

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

**AZ ALZHEIMER-KÓR NEM-TRANSZGÉN ÁLLATMODELLJEINEK
FEJLESZTÉSE ÉS A BETEGSÉG KEZELÉSÉRE ALKALMAS
GYÓGYSZERJELÖLT VEGYÜLETEK VIZSGÁLATA**

Ph.D. értekezés tézisei

Borbély Emőke

Témavezető: Dr. Fülöp Livia
Orvosi Vegytani Intézet,
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar,
Szegedi Tudományegyetem

BEVEZETÉS

Az Alzheimer-kór (AK) a neurodegeneratív betegségek egyik leggyakoribb típusa, amely a tanulási és a memória folyamatok károsodása mellett komplex magatartási változásokkal jellemezhető. Az AK-os betegek száma a várható életkor emelkedésével folyamatosan növekszik, így jelentős egészségügyi és társadalmi-gazdasági problémává válik.

Az AK neuropatológiailag súlyos szinapszisvesztéssel és rosszul feltekeredett fehérjék megjelenésével jellemezhető, amelyek aggregátumokat képeznek az agyszövetben, főként a neokortexban és a hippocampusban (HK). A β -amiloid ($A\beta$) fehérjékből álló extracelluláris plakkokat, valamint a hiperfoszforilált tau proteinekből felépülő intracelluláris neurofibrilláris kötegek jelenlétét az agyban először Alois Alzheimer írta le. Ezen aggregátumok cerebrális jelenléte a betegség fő patológiai jellemzője és napjainkban is szükséges az AK diagnózisának felállításához. Az $A\beta$ felhalmozódása több évtizeddel a neurológiai tünetek és az AK diagnózisa előtt elkezdődik. Az $A\beta$ lerakódások megjelenését a cerebroszpinális folyadék megemelkedett tau-szintje, jelentős agyi atrófia, neuronális hipometabolizmus és memóriefunkció csökkenés követi.

Az AK-nak két formája van: a dominánsan öröklődő, korai kialakulású vagy familiáris AK (FAK) és a nem öröklődő, késői megjelenésű vagy sporadikus AK (SAK). Az AK fő kockázati tényezője az életkor; a legveszélyeztetettebb csoport a 65 év feletti populáció. A FAK és a SAK klinikai és szövettani tünetei hasonlóak, kialakulásuk feltehetően közös molekuláris útvonalakon történik. A mai napig kutatások folynak a betegség etiológiájának tisztázására, ezért számos hipotézist javasoltak az AD patomechanizmusának magyarázatára. Ezek közül az egyik széles körben elfogadott teória, az amiloid kaszkád hipotézis (AKH) értelmében a kór kialakulását az amiloid prekursor proteinből proteolitikus hasítás útján keletkező $A\beta_{1-42}$ fehérje túlzott mértékű felhalmozódása, illetve ennek a csökkent mértékű kiürülése okozza.

Jelenleg az AK tüneteit tudjuk kezelni, az okát megszüntető terápia nem áll rendelkezésre. Az alap- és klinikai kutatási eredmények szerint a diagnosztizált AK-os betegeknél a terápiás beavatkozások már későiek lehetnek a progresszió enyhítésére, ezért nagy szükség van a tüneteket megelőző szakaszban a betegség kimutatásának, megelőzésének és kezelésének új, az AKH helyett más lehetséges molekuláris mechanizmusokra alapozott módszereire.

CÉLOK

Az AKH alapján olyan kísérleti modellek felállítását tűztük ki célul, amelyekben a kutatócsoporton belül megtervezett és szintetizált, potenciális gyógyszerjelölt vegyületek költség- és időhatékonyan *in vivo* tesztelhetők. Ennek érdekében kezelési protokollokat fejlesztettünk és validáltunk különböző aggregációs formájú, toxikus A β alkalmazásával.

1. Az *intrahippokampális (IHK) kísérletünkben* fibrilláris A β_{1-42} -t (fA β_{1-42}) injektáltunk patkányok HK-ába és megvizsgáltuk az egyszeri alkalommal történő kezelés hatását a térbeli memóriára és a dendrittüske sűrűségére. A patkányok térbeli tanulását és memóriáját tradicionális Morris-féle vízilabirintusban (Morris water maze, MWM) teszteltük.
2. Egy potenciális gyógyszerjelölt molekula, a Leu-Pro-Tyr-Phe-Asp-amid (LPYFDa) hatását egy kooperatív projekt keretein belül teszteltük. A holland munkatársaink az oA β_{1-42} és LPYFDa hatását vizsgálták vad típusú egerekben. Az állatokat félelemkondicionáló teszteknek vetették alá. Ezzel párhuzamosan mi célul tűztük ki a térbeli memória vizsgálatát az MWM módosított változatában (mMWM). Patkányokat egyszeri alkalommal kezeltünk oA β_{1-42} -vel, melyet az entorhinális kéregbe (EK) juttattunk be. Ebben a modellben az LPYFDa kognitív folyamatokra és neuroinflammációra gyakorolt neuroprotektív hatását tanulmányoztuk (*EK kísérlet*).

Az AK-val kapcsolatos gyógyszerkutatásban bekövetkezett változás arra készítetett bennünket, hogy bővítsük kutatási területeinket, és más terápiás lehetőségeket találjunk új biológiai célpontok felhasználásával. Célunk volt, hogy tanulmányozzuk a felnőttkori neurogenesis és a neuroinflammáció szerepét az AK-ban, és ezek kapcsolatát az szigma-1 receptor (S1R) függő molekuláris folyamatokkal.

