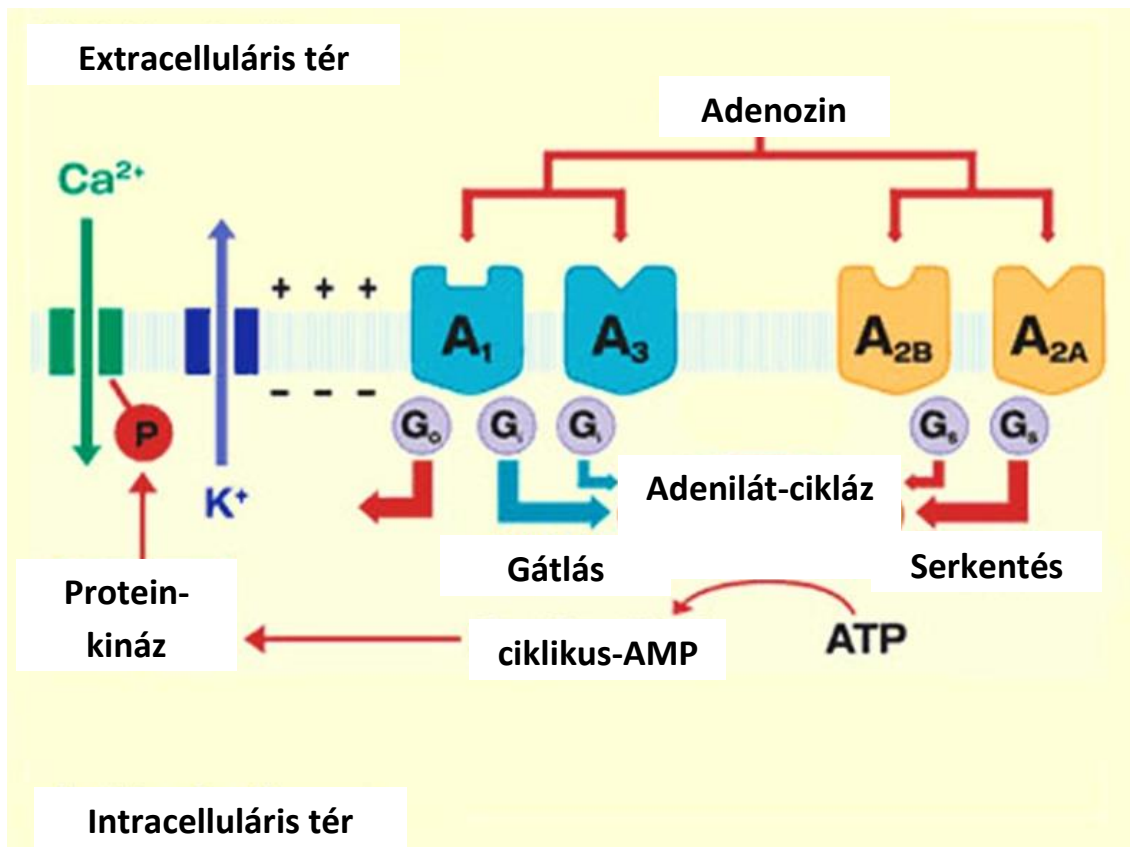
3. táblázat: A adenozin receptor típusok lokalizációja és szerepe az agyban. **NMDA receptor**-N-metil-D-aszpartát ; **cAMP**-ciklikus adenozin-monofoszfát;. Wei és mtsai. (2011) alapján.

Patológiás folyamatok során az extracelluláris adenozin koncentrációja megemelkedik, akár százszorosára. A megnövekedett koncentráció aktiválja az alacsonyabb affinitású adenozin receptor típusokat, melyek celluláris funkcióváltozást okoznak (Fredholm és mtsai., 2001; Latini & Pedata, 2001). Különböző neurológiai és pszichiátriai betegségek, mint ischemia, Huntington-kór, Parkinson-kór, depresszió, bipoláris zavarok, skizofrénia, fóbia, AK és epilepszia esetén bizonyítottan megváltozik az adenozin rendszer szabályozása (Gomes és mtsai., 2011).



2. ábra. Adenosin receptorok szerepe különböző fiziológias és patofiziológiai körülmények között, agyi régiók szerinti eloszlásuk knock-out modellek alapján. **STR**-striátum; **NA**-nucleus accumbens; **VLPO**-ventrolaterális preoptikus nucleus; **SN**-substantia nigra; **VTA**-ventrális tegmentális area; **A<sub>1</sub>**, **A<sub>2</sub>**, **A<sub>2A</sub>**, **A<sub>3</sub>**. adenosin receptor típusok. Wei és mtsai (2011) alapján.

Az adenosin gátló hatása az A<sub>1</sub> receptorok aktivációján keresztül érvényesül, melyek G-proteinekkel kapcsolva gátolják az adenilát-ciklázt, aktiválva a K<sup>+</sup>-csatornákat, gátolva a Ca<sup>2+</sup>-csatornákat és aktiválva a foszfolipáz C-t. Az N-típusú Ca<sup>2+</sup>-csatornákon keresztül cAMP szint emelésével (Yawo & Chuhma, 1993; Wu & Saggau, 1994) akadályozzák a görcstevékenységet, valamint elősegíti a neuroprotektív folyamatok beindulását (Ribeiro, 2005) (3. ábra).



3. ábra. Adenozin receptorok szignalizációja. ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ : Adenozin receptorok; ATP- adenozin-5'-trifoszfát; ciklikus AMP-adenozin-monofoszfát). Fredholm és mtsai. (2001) alapján.

[http://www.frontiersin.org/files/Articles/30507/fendo-03-00113-HTML/image\\_m/fendo-03-00113-g002.jpg](http://www.frontiersin.org/files/Articles/30507/fendo-03-00113-HTML/image_m/fendo-03-00113-g002.jpg)

Az  $A_1$  receptorok képesek posztzinaptikus hiperpolarizációt okozni a  $K^+$  konduktancia aktiválásával (Segal, 1982; Dunwiddie & Fredholm, 1989) és a neurotranszmitterek preszintaptikus felszabadulásának gátlásával (Dunwiddie & Hass, 1985; Ambrósio és mtsai., 1997).

Az  $A_{2A}$  receptoroknak is jelentős szerepe van a neurotranszmitterek felszabadulásának kontrollálásában több adenozin receptor által érintett agyi régióban (Sebastiano és Ribeiro, 1996), mind a gátló és serkentő válaszok mediálása révén (Fredholm és mtsai., 2001). A szinaptikus  $A_{2A}$  receptorok aktivációja képes down-regulálni az  $A_1$  receptorok hatását, ezáltal képes megerősíteni a krónikus epilepsziás folyamatokat (Ciruela és mtsai., 2006; Lopes és mtsai., 1999; Ekonomou és mtsai., 2000; Rebola és mtsai., 2003; Thompson és mtsai., 1992).

