Az MTT, az LDH és a bis-ANS újszerű alkalmazása: az extracelluláris béta-amiloid precipitációjának *ex vivo* modellezése

Ph.D. Tézisfüzet

Jánosi-Mózes Emese Szilvia

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
Idegtudományok Alprogram

Témavezető: Dr. Datki Zsolt László
Általános Orvostudományi Kar
Pszichiátriai Klinika
Szegedi Tudományegyetem

Szeged
2021

Az értekezés alapját képező közlemények:

I. **Mozes E**, Hunya A, Toth A, Ayaydin F, Penke B, Datki ZL. A novel application of the fluorescent dye bis-ANS for labeling neurons in acute brain slices. Brain Res Bull. 2011;86(3-4):217-221. doi:10.1016/j.brainresbull.2011.07.004 **IF: 2.818**

II. **Mozes E**, Hunya A, Posa A, Penke B, Datki Z. A novel method for the rapid determination of beta-amyloid toxicity on acute hippocampal slices using MTT and LDH assays. Brain Res Bull. 2012;87(6):521-525. doi:10.1016/j.brainresbull.2012.02.005 **IF: 2.935**

III. Datki Z, Galik-Olah Z, **Janosi-Mozes E**, et al. Alzheimer risk factors age and female sex induce cortical Aβ aggregation by raising extracellular zinc [published online ahead of print, 2020 Jun 9]. Mol Psychiatry. 2020;10.1038/s41380-020-0800-y. doi:10.1038/s41380-020-0800-y **IF: 12.384**

A tézis alapját képező közlemények összesített impakt faktora: 18.137

Tudományos munkám összesített impakt faktora: 26.911

Rövidítések jegyzéke

1,1'-dioctadecyl-3,3,3'3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate **(DiI)**; 3-octadecyl-2-[3-(3-octadecyl-2(3H)-benzoxazolylidene)-1-propenyl]-, perchlorate **(DiO)**; 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav (**HEPES**); 4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonic acid **(bis-ANS)**; 4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (**MTT**); 8-Anilinonaphthalene-1-sulfonic acid **(ANS)**; Alzheimer kór **(AK)**; amiloid prekurzor fehérje (amyloid precursor protein**; APP**); amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid **(AMPA);** béta-amiloid (amyloid-beta; **Aβ, Aβ1-42**); cink transzporter fehérje 3 (zinc transporter 3; **ZnT3);** Cornu Ammonis **(CA1, CA2, CA3);** dentate gyrus **(DG);** dimetil sulfoxide (**DMSO**); disszociációs konstans (**Kd**); ethylenediaminetetraacetic acid és Ca^{2+}- al szaturált formája (**EDTA, CaEDTA**); *ex vivo* rendszer (*ex vivo* system; **ExViS**); HEPES-pufferelt sóoldat (HEPES-buffered saline; **HBS);** hilus (**Hil**); hosszútávú potencírozódás (long-term potentiation; **LTP**); humán béta-amiloid (**h-Aβ**); humán neuroblasztóma sejtvonal (**SH-SY5Y**); laktát dehidrogenáz (**LDH**); magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum;

FBS); mesterséges cerebrospinális folyadék (artificial cerebrospinal fluid; **ACSF**)**;** mikrotubulushoz asszociált fehérje 2 (microtubule-associated protein 2; **MAP2**); N-Methyl-D-aspartic acid vagy N-Methyl-D-aspartate (**NMDA**); N-Methyl-D-aspartate Receptor **(NMDA-R);** N,N,N′,N′-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine (**TPEN**); nicotinamid adenin dinukleotid foszfát (**NADPH**); normalizált fluoreszcencia intenzitás (**NFI**); oldékony amiloid prekurzor fehérje (soluble amyloid precursor protein; **sAPPα**); optikai denzitás (**OD**); organotipikus hippokampális agyszelet kultúra (organotypic hippocampal slice culture; **OHSC**); oxigén-glükóz megvonás (oxygen-glucose deprivation; **OGD);** patkány béta-amiloid (rat amyloid-beta; **AβΔ2His**; **r-Aβ)**; propídium jodid (propidium iodide; **PI**); serkentő posztszinaptikus mező-potenciál (field excitatory postsynaptic potential; **fEPSP**); sokelektródás rendszer (multi-electrode array; **MEA**); subiculum (**Sub**); „theta-burst" stimuláció (**TBS**).

1. Bevezetés

Az Alzheimer-kór (AK) lefolyása során a hippokampusz neuronjainak 80%-a károsodik és/vagy elpusztul. Ennek következtében a betegség előrehaladtával kognitív zavarok jelennek meg, valamint dezorientáció és új – elsősorban az időre és térre vonatkozó – emlékek létrejötte lehetetlenné válik. A hippokampusz glutamáterg rendszerében az N-metil-D-aszpartát receptorok (NMDA-R), nagy sűrűségben fordulnak elő, így ez az agyterület kiemelkedő szerepet tölt be a memória és a tanulás központi formáiban. A posztszinaptikus NMDA-R lokális regulációja és aktivációja olyan jelátviteli kaszkádokat indít el, amelyek kulcsfontosságúak az ún. hosszútávú potencírozodás (LTP) létrejöttében és a szinaptikus plaszticitásban.

Az agyszelet-technikák fejlődésével az *ex vivo* (élő szervezeten kívüli, szövetazonos szerkezettel) modellek egyre nagyobb jelentőségre tesznek szert a neurodegeneratív betegségek pathofiziológiájának szövetszintű tanulmányozásában. Az *in vivo* modellekkel szemben, alkalmazásukkor nincs szükség hosszadalmas és bonyolult műtétek elvégzésére, pl. az agyi sérülés modellezése céljából vagy számos, összetett paraméter nyomonkövetése miatt, ugyanakkor megőrzik az eredeti szöveti architektúrát és sejt-sejt kapcsolatok dinamikáját. A hippokampális agyszeletek alkalmasságát a szinapszisok szerkezeti és funkcionális tanulmányozására számos tanulmány validálta, mind molekuláris, mind sejt- és hálózati szinten. A hippokampális agyszeleteken végzett sikeres, ill. fiziológiailag releváns mérések egyik kulcsfontosságú tényezője az életképesség minél hosszabb idejű fenntartása az *in vivo* fiziológiás körülmények biztosításával. Ennek érdekében laboratóriumunk kifejlesztett egy készüléket, egy ún. *ex vivo* rendszert (*ExViS*), amely költséghatékony és működőképes megoldást nyújt az akut

agyszeletek életképességének megőrzésére, akár több órás kezeléseket igénylő kísérletekben is.

