

A kutatás eredményei

Az Alzheimer-kór (AK) jellemző neuronális degeneráció kialakulásáért számosan az egyik jellemző neuropathológiai elváltozásban, a szenilis plakokban lerakódó beta amyloid peptidet (beta AP) teszik felelőssé (Emre és mtsai, 1992, Regland és Gottfries, 1992). Ismeretes, hogy a 40-42 aminosavból álló beta AP a 21. kromoszómán kódolt fehérjéről, a 695 aminosavból álló amyloid prekursor proteinből (APP) hasad le. Fiziológiai körülmények között az APP-ből szolubilis származékok keletkezhetnek a beta AP szekvenciáján belül történő proteolitikus hasítás révén (Esch és mtsai, 1990), mely hasításért az alfa-szekretáz a felelős (Schonlein és mtsai, 1993). Kóros esetben, AK-ban a beta- és gamma-szekretáz enzimek aktiválódnak, és ezek hasítási terméke a beta AP (Mundy 1994, Hussain és mtsai, 1999).

Az eltelt 4 évben kutatási fő irányvonalunk különböző pszichiátriai és egyéb gyógyszerek APP metabolizmusra és annak regulációs elemeire gyakorolt hatásának vizsgálata volt.

Az AK progressziója során egyre gyakrabban fordulnak elő agresszivitással, agitációval, nyugtalansággal járó viselkedési tünetek, melyek antipszichotikum terápiát igényelnek (Ropacki és Jeste, 2005). Ezért első vizsgálatsorozatunkban két antipszichotikum, a típusos haloperidol és az atípusos risperidon APP metabolizmusra gyakorolt hatását vizsgáltuk in vivo körülmények között, patkány cortexben. Mindkét antipszichotikum kötődik a dopaminerg, szerotonerg, adrenerg ill. muszkarinerg receptorokhoz, s azokon keresztül antagonistá hatást fejt ki (Scatton és mtsai, 2001). Különösen a klinikai gyakorlatban kevés extrapiramidális mellékhatásai miatt általánosságban használt risperidon mutat igen nagy affinitást a 2A és 2C szerotonerg, valamint alfa adrenerg receptorokhoz (Scatton és mtsai, 2001). Az 5HT_{2C} receptorokra gyakorolt hatás miatt elképzelhető volt, hogy az APP metabolizmusra a beta AP képződése szempontjából kedvezőtlenül hatnak. A haloperidolt illetve risperidont terápiás és toxikus dózisokban alkalmaztuk intraperitonealisán. Az akut kezelés során egyszeri oltást követően 6, 12, 24 és 96 óra elteltével, a krónikus kezelés során 1, 2, 3 ill. 4 hétig folyamatosan, naponta történő oltást követően vizsgáltuk a corticalis APP szinteket Western blot technikával. Eredményeink szerint akut kezelést követően 24 ill. 96 óra elteltével a haloperidol terápiás és toxikus dózisa egyaránt szignifikánsan növelte a corticalis APP szintet (Palotás és mtsai, 2003a). Risperidon alkalmazása esetén hasonló jellegű változást nem tudtunk kimutatni. A krónikus kezeléseket utáni különböző időpontokban végzett vizsgálataink szintén nem mutattak szignifikáns változást a kezelt és kontroll állatok között.

Eredményeinkből levonható következtetés szerint mindkét vizsgált antipszichotikum az APP metabolizmus szempontjából biztonságosan alkalmazható a klinikai gyakorlatban a demenciákhoz társuló agitáció és egyéb viselkedési tünetek kezelésére.

