

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar

SZAKDOLGOZAT

Epilepszia és Alzheimer-kór molekuláris szabályozásának vizsgálata stresszmodellben

Ivitz Eszter Virág
Biológia MSc II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
Pszichiátriai Klinika

Témavezetők: Dr. Pákáski Magdolna
Prof. Dr. Kálmán János
Belső konzulens: Prof. Dr. Gulya Károly

Szeged

2014

Tartalom

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	2
I.BEVEZETÉS.....	3
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
1.Epilepszia.....	4
2. Alzheimer-kór.....	4
3. Stressz.....	5
4. Stressz, Alzheimer-kór és epilepszia.....	6
5. Alzheimer-egérmodell.....	7
6. Neuronok.....	8
7. Glia.....	8
8. Asztroglia.....	10
8.1. Asztroglíózis és epilepszia	10
8.2. Asztroglíózis és Alzheimer-kór	11
8.3. Asztroglíózis.....	11
9. ADK és GRIN1	13
9.1.1. ADK és Epilepszia.....	14
9.1.2. ADK és Alzheimer-kór.....	15
9.1.3. ADK- Adenozin-kináz	15
9.2.1. GRIN1 és epilepszia	19
9.2.2. GRIN1 és Alzheimer-kór	20
9.2.3. GRIN1	21
III. CÉLKITŰZÉS.....	22
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	23
1. Állatok	23
2. Kezelés.....	23
3. Teljes RNS izolálás és reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció	24
4. Real-Time Polimeráz láncreakció	25
5. Statisztikai analízis	26
V. EREDMÉNYEK	27
VI. ÖSSZEFOGLALÁS.....	32
VII. IRODALOMJEGYZÉK.....	37
VIII. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS.....	48

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AC-adenilát cikláz

ADK-adenozin-kináz

AK-Alzheimer-kór

AMP-adenozin-monofoszfát

APP-amyloid prekursor protein

ATP-adenozin-trifoszfát

A β -amiloid β

cAMP-ciklikus adenzin-monofoszfát

CRH-corticotrop releasing hormone

EEG-elektroencefalográfia

GABA- gamma-aminovajsav

GAPDH- glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

GluN1/NR1-glutamát receptor-1 alegysége

GluN2B/NR2B-glutamát receptor-2B alegysége

GRIN1-glutamát (N-metil-D-aszpartát) receptor egyes alegységét kódoló gén

HPA-tengely- hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg-tengely

NMDA-N-metil-D-aszpartát

PKA-protein-kináz A

PSEN1-presenilin-1

PSEN2-presenilin-2

qPCR-kvantitatív polimeráz láncreakció

SPRD-Sprague-Dawley

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 (elektroencefalográfia). 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- β ($A\beta$) 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.

	Familiáris Alzheimer-kór mutációi			
	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 depresszióknak, 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 kialakulásában. 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 dendritusok 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 (elektroencefalográfia) 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.

Sejtek lokalizációja	Gliat típusai	Funkciója
Központi idegrendszer	Asztrocita: - <u>Fibrózus</u> (Fehér állomány) - <u>Protoplazmikus</u> (Szürke állomány)	-támasztás -külső környezet szabályozása: ionok, kálium, neurotranszmitterek visszavétele a szinaptikus transzmisszióban -kálcium szignalizáció -purinerg receptorok aktivációja -extracelluláris ATP felszabadítása
	- <u>Radiális glia</u> (fejlődő idegszövet, epithelium, retina, kisagy)	-neuronok migrációja a fejlődő idegrendszerben
	-Müller sejtek (Retina)	-retina fejlődésében fontos -szinaptikus plaszticitás regulálása
	-Bergmann glia (kisagy)	-kisagy fejlődésében van szerepe
	-Tanicita (agykamrák endependimárai)	-periventrális szervek kapillárisaival kapcsolat, cerebrospinalis folyadék-központi idegrendszer közötti kommunikáció
Perifériás idegrendszer	Oligodendrocita - <u>Perineuronális szatellita</u> (szürkeállomány) - <u>Interfaszikuláris oligodendroglia</u> (fehérállomány)	-támasztás, neuronok metabolizmusának befolyásolása, elektromos szigetelés, -mielin hüvely kialakítása
	Mikroglia (egész agyban)	makrofák aktivitás, neuronok metabolizmusának befolyásolása
	Ependima sejtek (belső üregek falában, plexus choroideus felszínén)	-epitheliális határfelület -cerebrospinalis folyadék szekréciója, -vér-agy-gát rendszer kialakítása
	Schwann sejtek (perifériás axonok)	-mielin hüvely kialakítása -fagocitikus aktivitás
	Szatellita sejtek (ganglionokban)	-funkcionális barrier -kémiai környezet regulálása -intracelluláris kalcium koncentráció szabályozása
	Enterális glia (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 fiziológiás 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 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 asztroglíózissal válaszolnak, mely patológiai jele a KIR-t érintő strukturális károsodásoknak. Asztroglíózis során megváltozik metabolikus enzimeik expressziós mintázata, befolyásolva a neuronális működéseket (Haydon., 2012).

8.1. Asztroglíózis és epilepszia

Temporális lebeny epilepsziában szenvedő betegek hippocampusában, valamint az epilepszia állatmodelljeiben is leírták a reaktív asztroglíózis változásait (Cohen-Gadol és mtsai, 2004; Borges és mtsai, 2003; Shapiro és mtsai., 2008). Neuronveszteséget követően, reaktív asztroglíózis 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 adenzint csökkentő változások az asztrocita függő adenzin 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 adenzin hatásának csökkentésével.

8.2. Asztrogliózis és Alzheimer-kór

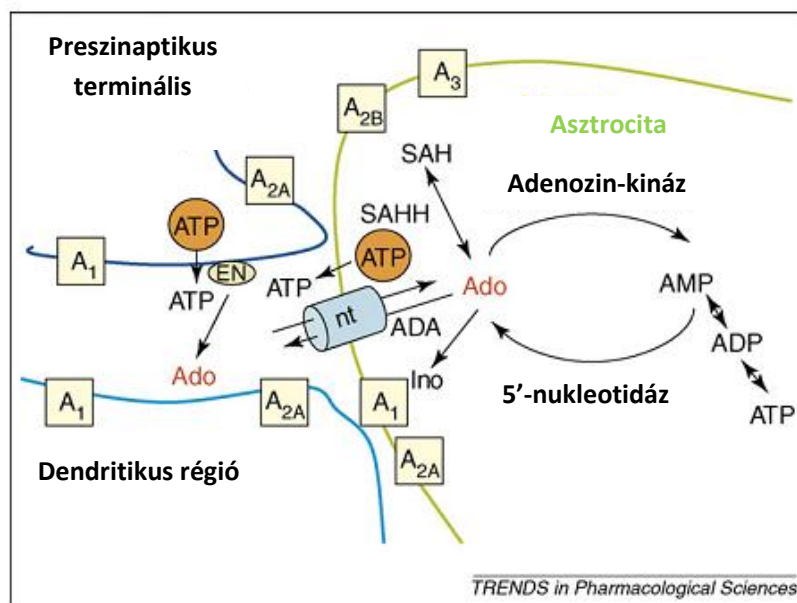
Az asztrogliózist mind AK-os betegek szövetében, mind Alzheimer-modell állatok agy izolátumaiban is megfigyelték (Nagele és mtsai., 2003; Olabarria és mtsai., 2010). Tanulmányok szerint korreláció áll fenn az asztrogliózis és a kognitív hanyatlás között (Simpson és mtsai., 2010). A reaktív asztrogliózist AK esetén számos faktor beindíthatja, mint a károsodott neuronok, gliák szignalizációja, valamint az extracelluláris A β (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⁺ 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 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 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 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 (A_1 , A_2 és A_3) (Fredholm és mtsai., 2005) (1. ábra). Az A_1 receptorok K^+ csatornákkal állnak kapcsolatban, ezáltal szerepe van a neuronok hiperpolarizációjában és excitabilitásuk csökkenésében (Newman, 2003). Az ATP felszabadulása excitátoros aktivációhoz vezethet, mind a P_2X receptorok stimulálásával a szomszédos neuronokon, vagy gátló folyamatokhoz az 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 glutamáterg transzmissziót a P_2Y 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; **A₁**, **A_{2A}**, **A_{2B}**, **A₃**- 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 β okozta szinapszis vesztésben. Kutatások szerint az NMDA receptor képes receptorként megkötni az A β -t, amely excitotoxikus sejthalált eredményez. A fibrilláris A β 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 asztrogliózis 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 asztrogliózis 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 A₁ receptor denzitasz csökkenést figyeltek meg, mely rohamtevékenységet, konvulzív aktivitást indukált (Boison, 2008; Rebola és mtsai., 2003, Rebola és mtsai., 2005). Kutatások szerint az A₁ 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 asztrogliózis és epilepszia esetén fellépő neuronális diszfunkció között (Li és mtsai., 2008).