Az AK során kialakuló, ún. szenilis plakkok egyik meghatározó komponense a béta-amiloid peptid (Aβ) különböző szintű aggregátuma. Bár e plakkoknak is vannak káros tulajdonságai (pl. disszociációs egyensúlyi források), az Aβ szolubilis, oligomer formáiról ma már tudjuk, hogy különösen neurotoxikusak. Az Aβ aggregátumok toxicitásának és új gyógyszerjelöltek védő hatásának mérésére megbízható, gyors, reprodukálható, érzékeny és releváns tesztekre van szükség a kutatásban. Az *ex vivo* agyszeleteken végzett elektrofiziológiai vizsgálatok mellett, az *in vitro* sejtkultúrákon végzett tetrazólium teszt (MTT) – amely a mitokondriális NADH-aktivitásról tájéjoztat – is általánosan alkalamzott módszer az Aβ toxikus hatásának vizagálatára. Célunk az volt, hogy egy olyan újszerű eljárást tervezzünk, amely képes az Aβ élettani hatásainak kvantitatív mérésére a hippokampusz szövetszintű kontextusában. Mérési modellünket az öregedés egy releváns eseményével egészítettük ki: az Aβ1-42 kezelés mellett az akut hippokampális agyszeletek egy enyhe glükóz-oxigén megvonáson (OGD) is átestek. Az agyi hipoperfúzió az AK egy ok-okozati jelensége, amely növelheti a betegség kialakulásának kockázatát. Az OGD-kezelt akut hippokampális agyszeleteken az Aβ toxicitás releváns modellként jelenik meg, amely ezáltal egyszerű, kvantitatív *ex vivo* módszerként szolgálhat potenciális védőanyagok tesztelésére.

Az agyban és a hippokampuszban megfigyelhető neurodegeneratív jelenségekről bővebb, mélyebb ismeretek szerezhetők, ha a sejtszintű fiziológiai vizsgálatainkat szövetszintű statikus képalkotó eljárásokkal is kiegészítjük. *In vitro* sejttenyészeten, valamint akut hippokampális agyszeleteken egyaránt az Aβ oligomerizációval kapcsolatos vizsgálataink bizonyították az oligomer-specifikus bis-ANS fluoreszcens festék neuronok jelölésére való alkalmasságát. E tanulmányban kifejtettük a bis-ANS újszerű alkalmazási lehetőségét mechanikailag sérült neuronok jelölésére az akut hippokampális szeletek felületén és e tulajdonságait a már széleskörben ismert és alkalmazott propidium jodid (PI) és a karbocianin alapú DiI fluoreszcens festékek kontextusában szemléltettük.

Az endogén eredetű, glutamáterg forrású cink ionok (Zn^{2+}) kulcsofontosságú szerepet játszanak a szinaptikus plasztícitás, a tanulás és a memória-kapcsolt folyamatok megfelelő működésében. Számos tanulmány rámutatott arra, hogy a cink homeosztázis felborulása – legyen szó cinktöbbletről vagy hiányról – kapcsolatba hozható különböző neurodegenratív betegségekkel, beleértve az AK-t is. A neuronokból felszabaduló Zn^{2+} kölcsönhatásba léphet az Aβ-val – akár már a szinaptikus résben is – és kimutatható az AK páciensek *post mortem* feltárt agyából származó szenilis plakkok centrumában. A kiválasztott

Zn^{2+} kötődik az NMDA, AMPA és glicin receptorokhoz és általában attenuációval szabályozza azok dinamikáját. A hippokampuszban található Zn^{2+} elengedhetetlen feltétele az LTP indukciónak. A közelmúltban publikált tanulmányunkban kimutattuk, hogy amennyiben masszív Zn^{2+} felszabadulást indukálunk az akut hippokampális agyszeletek neuronjaiban, az Aβ1-42 szinte azonnal bis-ANS festékkel specifikusan jelölhető oligomerekké aggregál. A jelenség következtében sérül az akut hippokampális szeletek életképessége és az LTP.

2. Célkitűzések

Doktor-jelölti tanulmányaim alatt végzett kutatás során, szoros csapatmunkával az alábbi célkitűzéseket valósítottuk meg:

1. Az MTT és a laktát dehidrogenáz (LDH) tesztek újszerű alkalmazása az Aβ1-42 aggregáció hatásának vizsgálatában, az öregedő agyat modellező akut hippokampális agyszeletekre finomhangolva;
2. A bis-ANS fluoreszcens festék újszerű alkalamazási lehetőségének feltárása az akut hippokampális szeletek felszínén található neuronok nyúlvány-keresztmetszeteinek jelölésére, valamint részletes fluoreszcens képalkotásban való alkalmazása az *ex vivo* hippokampusz strukturális, szövetszintű kontextusában;
3. A Zn^{2+} által indukált Aβ aggregáció *ex vivo* modelljének kidolgozása és az aggregált Aβ-Zn-precipitátum hatásának validálása az életképességre és szinaptikus működésre.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Akut hippokampális és más agyszeletek elkészítése

Klorál-hidrátos altatást (0,4 g/kg) követően a 10 ± 1 hetes hím patkányokat dekapitáltuk. A skalpbőr nélküli fejet 1 percre jéghideg desztillált víz alá helyeztük. Az agyat gyorsan kivettük, majd alacsony Ca^{2+} és emelt Mg^{2+} tartalmú, 4 ºC hőmérsékletű mesterséges gerincvelőfolyadékba (ACSF, preparáló oldat) merítettük. A preparáló oldat összetétele a következő volt (az értékek mM-ban értendők): NaCl 127; KCl 2; $MgCl^2$ 3,5; $CaCl_2$ 0,5; $NaHCO_3$ 25; d-glükóz 10; pH = 7,4. Ezután 0,4 mm vastagságú agyszeleteket vágtunk McIlwain szövetszeletelő készülékkel a hippokampuszból, a kisagyból és a neokortexből 4 ºC hőmérsékleten. Az agyszeletek területének méretét preparáló mikroszkóp alatt határoztuk meg. A wellek területe (15 mm^2) szolgált a kalibráció alapjául. A ≈9 mm^2 területű szeleteket további kezelés céljából gyorsan a karbogenizációs minikamrába (4.1 fejezetben ismertetett *ExViS*) vagy festés esetén Petri-csészébe helyeztük.

