

## **SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS**

**A pályázat címe:** "A neuroszteroidok szerepe a szinapszis átrendeződésben: az időskori memóriadeficit új megközelítése"

**Nyilvántartási szám:** 75954

Az utóbbi évtizedek kutatásai egyértelműen igazolták, hogy az idegrendszeri plaszticitást kiváltó tényezők között fontos szerepe van a nemi hormonoknak és a neuroszteroidoknak, melyek ma még nem minden részletében ismert mechanizmusokon keresztül képesek befolyásolni az agyban lejátszódó sejtszintű és molekuláris folyamatokat. Az egyedfejlődés során a szteroidok jelenléte nélkülözhetetlen a nemi hormonokra érzékeny régiók kialakításában, melynek eredményeképpen mind funkcionálisan, mind morfológiailag szexuálisan dimorf területek jönnek létre az agyban. Munkacsoportunk hosszú idő óta foglalkozik a szteroid hormonoknak és neuroszteroidoknak a morfológiai szinaptikus plaszticitásban játszott szerepével és igazolta, hogy a hatás eredményeképpen szinaptikus átrendeződés játszódik le számos agyterületen.

Ebbe a kutatási folyamatba illeszkedett bele a most lezárt OTKA pályázatunk, melynek célja az volt, hogy az időskori memória-deficit egy állatmodelljén tanulmányozzuk a hippocampális tüske szinapszisok szerepét és korfüggő változásait. Korábbi eredményeink alapján azt a kérdést is feltettük, hogy lehetséges-e az időskori változások befolyásolása ösztrogénnel ill. az egyik legismertebb neuroszteroid, a dehidroepiandroszteron (DHEA) alkalmazásával

Mivel korfüggő változások vizsgálatáról volt szó, a kutatási periódus első szakaszában a fiatal és felnőtt állatokat vizsgáltuk és ezzel párhuzamosan olyan kísérletek is folytak, melyek a jelenség mélyebb összefüggéseit kívánták feltárni.

- A hippocampális tüskeszinapszisok vizsgálata egy nagy gyakorisággal előforduló neuropszichiátriai megbetegedés, a depresszió állatmodelljén.
- Az ösztrogén receptorok ( $ER\alpha$  és  $ER\beta$ ) szerepe a hormon hatására létrejövő szinapszis átrendeződésben.
- DHEA és a DHEA analógok térszerkezetének tanulmányozása.
- Ösztrogén és DHEA hatása a microglia aktivációra.

### **EREDMÉNYEK:**

#### **1.1. A tüskeszinapszisok számának korfüggő változásai a hippocampus CA1 régió stratum radiatum rétegében**

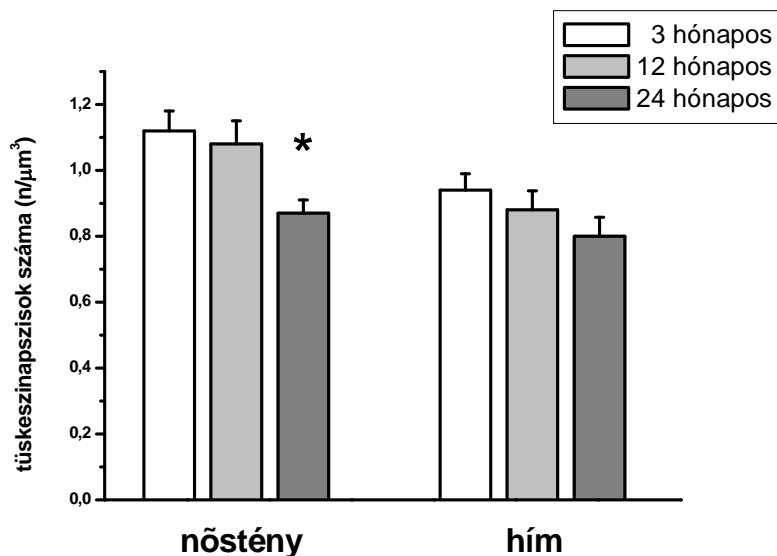
A memóriával kapcsolatos hippocampális jelenségek értelmezésében döntő fontosságúak a funkcióhoz köthető struktúrák és változások. A magyar idegtudomány kiemelten fontos adatokat szolgáltatott és szolgáltat ezen agyterület idegi kapcsolatainak azonosításában és jellemzésében, ezekből teljesen nyilvánvaló, hogy ez a jól definiálható szerkezet nem rigid és a rendszer funkcionális és morfológiai plaszticitása rendkívül fontos a változó külső és belső környezethez való alkalmazkodásban.