9.1.2. ADK és Alzheimer-kór

Az asztroglia szerepe az A β hasításában és metabolizmusában még vitatott, feltételezhetően az A β degradálásában és fagocitózisában van szerepe (Rossner és mtsai., 2005; Nicoll & Weller, 2003). AK esetén leírták, hogy megváltozik az A₁ 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 β kitettség esetén az asztrociták és mikroglia aktiválódhatnak, hipertrófiás állapotban képesek elszeparálni a neuronokat az A β fibrillumoktól, ezáltal betöltve neuroprotektív szerepüket. Asztrociták képesek megkötni és felvenni az A β , így szerepük lehet az A β akkumulálódásában (Mohamed & Posse, 2011). Az asztrogliózis 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).

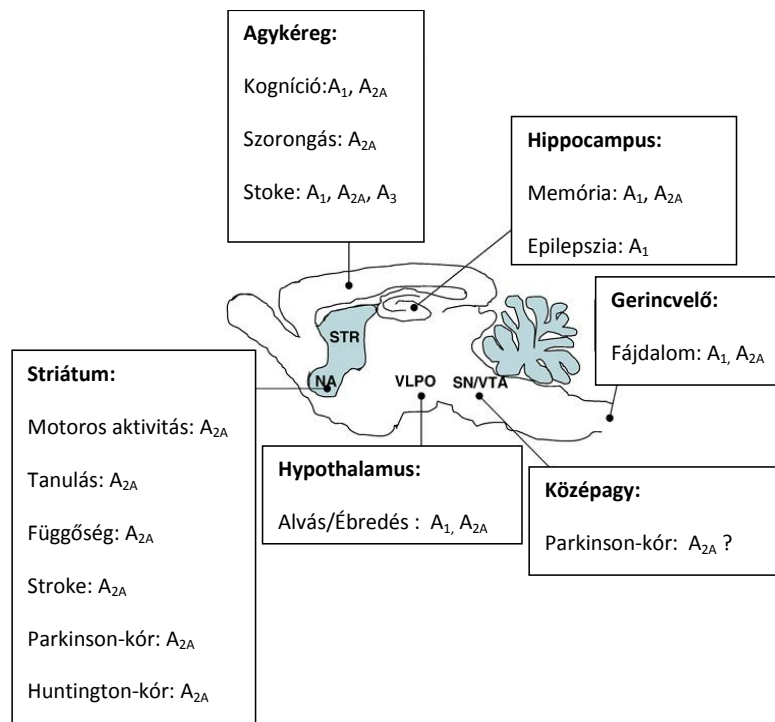
Az adenozin minden sejtben megtalálható, a purin nukleotid metabolizmus és más folyamatok termékeként (Cunha, 2001). Az adenozinnak szerepe van központi idegrendszer energia homeosztázisában, így neuroprotektív funkciókat lát el (Cunha, 2005; Ribeiro, 2005), illetve antikonvulzív (Boison, 2005; Fredholm 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 (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃), 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
A₁ receptor	(fokozott expresszió): -hippocampusban -cerebráli kéreg -cerebelláris kéreg -thalamikus magok	-K ⁺ áramlás szabályozása → neuronális hiperpolarizáció
A_{2A} receptor	Dopamin gazdag régiókban (nagyobb mennyiségben): -striátum -nucleus accumbens (kevesebb mennyiségben): -hippocampus -agykéreg	-szinaptikus transzmisszió szabályozása -szinaptikus plaszticitás kontrollálása -glutamát felszabadulás szabályozása -NMDA receptorok kontrollálása -gyulladásos folyamatok -növeli a transzmissziót a dopamin D2 receptorokon keresztül
A_{2B} receptor	-alacsony mennyisége az agyban	-Gs protein kapcsolt Adenilát-cikláz, cAMP, protein-kináz-A útvonal kapcsolat -arachidonsav útvonallal kapcsolat
A₃ receptor	(fokozott expresszió) -hippocampus -cerebellum	-csökkenti az intracelluláris cAMP koncentrációját -Ca ²⁺ mennyiségét szabályozza

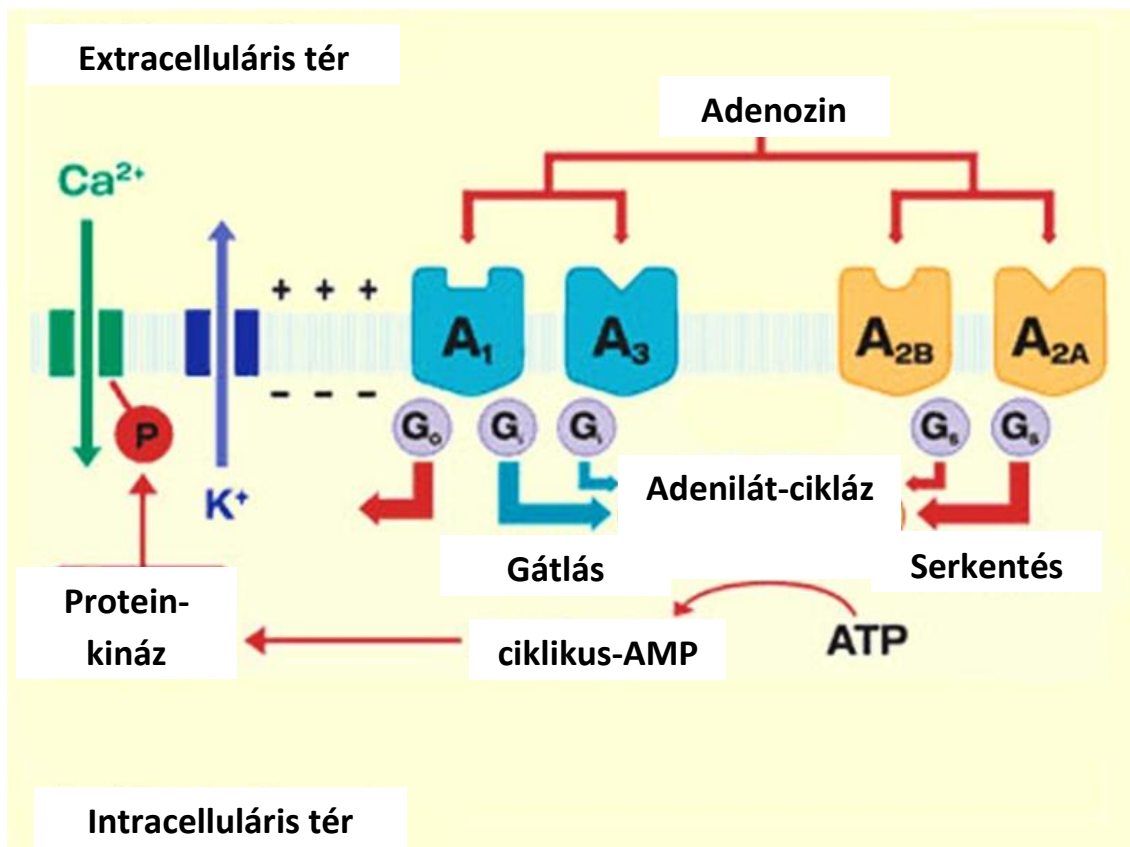
3. táblázat: A adenozin receptor típusok lokalizációja és szerepe az agyban. **NMDA receptor**-N-metil-D-aszpartát ; **cAMP**-ciklikus adenozin-monofoszfát;. Wei és mtsai. (2011) alapján.