A demenciák másik gyakori társtünete a depresszió. Egy felmérés adatai szerint AK-ban szenvedők 19 %-a szenved major depresszióban, 34%-a dysthimiában (Starkstein és mtsai, 1997), mely állapotok hosszantartó antidepresszáns medikációt igényelnek. Ezért következő kísérletsorozatunkban az antidepresszánsok hatását tanulmányoztuk. *In vitro* körülmények között 2 antidepresszánsként használt vegyület ill. gyógyszer hatását vizsgáltuk. Neuronális tenyészeteken végzett kísérleteink során a triciklikus (TCA) imipramint és a szerotonin újrafelvételt gátló (SSRI) citalopram különböző koncentrációit (1, 10 és 100 μM) hasonlítottuk össze (Pakaski és mtsai, 2005). Kísérleteinket embrionális patkány basalis előagyból származó neuronális tenyészeteken végeztük. 2 órás inkubálást követően mindkét antidepresszáns fokozta a tápfolyadékba szekretált APP mennyiségét. Maximális hatást imipramin esetében a legalacsonyabb koncentrációnál tapasztaltunk, míg a citalopram kezelés dózis függő APP szekréció növekedést eredményezett. A hatás idő függését vizsgálva szintén tapasztaltunk különbséget a 2 vizsgált vegyület között. Ezen kísérletekhez a maximális hatást mutató koncentrációkat alkalmaztuk. 1 μM imipramine 1 óra után eredményezett nagymértékű növekedést a tápfolyadékba szekretált APP mennyiségében, de még 3 ill. 6 órás kezelés esetén is kb. 3-szoros APP szekréció fokozódást indukált. A citalopram 1 óra után nem eredményezett szignifikáns változást, későbbi időpontokban az imipraminhoz hasonló mértékű növekedést tapasztaltunk. Az intracelluláris APP szintet csak a legmagasabb koncentrációjú (100 μM) imipramin csökkentette szignifikánsan, sem alacsonyabb koncentrációi, sem a citalopram különböző koncentrációi nem okoztak változást.

Az APP metabolizmus szabályozásában részt vevő faktorok közül a protein kináz C (PKC) esetleges változását vizsgáltuk. Irodalmi adatok szerint a muszkarin típusú acetilkolin (mACh) receptorok (Buxbaum és mtsai, 1992; Nitsch és mtsai, 1992), a metabotróp glutamát receptorok (Lee és mtsai, 1995) és a szerotonin receptorok (Nitsch és mtsai, 1996) szerepet játszhatnak az APP szekretoros, non-amyloidogén hasításában az amyloidogén iránnyal szemben. Ez a folyamat a PKC – foszfolipáz A₂ (PLA₂) aktiváción keresztül valósul meg (Nitsch és mtsai, 1996). *In vitro* kísérletünk során az imipramin kezelés hatására sikerült PKC szint emelkedést detektálnunk, citalopram kezelés nem eredményezett szignifikáns változást a PKC szintben. Eredményeinkből levont következtetés szerint mindkét vizsgált antidepresszáns az AK patomechanizmusa szempontjából jótékonyan befolyásolja az APP

metabolizmust, mivel növeli a fehérje szekrécióját. A szekretált APP ugyanis már nem alkalmas a beta és gamma szekretázok által történő hasításra, így a beta AP képződésre sem. Kísérleteink azt is bizonyították, hogy a triciklikus és SSRI antidepresszánsok APP metabolizmust moduláló hatásának regulációja különböző. A triciklikus imipramin PKC szintet fokozó hatása valószínűleg az 5HT2 receptorokon keresztül mediált. Az SSRI citalopram APP szekréciót növelő hatása valamilyen más módon szabályozott. In vitro kísérleteinket patkányok antidepresszánsal történő akut és krónikus kezelését követő in vivo vizsgálatokkal egészítettük ki. Az *in vitro* adatokkal ellentétben az agymintákban nem változott szignifikánsan az APP szintje sem az imipramin, sem a citalopram kezeléseket követően. Eredményeink arra utalnak, hogy a krónikus *in vivo* antidepresszáns kezelés nem befolyásolja kedvezőtlenül az APP metabolizmusát (Palotás és mtsai, 2003b).