Az ADK-t overexpresszáló egerekben spontán görcsaktivitást írtak le (Fedele és mtsai, 2005), míg az ADK farmakológiai inhibíciója gátolja a görcsaktivitás létrejöttét számos epilepszia modellben (Kowaluk & Jarvis, 2000). Akut agysérülést követően az adenosin rendszer szerepe jelentős. Az extracelluláris adenosin koncentrációja ilyenkor megemelkedik (Pearson és mtsai, 2006), megtörténik az ADK down-regulációja, mely egy protektív mechanizmusként szolgál az agyban (Serrano és mtsai., 2006). Az asztrogliózis során az ADK mennyisége megnövekszik (Gouder és mtsai., 2004), melynek patológiás mértékű növekedése epilepsziás fókusz kialakulását segítheti elő. Az asztrogliózisra és krónikus görcsrohamok hatására az adenosin rendszer átalakul, amely későbbi rohamokat indukálhat. Az A<sub>1</sub> receptorok down-regulációja (Rebola és mtsai, 2003) és a metabolikus változások tehetők felelőssé az alacsonyabb adenosin koncentrációjáért az agyban, melyek kombinált megjelenését írták le epilepsziás patkányok hippocampusában (Rebola és mtsai, 2003). Az adenosin neuroprotekciónak jelentősen függ az A<sub>1</sub> receptoroktól, mivel a receptorok aktivációjának szerepe van epilepszia és stroke esetén a prekondicionálásban, ezáltal a később fellépő károsodásoktól is megvédi az agyat (Plamondon és mtsai, 1999).

### 9.2.1. GRIN1 és epilepszia

A gerincesek központi idegrendszerében a gyors excitátoros neuronális transzmisszióban ionotróp glutamát receptorok szerepe elengedhetetlen (Monaghan és mtsai., 1989; Boulter és mtsai., 1991). A glutamát receptorok stimulációja valószínűleg hatást gyakorol más neuronális funkciókra, a sejtek fejlődésére, túlélésére, a szinaptikus stabilizációra, plaszticitásra, szinaptikus hatékonyságra, valamint részt vehet akut és krónikus neurotoxicitással összefüggő betegségek kialakulásában (Meldrum & Garthwaite, 1991; Kennedy, 1994; Bettler & Mulle, 1995), valamint epilepsziában is. A klinikumból és állatkísérletes vizsgálatokból származó eredmények ellentmondásosak a GluN1 (glutamát receptor-1 alegysége) expressziója szempontjából, feltételezhetően azért, mert különböznek a vizsgálatokban alkalmazott technikák, illetve eltérőek az expresszió szempontjából vizsgált területek is. Nem radioaktív in situ hibridizációs tanulmányok szerint krónikus temporális lebeny epilepsziában szenvedő betegek hippocampális mintáiban GluN1-pozitív sejtek hiányát figyelték meg, mely összefügg a tapasztalt neuronvesztéssel és az Ammon-szarvban történő szklerózissal (Bayer és mtsai., 1995). A GRIN1 (glutamát receptor-1 alegységét kódoló gén) hipomorf egerek fejlődése során és

felnőtt korban hajlamosabbak a görcsaktivitásra (Hanks és mtsai., 2013). Mori és munkatársai tanulmánya alapján a GluN1 és a GluN2B (glutamát receptor 2B alegysége) alegységek feltehetően részt vesznek a kortikális excitabilitás és plaszticitás regulálásában humán agykéregben (Mori és mtsai., 2011). A fent leírtak alapján a GRIN1 molekula nagy jelentőséggel bírhat az epileptikus aktivitás kialakulásában.

### **9.2.2. GRIN1 és Alzheimer-kór**

Az NMDA receptorok funkcionális regulációjának károsodása számos neurodegeneratív betegségénél előfordul, mint az AK esetében is. Az NMDA receptor általi neurotranszmisszióknak fontos szerepe van a memória kialakításban, a tanulásban és a szinaptikus plaszticitásban (Zhao és mtsai., 2005). Tanulmányokban az NMDA receptorok túlaktiválódását írták le korai fázisú AK-ban (Parameshwaran és mtsai., 2008). Az A $\beta$  képes megemelni az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szintjét a GluN2B alegységből felépülő NMDA receptorokat expresszáló kortikális neuronkultúrában (Ferreira és mtsai., 2012), - habár a mechanizmust, melynek során az A $\beta$  képes szinaptikus deficitet okozni az NMDA receptorok bevonásával - még nem tisztázott. Humán vizsgálatok során Jacob és mtsai. (2007) beszámoltak a GluN1 alegység down-regulációjáról AK betegek esetén (Hynd és mtsai., 2004b). Az A $\beta$  oligomerek képesek kötődni az NMDA receptorokhoz extracellulárisan (Costa és mtsai., 2012; Querfurth & LaFerla, 2010), így ez Ca<sup>2+</sup> felhalmozódáshoz vezet, mely excitotoxikus folyamatok beindulását idézheti elő, ami kiemelkedő jelentőségű AK esetén (Alberdi és mtsai., 2010). AK egyénekben bizonyítottan kevesebb az NMDA receptor a frontális kéregben és a hippocampusban (Schaeffer és mtsai., 2008). Egy tanulmány szerint az NR1/NR2B receptor arány expressziós szintje csökkent AK-s betegekben, mely növelheti a betegség súlyosságát (Mishizen-Eberz és mtsai., 2004).

Ismert, hogy az AK korai tüneteit: epizódikus és munkamemória zavarát az oligomer A $\beta$  formák okozhatják dendrittüske veszteséget előidézve (Selkoe, 2002). Morfológiai és biokémiai szinaptikus változások az öregedés velejárói, melyhez hozzájárulhatnak az A $\beta$  károsító hatásai (Quiro-Baez és mtsai., 2013; Mezler és mtsai., 2012). Az A $\beta$  képes preszinaptikus terminális funkcióira hatni, LTP-t károsítani (Russel és mtsai., 2012) már nagyon kis koncentrációban, valamint fokozhatja a neurotranszmitterek felszabadulását (Puzzo és mtsai., 2011). Az endogén A $\beta$  peptidek befolyásolhatják a szinaptikus vezikulumok aktivitásfüggő felszabadulását, mely szinapszis veszteshez

vezethet, egyúttal a serkentő és gátló szabályozás felborulását eredményezheti (Abramov és mtsai., 2009). Patkány hippocampális neurontenyészetben az A $\beta$  oligomerek növelték a szinaptikus vezikulák inaktív fázisát, csökkentve a vezikulák endocitózist és regenerációját, ezáltal gyengébb szinaptikus transzmissziót idézve elő (Park és mtsai., 2013.) Az A $\beta$  kitettséggel rendelkező neuronokban kevesebb a szinaptikus vezikulumok száma, különösen a preszinaptikusan aktív zónákban (Parodi és mtsai., 2010). Tehát a GRIN1, ezáltal az NMDA receptoroknak is kulcsszerepe lehet mind az AK-hoz kapcsolódó memóriavesztésben, mind pedig az epilepszia kialakulásában. Irodalmi adatok igazolják, hogy az AK-os betegek között az epilepszia prevalenciája 10-22 % (Pandis & Scarneas, 2012). Transzgén Alzheimer-modellekben, ahol az amiloid overexpresszió jelentős, szintén nagyobb görcshajlamról számoltak be. Ezek a tények alátámasztják azon új elméletet, mely szerint az epileptikus görcsaktivitás hozzájárul az AK kezdeti lépései során a kognitív deficit kialakulásához, melyben kulcsfontosságú az NMDA receptor expressziós változása.