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; **A₁**, **A₂**, **A_{2A}**, **A₃**-adenosin receptor típusok. Wei és mtsai (2011) alapján.

Az adenosin gátló hatása az A₁ receptorok aktivációján keresztül érvényesül, melyek G-proteinekkel kapcsolva gátolják az adenilát-cikláz, aktiválva a K⁺-csatornákat, gátolva a Ca²⁺-csatornákat és aktiválva a foszfolipáz C-t. Az N-típusú Ca²⁺-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

Az A_1 receptorok képesek posztzinaptikus hiperpolarizációt okozni a K^+ konduktancia aktiválásával (Segal, 1982; Dunwiddie & Fredholm, 1989) és a neurotranszmitterek preszinaptikus 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 A₁ 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 A₁ 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

felöltt 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 betegségnél 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 β képes megemelni az intracelluláris Ca²⁺ szintjét a GluN2B alegységből felépülő NMDA receptorokat expresszáló kortikális neuronkultúrában (Ferreira és mtsai., 2012), - habár a mechanizmust, melynek során az A β 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 β oligomerek képesek kötődni az NMDA receptorokhoz extracellulárisan (Costa és mtsai., 2012; Querfurth & LaFerla, 2010), így ez Ca²⁺ 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 β formák okozhatják dendrittüske veszteséget előidézve (Selkoe, 2002). Morfológiai és biokémiai szinaptikus változások az öregedés velejárói, melyhez hozzájárulhatnak az A β károsító hatásai (Quiro-Baez és mtsai., 2013; Mezler és mtsai., 2012). Az A β 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 β 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 β 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 β 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 génfamilia 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 ± 1 °C) és szabályozott páratartalom (55 ± 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 hippocampusból 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.

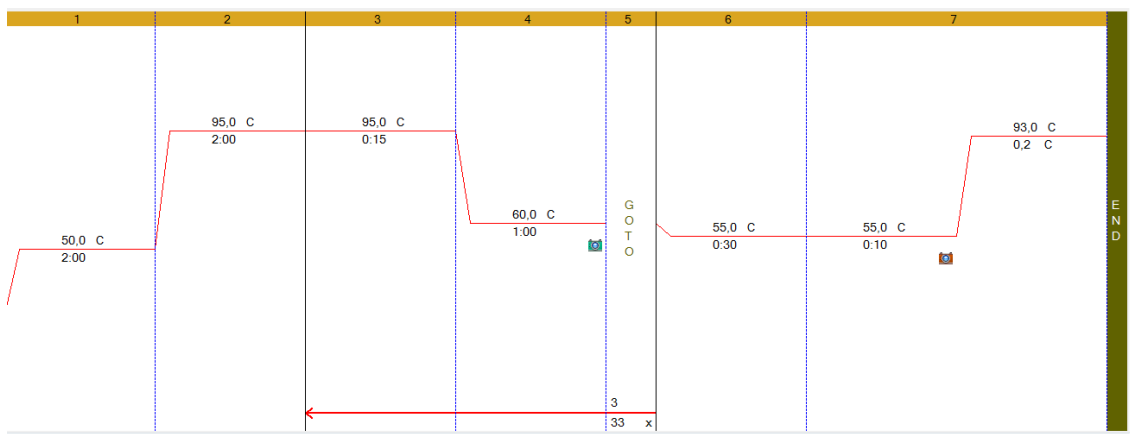
4. Real-Time Polimeráz láncreakció

A mintáinkban található mRNS kimutatását kvantitatív real-time polimeráz láncreakcióval (qPCR) végeztük Bio-Rad CFX96 TouchTM 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
ADK	TTCAGGAGCCACACAAAGCA	CAGCACAAGTTCCTGTTGGC	144
Grin-1	AACCAGGCCAATAAGCGACA	AGGATAGCGTAGACCTGGCT	134
GAPDH	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 jelvétele 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.

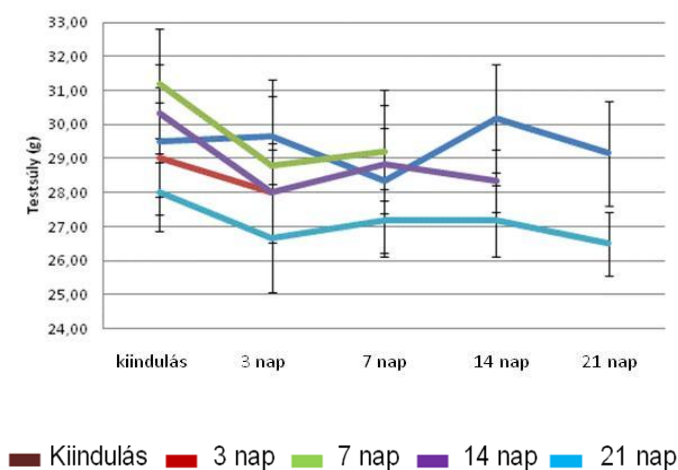
4. ábra. Az mRNS kimutatásához alkalmazott real-time PCR hőmérséklet- és időprofilja.

5. Statisztikai analízis

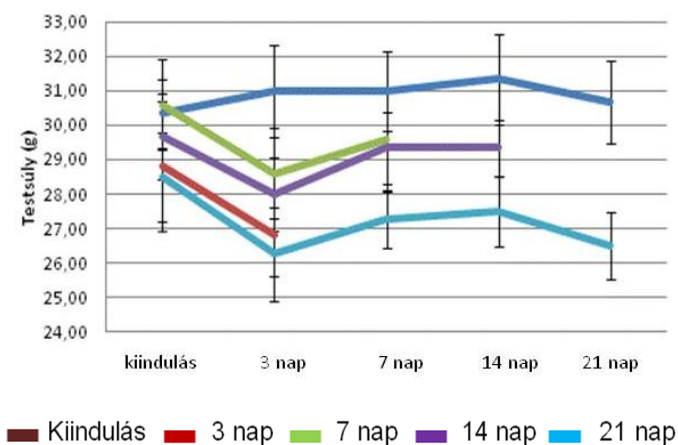
Az eredmények statisztikai analízisét SPSS 20.0 szoftver segítségével végeztük el Bonferroni és Tukey post hoc teszt felhasználásával. A csoportok összehasonlítása one-way ANOVA, majd Bonferroni és Dunett post hoc tesztek felhasználásával történt. Az adatokat átlag $\pm$ S.D. (standard deviáció) formában 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).

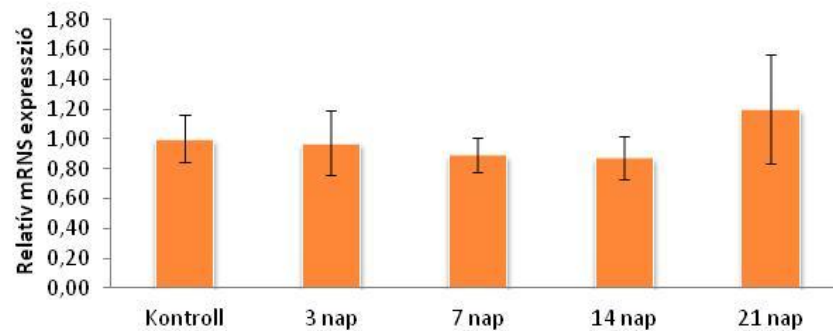


5. ábra. Vad típusú egértörzs testsúlyváltozása akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stresszkezelés hatására.