3.2. H-ACSF oldatok összetétele különböző kísérletekhez

Kísérleteinkben az alábbi 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav (HEPES)-tartalmú ACSF oldat-variációkat alkalmaztuk (a mennyiségek mM-ban értendők):

- H-ACSF/1: NaCl 122; KCl 3; $CaCl_2$ 0,3; $MgCl_2$ 3.7; $NaHCO_3$ 25; HEPES 5; d-glükóz 10; pH=7,4.
- H-ACSF/2: NaCl 132; KCl 3; $CaCl_2$ 2; $MgCl_2$ 2; $NaHCO_3$ 25; HEPES 5; pH=7,4.
- H-ACSF/3: NaCl 120; KCl 3; $CaCl_2$ 2; $MgCl_2$ 2; $NaHCO_3$ 25; HEPES 5; d-glucose 12; pH=7,4 (normál kalcium, magnézium és glükóz szint)

3.3. Akut hippokampális agyszeletek fluoreszcens festése

Az elkészült agyszeleteket, festés céljából, a szövetszeletelő tálcáról azonnal Petri-csészébe helyeztük. Mosás után a szeleteket tárgylemezre helyeztük, a mintát fedőlemezzel borítottuk. A fedőlemez és a tárgylemez távolságát egy kétoldalú ragasztópapír segítségével állítottuk be 0,4 mm-re. Minden, a hippokampusz középső részéből (± 2 mm) származó, anatómiailag ép szelet alkalmas volt a kísérletekre. A festő oldat az alábbi kompnenseket tartalmazta (a mennyiségek mM-ban értendők): NaCl 129; HEPES 20; $NaHCO_3$ 10; szukróz 10 (pH = 7,4), kiegészítve 10 µM bis-ANS, 3 µM PI vagy 50 µM DiI fluoreszcens festékekkel (1%-os dimetil szulfoxid [DMSO] oldatban). A bis-ANS és PI festékeket szimultán alkalmaztuk 10 percig, míg a bis-ANS/DiI jelölés során a kétféle festést egymás után végeztük el. Először 15 percig festettünk DiI-vel, majd a fent leírt összetételű oldattal mostuk a mintát, ezután 10 percig festettünk bis-ANS-vel.

3.4. Neuroblasztóma sejtek tenyésztése és fluoreszcens festése

Az SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonalat 24 óráig Petri-csészében 37 ^{o}C-on szélesztettük $3x10^4$ sejt/well és 5%-os konfluencia eléréséig, CO_2 inkubátorban. A sejtek tápoldata az allábbiakat tartalmazta: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (MEM):F-12 (1:1) fenol vörös, l-glutamin (4 mM), penicillin (200 egység/ml), sztreptomicin (200 g/ml), MEM nem esszenciális aminosav oldat (100× folyadék mg/L) és 10% magzati szarvasmarha szérum (FBS). Miután egy pengével egy egyenes vonal mentén vágást ejtettünk a monolayeren, 10 percig inkubáltuk a sejteket bis-ANS és PI jelenlétében.

3.5. Fluoreszcens mikroszkópia

A méréseket szobahőmérsékleten (24 ^{o}C) végeztük. A képek egy 24-bites Colour-View II FW kamerával készültek (2080 x 1544 pixel CCD érzékenység), amely az OLYMPUS IX71 inverz fluoreszcens mikroszkóp képalkotó rendszeréhez kapcsolódott. A képeket az analySIS 3.2 szoftver

segítségével készítettük és elemeztük. A különböző festékek fluoreszcenciáját az alábbi hullámhossz beállításokkal detektáltuk: (ex./em.): 380/535 nm (bis-ANS), 530/620 nm (PI) and 550/620 nm (DiI).

3.6. Hippokampális szeletek Aβ1-42 kezelése

A szeleteket jéghideg H-ACSF/1 oldatban preparáltuk, majd fotókat készítettünk, hogy meghatározhassuk a területüket. A kb. 9 mm^2 területű szeleteket gyorsan áthelyeztük az *ExViS* minikamrába (max. 5 szelet 1 ml H-ACSF/1 oldatban) és 30 percig kondicionáltuk karbogenizált preparáló oldatban (95/5% : O_2/CO_2) szobahőmérsékleten (24 ºC).

30 perc elteltével a hippokampális szeleteket a minikamrából 1 órára glükóz-mentes H-ACSF/2 oldatot tartalmazó (3 mL/Petri-csésze), karbogenizálástól mentes Petri-csészébe helyeztük. (A Petri-csésze egyenletes, körkörös mozgatását BIOSAN TS-100 thermo shaker eszköz segítségével biztosítottuk 375 rpm-en.) 1 óra elteltével az agyszeletek médiumát H-ACSF/3 oldatra cseréltük (3 mL/Petri-csésze). A szeleteket az Aβ1-42 kezelésre áthelyeztük a minikamrákba (max. 5 szelet 1 mL). 950 µL H-ACSF/3 oldathoz 50 µL frissen elkészített Aβ1-42 oldott oligomert adtunk (az Aβ1-42 végkoncentrációja: 20 µM). A habzást a minikamrákba helyezett, 5 mm átmérőjű úszó műanyag golyóval gátoltuk meg. Pozitív kontrollként kalsszikus apoptototikus ágensekkel kezeltük a szeleteket (pl. NaN3, H2O2, KCN és Thapsigargin).

3.7. MTT és LDH mérések

A szeletek 4 órás, 20 µM Aβ1-42 kezelése után, az LDH mérésre szánt felülúszót leszívtuk és kamránként 0,9 mL H-ACSF/3 oldatra cseréltük, amelyhez 0,1 mL MTT oldatot adtunk (5 mg/mL H-ACSF/3, az MTT végkoncentrációja így: 0,5 mg/mL volt). Az MTT hatóideje alatt (15 perc) a kamrában (*ExViS*) szünetelt a karbogenizálás. Hogy leállítsuk az MTT további redukcióját, eltávolítottuk a szeletekről a médiumot (H-ACSF/3), majd tiszta DMSO-val (100 µL/szelet/well) kioldottuk a formazán kristályokat a szeletekből (30 perc 96-well plate-ben). Ezután 70 µL DMSO-t pipettáztunk át minden wellből (szeletről) egy másik 96-well plate-be, hogy az oldott formazán optikai denzitását (OD) plate reader segítségével megmérjük (550/620 nm). A következő képletet alkalmaztuk az adatok szinkronizálásának érdekében: (OD550 – OD620)/szelet területe (mm^2) = 100% a kontrollban (Aβ1-42-vel nem kezelt szeletek).