Általánosan elfogadott, hogy a principális neuronok dendritjein található tüskeszinapszisok - melyek a sejthez érkező impulzusok nagy részét fogadják – kiemelt szerepet játszanak ezekben a plasztikus folyamatokban. Ennek megfelelően nagyszámú közleményben vizsgálták ezek számát, térfogati sűrűségét különböző kísérleti körülmények között. Sok adatunk van a korábbi, Golgi impregnációval vizualizált struktúrákon végzett fénymikroszkópos számolásokról, de a modern sztereológiai megközelítés elterjedése óta ezeket nem tartják korrektnek.

A pályázatban tervezett morфомetriai méréseket a Sterio f. disector módszerrel végeztük. Ez az ún, "unbiased" megközelítés reprodukálható eredményeket ad és rutinszerűen használjuk Laboratóriumunkban. Ennek során a hippocampális CA1 régió stratum radiatum rétegében határoztuk meg tüske szinapszisok térfogati sűrűségét.

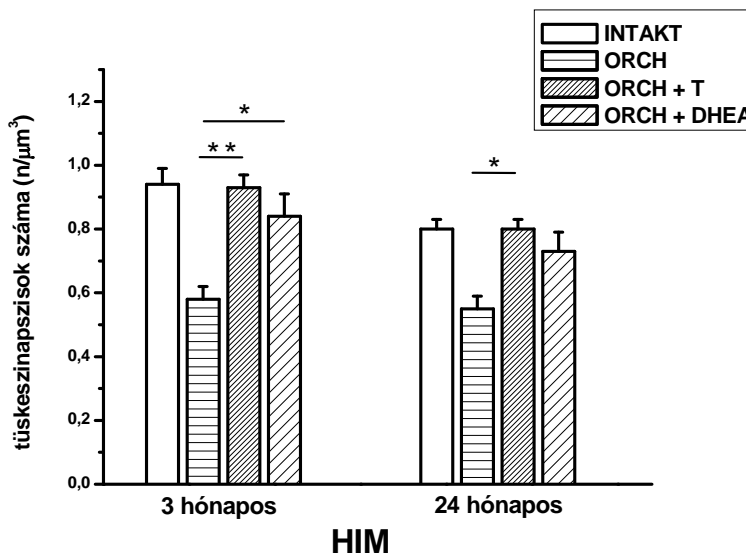
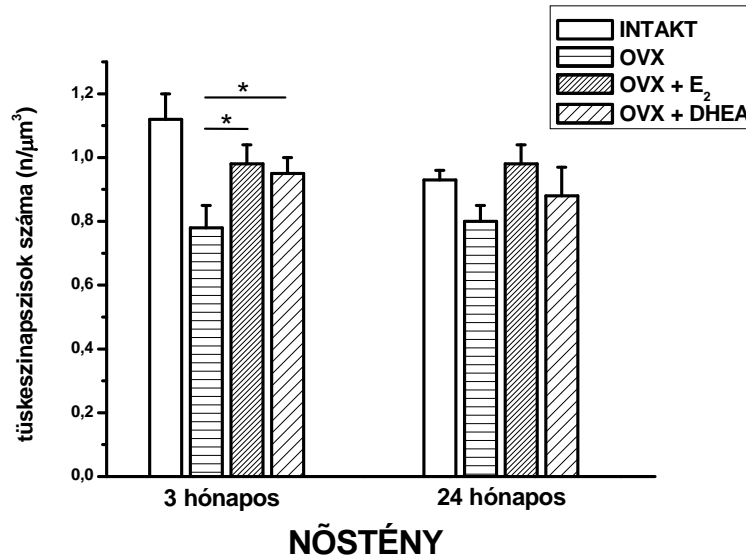
A vizsgálatok mindkét nembeli 3, 12 és 24 hónapos Wistar patkányokon történtek. Saját korábbi eredményeink és irodalmi adatok is azt jelzik, hogy a tüske szinapszisok száma funkcionális jelentőségű és ebből a szempontból fontos lehet az a tény, hogy a más szerzők által közltekénél kisebb különbséget találtunk a fiatal felnőtt és a 24 hónapos, idősebb állatok között. Ez a különbség csak a nőstények esetében volt szignifikáns.