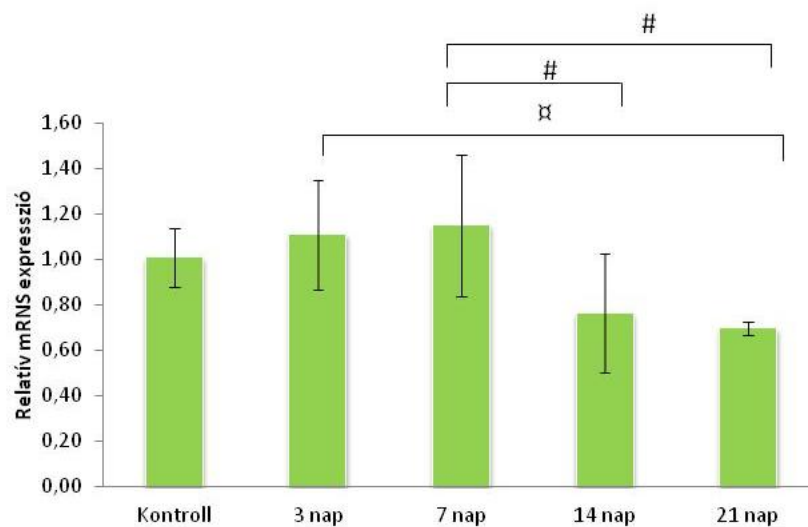
6. ábra. Alzheimer-modell egértörzs testsúlyváltozása akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stresszkezelés hatására.

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).



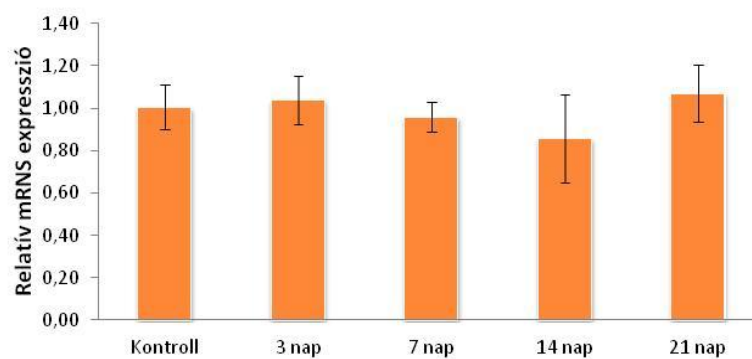
7. ábra. ADK mRNS expressziója vad típusú egértörzs hippocampusban akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stresszkezelés hatására.

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 mRNS expressziójában (8. ábra).

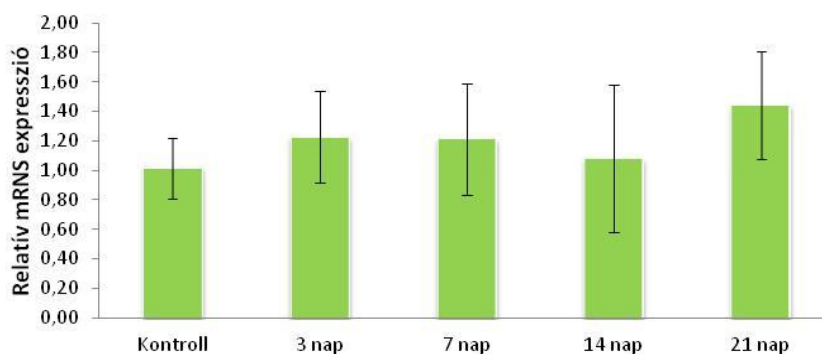


8. ábra. ADK mRNS expressziója vad típusú egértörzs prefrontális kortexében akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stresszkezelés hatására. Változás a kontroll csoporthoz viszonyítva, változás 3. naphoz és 7. naphoz viszonyítva. $^{\#}p < 0,05$; $\alpha p < 0,05$

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

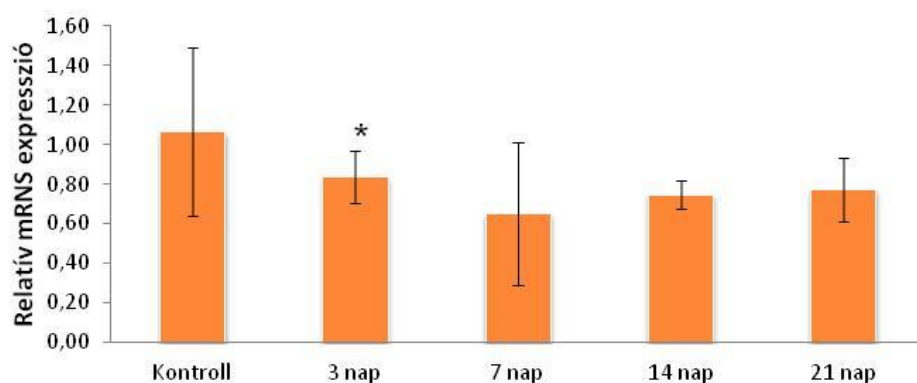


9. ábra. GRIN1 mRNS expressziója vad típusú egértörzs hippocampusában akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stresszkezelés hatására.



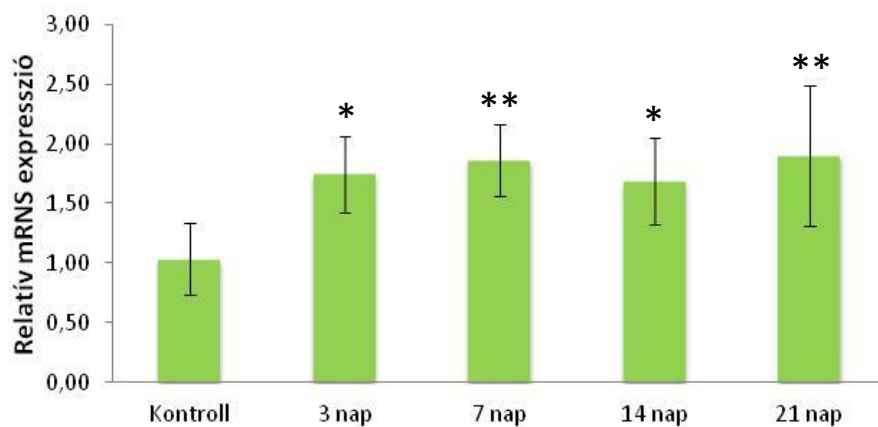
10. ábra. GRIN1 mRNS expressziója vad típusú egértörzs prefrontális kérgében akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stresszkezelés hatására.

Kísérletünk során kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikáns ($p^* < 0,05$) ADK mRNS 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).



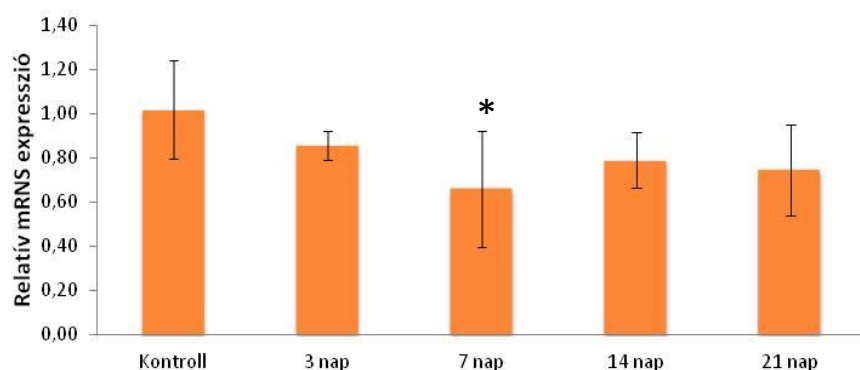
11. ábra. ADK mRNS expressziója APP(swe)/PSEN(e9d)1 dupla transzgén egértörzs hippocampusában akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stressz hatására. Változás a kontroll csoporthoz viszonyítva. * $p < 0,05$

Az APP(swe)/PSEN(e9d)1 dupla transzgén egértörzs prefrontális kéregében 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).



