

Szteroidok hatása a központi idegrendszeri neuronok aktivitására, plaszticitására, a kéreg reorganizációjára

Dr. Farkas Tamás docens

SZTE Összehasonlító Élettani Tanszék

OTKA-kód: F37407

A pályázat első évében számos próbálkozásunk volt a fototrombotikus lézió standardizálására, mely talán az egyik legelegánsabb fokális ischémiás módszer, ugyanis nem jár a koponyaüreg megnyitásával. A módszert számos éve sikeresen alkalmazó német kutatócsoporttal (professzor Otto Witte csoportja) történt konzultáció megerősítette a saját kísérleti eredményeinket és gyanúkat, miszerint nem lehet fototrombózis útján a lézionált agyi térfogatok szórását a statisztikai hibahatár alá csökkenteni. A lézió nagysága nagyban függ ugyanis a megvilágított agyfelszín vaszkularizációjától. Így további próbálkozásainkat a hideglézió felé irányítottuk. Kétféle módszert is kipróbáltuk: a folyékony hidrogénbe mártott termóddal történő és az aceton-szárazjéggel hűtött termóddal kialakított léziót, mely utóbbi menetét Dr. Lacza Zsombor útmutatásai alapján reprodukáltuk. A fagyasztás hatását koponyacsonton és dura materen keresztül is kipróbáltuk, és az utóbbi esetében erőfeszítéseinket siker koronázta. A kísérleti állatok agykérgén jól definiálható kiterjedésű és térfogatú (~10 mm³) agyszövet-elhalást okoz a termód 30 másodpercig tartó érintkezése az agyfelszínnel. Így megnyílt az út különböző neuroprotektív hatású neuroszteroidok tesztelésére laborunkban.

Első kísérletsorozatunkban (n=55) a dehidroepiandroszteron szulfát (DHEAS) és vele ekvimoláris mennyiségű 17béta-ösztadiol (E2) hatását vizsgáltuk a hidegléziós modellben. Viszonylag magas koncentrációt alkalmaztunk, és próbáltuk az esetlegesen megnyilvánuló protekció mechanizmusát is felderíteni. 20-30 napos fiatal hím állatokban az általunk alkalmazott hidegléziós módszer 10 mm³-nyi lézionált térfogatot okozott. Mindkét szteroidot megvizsgáltuk elő- és utókezelésként alkalmazva is a következőképpen: az előkezelés során a kísérleti állatok kétszer kaptak s.c. szteroid-kezelést 1 nappal és 1 órával a hideglézió kialakítása előtt, míg az utókezelés során a szteroidot közvetlenül a lézió után kapták meg (a DHEAS-t 50 mg/kg, az E2-t 35 mg/kg koncentrációban). Ezután az állatok még 1 órát éltek túl, aztán az agyi sérülést 1 %-os triphenyltetrazolium chloride (TTC) oldattal tettük láthatóvá az agykból készített 0,4 mm-es sorozatmetszeteken. Mindkét szteroid szignifikánsan csökkentette a lézió nagyságát, azonban a letrozole – aromatáz blokkoló, mely megakadályozza a DHEAS -> E2 konverziót – szisztémás alkalmazása megszüntette a DHEAS neuroprotektív hatását. Utóbbi azt bizonyítja, hogy a DHEAS az agyban alakul át aromatikusan konverzió révén protektív ösztadiollá. A legfontosabb megállapítása ezen kísérleteinknek az volt, hogy a DHEAS egyszeri alkalmazása utókezelésként is védőhatású volt a traumatikus agysérüléseket modellező hidegléziós modellünkben. Minthogy az aromatikusan konverzió csak az agyban történik, az E2 DHEAS-al történő helyettesítésével elkerülhetők az E2 periférián megjelenő káros (pl. rákkeltő) hatásai.