3. Egy új kísérleti modellben oligomer A β_{1-42} -t (oA β_{1-42}) intracerebroventrikulárisan (ICV) injektáltuk felnőtt, vad típusú C57BL/6 egerekbe, hogy az AK korai fázisára jellemző molekuláris folyamatokat idézzünk elő, amely során a felnőttkori neurogenesisben és a neuroinflammációban bekövetkező változások tanulmányozhatók (*ICV kísérlet*). Az A β -indukált *in vivo* egérmodellünkben célunk volt két S1R agonista, az N, N-dimetiltriptamin (DMT) és a 2-(4-morfolinetil)-1-fenil ciklohexán karboxilát (PRE084) neurogenezist befolyásoló és anti-

neuroinflammatorikus hatásának vizsgálata immunhisztokémiai módszerekkel és western blot analízissel.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Állatok

Az *IHK kísérletben* 210-230 g súlyú hím Wistar patkányokat (n=24, Charles-River, Németország) használtunk. Az *EK kísérletekhez* 8-10 hetes hím Wistar-Harlan patkányokat (n=133, Charles-River, Németország) alkalmaztunk, az állatok 250-350 g közötti súlyúak voltak. Az *ICV kísérletben* saját tenyésztésből származó hím 23-28 g-os és 12 hetes C57BL/6 vad típusú egerek (n=80) vettek részt a vizsgálatban.

A kezelésekhez alkalmazott anyagok leírása

Kutatócsoportunk az izo-A β_{1-42} peptidet, amely a természetes szekvencia kémiaiilag módosított formája, egy optimalizált szilárd fázisú peptidszintetikus eljárással állította elő. Az *IHK-kísérletekben* az fA β_{1-42} -t He és mtsai, míg az *EC-kísérletekben* az oA β_{1-42} -t Stine és mtsai módosított protokolljának alkalmazásával állítottuk elő. Az *ICV kísérletben* az izo-A β_{1-42} peptidre optimalizált saját protokollal állítottunk elő olyan oligomert tartalmazó oldatot, mely aggregációs állapotát a kísérletek időtartama alatt stabilan képes megtartani.

A neuroprotektív pentapeptidet, az LPYFD-amidot a kutatócsoportunk szintetizálta standard szilárd fázisú peptidszintézis módszerekkel.

Az 5-bróm-2-dezoxiuridint (BrdU), a DMT-t és a PRE084-et a Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) és Lipomed (AG, Switzerland) cégektől szereztük be.

Operáció, kezelési sémák

A ketamin és xilazin keverékével elaltatott állatok sztereotaxiás műtéten estek át. Mindhárom kísérletben az egyszeri injektálásokat Hamilton fecskendő segítségével végeztük el.

Az *IHK-kísérletben* az anyagokat a jobb HK-ba fecskendeztük unilaterálisan. A patkányokat véletlenszerűen két csoportba osztottuk: **1.** fA β_{1-42} (n=12); **2.** fiziológiás sóoldat (n=12).

Az *EK-kísérletben* az anyagokat bilaterálisan, oldalanként három helyre injektáltuk az EK-ba. A patkányokat az alábbi csoportokba osztottuk: **1.** PBS, n=10; **2.** LPYFDa, n=10; **3.** oA β_{1-42} , n=10; és **4.** oA β_{1-42} és LPYFDa (1:5 molarány), n=11.

Az *ICV-kísérletben* az egerek egyszeri, jobboldali ICV oA β_{1-42} vagy PBS injekciót kaptak. A vizsgálatok során az őssejtek megjelölésére BrdU oltást végeztünk. A sztereotaxiás műtét után 24 órával kezdődött meg az állatok intraperitoneális (IP) BrdU oltása, amely összesen 3 alkalommal, 6 órás időközönként történt. A műtét utáni 7-12. napon az egereket IP PRE084-

gyel vagy DMT-vel kezeltük. Ebben a kísérletben az állatokat 6 csoportba soroltuk: **1.** PBS-PBS, n=18; **2.** oA β_{1-42} -PBS, n=18; **3.** PBS-PRE084, n=11; **4.** oA β_{1-42} -PRE084, n=11; **5.** PBS-DMT, n=11; **6.** oA β_{1-42} -DMT, n=11.

Tradicionális MWM és módosított változata (mMWM)

Az *IHK-kísérletben* a térbeli tanulást és a memóriát az fA β_{1-42} beadását követő 14-20. napon tradicionális MWM-ban rögzített platform használatával vizsgáltuk. A patkányok naponta 4-szer egymás után úsztak blokkokban, 6 napon keresztül. Az utolsó úszás után 24 órával történt az állatok memóriájának tesztelése, amely során a platformot eltávolítottuk a medencéből.

Az *EK-kísérletben* a műtét utáni 15. napon kezdtük el az mMWM-et. Két műanyag platformot használtunk: egy nagyobb (d=10 cm) és egy kisebb (d=5 cm) rejtett szigetet. Az 1–5. napon a nagyobb, míg a 6. napon a kisebb platformot helyeztük a tartályba. A kísérletek során az állatokat napi kétszer úsztattuk, minden esetben két különböző indítási pontot használtunk, miközben a platform ugyanabban a pozícióban maradt. A kísérlet hat napig tartott. Az 1-4. napon az állatokat a „matching-to-sample” protokoll szerint teszteltük. Ebben a fázisban a nagy platformot minden nap áthelyeztük egy másik negyedbe (Q1-től Q4-ig). Az első úszás („minta”) során az állatoknak meg kellett tanulniuk a platform elhelyezkedését. A második úszás „tesztként” szolgált. Az 5. napon a nagy platform ugyanabba a kvadránsba került, mint előző nap (Q4), míg a 6. napon a kisebb platformot szintén a negyedik negyedbe helyeztük.

Hisztológiai vizsgálatok és western blot analízis (WB)

Az *IHK kísérletben* a viselkedési vizsgálatokat követően Golgi impregnálást végeztünk, amely során a natív patkányagyakat blokkokra vágtuk, majd a két-fázisú impregnálás után 100 μ m vastagságú hippokampális metszeteket készítettünk. A további szövettani kísérletekben (*EK*, *ICV kísérletek*) a rágszalókat klorál-hidráttal altattuk, majd transzkardiálisan perfundáltuk PBS-sel és paraformaldehiddel (PFA). Az agyakat egy napig utófixáltuk 4%-os PFA-oldatban, majd a mintákat 30%-os szacharózoldat keverékébe helyeztük.