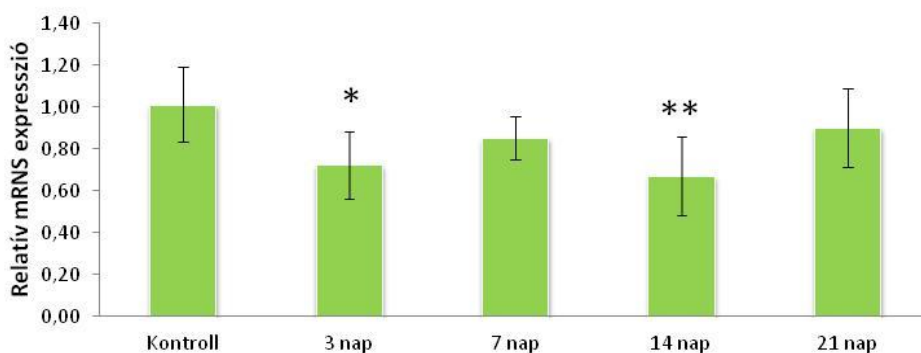
12. ábra. ADK mRNS expressziója APP(swe)/PSEN(e9d)1 dupla transzgén egértörzs prefrontális kéregében akut (3 nap) és krónikus (7, 14, 21 nap) stressz hatására. Változás a kontroll csoporthoz viszonyítva. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

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 kéregében 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 epilepsziának 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 & Scarneas, 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 ** 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 β felhalmozódás következménye. Akut stressz hatására a A β 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 egybevághat (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 vad típustól 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 kulcsfontosságú 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 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 eredményeképpen 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 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. Eredményeink megerősítése érdekében vizsgálatainkat fehérje szinten is elvégeztük ELISA technikával (Mouse ADK ELISA KIT; Sunredbio; Kat. szám:201-02-3008), az mRNS szinten változást tapasztalt csoportokban. Elmondható, hogy a vad típusú egértörzs prefrontális kéreg területén nem tapasztaltunk szignifikáns változást, viszont a krónikus stresszkezelés 21. napján nagymértékű ADK expresszió emelkedést figyeltünk meg a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az AK modell törzs esetén csak a prefrontális kéreg esetén tapasztaltunk szignifikáns expresszió emelkedést krónikus stressz 21. napján 3. naphoz viszonyítva ($p < 0,05$; ANOVA). A 3. naphoz viszonyított 7. napon történő expresszió emelkedés is jelentősnek tekinthető, de nem szignifikáns mértékben. A transzgén törzsben tapasztalt ADK fehérje expresszió változás a stresszkezelések hatására hasonló trendet mutatott, mint amit mRNS szinten tapasztaltunk. Kísérleteink alapján 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.

VII. IRODALOMJEGYZÉK

Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I.(2009): Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci.* 2009 Dec;12(12):1567-76. doi: 10.1038/nn.2433.

Alberdi E, Sánchez-Gómez MV, Cavaliere F, Pérez-Samartín A, Zugaza JL, Trullas R, Domercq M, Matute C. (2010): Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium.* 2010 Mar; 47(3):264-72. doi: 10.1016/j.ceca.2009.12.010. Epub 2010 Jan 12.

Alle H, Roth A, Geiger JR.(2009): Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. *Science* 2009; 325:1405–1408.

Ambrosio, A.F., Malva, J.O., Carvalho, A.P., Carvalho, A.M. (1997): Inhibition of N-, P/Q- and other types of Ca²⁺ channels in rat hippocampal nerve terminals by adenosine A1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 340, 301±310.

Angelatou F, Pagonopoulou O, Maraziotis T, Olivier A, Villemeure JG, Avoli M, Kostopoulos G. (1993): Upregulation of A1 adenosine receptors in human temporal lobe epilepsy: a quantitative autoradiographic study. *Neurosci Lett.* 1993 Nov 26;163(1):11-4.

Angulo E1, Casadó V, Mallol J, Canela EI, Viñals F, Ferrer I, Lluís C, Franco R. (2003): A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. *Brain Pathol.* 2003 Oct;13(4):440-51.

Aronica E, Sandau US, Iyer A, Boison D.(2013): Glial adenosine kinase--a neuropathological marker of the epileptic brain. *Neurochem Int.* 2013 Dec;63(7):688-95. doi: 10.1016/j.neuint.2013.01.028. Epub 2013 Feb 4.

Baloyannis SJ. (2009): Dendritic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 2009 Aug 15;283(1-2):153-7. doi: 10.1016/j.jns.2009.02.370. Epub 2009 Mar 17.

Bayer TA, Wiestler OD, Wolf HK. (1995): Hippocampal loss of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 mRNA in chronic temporal lobe epilepsy.

Berg, AT (2008). "Risk of recurrence after a first unprovoked seizure. *Epilepsia.* 49 Suppl 1: 13–8.

Bettler B¹, Mulle C (1995) Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology.* 1995 Feb;34(2):123-39.

Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 1993 Jan 7;361(6407):31-9.

Boison D. (2005): Adenosine and epilepsy: from therapeutic rationale to new therapeutic strategies. *Neuroscientist.* 2005 Feb;11(1):25-36.

- Boison D. (2006): Adenosine kinase, epilepsy and stroke: mechanisms and therapies. *Trends Pharmacol Sci.* 2006 Dec;27(12):652-8. Epub 2006 Oct 23. Review.
- Boison D. (2008): The adenosine kinase hypothesis of epileptogenesis. *Prog Neurobiol.* 2008 Mar; 84(3):249-62. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.12.002. Epub 2007 Dec 23. Review.
- Boison D. (2009): Engineered adenosine-releasing cells for epilepsy therapy: human mesenchymal stem cells and human embryonic stem cells. *Neurotherapeutics.* 2009 Apr; 6(2):278-83. doi: 10.1016/j.nurt.2008.12.001. Review
- Boison D.(2012): Adenosine dysfunction in epilepsy. *Glia.* 2012 Aug;60(8):1234-43. doi: 10.1002/glia.22285. Epub 2011 Dec 22.
- Borges K, Gearing M, McDermott DL, Smith AB, Almonte AG, Wainer BH, Dingledine R. (2003): Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Exp Neurol.* 2003 Jul;182(1):21-34.
- Bowser DN1, Khakh BS. (2007): Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. *J Gen Physiol.* 2007 Jun;129(6):485-91. Epub 2007 May 15.
- Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, MH Arrighi. (2007): Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia.* [Retrieved 18 June 2008];3(3):186–91. doi:10.1016/j.jalz.2007.04.381
- Chen Y, Dubé CM, Rice CJ, Baram TZ . (2008): Rapid loss of dendritic spines after stress involves derangement of spine dynamics by corticotropin-releasing hormone. *J Neurosci.* 2008 Mar 12;28(11):2903-11. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0225-08.2008
- Cheng , W. Logge, J. K. Low, B. Garner , T. Karl (2013): Novel behavioural characteristics of the **APP_{Swe}/PS1ΔE9** transgenic mouse model of Alzheimer's disease *Behavioural Brain Research* Volume 245, 15 May 2013, Pages 120–127
- Chourbaji S, Vogt MA, Fumagalli F, Sohr R, Frasca A, Brandwein C, Hörtnagl H, Riva MA, Sprengel R, Gass P. (2008): AMPA receptor subunit 1 (GluR-A) knockout mice model the glutamate hypothesis of depression. *FASEB J.* 2008 Sep;22(9):3129-34. doi: 10.1096/fj.08-106450. Epub 2008 May 20.
- Ciruela F, Ferré S, Casadó V, Cortés A, Cunha RA, Lluís C, Franco R. (2006): Heterodimeric adenosine receptors: a device to regulate neurotransmitter release. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Nov;63(21):2427-31.
- Cohen-Gadol AA1, Pan JW, Kim JH, Spencer DD, Hetherington HH. (2004): Mesial temporal lobe epilepsy: a proton magnetic resonance spectroscopy study and a histopathological analysis. *J Neurosurg.* 2004 Oct;101(4):613-20.
- Culebras A, Miller M, Bertram L, Koch J. (1987): Differential response of growth hormone, cortisol, and prolactin to seizures and to stress. *Epilepsia.* 1987 Sep-Oct;28(5):564-70.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. (2001): NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol.* 2001 Jun; 11(3):327-35.
- Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. (2010): A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci.* 2010 Feb 9;3:1. doi: 10.3389/neuro.02.001.2010. eCollection 2010.