Az LDH méréshez a fentebb említett felülúszót (H-ACSF/3) használtuk. 10 percig 500 x *g*-n centrifugáltuk, majd az LDH aktivitást standard LDH kit segítségével mértük meg. Az eredményeket az alábbi képlet segítségével számoltuk ki: (OD450 – OD620)/szelet területe (mm^2) = 100% a kontrollban (Aβ1-42-vel nem kezelt kamrákból származó médium).

3.8. A vezikuláris Zn^{2+} felszabadulása és a felszabadult Zn^{2+} által indukált Aβ oligomerizáció *ex vivo* detekálása

A fluoreszcencia intenzitás változásának kinetikáját 96-well plate-specifikus NOVOstar OPTIMA plate reader-rel mértük, amelynek üvegszál optikája (Ø 3 mm, 20 villanás/well/ciklus) lehetővé tette az adott akut agyszelet teljes felületének detektálását a well-ben.

Miután az agyszeletek 30 percig pihentek a minikamrában (*ExViS*) szobahőmérsékleten, Ca^{2+}-mentes karbogenizált ACSF-ben 30 másodpercig mostuk őket 2 mL előmelegített HEPES-pufferelt sóoldatban (HBS, összetétele mM-ban: NaCl 125; KCl 2; $CaCl_2$ 2; $MgCl_2$ 2; HEPES 25; d-glükóz 12; pH=7,4; 36 ºC). Ezután az agyszeleteket egy levágott hegyű pipetta (20-200 µL típus) segítségével a plate well-ekbe helyeztük (a wellek aljának területe: 15 mm^2). A szeleteket a médiummal együtt helyeztük át: 120 µL HBS/well. A HBS oldatot ezután óvatosan leszívtuk a szeletekről és – a mérés céljától függően – az alábbiak egyikével helyettesítettük:

a) RhodZin3, a Zn^{2+}-specifikus fluoreszcens festék HBS-ben oldva (10µM, 40 µL/well), hogy az endogén felszabaduló Zn^{2+}-et detektálhassuk; vagy

b)Bis-ANS, Aβ oligomer-specifikus fluoreszcens festék 10 µM koncentrációban az Aβ-Zn^{2+} aggregáció detektálására. Ennek érdekében, a bis-ANS-HBS oldatot szintetikus humán vagy patkány Aβ peptiddel (50 µM) egészítettük ki. Minden mérés előtt az Aβ peptid oldatot (0,5 mM) frissen készítettük el desztillált vízzel (pH=5).

Minden well közepén egy immobilizált szelet foglalt helyet. Az immobilizációt egy 40 µm pórus átmérőjű, kerek műanyag háló biztosította. Az eszköznek nem volt auto-fluoreszcenciája és kerámia csipesszel fogtuk meg. E folyamat legfeljebb 2 percet vett igénybe 10 szeletenként. A plate-et 35-36 ºC hőmérsékletre előmelegítettük. A plate reader belsejének hőmérséklete 36 ºC volt. A szeletkre helyezett műanyag háló és a well teteje közötti távolságot egységesen 9 mm-re állítottuk be egy 8,9 mm-nél jelölt műanyag cső segítségével.

A KCl kezelést (végső koncentráció: 50 mM) a plate reader-be épített mikro-pipettor segítségével hajtottuk végre (pipettázható mennyiség alsó határa: 1 µL), 420 µL/másodperc pipettázási sebességgel. A fluoreszcencia intenzitásának mérését 1 perccel a KCl kezelés előtt indítottuk el. A Zn^{2+}-felszabadulást és Zn^{2+}-Aβ precipitációt detektáló mérésekben a normalizált fluoreszcencia intenzitást (NFI) a következő képlet segítségével számoltuk ki: $(F_{max}-F_0)/F_0]$/szeletterület (mm^2), ahol F_0 a festékek kezdeti fluoreszcencia intenzitása a kezelés előtt; F_{max} pedig a fluoreszcencia intenzitás maximuma a Zn^{2+} felszabadulását követően. Egy ciklusban legfeljebb 10 well (1

szelet/well) szkennelhető (RhodZin3 λ ex. 550, em. 580 nm; bis-ANS: λ ex. 350 nm, em. 540 nm).

Egy ciklus időtartama 10 másodperc (1 másodperc/well, 20 felvillanás). A Zn^{2+}-specifitást CaEDTA hozzáadásával ellenőriztük. Az emissziót a wellek alján mértük.

3.9. Elektrofiziológiai mérések sokelektródás rendszerrel (MEA)

Egy akut hippokampális szeletet 3D-MEA chipre helyeztünk, amelyen 60 hegyes 60 μm magas elektróda helyezkedett ell 100 μm-es távolságra egymástól. A szeletről eltávolítottuk az oldatot és egy háló segítségével immobilizáltuk. A szeletet a detektálás alatt folyamatosan karbogenizált ACSF oldattal perfundáltuk (1,5 mL/perc; 34 °C). A vizsgálat előtt a szeleteket kétszer átmostuk ACSF oldatban majd további 1 órán át inkubáltuk a minikamrában, hogy meggyőződhessünk róla, hogy a preparálás során nem maradt vissza K^+ vagy peptid a médiumban. A szeleteket ezután 30 percre stabilizáltuk a MEA chipen.

Az adatokat sokcsatornás rendszeren rögzítettük. A Schaffer-kollaterálisokat kétfázisú hullámforma (100 + 100 μs) áram injektálásával stimuláltuk 0,033 Hz frekvenciával egy választott elektródán. Minden szeleten azonos régióból választottunk elektródát. A CA1 proximális *stratum radiatum* régiójából származó serkentő posztszinaptikus mező-pontenciálok (fEPSP) amplitúdó csúcsait vizsgáltuk. Egy 30 perces inkubációs periódust követően, a szeleteket folyamatosan közepes erejű stimulusokkal ingereltük. Amikor leaglább 20 percre sikerült stabil fEPSP-t előidézni, meghatároztuk az ingerlés küszöbértékét, majd felvettük a stimulus - kiváltott válasz görbét fokozatosan erősítve az ingerlést (I–O görbe, azaz input-output) a maximális ingerelhetőség eléréséig. A különböző kezelési csoportok I-O görbéje között nem volt szignifikáns különbség. A stimulusok intenzitását folyamatosan növeltük 120 μA-ig, 10 μA-es lépésekben. A teszt stimulus erősségét a küszöbinger és a maximális stimulus közötti intervallum 30%-ára állítottuk. 10 perces stabil kontroll szekvencia után théta-burst stimulációval (TBS; 15 × 100 Hz-es burst vonatok, 5 impulzus/burst, 200 ms törés intervallumok) LTP-t indukáltunk, maximális intenzitású stimulálás után 60 percig rögzítettük az fEPSP értéket.