Az *EK kísérletben* minden csoportból négy állatot dolgoztunk fel. Az utófixálást követően az EK-ból fagyasztó mikrotómmal koronális, 30 μ m vastag metszeteket vágunk. Az *ICV kísérlet* során két héttel az oA β_{1-42} beadása után dolgoztunk fel a mintákat (n=8-8 a PRE084- és DMT-kezelt csoportból, n=15-15 a kontrollcsoportokból). Az immunhisztokémiai analízist 20 μ M formalinnal fixált kriometszeteken végeztük. Az immunfestéshez a metszeteket elsődleges,

majd másodlagos antitestekkel inkubáltuk. A peroxidáz reakciót a Vectastain Elite ABC Kit rendszer alkalmazásával hajtottuk végre, szubsztrátként 3,3'-diaminobenzidint és erősítőként NiCl₂-t használtunk.

Az *EK* és az *ICV kísérlet* WB vizsgálata során a patkányok *EK*-ját (n=6 állat/csoport), valamint az egerek *HK*-ját és kortikális régióját (n=3 állat/csoport) cervikális diszlokációt követően eltávolítottuk. A szövetek homogenizálása és centrifugálása után, a fehérjemintákat SDS gélen futtattuk és nitrocellulóz membránra vittük, és elsődleges, majd másodlagos antitestekkel inkubáltuk. A minták immunoblot analízise során kimutathatóvá vált az *EK kísérletben* az $\alpha\beta_{1-42}$ hatása a GFAP expressziójára, illetve az *ICV kísérletben* az $\alpha\beta_{1-42}$, a PRE084 és a DMT S1R expresszióra gyakorolt hatása.

Az adatok kiértékelése

A Golgi technikával impregnált metszeteket inverz fénymikroszkóppal, olajimmerziós objektívek segítségével tanulmányoztunk. A dorzoventrális *HK CA1* régiójából összesen 25 piramissejtet vizsgáltunk meg állatonként (n=6 állat/csoport).

Az immunhisztokémiai mintákat egy metszetszkennel segítségével digitalizáltuk (Mirax Midi, 3DHistech Kft., Budapest, Magyarország; szoftverek: Panoramic Viewer 1.15.4, CaseViewer 2.1, QuantCenter, HistoQuant).

Az *össejtek (BrdU+)* és *neuroblasztok (DCX+)* számának meghatározását manuálisan végeztük. A denzitás meghatározásához az állatonként megszámlált sejtek számát elosztottuk a gyrus dentatus (*DG*)/*HK* területtel, és sejt/mm²-ként ábrázoltuk. A neuronal nuclei (*NeuN*), az ionizált kalciumkötő adapter molekula 1 (*Iba1*) és a GFAP esetében a neuronok (*NeuN+*), a mikroglia (*Iba1+*) és az asztrociták (*GFAP+*) területarányos sűrűségét (%) a kvantifikáló szoftver segítségével határoztuk meg.

Statisztika

Az *IHK kísérletben* a viselkedési adatokat ismételt méréses egyutas varianciaanalízissel (rANOVA) és Fisher-féle LSD post-hoc teszttel elemeztük. A Golgi-impregnálás eredményeinek értékeléséhez a független mintás Student-féle t-próbát alkalmaztuk.

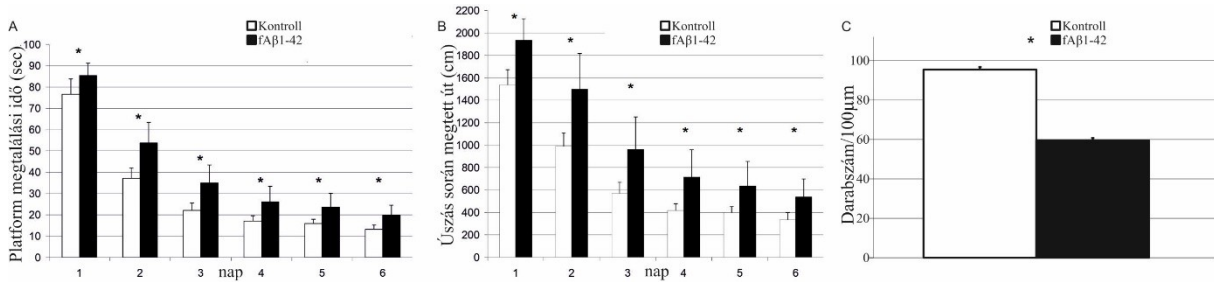
Az *EK* és *ICV kísérletekben* a viselkedési és immunhisztokémiai vizsgálatokból nyert adatokat ANOVA-val értékeltük ki, majd Fisher-féle LSD post-hoc tesztekkel végeztünk. A WB adatokat Kruskal-Wallis nem-paraméteres, majd Mann-Whitney U tesztekkel elemeztük. A statisztikai kiértékeléshez SPSS szoftvert használtunk, és az eredményeket átlag ± (SEM) értékben fejeztük ki. A statisztikai szignifikancia értéke $p \leq 0,05$.

EREDMÉNYEK

IHK kísérlet

Az fA β ₁₋₄₂ injektálása károsította a térbeli tanulási és memóriefolyamatokat az MWM-ben, valamint csökkentette a dendrittuske sűrűséget

A térbeli tanulás és memória vizsgálatát MWM-mel végeztük az fA β ₁₋₄₂ IHK bevétele után a 14-20. napon. A platform megtalálásához szükséges időt használtuk a térbeli memória kiértékeléséhez. Az eredményeink azt mutatták, hogy mindkét csoport teljesítménye napról-napra javult, amely a hosszú távú memória működését tükrözi. Habár mindkét csoportban csökkent a platform megtalálásához szükséges idő, az fA β ₁₋₄₂ csoporté a kontrollokhöz képest szignifikánsan hosszabbnak bizonyult (1.A ábra). Emellett szignifikáns különbség volt kimutatható a csoportok között az úszás során megtett útban is (1.B ábra). Az apikális dendrittuske sűrűséget Golgi festéssel határoztuk meg. A dendrittuske sűrűség eltérő volt a két csoport között, az fA β ₁₋₄₂-vel kezelt csoportban denzitásbeli csökkenést tapasztaltunk a kontrollok állatokhoz képest (1.C ábra).