Fiatal felnőtt állatokban korábban nemi különbséget írtak le a hippocampális CA1 régió stratum radiatum rétegében az aszimmetrikus tüske szinapszisok számában. Ezt a megfigyelést mi is meg tudtuk erősíteni, ugyanis a nőstények esetében a fiatal és 12 hónapos csoport szinapszisainak sűrűsége 10-15%-al magasabb, mint a hímeké. Idős állatok esetében ezt a különbséget csökken, de annak eldöntésére, hogy ez a számváltozás szignifikáns-e a jelenlegi esetszámunk nem volt elegendő.



1. ábra. A tüskeszinapszisok számának korfüggő változása patkány hippocampus CA1 régió stratum radiatum rétegében.

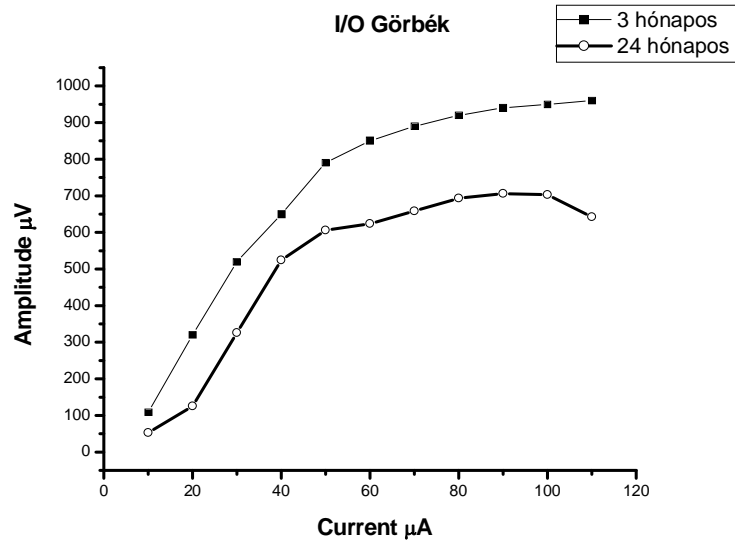
Az ösztrogén, tesztoszteron és a dehidroepiandroszteron (DHEA) hatását 3 és 24 hónapos oohidectomizált hím és ovariektomizált nőstény patkányokon tanulmányoztuk. A sztereológiai elemzések adatait feltüntető 2. ábra mutatja, hogy a műtétet követő hormonszint csökkenés hatására a tüskeszinapszisok száma is szignifikánsan csökken. Fiatal állatok esetében ezt a csökkenést a hormonkezelés ellensúlyozza. Idős állatok esetében is kimutatható ez a tendencia, de szignifikáns változást csak a tesztoszteron-kezelt hímeknél találtunk (2. ábra).