Következő *in vivo* elektrofiziológiai kísérleteinkben a DHEAS-kezelés hatását vizsgáltuk felnőtt állatokban (n=15) kialakított fokális agyi ischémiára, melynek során tanulmányoztuk a lézió által közvetlenül és közvetetten érintett (szomszédos) területek funkcionális működését. A kísérletsorozatban 4 állatcsoportunk volt:

1, a negatív kontrollok, melyekről csak kéregfelszíni kiváltott potenciálokat regisztráltunk 6.5 órán át az elsődleges szomatoszenzoros (SI) és motoros (MI) kéreg különböző pontjairól elektromos ellenoldali vibrisszapad-ingerlésre;

2, a hidegléziót kapott állatok, melyekben ugyanilyen ingerlés során egy félórás kontroll felvétele után léziót alakítottunk ki az MI punctum maximum áréájában, és ezután követtük a kiváltott válaszok változását 6 órán keresztül;

3, a DHEAS-kezelt állatok, melyek 12 órával a kísérlet előtt, és kezdete után fél órával 50 mg/kg koncentrációban szteroid injekciót kaptak, és követtük a kiváltott potenciálok változását; és végül

4, a DHEAS-kezelt és lézionált állatcsoport, mely mindkét kísérleti beavatkozást megkapta.

Következő megfigyeléseink voltak: a hideglézió hatására nagyfokú és kiterjedt kérgi diszinhibíciót (kérgi gátlási szint csökkenés) tapasztaltunk mindkét kérgi területen, mely a kiváltott potenciálok azonnali csökkenését és ezen belül az amplitúdók nagyfokú szórását (az átlagok nagy standard deviációját) eredményezte. A DHEAS-kezelés önmagában a kontroll állatokban mindkét vizsgált agykérgi áréában a kiváltott válaszok amplitúdójának nagyfokú növekedését eredményezte már 1 órával a második szteroid injekció után. A DHEAS és a hideglézió kombinációjakor a kérgi diszinhibíció nagymértékben lecsökkent, párhuzamosan a válaszok amplitúdóinak szórásának csökkenésével. A recovery gyorsabban történt a DHEAS-kezelt állatokban hideglézió után, amit az is mutatott, hogy az első 100 percben az SI-n regisztrálható amplitúdók szignifikánsan nagyobbak voltak a lézió után a szteroid-kezelt állatokban a kontrollokhoz képest. Összefoglalva: jóllehet a DHEAS-kezelés önmagában a kiváltott válaszok amplitúdóinak növekedését okozta a kontroll állatokban, a hideglézió során a kialakuló kérgi diszinhibíció csökkentése révén képes volt védeni az agykérget a túlzott excitabilitástól. A kombinált kezeléssel átesett állatokban tapasztalható csökkenés az átlagok szórásában szintén a kérgi excitáció-gátlás jobb egyensúlyára utal, melynek eredményeképp a kiváltott válaszok gyorsabban és nagyobb amplitúdóval jelentek meg újból az SI-n. *In vitro* elektrofiziológiai kísérletekben (n=5) vizsgáltuk a DHEAS ACSF-ben történő alkalmazása során még detektálható hatással járó legkisebb koncentrációkat. Ez a koncentráció $6 \cdot 10^{-5}$ M volt, mely alkalmazva a mezőpotenciálok amplitúdóinak növekedését és a páros pulzus kiváltott gátlás csökkenését okozta motoros kérgi agyszeletben a 2/3. rétegbeli ingerlés és elvezetés során az irodalmi adatoknak megfelelően. Ellentétben azonban az *in vivo* eredményeinkkel, agyszeletben a DHEAS indukált diszinhibíció tovább növekedett a fokális ischémia hatására, melynek pontos magyarázatát nem ismerjük. Feltehetően a bemeneteitől megfosztott kéregszelét az *in vivo* állapottól eltérő fiziológiai paraméterei tükröződnek az eltérő eredményekben.