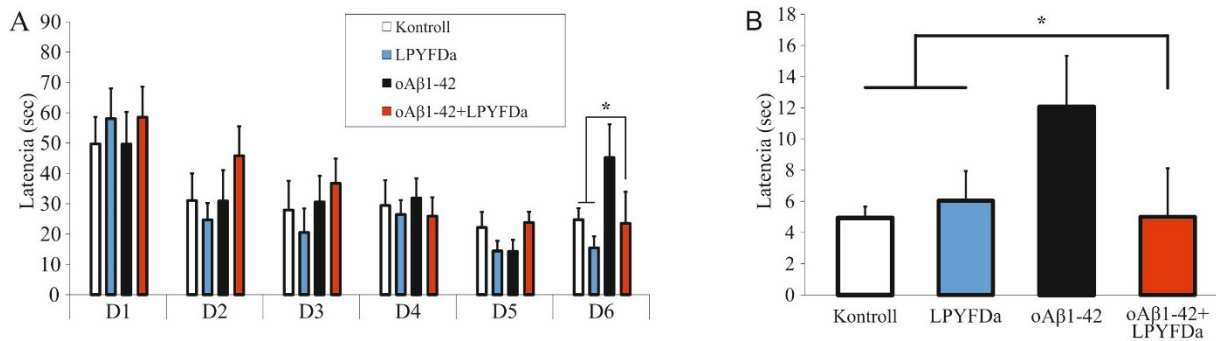
1. ábra Az IHK kísérlet eredményei. (A-B) Az fA β ₁₋₄₂-vel kezelt csoport teljesítménye csökkent az MWM-ben összehasonlítva a kontrollos csoporttal. (C) Az amiloid kezelés negatívan befolyásolta a dendrittuske sűrűséget.

EK kísérlet

Az oA β ₁₋₄₂ csökkentette, míg az LPYFDa javította a tanulási és memóriefunkciókat a kisebb platform alkalmazása során

Az EK kísérletben az oA β ₁₋₄₂ hatását teszteltük patkányokban a módosított MWM protokoll segítségével. Az LPYFDa-t, az oA β ₁₋₄₂-t vagy a két anyag kombinációját közvetlenül a patkányok EK-jába juttattuk, az mMWM-et 15 nappal az anyagok beadása után végeztük. Az állatok munkamemóriájának felmérésére a „matching-to-sample” paradigmát alkalmaztuk. Az 1-6. nap 1. úszásai során a csoportok közötti megtalálási időkből statisztikai különbséget nem lehetett kimutatni. Az 1-5. nap 2. úszásainál sem tapasztaltunk különbséget a csoportok között. Ezenkívül ebben az időintervallumban a pentapeptid is hatástalannak bizonyult. A 6. nap 2. úszásait értékelve azonban szignifikáns különbséget találtunk a platform megtalálásához szükséges időben. Az eredmények post-hoc analízise azt mutatta, hogy az

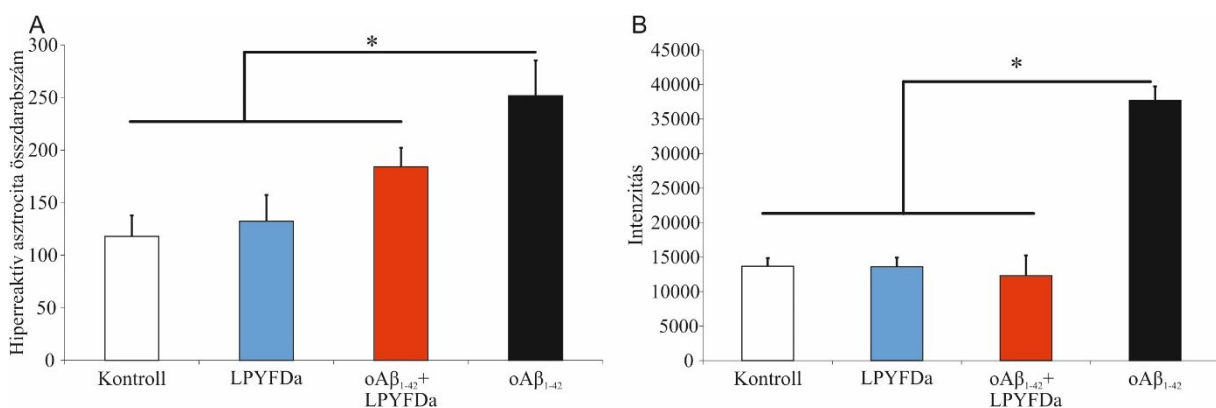
$\text{oA}\beta_{1-42}$ csoportnál hosszabb volt a megtalálási idő a másik három csoporthoz képest, amely igazolja az $\text{oA}\beta_{1-42}$ -kezelt patkányok enyhe tanulási és memória deficitjét, míg LPYFDa pozitív hatással volt a kognitív teljesítményre (2.A ábra). A 6. napon az $\text{oA}\beta_{1-42}$ -kezelt állatok új keresési stratégiája is megfigyelhető volt. A 2. úszás során a többi csoporthoz képest lényegesen hosszabb időt töltöttek a platformot keresve az annulus zónában. Emellett a keresési stratégia javulása is tapasztalható volt, amely az LPYFDa protektív hatásának tulajdonítható (2.B ábra).



2. ábra LPYFDa kísérletek viselkedési eredménye. (A) A 6 napos mMWM 2. úszásainak latenciái. (B) A keresés teljes időtartama az annulus zónában a 6. nap 2. úszásai során, amikor a kisplatformot használtuk.