### **9.2.3. GRIN1**

Az NMDA receptorok a serkentő hatású glutamát jelátvitelben játszanak szerepet. Az NMDA receptorok alegységeit három gén család kódolja: GluN1, GluN2, GluN3 (Cull-Candy és mtsai., 2001). Az NMDA receptorok főként az excitátoros szinapszisok posztzinaptikus részén, a preszinaptikus axonterminálisokban, valamint az asztrocitákban lokalizáltak. Az asztrocitákban is expresszálandó NMDA alegységek a neuronális NMDA receptor alegységekhez hasonlóan, eltérően expresszálandók agyterülettől és fejlődési szakasztól függően. Az agyban GluN1 mRNS expressziója 67-88 %-a a többi receptor alegység génexpressziójához viszonyítva (Goebel & Poosch, 1999). Az alegység hiánya az élettel összeegyeztethetetlen, nélkülözhetetlen része az NMDA receptornak, melyet a GluN1 alegységet érintő transzgén egérmodelljével igazoltak. Az állatok, melyekben hiányzott a GluN1 gén, születés után órákon belül elpusztultak (Forrest és mtsai., 1994). A GluN1 knockout egerekben a hippocampus CA1 régiójában az alegység expressziója alacsony volt, ezáltal tanulási és memória zavarokat tapasztaltak, melyhez hozzájárult a szinaptikus plaszticitás, tanulás és memória deficit kialakulása. (Tsien és mtsai., 1996).

### III. CÉLKITŰZÉS

Irodalmi adatok szerint az Alzheimer-modell egértörzs (APP(swe)/PSEN(e9d)1) hajlamosabb görcsaktivitásra, feltehetően az amiloid overexpresszió miatt. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján a káros distressz befolyásolja a neurodegeneratív folyamatokat, mely AK-ban is tapasztalható. Kísérletünkben a stressz és a görcsaktivitás esetleges kapcsolatát szeretnénk vizsgálni Alzheimer-modell egértörzsben vad típusú egértörzshöz hasonlítva. Ezért az akut és krónikus stressz hatását vizsgáltuk a hippocampus és a prefrontális kéreg területén, mivel az irodalom alapján a stressz által ezek a területek erősebben érintettek. Az epilepsziás rohamok kiváltó okaként az ADK expresszió emelkedését írták le, mely gátolja az adenosin gátló neuromodulátor hatását. A GRIN1 expresszió csökkenését számos neurodegeneratív betegség esetén leírták, ezáltal előidézve a kognitív folyamatok károsodását, a serkentő-gátló neuromoduláció felborulását, ami görcsaktivitásra való hajlamot vonhat maga után. Kísérletünkben az ADK és GRIN1 molekulák mRNS expresszió változásaira voltunk kíváncsiak a hippocampus és a prefrontális kéreg területén akut (antikonvulzív) és krónikus stressz (prokonvulzív) kezelés hatására, melyek esetlegesen magyarázatot adhatnak az AK és epilepszia kialakulására mRNS szinten.

## IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 1. Állatok

Vizsgálatainkhoz felnőtt, hím állatokból álló (n=30; átlag súly 30 g) C57BL/6J egér törzset és APP svéd mutációját, valamint presenilin gén 9. exonjában deléciós mutációját hordozó dupla transzgén állatmodellt (APP(swe)/PSEN(e9d)1) használtuk (Dr. Sántha Miklós; MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézet). Kísérleteinket a laboratóriumi állatok gondozásával kapcsolatos alapelveket (NIH Publikáció No. 85-23), a Magyar Egészségügyi Bizottság által jóváhagyott állatgondozással kapcsolatos protokollt (1998), és az Európai közösségek Tanácsának 1986. november 24-i rendeletét (86/609/EEC) betartva végeztük. Kísérleteinkben törekedtünk a legkevesebb állat felhasználására, továbbá a felhasznált állatok szenvedéseinek minimalizálására. Az állatok tartása erre a célra kialakított állatházban, szobahőmérsékleten ( $22 \pm 1$  °C) és szabályozott páratartalom ( $55 \pm 5$  %) mellett történt. Az állatok a kísérlet alatt korlátlan mennyiségű rágcsálótápot és vizet kaptak.

### 2. Kezelés

Az állatok kezelése során akut és krónikus immobilizációs stresszt alkalmaztunk, melyek beállítása munkacsoportunk előzetes vizsgálatai alapján történtek (Sántha és mtsai., 2012). Az állatok a kezelés alatt egy 50 mL-es műanyag centrifugacsőben voltak, sötétben, naponta 5 órán keresztül. Az állatok kezelését a 4. táblázatban tüntettem fel.

| Név        | vad típus | Alzheimer-modell törzs | stressz kezelés   |
|------------|-----------|------------------------|-------------------|
| 1. csoport | (n=6)     | (n=6)                  | nincs (kontroll)  |
| 2. csoport | (n=6)     | (n=6)                  | akut (3 nap)      |
| 3. csoport | (n=6)     | (n=6)                  | krónikus (7 nap)  |
| 4. csoport | (n=6)     | (n=6)                  | krónikus (14 nap) |
| 5. csoport | (n=6)     | (n=6)                  | krónikus (21 nap) |

4. táblázat. Az állatok kezelése.