Cunha RA. (2005): Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade. *Purinergic Signal*. 2005 Jun;1(2):111-34. doi: 10.1007/s11302-005-0649-1. Epub 2005 Mar 17.

Cunha RA.(2001): Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int*. 2001 Feb; 38(2):107-25. Review.

de Quervain DJ, Aerni A, Schelling G, Roozendaal B. (2009): Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Front Neuroendocrinol*. 2009 Aug;30(3):358-70. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.03.002. Epub 2009 Mar 31.

Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA. (2013): Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci*. 2013 Mar;36(3):174-84. doi: 10.1016/j.tins.2012.11.008. Epub 2013 Jan 5.

DeWitt DA, Perry G, Cohen M, Doller C, Silver J.(1998): Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1998;149:329–340.

Dunwiddie, T.V., Fredholm, B.B.(1989): Adenosine A1 receptors inhibit adenylate cyclase activity and neurotransmitter release and hyperpolarize pyramidal neurons in rat hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249, 31±37.

Dunwiddie, T.V., Haas, H.L. (1985): Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. *J. Physiol.* 369, 365±377

During M. J., Spencer D. D. MD (2004): Adenosine: A potential mediator of seizure arrest and postictal refractoriness; *Annals of Neurology*; Volume 32, Issue 5, pages 618–624, November 1992

E Y Yuen, W Liu, I N Karatsoreos, Y Ren, J Feng, B S McEwen and Z Yan (2011): Mechanisms for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory. *Molecular Psychiatry* (2011) 16, 156–170; doi:10.1038/mp.2010.50; published online 11 May 2010

Eadie MJ. (2012): Shortcomings in the current treatment of epilepsy. *Expert Rev Neurother*. 2012 Dec;12(12):1419-27. doi: 10.1586/ern.12.129.

Ekonomou A, Sperk G, Kostopoulos G, Angelatou F. (2000): Reduction of A1 adenosine receptors in rat hippocampus after kainic acid-induced limbic seizures. *Neurosci Lett*. 2000 Apr 21; 284(1-2):49-52.

Fedele DE, Gouder N, Güttinger M, Gabernet L, Scheurer L, Rülcke T, Crestani F, Boison D. (2005): Astroglialosis in epilepsy leads to overexpression of adenosine kinase, resulting in seizure aggravation. *Brain*. 2005 Oct; 128(Pt 10):2383-95. Epub 2005 Jun 1.

Fedele DE, Li T, Lan JQ, Fredholm BB, Boison D. (2006): Adenosine A1 receptors are crucial in keeping an epileptic focus localized. *Exp Neurol*. 2006 Jul; 200(1):184-90. Epub 2006 Jun 5.

Ferreira, I.L., Bajouco, L.M., Mota, S.I., Auberson, Y.P., Oliveira, C.R., Rego, A.C., (2012): Amyloid beta peptide 1-42 disturbs intracellular calcium homeostasis through activation of GluN2B-containing N-methyl-d-aspartate receptors in cortical cultures. *Cell Calcium* 51, 95e106.

Fiacco TA1, McCarthy KD. (2004): Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2004 Jan 21; 24(3):722-32.

Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, Stewart CL, Morgan JI, Connor JA, Curran T. (1994): Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron.* 1994 Aug;13(2):325-38.

Fredholm BB, Chen JF, Masino SA, Vaugeois JM. (2005): Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:385-412. Review.

Fredholm BB, Irenius E, Kull B, Schulte G. (2001): Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol.* 2001 Feb 15;61(4):443-8.

Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, Purcell SM, Betensky RA, Raju S, Prada C, Greenberg SM, Bacskai BJ, Frosch MP. (2006): Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis.* 2006 Dec;24(3):516-24. Epub 2006 Oct 5.

Goebel DJ, Poosch MS.(1999): NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999 Jun 8;69(2):164-70.

Gomes CV, Kaster MP, Tomé AR, Agostinho PM, Cunha RA. (2011): Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta.* 2011 May;1808(5):1380-99. doi: 10.1016/j.bbammem.2010.12.001. Epub 2010 Dec 9. Review.

Gouder N, Scheurer L, Fritschy JM, Boison D.(2004): Overexpression of adenosine kinase in epileptic hippocampus contributes to epileptogenesis. *J Neurosci.* 2004 Jan 21; 24(3):692-701.

Groc L, Choquet D, Chaouloff F (2008): The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. *Nat Neurosci.* 2008 Aug;11(8):868-70. doi: 10.1038/nn.2150. Epub 2008 Jul 11.

Gulya Károly (2000): Neurocitológia. Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar. pp. 103-105.

Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB.(1999): ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci.* 1999 Jan 15;19(2):520-8.

Halassa MM, Haydon PG. (2010): Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:335-55. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135843. Review.

Hanks AN, Dlugolenski K, Hughes ZA, Seymour PA, Majchrzak MJ. (2013): Pharmacological disruption of mouse social approach behavior: relevance to negative symptoms of schizophrenia.

Haydon PG, Carmignoto G. (2006): Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev.* 2006 Jul;86(3):1009-31. Review.

Hynd, M.R., Scott, H.L., Dodd, P.R., (2004b): Selective loss of NMDA receptor NR1 subunit isoforms in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 89, 240e247.

Iadecola C1, Nedergaard M. (2007): Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci.* 2007 Nov;10(11):1369-76.

Jacob, C.P., Koutsilieri, E., Bartl, J., Neuen-Jacob, E., Arzberger, T., Zander, N., Ravid, R., Roggendorf, W., Riederer, P., Grunblatt, E., (2007): Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 11, 97e116.

Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A. (2007): Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci.* 2007 Mar;10(3):331-9. Epub 2007 Feb 18.

Karst H, Joëls M. (2005): Corticosterone slowly enhances miniature excitatory postsynaptic current amplitude in mice CA1 hippocampal cells. *J Neurophysiol.* 2005 Nov;94(5):3479-86. Epub 2005 Jul 20.

Kennedy MB. (1994): The biochemistry of synaptic regulation in the central nervous system. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:571-600.

Kito S, Miyoshi R, Nomoto T. (1990): Influence of age on NMDA receptor complex in rat brain studied by in vitro autoradiography. *J Histochem Cytochem.* 1990 Dec;38(12):1725-31.

Kowaluk EA, Jarvis MF. (2000): Therapeutic potential of adenosine kinase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs.* 2000 Mar;9(3):551-64. Review.

Kristel Slegers, Nathalie Brouwers, Ilse Gijssels, Jessie Theuns, Dirk Goossens, Jan Wauters, Jurgen Del-Favero, Marc Cruts, Cornelia M. van Duijn, Christine Van Broeckhoven (2006): APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain.* 2006 Nov;129(Pt 11):2977-83. Epub 2006 Aug 18.

Kron MM1, Zhang H, Parent JM. (2010): The developmental stage of dentate granule cells dictates their contribution to seizure-induced plasticity. *J Neurosci.* 2010 Feb 10;30(6):2051-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5655-09.2010.

Lai, CW; Trimble, MR (1997): Stress and epilepsy. **Journal of Epilepsy.** 10 177 - 186.

Lakhan SE, Caro M, Hadzimechalis N. (2013): NMDA Receptor Activity in Neuropsychiatric Disorders. *Front Psychiatry.* 2013 Jun 10; 4:52. doi: 10.3389/fpsyt.2013.00052. eCollection 2013.