Az anesztetikumok APP metabolizmusra gyakorolt hatásának tanulmányozását az a megfigyelés indokolta, miszerint altatásos műtétek után igen gyakori a postoperatív kognitív hanyatlás (Parikh és Chung, 1995). Az Alzheimer-kór előfordulása szintén gyakrabban a hosszú altatást igénylő szívműtétek után (Gasparini és mtsai, 2002). Ezért kérdésként merült fel, van-e esetleges összefüggés az altatószerek alkalmazása és az APP metabolizmus változása között. Korábbi kísérleteinktől eltérően nemcsak fehérje szinten, hanem mRNS szinten is végeztünk kísérleteket. Az anesztetikumok közül a thiopentant, valamint a propofolt alkalmaztuk terápiás és toxikus dózisokban patkányoknál. A korábbi antipszichotikum vizsgálatunkhoz hasonlóan egyszeri akut, valamint 1, 2, 3, 4 héten át tartó intraperitonealis krónikus kezelést követően vizsgáltuk az állatok corticalis mintáit. Az APP fehérje szemiquantitatív meghatározásához szintén APP Western blot technikát, az APP mRNS detektáláshoz real-time PCR-t használtunk. Eredményeink szerint egyik altatószer sem indukált változást az APP protein és mRNS szintekben sem az akut, sem a krónikus kezelést követően (Palotás és mtsai, 2005). Következtetésként levonható, hogy a két vizsgált altatószer az APP metabolizmus szempontjából is biztonságos szernek tekinthető, alkalmazásuk nem növeli az AK előfordulási lehetőségét.

Az anesztéziában a benzodiazepineket is kiterjedten alkalmazzák a pre-medikáció ill. az anesztézia indukciója során. A benzodiazepinek APP metabolizmust esetlegesen módosító hatásának vizsgálatához a diazepamot (Seduxen) és a midazolamot (Dormicum) választottuk. Korábbi kísérleteinkhez hasonlóan akut és krónikus kezeléseket alkalmaztunk terápiás és toxikus dózisok mellett. A corticalis APP szintekben egyik kezelést követően sem tapasztaltunk szignifikáns APP szint változást. Eredményeink alapján mind a diazepam, mind

a midazolam aneszteziológiai alkalmazása biztonságos az APP metabolizmus és az AK kialakulás szempontjából (Kálmán és mtsai, 2006).

Az addiktív szerek használata során tapasztalható kognitív deficittünetek megjelenése szintén felveti a lehetőségét annak, hogy ezen szerek szintén amyloid képződést indukálnak. E kérdés megválaszolására *in vivo* morfinnal ill. metilén-dioximetamfetaminnal (MDMA) kezelt patkányok cortex mintáin is tanulmányoztuk az APP szintek változását. A regulációs folyamatok közül szintén a PKC, valamint az APP kóros hasításáért felelős BACE szinteket mértük immunoblot technikával. Ebben a kísérletsorozatunkban elkülönítettük a corticalis homogenát szolubilis és membránkötött frakcióit az APP és PKC immunoblot esetében. Eredményeink szerint a morfin kezelés nem változtatta meg az APP metabolizmusát. MDMA kezelés hatására a szolubilis APP derivátumok mennyisége csaknem felére csökkent a kontrollhoz képest. A PKC szintekben nem tapasztaltunk változást, viszont a BACE szint MDMA kezelést követően szignifikánsan megemelkedett. Vizsgálataink azt mutatják, hogy a két addiktív szer hatása az Alzheimer-kór patomechanizmusa szempontjából különböző, az MDMA az APP metabolizmusát az amyloid képződés irányába tolja s ennek háttérében a BACE aktiváció állhat (Kálmán és mtsai, 2006).