Az LPYFDa gátolta az $\text{oA}\beta_{1-42}$ által kiváltott neuroinflammációs folyamatokat

Az $\text{oA}\beta_{1-42}$ és az LPYFDa asztrociták aktivációjára gyakorolt hatásának vizsgálatára immunhisztokémiai festést alkalmaztunk. Az $\text{oA}\beta_{1-42}$ injektálása megnövelte az EK-ban a hiperreaktív asztrociták számát, míg az LPYFDa szignifikánsan csökkentette az $\text{oA}\beta_{1-42}$ -vel kiváltott neuroinflammációt (3.A ábra). A WB analízis szignifikáns különbségeket tárt fel a különböző kísérleti csoportok GFAP intenzitási szintjei között, és megerősítette az immunhisztokémiai eredményeinket, mivel a GFAP intenzitása ebben a kísérletben is szignifikánsan magasabb volt az amiloiddal kezelt csoportban, összehasonlítva a többi csoporttal (3.B ábra).



3. ábra Az LPYFDa hatása az neuroinflammációs folyamatokra. (A) A GFAP festés kvantitatív immunhisztokémiai eredményei. (B) A GFAP szintek WB-elemzése.

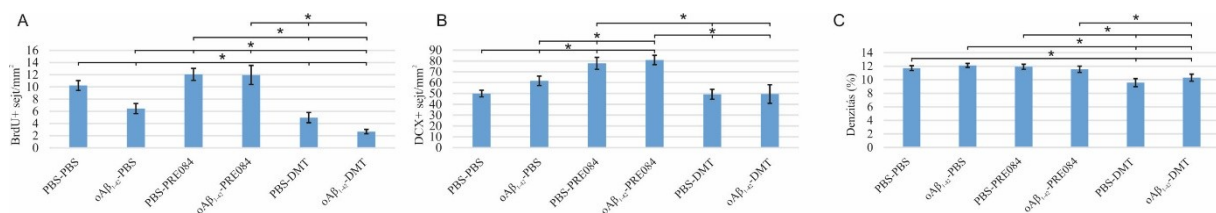
ICV kísérlet

A PRE084 és a DMT hatása a felnőttkori neurogenesisre $\alpha\beta_{1-42}$ -vel kezelt egerekben

Eredményeink statisztikai értékelése szignifikáns különbséget tárt fel a hat csoport között, a DG subgranuláris zónájában található BrdU+ őssejtek mennyiségét tekintve. Az $\alpha\beta_{1-42}$ szignifikánsan csökkentette a progenitor sejtek számát a kontrollcsoporthoz képest. A DMT-vel kezelt állatokban negatív változásokat észleltünk, az $\alpha\beta_{1-42}$ -DMT csoportban alig volt BrdU+ őssejt kimutatható. A PRE084 kezelés növelte a BrdU+ sejtek mennyiségét; az $\alpha\beta_{1-42}$ -vel kezelt csoportok közötti különbség szignifikáns volt (4.A ábra).

A PRE084 és a DMT szemcsesejtek érésére gyakorolt hatásának vizsgálata során az éretlen neuronokra jellemző mikrotubulusos-asszociált fehérjét, az úgynevezett doublecortint (DCX) jelöltük meg immunhisztokémiai módszerek segítségével, amely specifikusan a migráló neuronális prekurzorokban expresszálódik. Az $\alpha\beta_{1-42}$ -PBS- és PBS-PRE084-kezelt csoportokban az éretlen neuronok száma szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollcsoportban. Ezen kívül szignifikáns különbséget észleltünk az $\alpha\beta_{1-42}$ -PBS és az $\alpha\beta_{1-42}$ -PRE084 csoportok között is. A DMT kezelés nem befolyásolta az újonnan kialakuló neuronok számát összehasonlítva a csak vehikulummal kezelt egerekkel (4.B ábra).

Az érett hippocampális neuronok vizsgálatára a NeuN immunfestést használtuk. A DMT-vel kezelt állatokban jelentősen alacsonyabb NeuN+ denzitás volt tapasztalható a HK területén, mint a PBS-PBS és az $\alpha\beta_{1-42}$ -PBS csoportokban (4.C ábra).

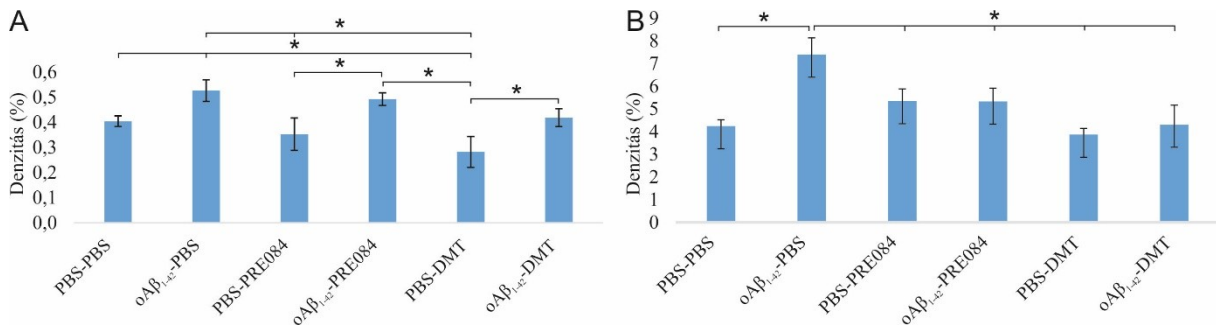


4. ábra A (A) BrdU, a (B) DCX és a (C) NeuN immunfestés eredményei.

A PRE084 és a DMT hatása az $\alpha\beta_{1-42}$ által kiváltott neuroinflammációra

A kísérleteink során az Iba1, egy makrofágokra specifikus fehérje, immunhisztokémiai jelölésével számszerűsítettük az aktivált mikrogliaikat. Az $\alpha\beta_{1-42}$ injektálása szignifikánsan megemelte az aktivált mikroglia sűrűségét összehasonlítva a kontrollcsoporttal. A PBS-DMT csoportban az Iba1+ mikroglia sűrűség szignifikánsan csökkent a vehikulummal kezelt állatokhoz képest. Mindazonáltal egyik kezelés sem tudta enyhíteni az $\alpha\beta_{1-42}$ gyulladást keltő hatását (5.A ábra).