Lan Xiong, MD, PhD, Claudia Gaspar, PhD, Guy A. Rouleau, MD, PhD, FRCPC (2005): Genetics of Alzheimer's Disease and Research Frontiers in Dementia. *Disclosures Geriatrics and Aging.* 2005;8(4):31-35.

Latini S, Pedata F. (2001): Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem.* 2001 Nov;79(3):463-84. Review.

Lee, M.C., Ting, K.K., Adams, S., Brew, B.J., Chung, R., Guillemin, G.J. (2010): Characterisation of the expression of NMDA receptors in human astrocytes. *PLoS One,* e14123.

Li T, Lytle N, Lan JQ, Sandau US, Boison D.(2012): Local disruption of glial adenosine homeostasis in mice associates with focal electrographic seizures: a first step in epileptogenesis? *Glia*. 2012 Jan;60(1):83-95. doi: 10.1002/glia.21250. Epub 2011 Sep 30.

Li T, Ren G, Lusardi T, Wilz A, Lan JQ, Iwasato T, Itohara S, Simon RP, Boison D. (2008): Adenosine kinase is a target for the prediction and prevention of epileptogenesis in mice. *J Clin Invest*. 2008 Feb;118(2):571-82. doi: 10.1172/JCI33737

Lopes LV, Cunha RA, Ribeiro JA.(1999): Cross talk between A(1) and A(2A) adenosine receptors in the hippocampus and cortex of young adult and old rats. *J Neurophysiol*. 1999 Dec;82(6):3196-203.

Magistretti PJ.(2009): Low-cost travel in neurons. *Neuroscience*. 2009;325:1349–1351.

Maguire J, Salpekar JA. (2013): Stress, seizures, and hypothalamic-pituitary-adrenal axis targets for the treatment of epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2013 Mar; 26 (3):352-62. doi: 10.1016/j.yebeh.2012.09.040. Epub 2012 Nov 29.

McEwen BS.(1999): Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:105-22. Review.

Minkeviciene R1, Rheims S, Dobszay MB, Zilberter M, Hartikainen J, Fülöp L, Penke B, Zilberter Y, Harkany T, Pitkänen A, Tanila H. (2009): Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *J Neurosci*. 2009 Mar 18;29(11):3453-62.

Mishizen-Eberz AJ, Rissman RA, Carter TL, Ikonovic MD, Wolfe BB, Armstrong DM. (2004): Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Dis*. 2004 Feb;15(1):80-92.

Mohamed A1, Posse de Chaves E. (2011): Aβ internalization by neurons and glia. *Int J Alzheimers Dis*. 2011 Feb 15;2011:127984. doi: 10.4061/2011/127984.a

Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. (1989): The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1989;29:365-402. Review. No abstract available.

Mori F¹, Ribolsi M, Kusayanagi H, Siracusano A, Mantovani V, Marasco E, Bernardi G, Centonze D.(2011): Genetic variants of the NMDA receptor influence cortical excitability and plasticity in humans. *J Neurophysiol*. 2011 Oct;106(4):1637-43. doi: 10.1152/jn.00318.2011. Epub 2011 Jul 13.

Mota SI, Ferreira IL, Rego AC (2014): Dysfunctional synapse in Alzheimer's disease - A focus on NMDA receptors. *Neuropharmacology*. 2014 Jan;76 Pt A:16-26. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.08.013. Epub 2013 Aug 22.

Mozhui K, Karlsson RM, Kash TL, Ihne J, Norcross M, Patel S, Farrell MR, Hill EE, Graybeal C, Martin KP, Camp M, Fitzgerald PJ, Ciobanu DC, Sprengel R, Mishina M, Wellman CL, Winder DG, Williams RW, Holmes A.(2010): Strain differences in stress responsivity are associated with divergent amygdala gene expression and glutamate-mediated neuronal excitability. *J Neurosci*. 2010 Apr 14;30(15):5357-67. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5017-09.2010.

Nagele RG, D' Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang HY.(2003): Astrocytes accumulate A β 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res* 2003;971:197-209

Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC, Wegiel J. (2004): Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2004 May-Jun;25(5):663-74. Review.

Neves G, Cooke SF, Bliss TV. (2012): Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jan;9(1):65-75.

Neves G, Cooke SF, Bliss TV.(2008): Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jan;9(1):65-75.

Newman EA. (2003): New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci*. 2003 Oct;26(10):536-42. Review.

Nicoll JA, Weller RO.(2003): A new role for astrocytes: beta-amyloid homeostasis and degradation. *Trends Mol Med*. 2003 Jul;9(7):281-2.

Olabarria M, Noristani HN, Verkhratsky A, Rodriguez JJ. (2010): Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia* 2010;58:831–838

O'Toole KK, Hooper A, Wakefield S, Maguire J (2014): Seizure-induced disinhibition of the HPA axis increases seizure susceptibility. *Epilepsy Res*. 2014 Jan;108(1):29-43. doi: 10.1016/j.eplesyres.2013.10.013. Epub 2013 Oct 28.

Palop JJ, Mucke L. (2009): Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2009 Apr;66(4):435-40. doi: 10.1001/archneurol.2009.15. Epub 2009 Feb 9. Review.

Pandis D, Scarmeas N. (2012): Seizures in Alzheimer disease: clinical and epidemiological data. *Epilepsy Curr*. 2012 Sep;12(5):184-7. doi: 10.5698/1535-7511-12.5.184.

Papa M, De Luca C, Petta F, Alberghina L, Cirillo G. (2014): Astrocyte-neuron interplay in maladaptive plasticity. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014 Feb 6;42C:35-54. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.01.010. [Epub ahead of print] Review.

Parameshwaran K¹, Dhanasekaran M, Suppiramaniam V. (2008): Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. *Exp Neurol*. 2008 Mar;210 (1):7-13. Epub 2007 Oct 24.

Park, J., Jang,M., Chang, S., (2013): Deleterious effects of soluble amyloid-beta oligomers

Park, T.J., Chung, S., Han, M.K., Kim, U.H., Kim, K.T., 1997. Inhibition of voltage-sensitive calcium channels by the A2A adenosine receptor in PC12 cells. *J. Neurochem*. 71, 1251±1260.

Parodi, J., Sepulveda, F.J., Roa, J., Opazo, C., Inestrosa, N.C., Aguayo, L.G. (2010): Beta-amyloid causes depletion of synaptic vesicles leading to neurotransmission failure. *J. Biol. Chem*. 285, 2506e2514.

Parpura V, Verkhratsky A.(2012): Homeostatic function of astrocytes: Ca(2+) and Na(+) signalling. *Transl Neurosci*. 2012 Dec;3(4):334-344.

Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG. (2005): Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*. 2005 Oct 7;310(5745):113-6.

Paula-Lima AC, Brito-Moreira J, Ferreira ST. (2013): Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2013 Jul;126(2):191-202. doi: 10.1111/jnc.12304. Epub 2013 May 28.

Pearson T, Damian K, Lynas RE, Frenguelli BG. (2006): Sustained elevation of extracellular adenosine and activation of A1 receptors underlie the post-ischaemic inhibition of neuronal function in rat hippocampus in vitro. *J Neurochem*. 2006 Jun;97(5):1357-68.

Petroff OA, Errante LD, Rothman DL, Kim JH, Spencer DD. (2002): Glutamate-glutamine cycling in the epileptic human hippocampus. *Epilepsia*. 2002 Jul;43(7):703-10.

Plamondon H, Blondeau N, Heurteaux C, Lazdunski M. (1999): Mutually protective actions of kainic acid epileptic preconditioning and sublethal global ischemia on hippocampal neuronal death: involvement of adenosine A1 receptors and K(ATP) channels. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999 Dec;19(12):1296-308.

Puzzo D, Privitera L, Fa' M, Staniszewski A, Hashimoto G, Aziz F, Sakurai M, Ribe EM, Troy CM, Mercken M, Jung SS, Palmeri A, Arancio O. (2011): Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol*. 2011 May;69(5):819-30. doi: 10.1002/ana.22313. Epub 2011 Apr 6.