Utóbbi 2 kísérletsorozatunk bár nem gyógyszeres kezelés hatására történő APP metabolizmust vizsgált, azonban egy kooperáció révén lehetőségünk nyílt az atherosclerosis transzgenikus állatmodelljéhez hozzájutni. S mivel az Alzheimer-kór rizikótényezői között a hypercholesterolaemia (HK) és a következményes atherosclerosis is előfordul, további kísérleteink célja annak eldöntése volt, hogy a HK diéta miképpen módosítja az APP metabolizmust. Ezen kísérleteinket vad típusú és apoB-100 transzgenikus egereken végeztük. Az állatok 17 héten át kapták a normál illetve a 2 % koleszterol tartalmú diétát. Az APP metabolizmust az előzőekben ismertetett módszerekkel tanulmányoztuk. A HK diéta a vad típusú egerekben növelte az APP mRNS szinteket, ugyanakkor az apoB-100 transzgenikus egerekben ugyanez a változás nem volt tapasztalható. Az apoB-100 gén overexpressziója sem idézett elő APP mRNS szint változást a vad típusú egerekhez képest. A Western blot kísérletek eredményei szerint a HK diéta 1,8-szorosára növelte az APP szintet az egerek corticalis mintáinak membránkötött frakciójában. S fehérje szinten az apoB-100 transzgenikus egerekben is tapasztalható volt APP szint emelkedés a vad típusú egerekhez képest. *Ex vivo* adataink szerint a hypercholesterolaemia illetve az apoB-100 emelkedett szintje az APP metabolizmust az amyloid képződés irányába tolja (Bjelik és mtsai, 2006).

Az atherosclerosis komplex és multifaktoriális folyamatában kulcs-szerepet játszó biglycan APP mRNS splicing-ra gyakorolt hatását szintén transzgenikus egerekben volt

lehetőségünk vizsgálni. Vizsgálatainkat nemcsak biglycan transzgént hordozó egerekben, hanem biglycan és ApoB-100 transzgéneket hordozó egerekben is végeztük. A corticalis APP mRNS szinteket szintén szemi-quantitatív PCR segítségével vizsgáltuk. A 2 modell közül csak a biglycan transzgén egér corticalis APP mRNS szintjeiben tapasztaltunk szignifikáns 122 %-os (APP695) illetve 157 %-os (APP770) növekedést. Vizsgálatainkból levont következtetés szerint a biglycan nemcsak az atherogenesisen keresztül lehet rizikófaktora az AK-nak, hanem direkt úton az APP metabolizmusra gyakorolt kedvezőtlen hatása révén is (Bjelik és mtsai, 2007).

Eredményeinket összefoglalva megállapítható, hogy az AK patomechanizmusa szempontjából a vizsgált

- antidepresszánsok kedvező hatással bírnak,
- az antipszichotikumok, anesztetikumok és benzodiazepinek nem indukálnak változást,
- az addiktív szerek közül az MDMA kedvezőtlen hatású.

Az atherosclerosis, mint rizikótényező folyamatában szerepet játszó magas koleszterin-tartalmú diéta, az apoB és biglycan emelkedett szintje egyaránt az amyloid képződés irányába tolja az APP metabolizmusát vagy mRNS, vagy protein szinten, így kedvezőtlen az AK patomechanizmusa szempontjából.

Bibliográfia

- Bjelik, A., Bereczki, E., Gonda, Sz., Juhász, A., Rimanóczy, Á., Zana, M., Csont, T., Pákáski, M., Boda, K., Ferdinándy, P., Dux, L., Janka, Z., Sántha, M., Kálmán, J. (2006) Human apoB overexpression and a high-cholesterol diet differently modify the brain APP metabolism in the transgenic mouse model of atherosclerosis. *Neurochem. Int.* 49, 393-400.
- Bjelik, A., Pákáski, M., Bereczki, E., Gonda, Sz., Juhász, A., Rimanóczy, Á., Zana, M., Janka, Z., Sántha, M., Kálmán, J. (2007) APP mRNA splicing is upregulated in the brain of biglycan transgenic mice. *Neurochem. Int.* 50, 1-4.
- Buxbaum, J.D., Oishi, M., Chen, H.I., Pinkas-Kramarski, R., Jaffe, E.A., Gandy, S.E., Greengard, P. (1992) Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer β /A4 amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10075-10078.