Az állatok testsúlymérése a kezelést megelőzően, minden vizsgálati időpontban megtörtént. Az egerek feldolgozását a stressz kezelést követő napokon végeztük (a kontroll csoport feldolgozása az 5. csoport állataival együtt). Az állatok kíméletes túlaltatása 6 %-os klorál hidráttal történt, majd endokardiális perfundálásukat 4 °C-os fiziológiás 0,9 %-os sóoldattal végeztük. A teljes hippocampus és prefrontális kéreg eltávolítása után megtörtént a két agyterület izolálása, majd a mintákat felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

### **3. Teljes RNS izolálás és reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció**

A mintákból teljes mRNS transzkriptomot izoláltunk jobb és bal oldali hippocamusból és prefrontális kéregből Nucleospin RNA II Total RNA isolation kit (k.sz.:740966.50, Macherey-Nagel, Düren, Germany) segítségével. Az izolálást a gyártó protokollja szerint végeztük, majd 0,5 µL RNáz inhitort (k.sz.: Fermentas, Glen Burnie, ML, USA) adtunk 40 µL eluált RNS-hez, az izolált RNS-t ezután felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

A reverz transzkripció előtt a mintáink RNS koncentrációját Nanodrop (NanoDrop-2000) készülék segítségével határoztuk meg. Az izolált mRNS mintáink cDNS-sé való átírásához High Capacity cDNA Rerverse Transcription kit-et (k.sz.: 4368814, Life Technologies Magyarország Kft.) használtunk a gyártó által ajánlott protokoll szerint. Mintánként 2000 ng RNS-t írtunk át cDNS-sé. A teljes reakciótérfogat 30 µl-e tartalmazta a 2000 ng RNS-t 15 µl nukleinsav mentes vízben és a 15 µl reverz transzkriptáz master mixet [3 µl random primer; 3 µl reverz transzkripció puffert; 1,2 µl (100 mM) dNTP mix; 1,5 µl MultiScibe TM reverz transzkriptáz; 0,75 µl RNáz inhibitor 40 U/ µl (Fermentas, Glen Burnie, ML, USA); és nukleinsav mentes víz (Ambion, Austin, TX, USA)]. Az átíráshoz C1000-Thermal Cycler (Bio-Rad) gépet használtunk. Az átírás három ciklusból állt: az első 25 °C-on 10 percig, a második 37 °C-on 120 percig, a harmadik ciklus 85 °C-on 5 percig zajlott. Az átírás után a mintákat 4°C-ra hűtöttük, majd 30 µl mintát 510 µl nukleáz mentes vízzel egészítettük ki, végül a Real-Time PCR-ig tárolásuk -20 °C történt.

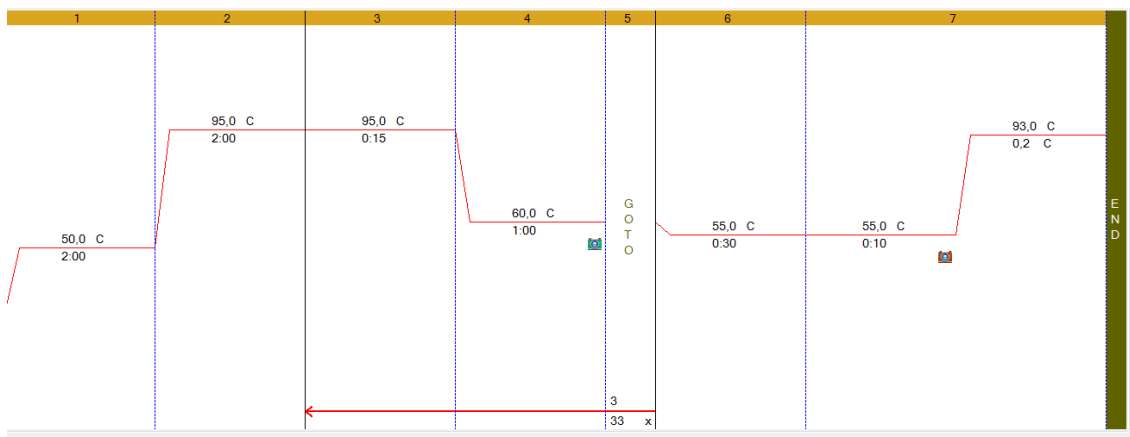
#### 4. Real-Time Polimeráz láncreakció

A mintáinkban található mRNS kimutatását kvantitatív real-time polimeráz láncreakcióval (qPCR) végeztük Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR gép (Bio-Rad Laboratories, Inc.) segítségével. A génspecifikus primerek tervezését <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> és <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> adatbázis felhasználásával végeztük, hogy kiválasszuk az egér specifikus mRNS szekvenciákat. A primerek szekvenciája az 5. táblázatban látható. Háztartási génként a gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenázt (GAPDH) használtuk. A negatív kontrollokban a templát cDNS-t vízzel helyettesítettük, valamint hozzáadtuk a többi reakcióban általunk használt primerpárokat is.

| Gén neve      | Forward 5'-3'        | Reverse 3'-5'         | Termék hossza |
|---------------|----------------------|-----------------------|---------------|
| <b>ADK</b>    | TTCAGGAGCCACACAAAGCA | CAGCACAAGTTCCTGTTGGC  | 144           |
| <b>Grin-1</b> | AACCAGGCCAATAAGCGACA | AGGATAGCGTAGACCTGGCT  | 134           |
| <b>GAPDH</b>  | TGTGTCCGTCGTGGATCTGA | TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG | 150           |

5. táblázat. A felhasznált primerek szekvenciája.

A qPCR reakció végtérfogata 20 µl volt, mely tartalmazta a 9 µl templát cDNS-t, a 0,5 µl forward és 0,5 µl reverse primer-t, a 10 µl SYBR® Select Master mix-et (Applied Biosystems®, Life Technologies Inc.). A qPCR során a következő hőmérséklet- és idő paramétereket alkalmaztuk: az UDG aktiváció 50 °C-on történt 2 percig; AmpliTaq® DNA Polymerase, UP aktivációja 95 °C-on 2 percig, a denaturáció 95 °C-on 15 percig, az annealing/extenziós lépés 60 °C-on 1 percig történt. Az ampifikáció után olvadáspont analízis történt, a hőmérséklet 0,2 °C/s-os emelésével 55 °C-tól 93 °C-ig 10 percig, folyamatos jelvétel mellett. A ciklus 33-szor ismétlődött a futás során (4. ábra). Minden futás során megtörtént a melt curve analízis. A relatív génexpresszió normalizálása a GAPDH-hoz történt. Eredményeink kiértékeléséhez a  $2^{\Delta\Delta C_t}$  módszert alkalmaztuk.



5.

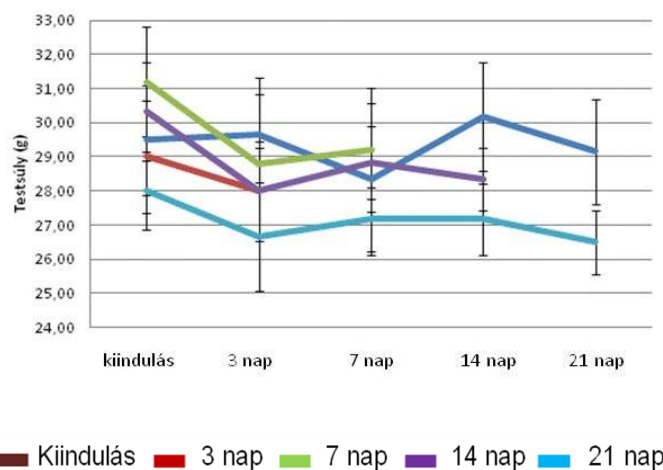
4. ábra. Az mRNS kimutatásához alkalmazott real-time PCR hőmérséklet- és időprofilja.