3.10. Statisztika

Az eredményeket az értékek átlagában ± az átlag standard hibája (S.E.M) adtuk meg. A statisztikai analízist és az eredmények ábrázolását Microsoft Excel és SPSS 10.0 szoftverben Student-t teszttel és ANOVA Bonferroni post hoc teszttel végeztük el. A csoportok közötti különbségeket a kontroll mérésekhez viszonyítva adtuk meg. Az értékeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p \leq 0.001$ és $p \leq 0.05$.

4. Eredmények

4.1. Az akut hippokampális agyszeletek életképességét és a béta-amiloid toxicitását vizsgáló kísérletek

4.1.1 Megoldás az akut agyszeletek több órás kezelése miatt szükséges túlélésére az *ExViS* saját fejlesztésű rendszer segítségével

Az akut, *ex vivo* agyszeleteken végzett, lentebb említett kezelések és toxicitás mérések a szeletek 4-6 órás túlélését igénylik. Hogy az agyszövetből preparált szeletek megőrizhessék "akut" jellegüket, egy speciális, a laboratóriumunkban kifejlesztett, karbogenizációs (5% CO_2, 95% O_2) rendszerbe helyeztük őket (*ExViS*). A készülék kiemelkedően fontos egységét képezik a legömbölyített végű, 1 mL munkatérfogatú kis kamrák. A kezelés, illetve a karbogenizáció szoba- és testhőmérsékleten (36 ºC) is végbemehet ebben a gumitömítéses, csavaros kupakkal szemi-hermetikusan lezárt rendszerben. A csavaros kupak manuális, precíziós kontrollt biztosít a megfelelő karbogenizációs nyomás beállítására. A dugón függőlegesen keresztülhalad egy tű (Ø=0,6mm), amely a kamrán kívül egy kemény műanyagcsőhöz csatlakozik. A csőben egy gáznyomást szabályozó billentyű található. Minél több agyszelet kerül egy kamrába, annál rövidebb ideig biztosítható az életbenmaradásuk azonos térfogatú médiumban. Legfeljebb 10 hippokampális agyszelet inkubálható biztonságosan 30 percig ugyanabban a kamrában. Az ezen a rendszeren alapuló, későbbiekben kifejlesztett hasonló metodikánkban, amelyet ebben a dolgozatban is részletezek, ahol az akut hippokampális agyszeleteket az Aβ toxicitás mérésére használtuk (MTT és LDH teszttel), az életbenmaradást a 4 órás kezelés során is biztosítani tudtuk (5 szelet/1mL).

4.1.2 Az *ExViS* validálása

Az *ExViS* srendszert MTT életképességi teszttel és elektrofiziológiai méréssel validáltuk.

Az MTT teszt eredménye: 30 és 180 perc karbogenizáció után nem találtunk különbséget az akut hippokampális agyszeletek mitokondriális redukáló képessége, azaz életképessége között. Ugyanakkor, a nem karbogenizált agyszeletek életképessége szignifikánsan lecsökkent már kevesebb mint 180 perc elteltével.

Elektrofiziológiai eredmények: Vizsgáltuk a TBS-el indukált LTP-t, hogy kiderítsük, károsul-e egy-egy hosszabb kezelés/inkubáció alatt a szinaptikus transzmisszió. A hippokampusz CA1 disztális és proximális *stratum radiatum* régiójában rögzítettük az fEPSP értékeket. Az fEPSP amplitúdójának növekedése mindkét régióban kitartott 60 perccel a TBS után is.

4.1.3 Az Aβ1-42 toxicitás mérése glükóz-oxigén megvonáson átesett hippokampális agyszeleteken MTT és LDH tesztekkel

Az általunk kidolgozott protokoll az alább felvázolt lépésekben valósult meg:

1. Az agy eltávolítása és az akut hippokampális szeletek preparációja után ezeket 30 percre karbogenizált H-ACSF/1 oldatba helyeztük 24 ºC hőmérsékleten, a fentebb említett *ExViS* rendszerben.
2. Ezután, 1 órán át enyhe OGD-t alkalmaztunk áthelyezve a szeleteket a H-ACSF/2 oldatot tartalmazó Petri-csészébe.
3. A szeleteket visszahelyeztük a karbogenizált minikamrába és oligomer állapotú Aβ1-42 peptiddel kezeltük 4 órán át H-ACSF/3 oldatban.
4. A szeletek életképességét MTT és LDH tesztekkel vizsgáltuk.

A két teszt együttes alkalmazása az OGD hippokampális modellben koherens eredményeket adott az Aβ1-42 toxikus hatására vonatkozóan. Mind az MTT, mind az LDH teszt kimutatta, hogy 1 óra pihentetés OGD körülmények között csökkenti az akut agyszövet életképességét. Az OGD és Aβ1-42 szimultán kezelés okozta a legnagyobb mértékű életképesség-csökkenést.

4.2. A bis-ANS fluoreszcens festék új alkalmazási lehetőségei neuronok jelölésére az akut agyszövetben

Kísérleteinkben, melyeket a következő fejezetben részletezek, a bis-ANS nem-kovalens, extrinsik fluoreszcens festéket használtuk, hogy megvizsgáljuk a Zn^{2+} és Aβ1-42 közötti kapcsolatot. E kísérletek során, egy véletlennek köszönhetően felfigyeltünk rá, hogy a festék alkalmas az akut hippokampális szeletek neuronális struktúráinak jelölésére a *gyrus dentatus* (DG), C*ornu Ammonis* (CA) 1-3, *hilus* (Hil) és *subiculum* (Sub) régiókban.