2. ábra. Ösztrogén, tesztoszteron és DHEA hatása a tüskeszínapszisok számára

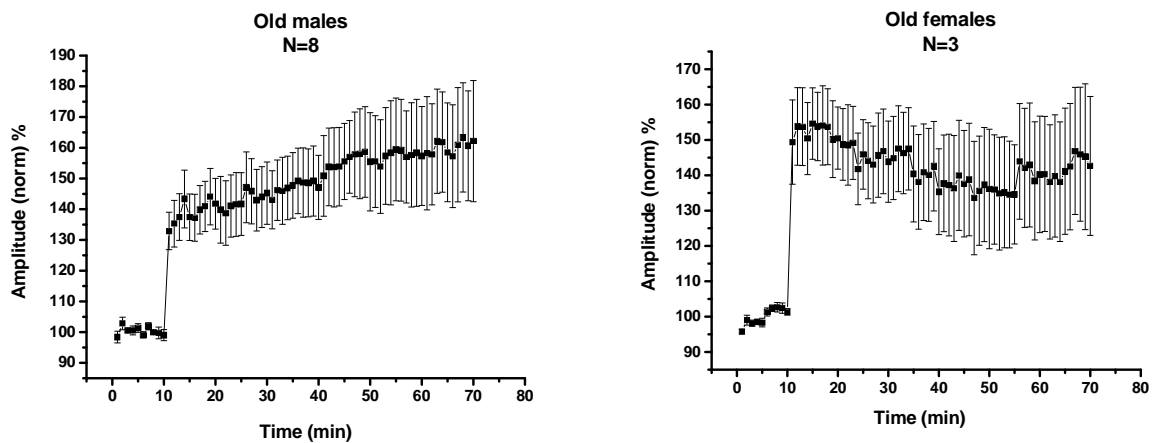
## 1.2. Elektrofiziológiai vizsgálatok (LTP) különböző korú patkányokon.

Elektrofiziológiai méréseink (IO görbe felvétele, és LTP indukciója) 3 hónapos és 2 évnél idősebb hím és nőstény patkányokon (450 gr ill. 300 gr felett) történtek. Az LTP indukciója előtt, a kísérleti protokollnak megfelelően ellenőriztük a glutamaterg szinaptikus transzmisszió mértékét. Valamennyi vizsgált állat hippokampális agyszeletében találtunk mezőpotenciálokat, de a növekvő mértékben alkalmazott ingerlő áram erősségének függvényében ábrázolva a kiváltott fEPSP amplitúdók az idősebb állatok esetében 30-35%-kal alacsonyabbak voltak, mint a fiatal felnőtt állatokban mérhető potenciálok. (3. ábra)



3. ábra. Az idősebb patkányok agyszeletéből kiváltott mezőpotenciálok amplitúdója szignifikánsan kisebb a fiatal állatokban mértnél.

Meglepő módon azonban ilyen körülmények között is tudunk indukálni LTP-t, melynek nagysága és tartóssága nem maradt el szignifikánsan a fiatal felnőtt állatokban indukálható LTP-től. (4. ábra)



4. ábra. A 24 hónapos patkányok agyszeleteiből kiváltott LTP.

A rendelkezésünkre álló kisszámú öreg állat nem tette lehetővé, hogy statisztikailag értékelhető számú mintán tanulmányozzuk a hormonok és DHEA hatását az LTP-re. Az előzetes mérések idős állatokban nem mutattak változást.

#### 1.4. Génexpressziós vizsgálatok patkány hippocampusban

Génexpressziós vizsgálatunkat 3 hónapos állatokon végeztük. A patkányokból dekapitálás után kipreparált hippocampusokat RnaLater oldatban stabilizáltuk, majd a

mintákból szilikagéles, ioncserélő oszlopok felhasználásával nagy tisztaságú teljes RNS-t preparáltunk. A kapott RNS minőségét és mennyiségét Nanodrop készülékkel, spektrofotometriásan ellenőriztük. A minták globál génextpressziós vizsgálatát patkány Affymetrix csipekkel végeztük el.

