

**AZ ALZHEIMER KÓR ÁLLATMODELLJEI:
A β -AMYLOID 1-42 OLIGOMEREK
INTRACEREBROVENTRIKULÁRIS ADMINISZTRÁCIÓJA
VAD TÍPUSÚ PATKÁNY MODELLEN ÉS AZ LA1011
GYÓGYSZERJELÖLT TESZTELÉSE APP/PS1
TRANSZGENIKUS EGÉR VONALON**

Ph.D. értekezés tézisei

Kasza Ágnes

**Témavezető:
Prof. Dr. Penke Botond**

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
Orvosi Vegytani Intézet
Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem



**Szeged
2018**

BEVEZETÉS

Az Alzheimer-kór (AK) napjaink egyik legismertebb korfüggő demenciája, mely különösen az idősebb populációt érinti. A multifaktoriális betegség a szellemi képességek súlyos romlásával jár, legfőbb jellemzői a progresszív memóriavesztés és a térbeli tájékozódás zavara. A kór legfőbb neuropatológiai jellegzetességei az extracellulárisan előforduló amiloid plakkok és az intracellulárisan megjelenő neurofibrilláris kötegek (NFT). Az amiloid plakkokat alkotó β -amiloid ($A\beta$) peptid fibrillumok neuroinflammációt gerjesztenek. Az intracelluláris $A\beta$ oligomerek viszont az endoplazmatikus retikulumban (ER) zajló folyamatok hibás működését okozzák, emiatt ER-stressz alakul ki. Felborul az ER és a mitokondrium Ca^{2+} -homeosztázisa, ami gátolja a hosszú távú potenciózást (LTP), egyidejűleg előidézi a hosszú távú depressziót (LTD) és a dendrittüske szám csökkenést. Az AK korai jellemzőinek tanulmányozásához rendkívül fontos egy egyszerű, megismételhető, költséghatékony *in vivo* állatmodell létrehozása.

Doktori munkám kezdetén egy jól jellemzett szintetikus $A\beta_{1-42}$ oligomer toxikus formájának azonosítását tűztem ki célul, melyet patkány agyba injektálva létrehozható egy, az AK-t megbízhatóan rekonstruáló állatmodell. Négy egymást követő kísérletet végeztünk el patkányokon egyszeri intracerebroventrikuláris (icv) $A\beta_{1-42}$ injektálással. Eredményeink azt mutatták, hogy a különböző $A\beta_{1-42}$ oligomer minták toxikus hatása a peptid koncentráció és az aggregációs idő függvénye. Ezen eredmények ismeretében hoztuk létre jól jellemzett o $A\beta_{1-42}$ icv injektálásával az AK korai fázisát tükröző patkány modellünket. Ezekkel a kísérletekkel egyidejűleg az APPxPS1 transzgenikus (tg) egér modellen egy hősokkfehérje (HSP)-koindukáló (egy kooperáló kutatócsoport által szintetizált) LA1011 jelzésű gyógyszerjelölt neuroprotektív hatását határoztuk meg. Az icv injektált $A\beta_{1-42}$ oligomerek toxikus, ill. a gyógyszerjelölt LA1011 neuroprotektív hatását magatartás teszttel, hisztológiai módszerekkel, LTP méréssel és dendrittüske számolással vizsgáltuk.

Doktori munkám során a kémiaileg jól jellemzett o $A\beta_{1-42}$ icv injektálása a térbeli memória romlását okozta a patkány modellen. A kísérletekhez a 8-10 nm mérettartományba eső oligomerek bizonyultak legalkalmasabbnak. Az APP/PS1 tg egérvonalon végzett magatartás-farmakológiai vizsgálatainkkal a HSP-koindukáló

LA1011 neuroprotektív hatását is kimutattuk, ezzel bizonyítva, hogy vegyületünk alkalmas lehet a további gyógyszerfejlesztésre.

CÉLKITŰZÉSEK

A szakirodalom álláspontja szerint szükség van egy egyszerű, költséghatékony, megismételhető, az AK-t megbízhatóan rekonstruáló, jól jellemzett A β -injektált állatmodell létrehozására. Doktori munkám elsődleges célkitűzése egy, az AK korai szakaszát jellemző patkánymodell létrehozása és validálása volt, icv injektált oA β 1-42-t alkalmazásával.