A bis-ANS újonnan felfedezett neuron-jelölő tulajdonságának vizsgálata során az alábbi megfigyeléseket tettük:

1. **A bis-ANS csak élő szövetben ad specifikus jelet.** Az akut, élő agyszeletekkel ellentétben, a formaldehiddel fixált szeletek nem specifikus, homogén jelet adtak.
2. **$NaHCO_3$-mentes oldatban a bis-ANS nem emittál specifikus jelet** 10 perc festés után. Úgy tűnik, a bis-ANS fluoreszcenciája $NaHCO_3$-függő. A mechanizmus nem ismert.
3. **A bis-ANS csak membránsérült sejteket jelöl.** Nem differenciált SH-SY5Y monolayer neuroblasztóma sejttenyészeten egy penge élével egyenes vonalú vágást ejtettünk a Petri-csésze alján. 10 percig bis-ANS-sel és PI-dal (amely szintén csak mechanikusan sérült sejtekbe jut be) festettük a sejteket, majd fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk a mintát. A digitális képeket egymásra helyeztük. Azt tapasztaltuk, hogy a két festék csak a vágás mentén elhelyezkedő sejteket jelölte.

4.3. Az Aβ1-42 Zn^{2+} által előidézett toxikus aggregációjának hatása a sejt-életképességre és a szinaptikus funkcióra

4.3.1 K^+-indukált Zn^{2+} felszabadulás a különböző *ex vivo* agyszeletekben

A KCl-os kezelés (50 mM) a neuronok masszív depolarizációját idézi elő, amelynek következtében Zn^{2+} szabadul fel az extracelluláris térbe (akut agyszeletek médiumába). A Zn^{2+} felszabadulás intenzitását különböző agyi régiókból származó szeletekben mértük a cink-specifikus RhodZin3 fluoreszcens festék alkalmazásával. A fluoreszcencia intenzitás kinetikája szignifikánsan különbözött a thalamuszból, neokortexből illetve a hippokampuszból származó szeletekben. A legerősebb jelet a hippokampális szeletek produkálták, míg a thalamikus szeletek nem mutattak detektálható Zn^{2+}-felszabadulást. E tapasztalatok megegyeznek az irodalmi adatokkal.

4.3.2 Zn^{2+}-kel indukált *in vitro* Aβ aggregáció

Sejtmentes környezetben is megvizsgáltuk az Aβ aggregációját Zn^{2+} jelenlétében. Az aggregációt a bis-ANS oligomer-specifikus festék fluoreszcenciájának segítségével detektáltuk. Azt találtuk, hogy a Zn^{2+} hatására (50 μM) a humán Aβ1-42 (h-Aβ; 50 μM) aggregációja másodpercek alatt végbement, ám a folyamat könnyen visszafordítható volt miután cink-specifikus kelátort (CaEDTA, 0,5 mM) adtunk a rendszerhez. Zn^{2+} hiányában a h-Aβ lassaban és tökéletlenül aggregálódott és ezt nem befolyásolta a KCl hozzáadása sem, amelyet az endogén Zn^{2+}-felszabadulás előidézésére használtunk a további kísérletekben.

4.3.3 A K^+-mal indukált Zn^{2+}-felszabadulás hatása az Aβ aggregációjára *ex vivo* hippokampális agyszeletekben

A h-Aβ gyorsan bis-ANS fluoreszcens festékkel detektálható oligomerekké aggregálódott, miután az akut hippokampális agyszeletekben K^+-mal Zn^{2+}-felszabadulást idéztünk elő. A gyors h-Aβ aggregációt gátolni lehetett, ha a magas K^+-tartalmú pufferből a Ca^{2+}-ot kivontuk, tehát az aggregálódást serkentő faktornak mindenképpen a szinaptikus aktivitás során kellett a médiumba kerülnie. Az aggregáció folyamata visszafordítható a cink-specifikus CaEDTA hozzáadásával és a K^+-os kezelés nem okozott detektálható aggregációt a patkány Aβ (r-Aβ; AβΔ2His) esetében. E két megfigyelés alátámasztja, hogy az aggregációt okozó faktor a Zn^{2+}.

4.3.4 Az akut hippokampális agyszeletek *ex vivo* kezelése Zn^{2+}-kel és Aβ-val

4.3.4.1 A Zn^{2+} és Aβ kezelések toxikus hatása

Az akut hippokampális agyszeleteken MTT életképességi tesztet végeztünk, miután azokat Aβ1-42 (h-Aβ) és Zn^{2+} kezelésnek tettük ki (15 μM mindkét kezelés). A szeleteket nem tettük ki magas K^+ szintnek. Az MTT eredmények

azt mutatták, hogy a 3 órás Zn^{2+} vagy Aβ1-42 kezelés nem csökkentette jelentősen az életképességet, ám a két ágenssel való együttes kezelés szignifikáns ($p<0.001$) életképesség-csökkenést okozott. A kontroll esetében nem tapasztaltunk életképesség-csökkenést a 3 órás inkubáció után.

4.3.4.2 Az LTP sérülése Zn^{2+} és Aβ kezelések következtében

A Zn^{2+}-kel kezelt szeletekben előidézett válasz az 50-90 µA stimulációs tartományban szignifikánsan kisebb intenzitású volt a kontrollhoz képest. Az h-Aβ-val kezelt szeletek előidézhető válasza még kisebb volt. Nem várt módon, azokban a szeletekben amelyeket egyszerre kezeltünk Zn^{2+}-kel és Aβ-val, nem tudtunk a stimulusra adott választ kiváltani. 10 perces stabil kontrollszekvencia rögzítése után LTP-t indukáltunk TBS-val. A maximális intenzitású stimulációra kapott fEPSP értékeket 60 percig rögzítettük. Az h-Aβ-val és Zn^{2+}-kel egyidejűleg kezelt szeletekben nem tudtunk LTP-t kiváltani.

5. Diszkusszió

A hippokampális agyszelet modelleket széles körben alkalmazzák a preklinikai és alapkutatásban a szinapszisok struktúrájának és működésének molekuláris, sejt- és hálózatszintű vizsgálatára. Három, az akut hippokampális agyszeleteken alapuló technikát fejlesztettünk ki és sikeresen alkalmaztuk őket kísérleteinkben, amelyekben modellezni szerettük volna az Aβ1-42 toxikus oligomerizációjának sejt-életképességre és a szinaptikus működésre gyakorolt hatását szöveti kontextusban.