Az elemzés során azokat a géneket azonosítottuk, amelyek a 17 $\beta$ -ösztradiollal kezelt patkányokban az ovariektomizált állatok hipokampusz génaktivitásához képest szignifikánsan eltérő kifejeződést mutattak. A szignifikancia határt 1.5-szeres változásban határoztuk meg. A változást mutató gének közül 37 alacsonyabb, 25 pedig magasabb kifejeződést mutatott a kontrollhoz képest. A repressziót mutató gének közül kiemelendők azok, amelyek az általános stressz válasszal, oxidatív és endoplazmatikus stresszel kapcsolatosak (early growth response 1 - Egr1, activity regulated cytoskeletal-associated protein - Arc, FBJ osteosarcoma oncogene - Fos, ninjurin 2 - Ninj-2). Emellett számos agyi kifejeződést mutató gén aktivitási szintje csökkent az ösztadiol hatására: (neurotensin, Bex4, Olfm3, Npas4). A megemelkedett génaktivitást mutató gének közül a 3. Ryanodine receptor és az echinoderm microtubule associated protein like 5 fehérjét kódoló gén, valamint az Adam4 metalloproteináz génje emelendő ki.

A génextpressziós vizsgálataink következő fázisában különböző 17 $\beta$  ösztadiol koncentrációk hatását tanulmányoztuk patkány hippocampusban. Az Affymetrix csipekkel kapott eredményeink több olyan gén expressziós mintázatában mutattak ki különbséget hormonkezelést követően, melyekről feltételezik, hogy befolyásolhatják a szinapszis képződést/átrendeződést. A jelen pályázat célkitűzései szempontjából az egyik érdekes molekula a neuronal pentraxin II (NPTX2), a pentraxin család idegsejtekben expresszálódó tagja. Ennek a fehérjének szerepet tulajdonítanak a szinaptikus plaszticitásban, ugyanis az irodalmi adatok azt is mutatják, hogy az ingerületáttevődésben lényeges makromolekulák felvételében vesz részt. Hasonló funkciót láthat el a Rab8 molekula is, amelyről igazolták, hogy a Golgi apparátus és a szinaptikus membrán közötti anyagtranszportban ill. az exocitotikus vezikulák membránhoz való kapcsolódásában játszik szerepet. Más kísérletek alapján azt feltételezik, hogy az AMPA receptornak a dendrittüskékhez történő szállításáért felelős. A c-RET gén által kódolt tirozin kináz receptor fontos lehet egyes neurotrofikus faktorok (GDNF) hatásának közvetítésében.

*c-RET*: alacsony koncentrációjú 17 $\beta$  ösztadiol kezelés (0.1 nM) után 2.15x, míg magas koncentráció (2.5 nM) esetén 3.79x indukciót mutattunk ki.

*neuronal pentraxin II (NPTX2)*: csak magasabb dózisú kezelés után mutatott emelkedett mRNS szintet (1.82x).

*Rab8b fehérjét kódoló gén*: 2.52x növekedés 2.5 nM 17 $\beta$  ösztadiol kezelés után.

A *c-fos* génextpresszió csökkent a 17 $\beta$  ösztadiol hatására (0.54x).

A DNS-chip kísérletek alapján azonosított gének közül a felsoroltak és a c-fos esetében már elvégeztük a valós idejű kvantitatív PCR igazoló méréseket is.

## **2. Hippocampális tüskeszinapszisok lehetséges szerepe a depresszióban.**

Szakirodalmi adatok valószínűsítik, hogy a hippocampális tüskeszinapszisok számának változása (plaszticitása) fontos szerepet játszik a kognitív ill. a viselkedést érintő folyamatokban. Ezt a munkahipotézist a korfüggő változások mellett egy másik kísérleti rendszeren is ellenőriztük. Ezek során a hippocampális tüskeszinapszisok számának változását tanulmányoztuk az ún. "learned helplessness" modell segítségével és ezen feltevés ellenőrzésére párhuzamosan végeztünk magatartási és finomszerkezeti vizsgálatokat hím,

valamint ovariectomizált nőstény patkányokon. A depresszió modellezésére használt elkerülhetetlen elektromos láb-sokk kezelés után már 24 órával a szinapszisok számának szignifikáns csökkenését találtuk a hippocampus CA1 és CA3 stratum radiatum, valamint a gyrus dentatus stratum moleculare rétegeiben. Ez a különbség még 7 nap múlva is kimutatható volt és ebben az időszakban az állatok aktív avoidance tesztje jelentős menekülés késlekedést mutatott. Kortikoszteron kezelés hasonló morfológiai és viselkedésbeli változásokat indukált, ami azt sugallja, hogy a jelenség létrejöttében a hormonnak szerepe lehet. Az antidepresszáns desipramin-nal történő kezelés kivédte az elektromos sokkolást követő szinapszis szám csökkenést és a viselkedési változásokat.