A hideglézió során az érintett agyi régióban sérül a véragy-gát, továbbá az ún. perilesion rim-ben (penumbra) az idegsejtek sejtmembránja is (jellemzően a piramis-sejtek apikális dendritje). Ezen az irodalomból származó adatok adták az ötletet, hogy a megvizsgáljuk azt, hogy a szérum albuminhoz nagy affinitással kötődő festék, az Evans kék vajon alkalmas lehet-e a sérült neuronok kimutatására. S ha igen, akkor lehetséges-e segítségével különböző neuroprotektív anyagokat kvantitatív módon, sejtszinten tesztelni. A kísérletekhez felnőtt állatokat használtunk (n=29), és a hideglézió kialakításának menete és a DHEAS előkezelés azonos volt a már korábban leírtakkal. Az állatok 2%-os Evans kék oldatot kaptak i.v. a hideglézió kialakítása során, majd 30 perces túlélés után perfundáltuk őket, és az agykból 50 mikrométeres szeleteket készítettünk. A penumbra régióban a sérült sejtek várokozásunknak megfelelően felvették az Evans kék festéket, mely sejtek így fluoreszcens mikroszkópban jól detektálhatók (excitációs hullámhossz 530-550 nm, emissziós hullámhossz >590 nm), nagyobb nagyítással pedig szómájuk, bazális és apikális dendritjük is könnyen tanulmányozható. Az Evans kék pozitív sejteket összeszámolva a DHEAS-kezelt állatcsoportban (n=12) szignifikánsan kevesebb sérült sejtet találtunk a kontroll állatcsoporthoz (n=17) képest. Összefoglalva: a fokális ischémia során a neuroprotektív anyagok elsődleges célterülete a penumbra (perilesion rim), melyben a hideglézió kialakítása során sérül a véragy-gát. A szisztémásan alkalmazott Evans kék festék bejut az agy interstitiumába, és bekerül a sérült sejtek citoplazmájába. A pozitív sejteket egyszerűen és gyorsan ki lehet mutatni fluoreszcens mikroszkóppal. Ez az új, általunk leírt módszer alkalmas neuroprotektív anyagok hatásosságának tanulmányozására, mely olcsóbb bármely immuncitokémiai módszernél.

További, más irányú erőfeszítéseket tettünk a globális ischémia laborunkban történő meghonosítására. Az egyik ilyen általánosan elfogadott módszer a 2VO, melynek során a két artéria carotis communis-t szorítják el reverzibilis módon, különböző ideig. A kialakuló globális ischémia során a bekövetkező véráramlási zavar legkifejezettebben a hippokampális sejtek pusztulásában nyilvánul meg. Ezzel a módszerrel a különböző neuroprotektív anyagok hippokampális sejtekre gyakorolt védőhatását tervezzük tanulmányozni *in vivo* elektrofiziológiai

kísérletekben (ellentétes oldali CA3 ingerlés, CA1 elvezetés) és morfológiai kísérletekben immunhisztokémiával (NeuN, Fluoro Jade B). Elektrofiziológiai előkísérleteink nem várt eredményt hoztak, ugyanis rendkívül nagy különbséget tapasztaltunk a Charles River és Harlan (mindketten a Wistar törzshöz tartozó) állatok 2VO utáni hippocampális aktivitásában. A Charles River állatokban a populációs spike-ok nagysága 80 %-on stabilizálódott a lekötés után a kísérlet végéig (> 3 óra), míg a Harlan állatoknál csak átlagosan 90 percig voltak hasonló nagyságú amplitúdók detektálhatók, majd az amplitúdók fokozatos eltűnését követően valamennyi Harlan állat (16-16 állatunk volt csoportonként) elpusztult 3 órán belül. Érdekességképpen a 3 napon át lekötött állatok CA1 aktivitásában nem volt különbség. Megfigyelésünknek az agyi ischémia kutatásban megnyilvánuló jelentőségéhez nem fér kétség, hiszen adataink a két állatcsoport alapvetően különböző ischémiás toleranciáját bizonyítják.

Egy 25 állatot felölelő kísérletsorozatban megvizsgáltuk a DHEAS protektív hatását 5 mg/kg (a korábbi koncentráció tizede), valamint a nagy dózisú DHEAS-kezeléssel ekvivalens koncentrációjú progeszteron (40 mg/kg) és ugyancsak egytizednyi (4 mg/kg) progeszteron hatását a hideglézió okozta agyszövet-károsodásra. Legelső DHEAS kísérletsorozatunk publikálásakor kapott bírálatok egyik legfőbb érve az volt, hogy a humán klinikai gyakorlatban alkalmazottnál képest az általunk használt koncentráció 2-3 nagyságrenddel nagyobb volt. Meg kell jegyezni azonban azt, hogy a humán alkalmazások során is legalább ekkora szórás van a felhasznált koncentrációkban, és ez már részben átfedi az általunk alkalmazott koncentrációt. A kísérleti körülmények (az állatok neme, kora, törzse, szállítója, és a kísérletezők személye) teljesen azonos volt a legelső kísérletsorozat körülményivel. Eredményeink a következők voltak: az 5 mg/kg DHEAS-kezelés hatása összemérhető volt a 40 mg/kg progeszteron hatásával, a lézionált térfogatok kisebbek voltak kontrollhoz képest, de szignifikánsan nem különböztek tőle. A 4 mg/kg progeszteron semmilyen védőhatást nem mutatott.