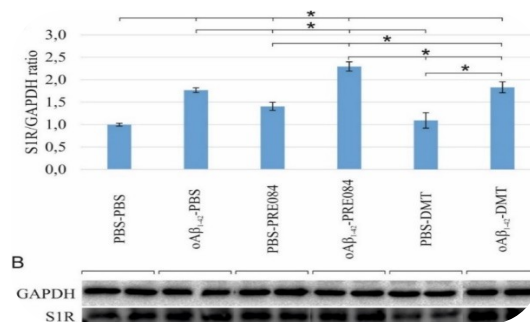
A különböző csoportok HK-jában a reaktív asztrocitákra jellemző GFAP mennyiségének meghatározása során szignifikánsan eltérő GFAP+ sejtűrűséget tudunk kimutatni. A hiperreaktív asztrociták arányának szignifikáns növekedését észleltük az oA β ₁₋₄₂-PBS csoportban a PBS-PBS-kezelt egerekhez képest. Ezenkívül a GFAP+ denzitás minden más csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt az oA β ₁₋₄₂-PBS-sel kezelt egerekhez képest. Az eredmények szerint az oA β ₁₋₄₂ asztrocita aktivációra kifejtett stimuláló hatását PRE084 és DMT adásával enyhíteni tudtuk (5.B ábra).



5. ábra Az (A) Iba1 és a (B) GFAP immunfestés eredményei.

Az S1R protein szint változása a kezelések hatására

Az oA β ₁₋₄₂ és a PRE084, illetve a DMT S1R expressziójára gyakorolt hatásának meghatározására HK és agykéreg mintákon WB analízist végeztünk. Összehasonlítva a vehikulummal kezelt kontroll egerekkel, a PBS-DMT-vel kezelt csoport kivételével az S1R fehérje szintek minden más csoportban szignifikánsan emelkedtek. Az oA β ₁₋₄₂-PBS-sel kezelt csoport magasabb fehérjeszintet mutatott az oA β ₁₋₄₂-PRE084 és az oA β ₁₋₄₂-DMT csoporttal összehasonlítva, míg szignifikánsan alacsonyabb S1R szintet mutattunk ki a PBS-PRE084 és a PBS-DMT csoportok állataiban. Emellett az oA β ₁₋₄₂ bármelyik S1R agonista együttes injektálásával növelte az S1R fehérjeszintet a megfelelő kontrollcsoporthoz képest (oA β ₁₋₄₂-PRE084 vs. PBS-PRE084; oA β ₁₋₄₂-DMT vs. PBS-DMT), valamint az S1R expressziója szignifikánsan megnövekedett az oA β ₁₋₄₂-PRE084-gyel kezelt állatokban az oA β ₁₋₄₂-DMT csoporthoz képest (6. ábra).



6. ábra A WB analízis eredménye.

MEGBESZÉLÉS

Kutatásaink során igazoltuk, hogy az $\text{oA}\beta_{1-42}$ és a $\text{fA}\beta_{1-42}$ intraparenchymális vagy ICV adagolásával kifejlesztett állatmodellek megbízhatóan és reprodukálhatóan működnek, így hasznos paradigmák az AD korai viselkedési és molekuláris tüneteinek kimutatására.

A viselkedési kísérletek során egy módosított MWM protokollt használtunk, amely az eredményeink alapján alkalmazható az $\text{oA}\beta_{1-42}$ okozta enyhe kognitív zavarok kimutatására patkánymodellben. Az $\text{oA}\beta_{1-42}$ -vel kezelt patkányok enyhe térbeli tanulási és memóriazavarokat mutattak, ha a keresési és a célterület arányát megváltoztatjuk. Ez módszer sikeresen modellezheti azt a változó környezetet, amelyben az AK-os betegek térbeli tanulási és memóriazavarai megjelennek. Ebben a paradigmában az LPYFDa pentapeptid védőhatását viselkedési és szövettani kísérletekkel is igazoltuk.

Az ICV kísérletben kidolgoztunk egy az $\text{oA}\beta_{1-42}$ injektálásával létrehozott korai AD modellt, amelyben akut neuroinflammációt, károsodott neurogenézist és emelkedett S1R szintet mutattunk ki. A felnőttkori neurogenézis elengedhetetlen a központi idegrendszer plaszticitásához. Az AD kezelése során a neurogenézis elősegítése, míg a neuroinflammáció visszaszorítása kedvező terápiás hatással bírhat. Mindkét folyamatban fontos szerepet játszik az S1R. Modellünkben két S1R agonistát teszteltünk. A DMT, amely mérsékelten kötődik az S1R-hez, de feltehetően nagy affinitással az 5-HT receptorokhoz, negatívan befolyásolta a neurogenézis korai fázisát. Ezzel szemben a szelektív S1R agonista, a PRE084 javította a hippokampális őssejtek proliferációját és differenciálódását, amely a progenitor sejtek és az éretlen neuronok mennyiségi növekedésében nyilvánult meg. További kísérletek szükségesek a DMT neurogenézist és az érett neuronok túlélését befolyásoló fő molekuláris útvonalainak vizsgálatához. Ezenkívül a DMT és a PRE084 szignifikánsan csökkentette az $\text{oA}\beta_{1-42}$ által kiváltott hiperreaktív asztrogliózist, azonban egyik ligandum sem volt jelentős hatással a mikroglia aktivációra. Ezért további vizsgálatokra van szükség a DMT és a PRE084 szerepének tisztázására az $\text{A}\beta_{1-42}$ által indukált neuroinflammációs folyamatokban, valamint az eredmények humán esetekre való alkalmazásának a felmérésére.

ELÉRT EREMÉNYEK

A jelen tanulmány főbb megállapításai a következők:

1. Két széles körben használt rágcáslómodellben exogén $\text{oA}\beta_{1-42}$ vagy $\text{fA}\beta_{1-42}$ alkalmazásával AD-szerű tüneteket váltottunk ki.