## 5. Statisztikai analízis

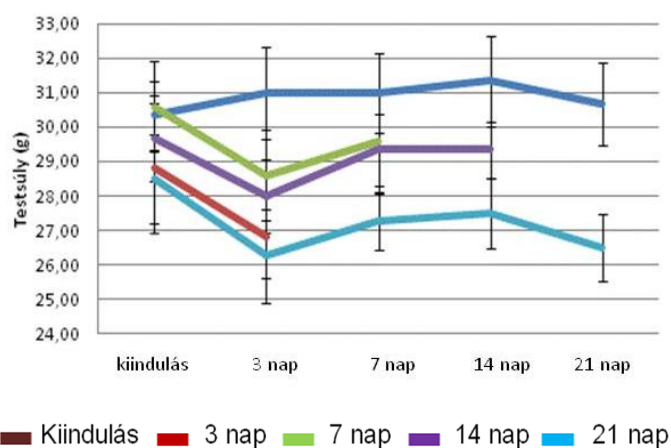
Az eredmények statisztikai analízisét SPSS 20.0 szoftver segítségével végeztük el Bonferroni és Tukey post hoc teszt felhasználásával. A csoportok összehasonlítása one-way ANOVA, majd Bonferroni és Dunett post hoc tesztek felhasználásával történt. Az adatokat átlag  $\pm$  S.D. (standard deviáció) formában jelenítettük meg. A szignifikancia szint:  $p < 0,05$  és  $p < 0,01$  volt.

## V. EREDMÉNYEK

Kísérletünk során az állatok testsúly monitorozása minden vizsgálati időpontban megtörtént, melynek eredményeként nem tapasztalunk szignifikáns változást (5. ábra és 6. ábra).

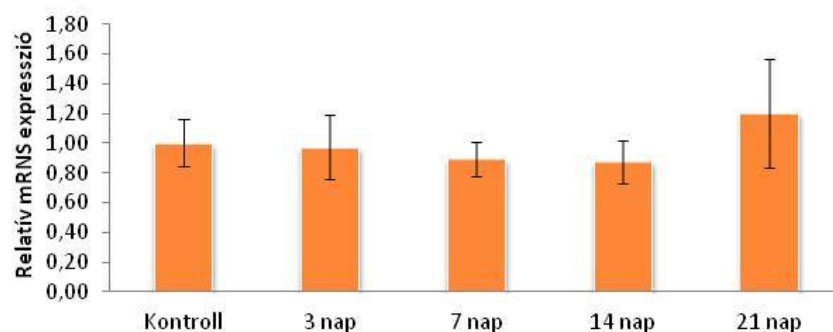


5. ábra. Vad típusú egértörzs testsúlyváltozása akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stresszkezelés hatására.



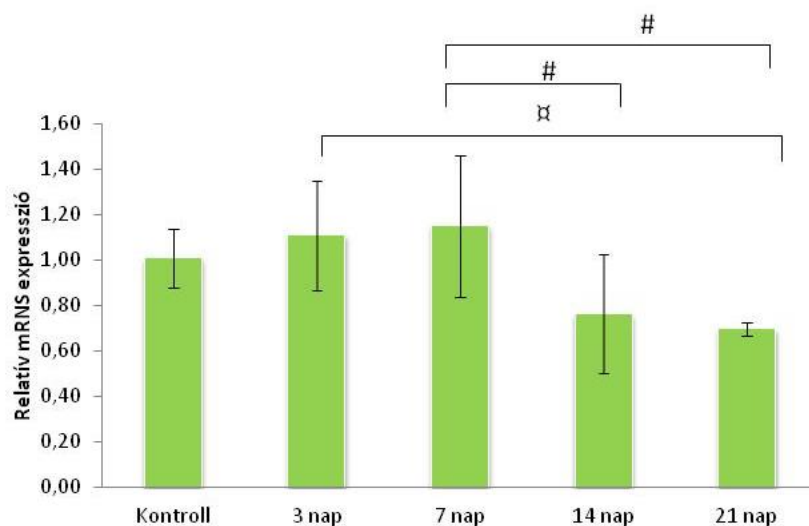
6. ábra. Alzheimer-modell egértörzs testsúlyváltozása akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stresszkezelés hatására.

A qPCR-al végzett expressziós vizsgálatok szerint a vad típusú egértörzs hippocampusában ADK mRNS expresszió szempontjából nem tapasztaltunk szignifikáns változást a kontroll csoporthoz viszonyítva (7. ábra).



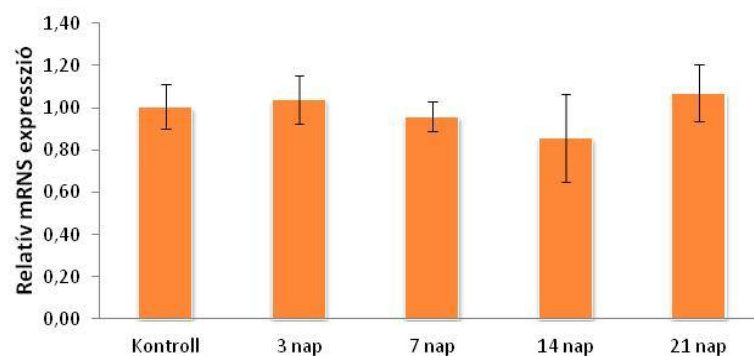
7. ábra. ADK mRNA expressziója vad típusú egértörzs hippocampusban akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stresszkezelés hatására.

A hippocampuszal ellentétben a prefrontális kéregben vad típusú egértörzs esetén az ADK expressziójában akut stressz hatására és a krónikus stressz 7. napján expresszió növekedést tapasztaltunk, míg a krónikus stressz 14. és 21. napján nem szignifikáns expresszió csökkenést figyeltünk meg. A prefrontális kéregben a 3. naphoz viszonyított 21. napon, 7. naphoz viszonyított 14. napon, valamint 7. naphoz viszonyítva a 21. napon szignifikáns csökkenést ( $p < 0,05$ ) mértünk az ADK mRNA expressziójában (8. ábra).