Az icv A β 1-42 injektálással létrehozott korai AK modelljét az alábbi, egymást követő kísérleti lépésekkel terveztük meg és hoztuk létre:

1. A 7-amino-4-metilkumarin-3-ecetsavval (AMCA) fluoreszcensen jelölt A β 1-42 oligomer preparátumok icv injektálását követő detektálása a hippocampusz (HC) területén.
2. Az "in situ" preparált A β 1-42 oligomerek toxikus formájának fellelése.
3. Az oA β 1-42 icv injektálását követő magatartástereszték elvégzése.
4. Morfológiai változások – neuronális elváltozások, tau-patológia - szövettani vizsgálatokkal történő kimutatása az HC területén.
5. A szinaptikus degeneráció ellenőrzése a dendrittüske szám csökkenésének mérésével a cornu ammonis 1 (CA1) területén.
6. A modell validálása egy további kísérlettel az eredmények alapján toxikusnak kimutatott oA β 1-42-val.

A fenti kísérlettel egy időben magatartás-farmakológiai vizsgálatokkal mértük fel az általunk szintetizált HSP-koindukáló 1,4-dihidro-piridin-származék LA1011 potenciális AK gyógyszerjelöltünk neuroprotektív hatását az AK egyik tg (APPxPS1) egér modelljén.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Állatok

Kísérleteinkhez Charles River-Harlan hím patkányokat (Domaszék, Hungary, 270-300g) használtunk, melyek *ad libitum* juthattak standard patkánytáphoz és csapvízhez. A gyógyszerjelölt tesztelést B6C3-Tg (APP^{swe}/PS1^{dE9})85Dbo/Mmjax (APPxPS1, Jackson Laboratory Bar Harbor, ME, USA) C57BL/6 genetikai háttérű tg egereken végeztük el.

A β 1-42 oligomer preparátumok szintézise

Az A β 1-42 peptidet a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetének munkatársai állították elő, szilárd fázisú peptidszintézissel. Először szintetizálták az A β 1-42 peptid prekuzort (izo-A β 1-42) Fmoc protokoll szerint. Az izopeptidet semleges-enyhén lúgos pH körülmények között O \rightarrow N acilvándorlással alakították át az A β 1-42 peptiddé, a végterméket izolálták és HPLC oszlopon tisztították. A peptidet végül felhasználás előtt enyhén lúgos (pH 7,4) körülmények között hagyták aggregálódni. Az aggregáció időtartamának és a peptid koncentrációnak a függvényében különböző aggregáltsági fokú, vízben oldódó A β 1-42 oligomer keveréket kaptak.

A fluoreszcensen jelölt A β peptidet (AMCA-A β) is a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetének munkatársai állították elő. Az atomerő mikroszkópiához (AFM) A β 1-42 oligomert tartalmazó oldatból 10 μ l -t pipettáztak a muszkovit felszínére (Muscovite mica, V-1 quality, Electron Microscopy Sciences, Washington DC, USA). Két perc inkubációs idő után a mintákat kétszer 10 mikroliter desztillált vízzel mosták, majd nitrogén árammal szárították. Az AFM felvételeket szobahőmérsékleten készítették NT-MDT SOLVER Scanning Probe Microscope alkalmazásával.

Kezelés

Különböző A β 1-42 oligomerek icv injektálása patkány modellen

A patkányokat intraperitoneálisan (ip) beadott ketamin (10.0 mg/100 g) és xylazin (0.8 mg/100 g) keverékével altattuk. Az oldatokat Hamilton fecskendővel injektáltunk bilaterálisan, 7.5 μ l-t oldalanként (1.5 μ l/min). Az állatokat antibiotikummal és fájdalomcsillapítóval kezeltük a műtétet követően.

A fluoreszcens mikroszkópiához a patkányokat először fibrillári (fA β), majd egy következő kísérletben oligomer szerkezetű AMCA (7-Amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid)-jelölt A β 1-42-val injektáltuk. A fA β -t bilaterálisan, az oA β -t unilaterálisan, a jobb oldali agykamrába injektáltuk. 5 illetve 60 perccel a kezelést követően az állatokat perfundáltuk és 30 μ m szagittális metszeteket készítettünk a fluoreszcens vizsgálatok kiértékeléséhez.

Az állatokat a kísérletek során a konroll (hidrogén-karbonát pufferes fiziológiás sóoldat, HCBS) csoport mellett különböző oA β 1-42-val kezelt csoportra osztottuk. A körülmények változtatásával (három különböző aggregációs időt (24 h, 120 h and 168 h) és négy különböző koncentrációt (25, 50, 75 and 200 μ M) alkalmazva), ezek kombinációjával készítettük el a különböző oA β mintákat a kísérleti állatok kezelésére.