Utolsó *in vitro* elektrofiziológiai kísérletsorozatunkban a progeszteron (n=5) és a tetrahydrodeoxikortikoszteron (THDOC, n=4) fürdőfolyadékban történő alkalmazásának hatását tanulmányoztuk motoros kérgi agyszövetekben a horizontális kapcsolatok 2/3 rétegbeli ingerlése és elvezetése során. A mindkét szteroid facilitáló hatású volt, míg azonban a 10^{-5} M koncentrációjú THDOC által okozott növekedés 200%-os, és nem kimosható volt, addig a progeszteron oldékonyságának maximális tartományában (10^{-7} M) szintén a mezőpotenciálok előbbivel összemérhető növekedését eredményezte, mely azonban tranzienst, kimosható volt. További kísérleteket tervezünk ezen kérdéskör alaposabb tanulmányozására.

The effects of steroids on the neural activity, plasticity and cortical reorganization of the CNS

Tamás Farkas PhD, senior lecturer
University of Szeged, Department of Comparative Physiology
OTKA ID: F37407

During the first year of this grant there were several unsuccessful attempts to standardize the phototrombotic lesion, which is probably the most elegant model for focal cortical ischemia, because during its use there is no need to open the skull. After personal communication with Professor Otto Witte, whose group has been successfully using this model for decades, it became for us clear, as we already suspected, it is not possible to reduce the individual variance in phototrombosis. The lesion volume is highly dependent on the surficial vascularisation of the cortex. Therefore, we rendered our attention to the method of cortical cold lesion. Two types of thermodes were examined: one cooled with liquid nitrogen and the second one cooled with a mixture of acetone and dry ice. The last one was shown and of its use was instructed by Dr. Zsombor Lacza. The effects of cooling were examined both through the skull and through the dura mater after opening the skull. The thermode placed onto the dura mater for 30 s proved to be sufficient and adequate during lesioning the cortex. With its use we are able to carry out a lesioned volume of $\sim 10 \text{ mm}^3$ with small individual variances. This new method opened the way for us to test different putative neuroprotective compounds, e.g. neurosteroids in our laboratory.

In the first series of experiments ($n=55$) we evaluated the effects of DHEAS and 17 β -estradiol (E2) in our focal cortical cold lesion model, in which DHEAS (50 mg/kg, sc) and E2 (35 mg/kg, sc) were administered either as pretreatment (two subsequent injections 1 d and 1 h before lesion induction) or posttreatment (immediately after lesion induction). The focal cortical cold lesion was induced in the primary motor cortex by means of a cooled copper cylinder placed directly onto the cortical surface. One hour later, the animals were killed, the brains cut into 0.4-mm-thick slices, and the sections stained with 1% triphenyltetrazolium chloride. The volume of the hemispheric lesion was calculated for each animal. The results demonstrated that the lesion area was significantly attenuated in both the DHEAS- and E2- pre and posttreated groups and that in the presence of letrozole, a nonsteroidal aromatase inhibitor, no neuroprotection was observed, suggesting that the beneficial effect of DHEAS on the cold injury might depend on the conversion of DHEAS to E2 within the brain. It is concluded that even a single posttraumatic administration of DHEAS may be of substantial therapeutic benefit in the treatment of focal brain injury.

In the present *in vivo* electrophysiological experiments conducted on adult rats ($n=15$), we studied the pure effects of peripherally administered DHEAS on the primary somatosensory (SI) and motor cortical (MI) responses of (i) anaesthetized controls, (ii) motor cortical focal cold lesioned, (iii) DHEAS treated and (iv) lesioned+DHEAS treated rats. The effect of DHEAS on field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) was studied *in vitro* on brain slices too. DHEAS (50 mg/kg) was injected subcutaneously 12 h before and immediately after the cold lesion induction. The anaesthetized rats were fixed in a stereotaxic frame, the primary somatosensory and motor cortices were exposed, and control SI and M responses were evoked with contralateral whisker pad stimulation. After registration of evoked responses for a 35 min period, a copper cylinder described above was used to produce a lesion in the primary motor cortex, then the registration of evoked responses were continued for an additional 360 min period. Pure DHEAS administration in controls resulted in a slight increase in amplitudes of both SI and MI responses. After a focal cold lesion, the most serious reduction in amplitudes was observed in the focus of the lesion in the primary motor cortex, but the amplitudes of SI responses were also decreased. 3-5 h after the lesion, the amplitudes started to increase in the primary motor cortex, around the injury, while the recovery of the SI responses started already 2 h after the motor cortical lesion.