Az *ExViS* rendszer – amely egy *ex vivo* agyszövet modellek életbentartására alkalmas univerzális minikamra rendszer – kifejlesztésének célja az volt, hogy különböző idegrendszeri betegségek pathomechanizmusát, illetve gyógyszerjelöltek hatását tudjuk gördülékenyen és költséghatékonyan vizsgálni. A készülék gazdaságosan felépíthető és legfőbb előnye a piacon megtalálható hasonló készülékekkel szemben, hogy kis munkatérfogatban is viszonylag hosszú ideig (3-4 óra) életbentartható az agyszövet. A kis munkatérfogat (1 mL) különösen hasznosnak bizonyul, amikor drága kezelőanyagokkal kell dolgozni. Ezen kívül, a készülék ún. "lebegtető inkubációt" biztosít, ennek következtében az agyszeletek nincsenek olyan nagymértékben kitéve a gravitáció-torzító hatásainak, mint egy kétdimenziós rendszer esetében. E minikamrás készülék alkalmasságát MTT teszttel és LTP vizsgálattal validáltuk Wistar patkányból származó hippokampális agyszeleteken.

E saját rendszer lehetővé tette számunkra, hogy *ex vivo* hippokampális agyszeleteken 3-4 órás kezeléseket előíró protokollokat tervezhessünk. Hogy a szeletek életképességét vagy bizonyos kezelések hatását számszerűsítve

mérni tudjuk, a sejtkultúrákon széles körben alkalmazott MTT tesztet "átszabtuk" az *ex vivo* hippokampális szöveti modellre.

Az MTT és LDH tesztek megbízható és viszonylag könnyen kivitelezhető *ex vivo* technikáknak bizonyultak az Aβ1-42 toxikus hatásának agyszövet szeleteken végzett kvantitatív vizsgálatában. A modellt az öregedés szempontjából az OGD előkezeléssel kiegészítve igyekeztünk relevánsabbá tenni. Az MTT és LDH tesztek együttes alkalmazása megbízható eredményeket szolgáltatott az Aβ1-42 toxikus hatásáról az OGD akut hippokampális szeletmodellen. Mindkét kolorimetrikus teszt az életképességet méri az OD összefüggésében, amely az MTT teszt esetében egyenesen, míg az LDH tesztben fordítottan arányos az életképességgel. Ez a különbség a két teszt eltérő hatásmechanizmusából adódik: míg az MTT teszt az ép sejtekre jellemző mitokondriális dehidrogenáz enzim aktivitását méri, addig az LDH a médiumba sejtkárosodás útján kiürült laktát-dehidrogenázt. Az OGD és Aβ1-42 kezelés együttes hatása erőteljesebb életképesség-csökkenést okozott, mint külön-külön alkalmazva. A metodikát klasszikus toxikus ágensekkel, mint a H_2O_2 vagy a Thapsigargin is validáltuk.

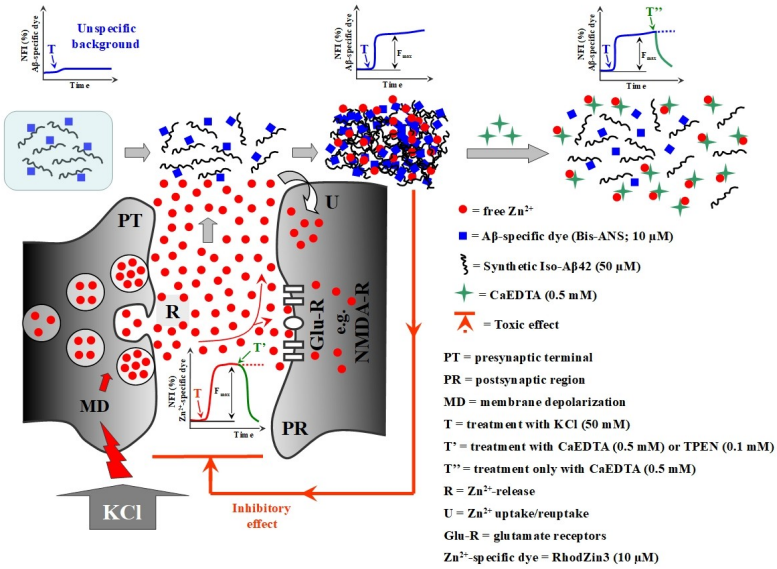
Miközben a Zn^{2+} hatását vizsgáltuk az Aβ1-42 aggregációs hajlamára, felfedeztük, hogy az eredetileg kis rendezettségű oligomerek detektálására fejlesztett bis-ANS fluoreszcens festék képes bizonyos körülmények között neuronokat jelölni az *ex vivo* agyszeleteken. A festék neuron-jelölő tulajdonságait tehát mélyebben is megvizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a bis-ANS membrán-sérült neuronokat fest az élő szövetben, így a szeletek vágási felszínén lehetővé teszi a nyúlvány-keresztmetszetek mennyiségének képi analízisét. A festék nem jelöli a neuronokat fixált szöveten, illetve $NaHCO_3$-mentes festőoldatban. Ez utóbbi mögött rejlő mechanizmus még nem ismert. A bis-ANS fluoreszcencia jelét kollokalizálni tudtuk sejtszinten PI jelével (membrán-sérült neuronok DNS-ét jelöli) és régió szinten a csupán intakt neuronokat jelölő DiI fluoreszcenciájával. A bis-ANS tehát, oligomer-specifitása mellett, alkalmas az *ex vivo* agyszeletek neuronális struktúráinak egyszerű és gyors vizualizációjára, valamint a nyúlványsűrűség meghatározására képanalizáló módszerekkel.

Az irodalmi adatokkal összhangban azt találtuk, hogy a Zn^{2+} és Aβ között lejátszódó reakció toxikus Aβ oligomereket képez és a folyamat a spontán aggregációnál rövidebb idő alatt játszódik le. Ennek következtében sérül az LTP és a hippokampális agyszeletek mitokondriális (NADH termelés) aktivitása.