Alapkutatási, de klinikai szempontból is nagyon fontos az a közismert tény, hogy a depresszív viselkedés előfordulása szexuálisan dimorf, statisztikai adatok egyértelműek abban a tekintetben, hogy a nőknél kb. kétszer olyan gyakorisággal fordul elő. A nőstény patkányok hippocampális tüske szinapszisain végzett vizsgálataink azért jelentősek mert az általunk alkalmazott állatmodell alkalmas arra, hogy tanulmányozzuk az ösztrogén hatását, a korábban már megfigyelt plasztikus szinaptikus változásokra.

A kísérletesen kiváltott depressziós viselkedést a hímekhez hasonlóan az ovariectomizált nőstényekben is a tüske szinapszisok számának szignifikáns csökkenése kísérte. Eredményeink azt igazolták, hogy az ismert antidepresszáns gyógyszer desipraminhoz hasonlóan az ösztradiol is hatásosnak bizonyult a viselkedésbeli eltérések helyreállításában és ezzel párhuzamosan a tüske szinapszisok száma is növekedett. Az elvégzett korreláció analízis szignifikáns negatív korrelációt mutatott a depressziós viselkedés súlyossága és a hippocampális tüske szinapszisok száma között.

Adataink azt mutatják, hogy a hippocampális szinapszisok szerepet játszanak a depresszió neurobiológiájában és az általunk alkalmazott állatmodell alkalmazható lehet az antidepresszáns gyógyszerek hatásának vizsgálatára is.

### **3. Az ösztrogén receptorok (ER $\alpha$ és ER $\beta$ ) szerepe a hormon hatására létrejövő szinapszis átrendeződésben.**

Korábbi vizsgálatainkban igazoltuk, hogy nem csupán a nemi hormonok hanem egyes neurosteroidok (DHEA) is képesek szinapszis átrendezést indukálni egyes agyterületeken, de nagyon kevés adattal rendelkezünk arra vonatkozóan, hogy a hatás közvetítésében milyen receptorok játszanak szerepet. A kérdés tanulmányozására hypothalamus egy magját az anteroventrális periventriculáris nucleust (AvPv) választottuk, ahol már igazolták az ösztrogén receptort expresszáló neuronok jelenlétét. Vizsgálataink során ezen túlmenően megállapítottuk, hogy a magban mindkét típusú ösztrogén receptor az ER $\alpha$  és ER $\beta$  is jelen van. Az alfa és béta típusú ösztrogén receptorok eloszlása nem homogén: míg az ER $\alpha$  immunpozitív sejtek a mag minden részén, addig az ER $\beta$ -pozitív sejtek csaknem kizárólag az agykamra közelében található. Ennek megfelelően elektronmikroszkópos tanulmányainkhoz az AvPv rostrális részéről származó metszeteket használtunk, ahol a béta-típusú ösztrogén receptort expresszáló sejtek jól körülhatárolható módon helyezkednek el a kamrát határoló endimális rétegtől 50  $\mu$ m-es sávban, míg ettől laterálisan csak ER $\alpha$  immunoreaktív sejtek fordulnak elő.