In the course of the post-lesion recovery period, the motor cortical responses, peripherally to the centre of the lesion, frequently produced responses with extremely high and low amplitudes. The paired pulse paradigm revealed a changing but basically high level of disinhibition and facilitation in extended cortical areas after the focal cortical cold lesion. The deviations (e.g. the extremely augmented responses) in cortical functioning of anaesthetized rats however, was unambiguously diminished by DHEAS administration, and the recovery period of cortical responses was significantly shorter after the steroid treatment. In *in vitro* studies (n=5), DHEAS administration however, resulted in enhanced level of disinhibition in extended cortical areas of both hemispheres, which was further elevated after focal cortical ischemia. This observation draws attention to the possible differences between the results obtainable in different models (*in vitro* vs *in situ*).

It is known from the literature that focal cold lesion-induced injury, a frequently-used model of vasogenic edema, causes enhanced permeability of the blood-brain barrier and also of the plasma membrane of cells in the perilesion rim of the injury, as can be demonstrated with apoptotic markers, for example. The affected cells might be visualized not only by immunocytochemistry, but also by means of fluorescent microscopy subsequent to i.v. Evans blue administration. In this series of experiments (n=29) we tried to demonstrate that the injured neurons in the perilesion rim can be visualized with intracellularly accumulated Evans blue, determined by fluorescent microscopy; and to investigate whether fluorescent microscopy (following the i.v. administration of Evans blue) is a suitable method for the rapid and cheap testing and screening of presumed neuroprotective substances. To validate the method, we used dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) pretreatment, as described before. The Evans blue-positive cells were detected in the perilesion rim, fluoresced bright-red and could be easily counted. Statistical analysis revealed that DHEAS administration significantly reduced the number of degenerating neurons as compared with that for the animals in the vehicle-treated control group. It is proved that this model is suitable for estimation of the effectiveness of presumed neuroprotective molecules or treatments in certain kinds of traumatic brain lesion models.

A frequently used model of global cerebral ischemia in rats is the two-vessel occlusion (2VO), which results in a dysfunction predominantly within the CA1 field of the hippocampus. In the present work, the acute effects of 2-carotid occlusion-induced global ischemia on the CA3 stimulation-evoked population spike activity in region CA1 of Wistar rats from different suppliers (Charles-River and Harlan, n=16, 16, respectively) were compared. In the acute electrophysiological experiments, the hippocampal CA1 responses revealed that the Charles-River rats immediately compensated the 2VO much better than did the Harlan rats. However, 3 days later, no difference could be observed between the CA1 activities of these rats. The presented data show that the Wistar rats from different vendors represent an important source of variability in the results of acute experiments on the hippocampal ischemia. These observations draw attention to the importance of the careful choice of the laboratory rats (both strains and breeds) used in such experiments.

In an experiment series using 25 rats, the protective effects of low doses DHEAS treatment (5 mg/kg, i.e. one tenth of the former concentration), high doses of progesterone (40 mg/kg, i.e. equimolar to the former high doses DHEAS concentration) and low doses of progesterone (4 mg/kg) were studied. During the review process of our Endocrinology paper one of the strongest objection was the high doses of applied DHEAS, which could be up to 100-1000 times higher than what is used in human clinical practice. The circumstances of this study (the gender, age, strain, vendor of animals and the participating personals) were identical to the previous series of experiment. Our results are as follows: the low doses DHEAS treatment had a similar effect on lesioned cortical volumes as compared it to that of high doses progesterone treatment. Although the lesioned areas were smaller, they did not reach any level of significance compared these to controls. The 4 mg/kg progesterone treatment did not show any protective effects.

In the last series of *in vitro* electrophysiological experiments we tested the effects of bath applied progesterone (n=5) and tetrahydrodesoxycorticosterone (THDOC, n=4) on the amplitudes of fEPSPs elicited in L2/3 of the motor cortical slice. Both steroids had a facilitatory effect on fEPSPs: the THDOC in a concentration of 10^{-5} M caused an amplitude elevation of 200%, which was persistent, while progesterone already in a concentration of 10^{-7} M elicited an augmentation of similar manner, although it was completely washable. Further experiments are planned to elucidate this phenomenon.