Az LA1011 gyógyszerjelölt tesztelése transzgenikus egér modellen

Ebben a kísérletben hím APP/PS1 tg és vad típusú egereket 3 hónapos koruktól 6 hónapon keresztül naponta injektáltuk intraperitoneálisan 3mg/kg dózisban LA1011 gyógyszerjelöltünkkel. A kontroll csoportot fiziológiás sóoldattal kezeltük. A kezelési időt követően a 9 hónapos állatok térbeli memóriáját Morris féle vízilabirintusban teszteltük.

Morris féle vízilabirintus teszt

A kísérlet egy kör alakú medencében zajlott, melyben egy víz alatti platformot helyeztünk a képzeletben felosztott medence egyik kvadránsába. Az állatok 5 napon keresztül naponta két alkalommal úsztak maximum 90 másodpercig. A kísérletben a platform megtalálásához szükséges időt mértük, a kiértékeléshez az első úszásokból származó adatokat használtuk fel.

Hisztológia

A magatartás tesztet követően az állatokat ketamin (10.0 mg/100 g) és xylazin (0.8 mg/100 g) keverékével altattuk, transzkardiálisan perfundáltuk először foszfát-pufferes fiziológiás sóoldattal (PBS) majd 4%-os paraformaldehid oldattal. Az agyakat eltávolítottuk és 24 órán át friss paraformaldehid keverékben utófixáltuk, majd 30%-os cukoroldatba tettük 4 °C-ra. Az agyakból fagyasztó mikrotóm segítségével 30 μ M-es koronális metszeteket készítettünk.

Krezilibolya festékkel az élő neuronokat jelöltük meg a neuronpusztulás mértékének meghatározásához. A neurofibrilláris kötegek megjelenítésére humán Mab (clone AT100) primer antitestet alkalmaztunk. A A β 1-42 hisztokémiai jelölésére egerekben az anti-nyúl1-42 amyloid primer antitest (WO-2) ajánlott. Az FD Rapid GolgiStain™ Kit-tel a HC CA1 területén a dendrittüskék számát vizsgáltuk.

Ex vivo elektrofiziológia

Standard protokollt alkalmazva 350 μ M vastagságú akut hippokampális szeleteket készítettünk a patkányok agyából. Az elvezetett mezőpotenciálok (fEPSPs) a HC CA1-es régió striatum radiatum proximális rétegéből származnak. Az LTP indukálás theta-burst stimulussal (TBS) történt multi-electrode array (MEA) berendezéssel.

Statisztika

A Morris féle vízilabirintus tesztet SPSS szoftverrel és Python's Lifelines library, Github repository programmal értékeltük ki. A statisztikai kiértékeléshez a platform megtalálásához szükséges időt vettük figyelembe. Cox Proportional Hazard modell alkalmazásával “túlélési görbét” illesztettünk az adatokra a napok és a kezelési csoportok függvényében. A kezelési csoportok közötti összehasonlításra log-rank tesztet alkalmaztunk.

A szövettani, dendrittüske elemzés és LTP vizsgálatok eredményeit három, vagy több kezelési csoport esetén varianciaanalízissel (egy utas ANOVA) hasonlítottuk össze, a csoportok közötti teljesítményt Fisher's LSD *post-hoc* teszttel analizáltuk, ahol ezt az adatok lehetővé tették. Nem homogén adatok esetén Games Howell post hoc, különböző, ám kellően nagy elemszámú csoportok esetén and Hochberg's GT2 post hoc tesztet alkalmaztunk. Nem normális eloszlás esetén a nemparametrikus Kruskal-Wallis teszttel és Mann-Whitney U próbával értékeltünk ki.

Két kezelési csoport esetén a magatartás teszt statisztikai kiértékelése ismételt méréses multifaktoriális varianciaanalízissel, a dendrittüske számolás adatainak kiértékelése pedig Student-féle t-próba alkalmazásával történt. A statisztikai analíziseket SPSS szoftverrel végeztük el, a szignifikanciát $p < 0.05$ értékben határoztuk meg.