Kettős immunfestés utáni morfometriai mérésekkel igazoltuk, hogy az anteroventrális periventriculáris nucleus-ban az ösztrogén receptort expresszáló neuronok szinaptikus mintázata (serkentő és gátló axo-szomatikus szinapszisainak aránya) eltér a mag többi neuronjától. Az ER-immunoreaktív sejteken végződő GABAerg axo-szomatikus, gátló szinapszisok száma magasabb, mint a nem jelölt sejtek esetében, míg a nem-jelölt sejtek populációjában az axo-szomatikus szinapszisok zöme nem GABAerg. A hormonszint

változását az AvPv-ben is szinapszis átrendeződés kíséri, de a nucleus arcuatus-ban tapasztalt csökkenéssel ellentétben ebben a magban megnő a GABAerg szinapszisok száma. A hatás specifikus: szinapszis átrendeződés csak a béta típusú ösztrogén receptort tartalmazó neuronokban mutatható ki.

#### **4. DHEA és a DHEA analógok térszerkezetének vizsgálata.**

A DHEA által indukált változások értelmezéséhez nagyon fontos azt eldönteni, hogy maga a neuroszteroid vagy az abból az aromataz enzim segítségével szintetizálódó  $17\beta$ -ösztradiol a hatékony vegyület. Ezt tisztázandó, igen lényegesek az aromataz gátló letrozol-lal végzett kísérletek, melyek ellentmondó és nehezen értelmezhető eredményt mutattak. Felmerült az a lehetőség, hogy DHEA, letrozol, aromataz molekulák kölcsönhatásának hátterében térszerkezeti okok állnak, ennek tisztázására a reaktív gliózis állatmodelljét használva egy DHEA analóggal végeztünk kísérleteket. Igazoltuk, hogy a  $16\alpha$ -iodomethyl- $13\alpha$ -DHEA önmagában adva nem befolyásolja az idegi sérülést követő asztrocita aktiválódást, de letrozollal kombinálva hatásos. A számított molekuláris szerkezete alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a  $16\alpha$ -iodomethyl- $13\alpha$ -DHEA az aromataz szteroid kötő helyéhez kapcsolódva válik inaktívvá. A hasonló molekuláris szerkezetű letrozol ugyanerre a helyre köt be, ezért jelenlétében az analóg molekula képes kifejteni hatását.

#### **5. Ösztrogén és DHEA hatása a microglia aktivációra**

A  $17\beta$ -ösztradiol és DHEA morfológiai szinten megnyilvánuló hatásait vizsgálva, többek között megfigyeltünk gliális változásokat is. A szinaptikus átrendeződéssel kapcsolatban hasonló jelenséget korábban más agyterületeken is leírtunk már, de a glia-válasz nem csupán az idegi plaszticitás, de a neuroprotekciónak szempontjából is lényeges lehet. Általánosan elfogadott, hogy az idegi károsodások, valamint az azt követő morfológiai és funkcionális regeneráció nem korlátozódik a neuronokra, ezekben a folyamatokban a neuroglia is fontos szerepet játszik. Ezt a kérdést tanulmányozva az idegi sérülést által kiváltott mikroglia reakciót, valamint a  $17\beta$ -ösztradiol és DHEA neuroprotektív szerepét vizsgáltuk egy jól reprodukálható állatmodellben. Kísérleteink során a mikroglia-specifikus marker CD11b immunoreaktív struktúrák morfológiai módszerekkel történő elemzésével követtük a nucleus oculomotoriusban az axotomia által kiváltott mikroglia aktiválódás mértékét, valamint időbeli lefolyását. Adataink szerint a mikroglia reakció első jelei már 24 órával a sérülés után megjelennek és a negyedik napon érik el a maximumot. Ovariectomizált nőstényekben a  $17\beta$ -ösztradiol ( $5 \mu\text{g}/100\text{g b.w./nap}$ ) szignifikánsan csökkenti a mikroglia aktivációt. Hasonló hatást tudunk kimutatni DHEA (neuroszteroid), raloxifen (szelektív ösztrogén receptor modulátor), genistein (fitoösztrogén) esetében is. A hormonhatás mechanizmusának tisztázásához fontos, de további vizsgálatokat igénylő adat, hogy a mikroglia sejtekben nem tudtuk kimutatni az ösztrogén receptorok jelenlétét, míg a motoneuronok az  $ER\alpha$ -t és  $ER\beta$ -t is expresszálják.