- Az *IHK kísérletben* patkánymodellben kimutattuk, hogy az $fA\beta_{1-42}$ rontja a térbeli tanulást hagyományos MWM-ben tesztelve, valamint csökkenti a dendrittüske sűrűséget a HK CA1 régiójában.
- Az *EK kísérletben* a patkányokban enyhe, de szignifikáns térbeli deficitet figyeltünk meg, amikor az MWM módosított változatát használtuk, azaz csökkentettük a platform méretét. Ebben a kísérletben neuroinflammációt tapasztaltunk, mivel a hiperreaktív asztrociták megnövekedett szintjét mutattuk ki az EK területén.
- Az *ICV kísérletben* bizonyítottuk, hogy az egerekben $oA\beta_{1-42}$ ICV beadását követően AD-ra jellemző neurogenesisbeli és neuroinflammációs elváltozások alakultak ki a HK területén.

2. A kidolgozott kísérleti modellekben megvizsgáltuk 3 anyag, egy neuroprotektív pentapeptid (LPYFDa) és két S1R modulátor (DMT és PRE-084) hatását a molekuláris folyamatokra.

- Az *EK kísérletben* az LPYFDa kivédte az $oA\beta_{1-42}$ toxikus hatását.
- Az *ICV kísérletben*
 - a DMT gátolta, míg a PRE084 elősegítette a progenitor sejtek túlélését.
 - a DMT nem befolyásolta, míg a PRE084 növelte az éretlen neuronok számát.
 - a neuronok denzitását a PRE084 beadása nem befolyásolta, míg a DMT a neuronok számának csökkenését okozta.
 - a PRE084 és a DMT az $oA\beta_{1-42}$ indukálta mikroglia aktivációt nem enyhítette, míg a DMT önmagában szignifikánsan csökkentette a mikroglia denzitást.
 - a DMT és PRE084 csökkentette az $oA\beta_{1-42}$ -val indukált reaktív asztrociták mennyiségét.
 - az S1R protein szint emelkedett az $oA\beta_{1-42}$ kezelés hatására, valamint az $oA\beta_{1-42}$ és a PRE084 vagy a DMT együttes beadásával.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom első témavezetőimnek, Prof. Dr. Toldi Józsefnek és Dr. Kóródi Katalinnak, hogy elindították tudományos pályafutásomat.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Penke Botondnak és Dr. Penke-Verdier Zsuzsának a szakmai mentorálást, tudományos útmutatást és támogatást a tanulmányaim során.

Köszönöm utolsó témavezetőmnek és mentoromnak, Dr. Fülöp Líviának, hogy lehetővé tette ezt a munkát. Rendkívül hálás vagyok a segítségéért és támogatásáért.

Szeretném megköszönni a laboratórium minden tagjának a közös munkát. Külön köszönettel tartozom Szilágyi-Szögi Titanillának a kiváló segítségéért és barátságáért.

Köszönetet mondok az Orvosi Vegytani Intézet egykori és jelenlegi munkatársainak.

Végezetül, rendkívül hálás vagyok az egész családomnak a türelmükért, segítségükért és támogatásukért.

A kutatást a következő pályázatok támogatták:

European Union Seventh Framework Programme Food Grant 211 696 (LipiDiDiet) as well as by the Hungarian research grant TÁMOP 4.2.2/A-11/1/KONV-2012-0052.

National Research, Development, and Innovation Office (GINOP-2.3.2-15-2016-00060) and by the Hungarian Brain Research Program I and II - Grant No. KTIA_13_NAP-A-III/7, and 2017-1.2.1-NKP-2017-00002.

A Ph.D. TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

- I. **LPYFDa neutralizes amyloid-beta-induced memory impairment and toxicity.** Journal of Alzheimer's Disease 2010 Jan;19(3):991-1005.
Ivica Granic, Marcelo F. Masman, Cornelius Mulder, Ingrid M. Nijholt, Pieter J.W. Naude, Ammerins de Haan, Emőke Borbély, Botond Penke, Paul G.M Luiten, Ulrich L.M. Eisel. (IF: 4,261)
- II. **Simultaneous Changes of Spatial Memory and Spine Density after Intrahippocampal Administration of Fibrillar A β 1–42 to the Rat Brain.** BioMed Research International, 2014 June 23; Article ID 345305, doi:10.1155/2014/345305, Emőke Borbély, János Horváth, Szabina Furdan, Zsolt Bozsó, Botond Penke, and Livia Fülöp (IF: 1,579)
- III. **Impact of two neuronal Sigma-1 receptor modulators, PRE084 and DMT, on neurogenesis and neuroinflammation in an A β 1-42-injected, wild-type mouse model of AD.** Int J Mol Sci. 2022 Feb 24;23(5):2514. doi: 10.3390/ijms23052514.

Emőke Borbély, Viktória Varga, Titanilla Szögi, Ildikó Schuster, Zsolt Bozsó, Botond Penke, Lívía Fülöp (IF: 5,924)