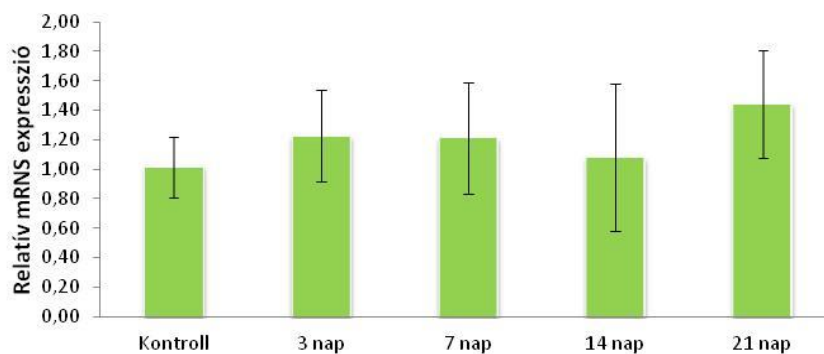


8. ábra. ADK mRNA expressziója vad típusú egértörzs prefrontális kortexében akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stresszkezelés hatására. Változás a kontroll csoporthoz viszonyítva, változás 3. naphoz és 7. naphoz viszonyítva.  $^{\#}p < 0,05$ ;  $\alpha p < 0,05$

Vad típusú egértörzs hippocampusábanban (9. ábra) és prefrontális kérgében (10. ábra) a GRIN1 expressziója a kontroll csoporthoz viszonyítva nem mutatott szignifikáns változást.

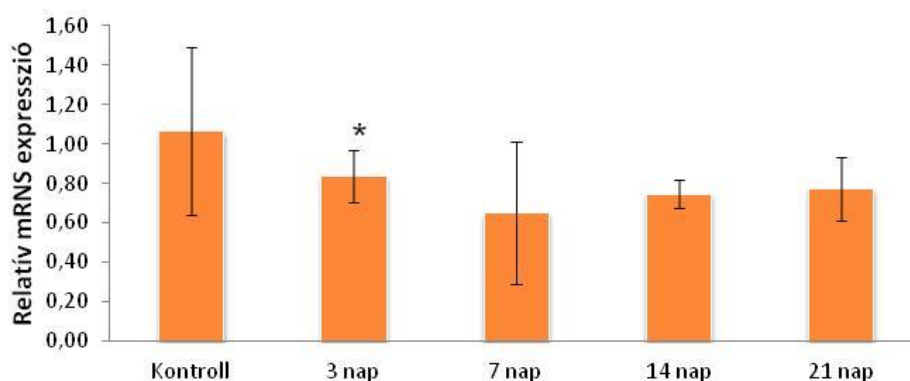


9. ábra. GRIN1 mRNA expressziója vad típusú egértörzs hippocampusában akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stresszkezelés hatására.



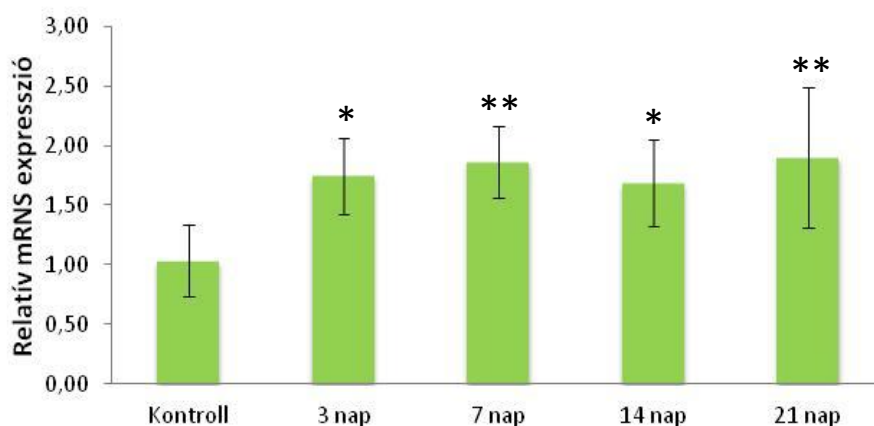
10. ábra. GRIN1 mRNA expressziója vad típusú egértörzs prefrontális kérgében akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stresszkezelés hatására.

Kísérletünk során kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikáns ( $p^* < 0,05$ ) ADK mRNA expresszió csökkenést mértünk az APP(swe)/PSEN(e9d)1 dupla transzgén egértörzs hippocampusában akut stressz esetén, krónikus stressz hatására szintén expresszió csökkenést tapasztaltunk, de nem szignifikáns mértékben (11. ábra).



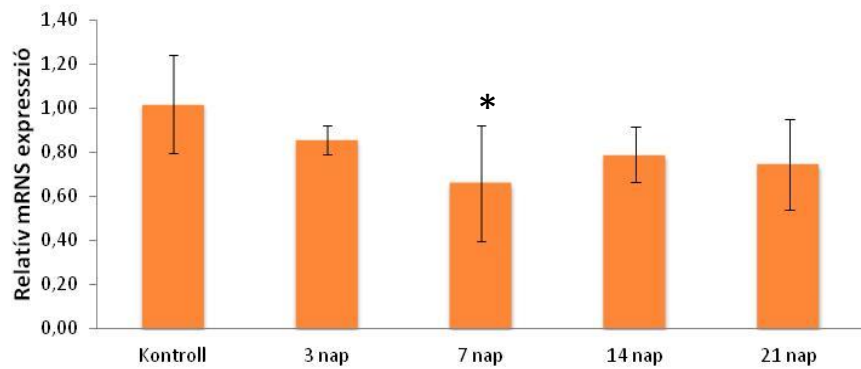
11. ábra. ADK mRNS expressziója APP(swe)/PSEN(e9d)1 dupla transzgén egértörzs hippocampusában akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stressz hatására. Változás a kontroll csoporthoz viszonyítva. \* $p < 0,05$

Az APP(swe)/PSEN(e9d)1 dupla transzgén egértörzs prefrontális kérgében akut stressz esetén és krónikus stressz minden napján kontroll csoporthoz viszonyított szignifikáns növekedést ( $p < 0,05$ ;  $p^{**} < 0,01$ ) tapasztaltunk az ADK mRNS expressziójában (12. ábra).