Querfurth HW, LaFerla FM. (2010): Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362:329–344. CrossRef Medline

Rebola N, Pinheiro PC, Oliveira CR, Malva JO, Cunha RA. (2003): Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Res*. 2003 Oct 10;987(1):49-58.

Rebola N, Rodrigues RJ, Oliveira CR, Cunha RA. (2005): Different roles of adenosine A1, A2A and A3 receptors in controlling kainate-induced toxicity in cortical cultured neurons. *Neurochem Int*. 2005 Oct;47(5):317-25.

Ribeiro JA. (2005): What can adenosine neuromodulation do for neuroprotection? *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005 Aug;4(4):325-9. Review.

Rodríguez JJ, Olabarria M, Chvatal A, Verkhratsky A. (2009): Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ*. 2009 Mar;16(3):378-85. doi: 10.1038/cdd.2008.172. Epub 2008 Dec 5. Review.

Rossner S, Lange-Dohna C, Zeitschel U, Perez-Polo JR. (2005): Alzheimer's disease beta-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. *J Neurochem* 2005;92:226–234.

Sántha P., Pákási M., Fazekas Ö., Fodor E., Kálmán S., Kálmán J. Jr., Janka Z., Szabó Gy., Kálmán J. (2012): Restraint stress in rats alters gene transcription and protein translation in the hippocampus. *Neurochemical Research* .May 2012, Volume 37, Issue 5, pp 958-964

Scemes E, Giaume C. (2006): Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia*. 2006 Nov 15;54(7):716-25. Review.

Scemes E, Giaume C.(2006): Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia*. 2006 Nov 15;54(7):716-25.

Schaeffer EL, Gattaz WF. (2008): Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A2 enzyme. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008 May;198(1):1-27. doi: 10.1007/s00213-008-1092-0. Epub 2008 Feb 19.

Schell MJ1, Molliver ME, Snyder SH. (1995): D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Apr 25;92(9):3948-52.

Sebastião AM, Ribeiro JA.(1996): Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog Neurobiol*. 1996 Feb;48(3):167-89.

Segal, M., (1982): Intracellular analysis of a post-synaptic action of adenosine in the rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol*. 49, 193±199.

Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C. (2006): Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Mar;7(3):194-206. Review.

Selkoe DJ.(2002): Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 2002 Oct 25;298(5594):789-91.

Serrano A, Haddjeri N, Lacaille JC, Robitaille R. (2006): GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J Neurosci*. 2006 May 17;26(20):5370-82.

Shapiro LA, Ribak CE, Jessberger S. (2008): Structural changes for adult-born dentate granule cells after status epilepticus. *Epilepsia*. 2008 Jun;49 Suppl 5:13-8. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01633.x. Review.

Shen HY, Lusardi TA, Williams-Karnesky RL, Lan JQ, Poulsen DJ, Boison D. (2011): Adenosine kinase determines the degree of brain injury after ischemic stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011 Jul;31(7):1648-59. doi: 10.1038/jcbfm.2011.30. Epub 2011 Mar 23.

Simpson JE, Ince PG, Lace G, et al.(2010): Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol Aging* 2010;31:578–590.

Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P.(2005): Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci*. 2005 Aug;8(8):1051-8. Epub 2005 Jul 17.

Stephen G. Waxman (2005): Összehasonlító neuroanatómia; Medicina kiadó

Temkin NR, Davis GR (1984): Stress as a risk factor for seizures among adults with epilepsy. *Epilepsia*. 1984 Aug;25(4):450-6.

Thompson K, Holm AM, Schousboe A, Popper P, Micevych P, Wasterlain C. (1998): Hippocampal stimulation produces neuronal death in the immature brain. *Neuroscience*. 1998 Jan;82(2):337-48.

Thompson, S.M., Hass, H.L., Gahwiller, B.H. (1992): Comparison of the actions of adenosine at pre- and post-synaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol*. 451, 347±363.

Thurman, DJ; Beghi, E; Begley, CE; Berg, AT; Buchhalter, JR; Ding, D; Hesdorffer, DC; Hauser, WA; Kazis, L; Kobau, R; Kroner, B; Labiner, D; Liow, K; Logroscino, G; Medina, MT; Newton, CR; Parko, K; Paschal, A; Preux, PM; Sander, JW; Selassie, A; Theodore, W; Tomson, T; Wiebe, S; (2011): "Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy." *Epilepsia*. 52 Suppl 7: 2–26.

Tsai G, Coyle JT.(2002): Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002;42:165-79. Review.

Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S.(1996): The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*. 1996 Dec 27;87(7):1327-38.

Umemori J, Takao K, Koshimizu H, Hattori S, Furuse T, Wakana S, Miyakawa T.(2013): ENU-mutagenesis mice with a non-synonymous mutation in *Grin1* exhibit abnormal anxiety-like behaviors, impaired fear memory, and decreased acoustic startle response. *BMC Res Notes*. 2013 May 21;6:203. doi: 10.1186/1756-0500-6-203.

van Groen T, Kiliaan AJ, Kadish I.(2006): Deposition of mouse amyloid beta in human APP/PS1 double and single AD model transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 2006 Sep;23(3):653-62. Epub 2006 Jul 10.

Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H. (1998): Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev*. 1998 Jan;78(1):99-141.

Walter F. Boron and Emile L. Boulpaep (2011) *Medical Physiology* 2nd edition. Elsevier.

Wang HW, Pasternak JF, Kuo H et al. (2002): Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res*. 924:133-140, 2002.

Wetherington J, Serrano G, Dingledine R. (2008): Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron*. 2008 Apr 24;58(2):168-78. doi: 10.1016/j.neuron.2008.04.002. Review.

Wilden, JA; Cohen-Gadol, AA (2012): Evaluation of first nonfebrile seizures. *American family physician* 86 (4): 334–40.

Wu, L.G., Saggau, P., (1994): Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron*. 12, 1139±1148.

Yawo, H., Chuhma, N., (1993): Preferential inhibition of o-conotoxin-sensitive presynaptic Ca²⁺ channels by adenosine autoreceptors. *Nature*. 365, 256±258.

Zarate C Jr, Machado-Vieira R, Henter I, Ibrahim L, Diazgranados N, Salvatore G.(2010): Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders? *Harv Rev Psychiatry*. 2010 Sep-Oct;18(5):293-303. doi: 10.3109/10673229.2010.511059. Review.

Zhao MG, Toyoda H, Lee YS, Wu LJ, Ko SW, Zhang XH, Jia Y, Shum F, Xu H, Li BM, Kaang BK, Zhuo M. (2005): Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron*. 2005 Sep 15;47(6):859-72.

Zimmermann H, Braun N.(1996): Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system. *J Auton Pharmacol*. 1996 Dec;16(6):397-400.

Ziyatdinova S1, Gurevicius K, Kutchiashvili N, Bolkvadze T, Nissinen J, Tanila H, Pitkänen A. (2011): Spontaneous epileptiform discharges in a mouse model of Alzheimer's disease are suppressed by antiepileptic drugs that block sodium channels. *Epilepsy Res*. 2011 Mar;94(1-2):75-85. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2011.01.003.

<http://jaxmice.jax.org/strain/005864.html> (Utolsó letöltés: 2014. 04.10.)

http://www.frontiersin.org/files/Articles/30507/fendo-03-00113-HTML/image_m/fendo-03-00113-g002.jpg (Utolsó letöltés: 2014. 04.10.)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> ((Utolsó letöltés: 2014. 04.11.)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Utolsó letöltés: 2014. 04.11.)

VIII. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott*Ivitz Eszter Virág*..... a dolgozatomban leírt munkafolyamatok közül a:

- Teljes RNS izolálást
- mRNS-ről történő cDNS átírást
- Real-time PCR-t
- Kiértékelést

végeztem el.

.....
aláírás

Szeged, 2013. május 14.