- Emre, M., Geula, C., Ransil, B.J., Mesulam, M.M. (1992) The acute neurotoxicity and effects of intracerebrally injected β -amyloid in the rat brain. *Neurobiol. Aging* 13, 553-590.
- Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D., Ward, P. (1990) Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.
- Gasparini, M., Vanacore, N., Schiaffini, C., Brusa, L., Panella, M., Talarico, G., Meco, G., Lenzi, G.L. (2002) A case-control study on Alzheimer's disease and exposure to anesthesia. *Neurol. Sci.* 23, 11-14.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., Smith, T.S., Simmons, D.L., Walsh, F.S., Dingwall, C., Christie, G. (1999) Identification of a novel aspartic protease (asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell Neurosci.* 14, 419-427.
- Kálmán, J., Palotás, M., Pákáski, M., Hugyecz, M., Janka, Z., Palotás, A. (2006) Unchanged rat brain amyloid precursor protein levels after exposure to benzodiazepines in vivo. *Eur. J. Anaesthesiol.* 23, 772-775.
- Kálmán, J., Bjelik, A., Hugyecz M., Tímár, J., Gyarmati, Zs., Zana, M., Fürst, Zs., Janka, Z., Rakonczay, Z., Horváth, Z., Pákáski, M. (2006) 3,4-Methylenedioxymetamphetamine (MDMA), but not morphine, alters APP processing in the rat brain. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 1-8.
- Lee, R.K.K., Wurtman, R.J., Cox, A.J., Nitsch, R.M. (1995) Amyloid precursor protein processing is stimulated by metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 8083-8087.
- Mundy, D.I. (1994) Identification of the multicatalytic enzyme as a possible gamma-secretase for the amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 333-341.
- Nitsch, R.M., Deng, M., Growdon, J.H., Wurtman, J.R. (1996) Serotonin 5HT_{2a} and 5HT_{2c} receptors stimulate amyloid precursor protein ectodomain secretion. *J. Biol. Chem.* 271, 4188-4194.
- Nitsch, R.M., Slack, B.E., Wurtman, R.J., Growdon, J.H. (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258, 304-307.
- Palotás, A., Pákáski, M, Palotás, M., Hugyecz, M., Molnár, J., Penke, B., Janka, Z., Kálmán, J. (2003a) Effect of haloperidol and risperidone on amyloid precursor protein levels in vivo. *Brain Res. Bull.* 62, 93-99.

- Palotás, M., Palotás, A., Pákási, M., Hugyecz, M., Janka, Z., Penke, B., Kálmán, J. (2003b) Antidepresszívumok hatása az amyloid prekursor protein metabolizmusára patkány agyban. *Neuropsychopharmacologica Hungarica* V/3, 133-137.
- Palotás, M., Palotás, A., Bjelik A., Pákási, M., Hugyecz, M., Janka, Z., Kálmán, J. (2005) *Neurochem. Res.* 30, 1021-1026.
- Parikh, S.S., Chung, F. (1995) Postoperative delirium in the elderly. *Anaesth. Analg.* 80, 1223-1232.
- Pákási, M., Bjelik, A., Hugyecz, M., Kása, P., Janka, Z., Kálmán, J. (2005) Imipramine and citalopram facilitate amyloid precursor protein secretion in vitro. *Neurochem. Int.* 47, 190-195.
- Regland, B., Gottfries, C.G. (1992) The role of amyloid beta-protein in Alzheimer's disease. *Lancet* 340, 467-469.
- Ropacki, S.A., Jeste, D.V. (2005) Epidemiology of and risk factors for psychosis of Alzheimer's disease: a review of 55 studies published from 1990 to 2003. *Am J Psychiatry* 162, 2022-2030.
- Scatton, B., Cohen, C., Perrault, G., Oblin, A., Claustre, Y., Schoemaker, H., Sanger, D.J., Rouquier, L., Porsolt, R. (2001) The preclinical pharmacologic profile of tiapride. *Eur. Psychiatry* 16 Suppl 1: 29-34.
- Schonlein, C., Probst, A., Huber, G. (1993) Characterization of proteases with the specificity to cleave at the secretase-site of beta-APP. *Neurosci Lett.* 161, 33-36.
- Starkstein, S.E., Chemerinski, E., Sabe, L., Kuzis, G., Petracca, G., Teson, A., Leiguarda, R. (1997) Prospective longitudinal study of depression and anosognosia in Alzheimer's disease. *Br. J. Psychiatry* 158, 872-877.