Az extracelluláris Aβ toxikus oligomerizációjára egy olyan modellt javaslunk, amelyben a Zn^{2+} felszabadulása fontos szerepet játszik és az öregedéssel járó rosszabb energiaháztartás miatt, a neurotranszmisszió során, a sejtek Zn^{2+}-visszavétele kevésbé hatékony (1. ábra). E mechanizmus következtében

megnő az extracelluláris Zn^{2+} mennyisége, elősegítve az Aβ gyors aggregációját. A szinaptikus aktivitás során az Aβ is az extracelluláris térbe ürül. Az Aβ és a Zn^{2+} így a szinaptikus résben keletkező aggregátumokba csapdázódik és a szinapszis sérüléséhez vezet. Zn^{2+}-specifikus kelátor hatására az aggregátumok felbomlanak. A szinaptikus résbe ürült Zn^{2+} visszavételének mechanizmusai további kutatásokat igényelnek. Jelenleg 24 cink-transzporter fehérjéről tudunk, amelyek a cinket a citoplazmába, a vezikulákba (pl. a glutamáterg vezikulák ZnT3 cink-transzportere), vagy a sejten kívülre juttatják. Ismert néhány olyan csatorna is, amely a sejtbe való visszajuttatást végzi, úgy mint a Divalent Metal Transporter 1, AMPA/kainát és NMDA receptorok. A Zn^{2+} kapcsolódik az NMDA receptorhoz és attenuálja, gátolja azt, így elméletünk szerint a Zn^{2+} az NMDA receptor internalizálásával és reciklizálódásával juthat vissza a sejtbe. (Az NMDA receptor képes a Zn^{2+}-felvételt szabályozni, de nem ismert, hogy ez lenne a Zn^{2+}-visszavétel fő útvonala).

Az *in vivo* és *in vitro* modellek néhány hátrányát kiküszöbölve, az *ex vivo,* akut agyszelet-technika alkalmasnak bizonyult a specifikus stimulusokkal közvetlenül kiváltható molekuláris események vizsgálatára, vagy az életképességet és funkciót befolyásoló kezelések hatásának tanulmányozására háromdimenziós szöveti kontextusban. A laboratóriumunkban kifejlesztett akut hippokampális szeleteken és az Aβ1-42 oligomer toxicitásának mérésén alapuló metodika releváns és költséghatékony kísérleti modellként szolgálhat védőanyagok és hipotézisek tesztelésére viszonylag rövid idő alatt. Lehetővé teszi az iteratív tesztelést, szövetszintű toxikológiát, valamint a részletes és egyszerű képalkotást.



1. Ábra: A szinaptikus résben felszabaduló Zn^{2+} által indukált Aβ aggregáció sematikus ábrázolása és a jelenség szinaptikus működésre gyakorolt hatásának szemléltetése

6. Összefoglalás

Annak érdekében, hogy az *in vitro* és *in vivo* metodikák néhány közismert hátrányait kiküszöböljük, kifejlesztettünk egy egyszerű és gazdaságos szerkezetet, amelyet *ExViS*-nek neveztünk el (*Ex Vivo* System; univerzális minikamra rendszer) és amely képes életben tartani az akut szövetszeleteket. A rendszer megkönnyítette és lehetővé tette további akut (*ex vivo*) hippokampális agyszeleteken alapuló technikák fejlesztését, hogy az AK-ra jellemző egyes patomechanizmusokat modellezni tudjuk. PhD tanulmányaim során az alábbi akut hippokampális agyszeleteken alapuló metodikákat és *ex vivo* modelleket dolgoztuk ki:

1. Az Aβ1-42 aggregátumok (pl. oligmerek) toxicitásának gyors, megbízható és kvantitatív meghatározása öregedő (OGD) akut hippokampális szelet-modellen MTT és LDH tesztek alkalmazásával;
2. A Zn^{2+} által előidézett Aβ1-42 oligomerizáció toxikus hatásának kvantitatív meghatározása akut hippokampális szeleteken MTT teszttel;

3. Részletgazdag fluoreszcens képalkotás a neuronok nyúlvány-keresztmetszeteiről és nyúlvány-hálózatáról akut hippokampális agyszeleteken a bis-ANS újszerű alkalmazásával és annak együttfestési variációival;
4. A glutamáterg szinapszisokban felszabaduló Zn^{2+} hatása az Aβ1-42 aggregációjára és a jelenség sejtéletképességre, tanulásra és memóriára (pl. LTP) gyakorolt hatásának modellezése akut hippokampális agyszeleteken.

Az akut hippokampális agyszeleteken alapuló modellek alkalmas eszközei az AK-ra jellemző, a hippokampusz működését befolyásoló pathomechanizmusok mélyebb megértésének, különs tekintettel az Aβ oligomerizációra. Így kövezik ki a különböző hipotézisek vagy potenciális védőanyagok teszetléséhez vezető utat, valamint az *in vivo* megfigyelt jelenségek és az *in silico* predikciók validálását is lehetővé teszik.

7. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom a következő személyeknek, akik nélkül ez a kutatás és doktori tanulmányaim nem valósulhattak volna meg. Témavezetőmnek és barátomnak **Dr. Datki Zsoltnak**, aki nagy szakértelemmel és rálátással segítette munkámat és mind szakmailag, mind emberileg támogatott a legnagyobb kihívásokkal teli időszakokban is, valamint lehetőséget teremtett egy régen elkezdett kutatás fonalának újrefelvételére és disszertációvá formálására. Különösen hálás vagyok **Dr. Penke Botond Professzor Úrnak**, amiért számos lehetőséget biztosított számomra a szakmai fejlődéshez és az elhivatott kutató példaképeként tekinthettem rá kutatóéveim során. Köszönöm **Dr. Hunya Ákosnak**, hogy megtanított azokra az alapvető metodikákra és készségekre, amelyek e disszertáció egyes kísérleteinek is alapjául szolgáltak és hozzásegítettek, hogy laborunk hasznos(abb) tagjává válljak. Köszönöm **Dr. Fülöp Líviának** és **Dr. Bozsó Zsoltnak** a biokémiában nyújtott óriási szakmai segítséget és **Dr. Szegedi Viktornak**, hogy szakértelmével lehetővé tette az elektrofiziológiai méréseket. Köszönöm **Dr. Galik-Oláh Zitának**, hogy kisbabája mellett nagy türelemmel és az időt nem sajnálva alaposan átnézte és kijavította dolgozatomat. Köszönöm **Országné Mihók Mónikának** és **Gálné Batki Máriának**, a világ két legrátermettebb laboratóriumi asszisztensének, hogy gyakorlati szakértelmüknek köszönhetően a kísérletek gördülékenyen valósulhattak meg.

Nem utolsó sorban egy csodálatos ám energiaigényes kisfiú édesanyjaként, szinte lehetetlen lett volna megszakítás nélküli hosszabb időt fordítanom e dolgozat megírására, ezért köszönöm férjemnek, hogy mindezt türelemmel és odaadással lehetővé tette (és a dolgozat ábráinak szerkesztésében is segített), valamint családomnak a támogatást és bátorítást.