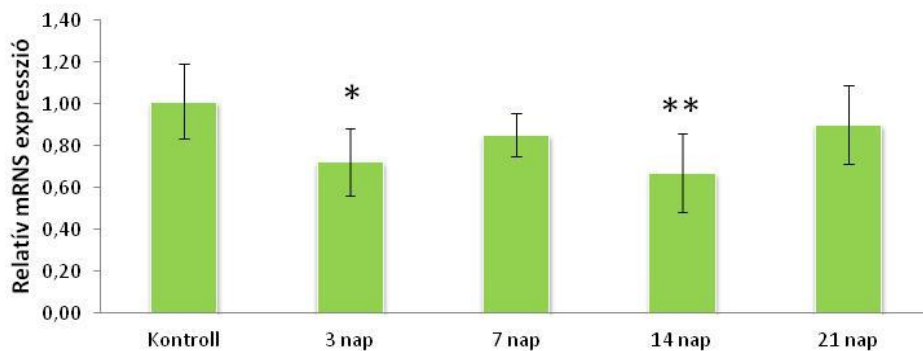
12. ábra. ADK mRNS expressziója APP(swe)/PSEN(e9d)1 dupla transzgén egértörzs prefrontális kéregében akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stresszkezelés hatására. Változás a kontroll csoporthoz viszonyítva. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

A GRIN1 expressziója esetén APP(swe)/PSEN(e9d)1 dupla transzgén egértörzsben csak a krónikus stressz 7. napján látható szignifikáns csökkenés ( $p < 0,05$ ), míg akut stressz és krónikus stressz 14. és 21. napján nem szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a hippocampusban (13. ábra).



13. ábra. GRIN1 mRNS expressziója APP(swe)/PSEN(e9d)1 dupla transzgén egértörzs hipocampusában akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stresszkezelés hatására. Változás a kontroll csoporthoz viszonyítva. \* $p < 0,05$

A prefrontális kéreg esetén a kontroll csoporthoz viszonyított szignifikáns expresszió csökkenést ( $p^* < 0,05$ ) a GRIN1 mRNS expressziójában akut stressz, valamint krónikus stressz 14. napján tapasztaltunk ( $p^{**} < 0,01$ ). A krónikus stressz 7., illetve a 21. napján nem volt szignifikáns változás (14. ábra).



14. ábra. GRIN1 mRNS expressziója APP(swe)/PSEN(e9d)1 dupla transzgén egértörzs prefrontális kérgében akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stresszkezelés hatására. Változás a kontroll csoporthoz viszonyítva. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

## VI. ÖSSZEFOGLALÁS

A káros distressz rizikófaktora az AK-nak és az epilepsiának is, reverzibilis dendrit deafferentációhoz vezet, mely a szinaptikus funkció károsodásával és neurodegenerációval jár (Beloyannis, 2009). Korábbi eredményeink alapján ennek hátterében a citoszeletális elemek átrendeződése állhat (Sántha és mtsai., 2012), viszont ez nem magyarázza meg azt a jelenséget, hogy a stressz miért bír befolyással a görcsaktivitásra. Kísérletünkben az akut és krónikus stressz hatását vizsgáltuk APP/PSEN1(e9d) transzgén és vad típusú egér törzseknél, az állatok hippocampusában és prefrontális kérgében az ADK és GRIN1 expresszió szempontjából. A transzgén egerekről már korábban leírták, hogy hajlamosak a görcsaktivitásra, melynek hátterében az amiloid overexpressziót feltételezik (Palop & Mucke, 2009). Ez egybevág a klinikumból származó adatokkal, mely szerint az AK-os betegeknek az epilepszia prevalenciája magasabb az átlag populációban megfigyelt 1 %-os gyakoriságnál (Pandis & Scarmeas, 2012).

Eredményeink igazolják, hogy az akut és krónikus stresszkezelés hatással van az általunk vizsgált ADK és GRIN1 hippocampális és prefrontális kérgi transzkripciójára (15. ábra). Közismert, hogy a stressz hozzájárul a neuronális degenerációhoz az agyban, különösen a hippocampus területén, mivel a stressz hatására megtörténik a kortikoszteroidok szekréciója, amely szupresszálja a hippocampális neuronok aktivitását. Mivel ez az agyterület a tanulás és memória kialakításáért felelős, károsodása az AK kialakulásához vezethet (Chen és mtsai., 2008; McEwen, 1999).

| Egértörzsek      |        | Vadtípusú egértörzs |                    | Alzheimer-modell egértörzs |                        |
|------------------|--------|---------------------|--------------------|----------------------------|------------------------|
| Agyterületek     |        | Hippocampus         | Prefrontális kéreg | Hippocampus                | Prefrontális kéreg     |
| Akut stressz     | ADK    | Nem szignifikáns    | Nem szignifikáns   | * p<0.05 ↓                 | * p<0.05 ↑             |
|                  | Grin-1 | Nem szignifikáns    | Nem szignifikáns   | Nem szignifikáns           | * p<0.05 ↓             |
| Krónikus stressz | ADK    | Nem szignifikáns    | Nem szignifikáns   | Nem szignifikáns           | *p<0.05<br>** p<0.01 ↑ |
|                  | Grin-1 | Nem szignifikáns    | Nem szignifikáns   | * p<0.05 ↓                 | ** p<0.01 ↓            |

15. ábra. Eredmények összefoglalása. Változás a kontroll csoporthoz viszonyítva. \*p<0,05; \*\*p<0,01

Kísérletünk során a vad típusú egértörzsben stresszkezelés hatására egyik agyterületen sem tapasztaltunk szignifikáns változást az ADK és GRIN1 mRNS expressziója szempontjából. Az Alzheimer-modell egértörzsben ezzel ellentétben mindkét területen szignifikáns változást mértünk a vizsgált molekulák expressziójában, akut és krónikus stresszkezelést követően egyaránt (15. ábra). Az Alzheimer-modell egértörzs hippocampusában akut stresszre bekövetkező szignifikáns ADK expresszió csökkenés, feltehetően az egértörzsben a jelentősebb mértékű A $\beta$  felhalmozódás következménye. Akut stressz hatására a A $\beta$  által már korábban aktiválódott protektív folyamatokat tovább fokozza, mely az ADK down-regulációjával jár (Maguire & Salpekar, 2013). A neurodegenerációt az ADK gyors, hosszabb távú downregulációja követi, mely protektív folyamat, mivel így az excitotoxicitást gátló adenosin hosszabb ideig képes a szinaptikus résben kifejteni neuromodulátor hatását (Boison 2008; Cunha és mtsai., 2001). Ez a jelenség magyarázhatja a hippocampusban tapasztalt, az akut stressz okozta expresszió csökkenést a transzgén törzsben, mely a korábban leírt akut stressz által kifejtett protektív hatással egybevág (Maguire & Salpekar, 2013).