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

- IV. **A combined electrophysiological and behavioural study for the assessment of activity-dependent changes in mice.** Kóródi K, Bite A, Borbély E, Kovács G, Nagy A, Süle Z, Toldi J. *Acta Biol Hung.* 2002;53(1-2):85-94.
- V. **Overexpression of Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice. Cell Stress Chaperones.** Melinda Erzsébet Tóth, Viktor Szegedi, Edina Varga, Gábor Juhász, János Horváth, Emőke Borbély, Balázs Csibrány, Róbert Alföldi, Nikolett Lénárt, Botond Penke, Miklós Sántha 2013 Nov;18(6):759-71.
- VI. **Effects of the Pentapeptide P33 on Memory and Synaptic Plasticity in APP/PS1 Transgenic Mice: A Novel Mechanism Presenting the Protein Fe65 as a Target.** Szögi T, Schuster I, Borbély Emőke, Gyebrovcszki A, Bozsó z, Gera j, Rajkó R, Sántha M, Penke B, Fülöp L. *Int. J. Mol. Sci.* 2019 Jun 22;20(12):3050. doi: 10.3390/ijms20123050.
- VII. **Post-diaminobenzidine Treatments for Double Stainings: Extension of Sulfide-Silver-Gold Intensification for Light and Fluorescent Microscopy.** Török I, Seprényi G, Pór E, Borbély E, Szögi T, Dobó E. *J Histochem Cytochem.* 2020 Aug;68(8):571-582. doi: 10.1369/0022155420942213.
- VIII. **Neuroinflammatory processes are augmented in mice overexpressing human heat-shock protein B1 following ethanol-induced brain injury.** Dukay B, Walter FR, Vigh JP, Barabási B, Hajdu P, Balassa T, Migh E, Kincses A, Hoyk Z, Szögi T, Borbély E, Csoboz B, Horváth P, Fülöp L, Penke B, Vigh L, Deli MA, Sántha M, Tóth ME. *J Neuroinflammation.* 2021 Jan 10;18(1):22. doi: 10.1186/s12974-020-02070-2.
- IX. **Hippocampal Sclerosis in Pilocarpine Epilepsy: Survival of Peptide-Containing Neurons and Learning and Memory Disturbances in the Adult NMRI Strain Mouse.** Mátyás A, Borbély E, Mihály A. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 24;23(1):204. doi: 10.3390/ijms2301020.
- X. **Examination of Longitudinal Alterations in Alzheimer's Disease-Related Neurogenesis in an APP/PS1 Transgenic Mouse Model, and the Effects of P33, a Putative Neuroprotective Agent Thereon.** Szögi T, Borbély E, Schuster I, Bozsó Z,

Sántha M, Tóth ME, Penke B, Fülöp L. Int J Mol Sci. 2022 Sep 8;23(18):10364. doi: 10.3390/ijms231810364.PMID: 36142277.

POSZTEREK

- I. **Behavioural evaluation of a simple, non transgenic model of Alzheimer's disease**
Rosta JM, Borbely E, Penke Zs, Penke B, Toldi J 7th International Conference, AD/PD 2005, Sorrento, Italy, March 9-13.
- II. **Protective effect of putative drug candidates on the amyloid-beta oligomer-induced astrocyte activation in rat entorhinal cortex** D Simon; E Borbely; E Sipos; K Soós; B Penke; L Fülöp Neurodegenerative Diseases: Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Advances, Concepts and New Challenges Prague, Czech Republic 2009.03.11. – 15.
- III. **Intracerebroventricular administration of the synthetic A β 1-42 to the rat brain. Connection of spatial memory and spine density** E. Borbély, J. Horváth, Á. Kasza, Zs. Frank, S. Furdan, G. Fűr, T. Szögi, K. Németh, L. Fülöp, Z. Bozsó, Z. Penke, B. Penke, 75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award, Szeged, Hungary, 2012.
- IV. **Amyloid plaques confer neuroprotection against exogenous A β** I. Gureviciene, Á. Kasza, Z. Frank, E. Mugantseva, Z. Datki, E. Borbély, J. Horváth, L. Khirug, B. Penke, H. Tanila, SfN Annual Meeting, New Orleans, LA, 2012.
- V. **Administration of the synthetic A β 1-42 to the rat brain: comparison of intracerebroventricular and intrahippocampal injection model in spatial memory** E. Borbély, Á. Kasza, J. Horváth, Zs. Frank, Sz. Furdan, G. Fűr, T. Szögi, K. Németh, L. Fülöp, Zs. Bozsó, Z. Penke, B. Penke IBRO International Workshop 2012, Szeged, Hungary, January 19-21.
- VI. **Intracerebroventricular and intrahippocampal administration of the synthetic a β 1-42 to the rat brain. connection of dendritic spine density and spatial memory.** E. Borbély, J. Horváth, Sz. Furdan, G. Fűr, T. Szögi, Zs. Bozsó, B. Penke, L. Fülöp, 11th International Conference, AD/PD 2013, Florence, Italy, March 6-10.
- VII. **Novel Method for *In Vivo* 3D Monitoring of the Hippocampal Neurodegeneration in Sleep Deprived Hairless Mice** E. Mozes, Zs. Datki, B. Penke, E. Borbely, J. Horvath, L. Fulop 11th International Conference, AD/PD 2013, Florence, Italy, March 6-10.
- VIII. **Krónikusan injektált védőanyag hatásának vizsgálata a térbeli memóriára és a dendrittüske sűrűsége APP/PS1 transzgenikus egerekben** Furdan Szabina,

- Borbély E.**, Horváth J., Penke B., Fülöp L. XIII. Alzheimer-kór Konferencia és a Magyar Neuropathológiai Társaság 2013. éves Kongresszusa, 2013, Debrecen, Magyarország, Szeptember 20-21.
- IX. **Az alvásmegvonás hatásának *in vivo* vizsgálata egér hippocampusban** Mózes E., **Borbély E.**, Horváth J., Furdan Sz., Datki Zs., Penke B., Fülöp L. XIII. Alzheimer-kór Konferencia és a Magyar Neuropathológiai Társaság 2013. éves Kongresszusa, 2013, Debrecen, Magyarország, Szeptember 20-21.
- X. **Effects of chronically injected neuroprotective compound on spatial memory and hippocampal dendritic spine density in APP/PS1 transgenic mice** Sz. Furdan, **E. Borbély**, J. Horváth, B. Penke, L. Fülöp IBRO International Workshop 2014, Debrecen, Hungary, January 16-17.
- XI. **Application of fear conditioning and fear extinction assay on anxious (Ax) and non-anxious (nAx) mice** Á. Szántai, **E. Borbély**, G. Müller, L. Fülöp, V. Szegedi IBRO International Workshop 2014, Debrecen, Hungary, January 16-17.
- XII. **Effects of the neuroprotective pentapeptide, p33 on the neurogenesis in APP/PS1 mice** T. Szögi, **E. Borbély**, D. Tüdös, B. Penke, L. Fülöp 13th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's, AD/PD 2017, Vienna, Austria Mar 29 – Apr 2.
- XIII. **Longitudinal examination of the neurogenesis in transgenic Alzheimer's disease mice model** T. Szögi, **E. Borbély**, D. Tüdös, B. Penke, L. Fülöp 13th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's, AD/PD 2017, Vienna, Austria Mar 29 – Apr 2.