A prefrontális kéregben mind akut és krónikus stressz esetén szignifikáns ADK expresszió emelkedés tapasztalható. A stressz okozta neurodegeneráció az asztrogliózis jelenségét vonja maga után (Papa és mtsai., 2014). Ez a jelenség a transzgén törzsben feltehetően kifejezettebb, mivel az amiloid overexpresszió önmagába is nagyobb mértékű neurodegenerációt eredményez, amit a stressz tovább növel. Korábbi adatokkal ellentétben, kísérletünkben azt találtuk, hogy a görcsaktivitást szabályzó ADK expresszió érzékenyebben reagált az akut stresszre a vizsgált törzsek prefrontális kérgében. Ezen a területen a transzgén törzsnél expresszió emelkedést találtunk, ami a görcsaktivitás kialakulásának kedvez (Fedele és mtsai., 2006). Ennek hátterében az állhat, hogy a stressz kisebb mértékben érinti a prefrontális kérget, vagyis ezen a területen a neurodegeneráció mértéke is alacsonyabb, mivel a protektív folyamatok kevésbé aktiválódtak, ami alacsonyabb mértékű ADK downregulációt eredményez (Angulo és mtsai., 2003), így stressz hatására bekövetkező változások nagyobb mértékében képesek hatásukat kifejteni az ADK expresszióra. A vadtypustól eltérő mintázat jól magyarázhatja a már több helyen bemutatott adatokat, hogy ezen transzgén állatok 4,5 hónapos korukra már 55 %-ban mutatnak epileptikus görcsaktivitást (van Groen és mtsai., 2006; Garcia-Alloza és mtsai., 2006), ami 38 %-os mortalitással jár (Minkeviciene és mtsai., 2009). A fokozottabb ADK expresszió felelőssé tehető az adenosin szint csökkenéséért, ami elősegíti a rohamok

generalizációját, amely végül az állat elpusztulását eredményezi (Li és mtsai., 2012). Habár ADK expresszió emelkedés önmagában nem alakítja ki a klinikai tüneteket, ismert tény, hogy az ADK overexpresszió már önmagában elegendő a hiperszinkron tevékenység kialakításához (Li és mtsai., 2012; Gomes és mtsai., 2011), amit az amiloid overexpresszió tovább erősíthet. Egyes elméletek szerint az amiloid is prokonvulzív hatású, ami megmagyarázhatja az AK és az epilepszia magasabb komorbiditását.

Az epileptikus aktivitás kialakulása valószínűleg egy komplexebb folyamat eredménye, melyben központi szerepet játszhat az NMDA receptor, melynek nem csupán a stressz válasz kialakításában és az excitotoxicitás során tulajdonítanak fontos szerepet, hanem a kogníció folyamataiban is (Paula-Lima és mtsai., 2013). Ezáltal a molekula kulcs fontosságú lehet az epilepszia, stressz és AK kapcsolatának megértésében. Az irodalmi adatok alapján az NMDA receptor GluN1 alegységét kódoló GRIN1 expresszió csökkenése maga után vonja a kognitív folyamatok károsodását (Unemori és mtsai. 2013), valamint a GRIN1 hipomorf egerek hajlamosabbak a görcsaktivitásra is (Hanks és mtsai., 2013). A GRIN1 expresszió csökkenését mutatták ki AK betegek agyi szövetének postmortem vizsgálata során (Mori és mtsai., 2011; Jacob és mtsai., 2007). Közismert, hogy az NMDA receptoroknak szerepük van a memória és tanulás kialakításában (Kito és mtsai, 1990). A receptor mennyiségének csökkenése vagy funkcionális károsodása számos neurodegeneratív betegségben szerepet játszik, mint a szkizofrénia (Tsai & Coyle, 2002), depresszió (Chourbaji és mtsai., 2008) és hangulatzavarok kialakulásában (Zarate Jr. és mtsai., 2010).

A GRIN1 mRNS expressziója szempontjából elmondható, hogy akut stressz hatásra a prefrontális kéregben, míg krónikus stresszkezelésre mindkét agyterületen szignifikáns expresszió csökkenést mértünk a transzgén egértörzsben. Ez a csökkenés megerősíti a korábbi irodalmi adatokat, melyek a jelenséget neuronkárosodással, ezáltal a dendrittüskék csökkenésével magyarázzák (Tran és mtsai., 2010). A GRIN1 nemcsak a neuronokban, hanem az asztrocitákban is kifejeződik (Lee és mtsai., 2010). A GRIN1 alegységgel rendelkező NMDA receptorok szinaptikus aktivitásra vagy akár sérült neuronokból szivárgó glutamát hatására aktiválódnak és az asztroglia intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szintjének emelésével, a gátló neuromodulátoros anyagok felszabadulását teszik lehetővé (Parpura és mtsai., 2012). Ezt segítheti elő a már korábban leírt ADK downreguláció is. Az asztrociták által létrejövő negatív feedback gátolja a NMDA receptorok aktivitását, mely

így az excitotoxicitást, mind pedig a további NMDA receptor aktivitásától is függő amiloid hasítást mérsékli.

A leírt változás több folyamat eredményképpen jön létre. A transzgén törzsben az amiloid overexpresszió dendrittüske veszteséggel jár (Tran és mtsai., 2010), mely az NMDA receptorok mennyiségének csökkenését is eredményezi, amit a stresszhatás tovább erősít. A nagyobb koncentrációban jelenlévő amiloid több útvonalon keresztül is befolyásolhatja a NMDA receptorok csökkenését. Egyrészt indirekt módon az  $\alpha 7$ -nikotinos acetilkolin receptoron keresztül, mely amiloidot kötve az NMDA receptorok fokozottabb endocitózist eredményezi (Snyder és mtsai., 2005). Másrészt direkt módon, magán az NMDA receptorokon, mivel ez az amiloid receptoraként is funkcionálhat. Az amiloid megkötését  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás követi, ami tartósan depolarizálja a neuront, megteremtve az excitotoxicitáshoz szükséges feltételeket (Wang és mtsai., 2002). Ezt tovább súlyosbítja, hogy a fibrilláris amiloid képes gátolni a glutamát reuptake rendszert asztrocitákban, a glutamát túlzott mértékű felhalmozódása is felelőssé tehető a hiperszinkron tevékenységek és sejtkárosító folyamatok kialakulásáért.

Kísérletünk összefoglalásaként elmondható, hogy kimutattuk, az APP/PSEN1(e9d) transzgén egértörzs eltérően reagál mind az akut, mind a krónikus stresszre a vad típushoz hasonlítva, az ADK és a GRIN1 hippocampális és prefrontális kérgi mRNS expressziója szempontjából. Fontos kihangsúlyoznunk, hogy eredményeink az mRNS expressziós változásokat reprezentálják, így további kísérleteket tervezünk a fehérjék vizsgálatára. Amennyiben eredményeinket fehérje szinten is reprodukálni tudjuk, elmondhatjuk, hogy eredményeinkkel új összefüggésre mutattunk rá az epileptikus görcsaktivitás, az AK és a stressz kapcsán, mely lehetővé teszi a regulációs folyamatok könnyebb megértését és potenciálisan új, célzottabb gyógyszer targetek kifejlesztését is. Kísérletünk erőssége, hogy új információval bír a különböző egértörzsek stressztoleranciáját illetően a különböző régiók tekintetében is.