EREDMÉNYEK

oA β 1-42 icv injektálása patkány modellen

A doktori munkám kezdetén egy új, megbízható, kölcséghatékony, az AK-t rekonstruáló állatmodell létrehozását tűztem ki célomul. Ennek eléréséhez jól jellemzett, patkány agyba icv injektált A β 1-42 oligomerek hatásait vizsgáltuk. Mivel előzőleg kimutattuk, hogy az A β 1-42 fibrilláris formája kívül a kamrafalra, emiatt egy esetleges icv kísérletre alkalmatlan, az icv kísérletek megkezdése előtt meg kellett bizonyosodnunk arról, hogy A β 1-42 oligomer formája képes penetrálni a kamrafalon. Célunk A β 1-42 oligomer icv injektálást követő hippocampális területen való megjelenésének bizonyítása lett. Unilaterális AMCA-jelölt A β 1-42 oligomer jobboldali agykamrába injektálását követően kimutattuk, hogy a A β 1-42 oligomer formája átjut a parenchymába.

Következő lépésként a különböző (24 h, 120 h és 168 h aggregációs idejű 25, 50, 75 és 200 μ M peptid koncentrációjú) A β 1-42 oligomereket vizsgáltuk. Ehhez három egymást követő kísérletsorozatot végeztünk különböző aggregáltsági fokú oA β 1-42 peptidet tartalmazó oldatokkal (icv bevitel). Az aggregátumok morfológiáját és méretét atomerő mikroszkópia segítségével térképeztük fel. Elsőként két különböző (24 h és 168 h aggregációs idejű, 25 μ M peptid koncentrációjú) oA β 1-42 aggregátum neurotoxikus hatását kutattuk. Vizsgálódásunkat egy szisztematikus kísérletsorozattal folytattuk a legtoxikusabb A β 1-42 feltérképezésére. Végző lépésként az általunk legtoxikusabbnak vélt A β 1-42 oligomer validálását végeztük el egy kiegészítő kísérlettel.

A térbeli memóriát MWM teszttel vizsgáltuk. Az első úszások során az arénában eltöltött időt (a platform megtalálásáig eltelt idő) mértük fel. Az arénában eltöltött idő átlaga szerint az első úszások során az oA β 1-42 24 h/75 μ M, 24 h/200 μ M és 168 h/25 μ M formái okoztak térbeli memórizavart. Szignifikáns különbséget találtunk a csoportok teljesítménye között, a HCBS kezelt (kontroll) csoport szignifikánsan kevesebb időt töltött el a platform keresésével mint a fent említett oA β 1-42 kezelt csoportok.

A HC területén végzett szövettani vizsgálataink eredménye alátámasztja a magatartás tesztben tapasztaltakat. Az élő neuronok számát tekintve szignifikáns különbséget a 24 h keresztül aggregáltatott oA β 1-42 injektált csoportok és a kontroll csoport között ugyan nem mutattunk ki, azonban egyértelmű tendenciát tapasztaltunk az

egyres kezelési csoportok között, amely a koncentráció és a élőneuronszám fordított arányosságát mutatja. Minél magasabb az injektált $\text{oA}\beta\text{1-42}$ koncentrációja, annál nagyobb mértékű élőneuronszám csökkenést figyelhetünk meg a vizsgált területen. 168 h aggregációs időt alkalmazva szignifikáns különbséget találtunk a csoportok között az élőneuronszám tekintetében, az összes $\text{oA}\beta\text{1-42}$ kezelt csoport esetén szignifikánsan alacsonyabb élőneuronszámot találtunk a HC területén a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A neurofibrilláris kötegek megjelenítésére alkalmazott hisztológiai vizsgálatokkal szintén alá tudtuk támasztani az előző kísérletek eredményeit: szignifikánsan nagyobb mennyiségű immunpozitív sejtet figyeltünk meg a 24 h/200 μM , 168 h/25 μM és a 168 h/75 μM $\text{oA}\beta\text{1-42}$ kezelt csoportokban a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A kísérleteket a HC területén végzett elektrofiziológiai elvezetésekkel folytattuk, az itt kapott adatok is összhangban vannak az magatartás teszt és a szövettani vizsgálatok eredményeivel. A 24 h aggregációval készült $\text{oA}\beta\text{1-42}$ peptid minták kisebb mértékű zavart okoztak a hosszútávú potenciáció (LTP) kialakulásában, viszont a 168 h amiloid aggregátumok injektálása jelentős mértékben akadályozta a memóriaképződés folyamatát. A 24 h aggregációs kísérletekben a 25 μM és a 75 μM koncentrációk valamint a 168 h/200 μM LTP-re gyakorolt hatása kisebb mértékben mutatható ki.

Kísérleti eredményeinket utolsó lépésként a dendrittüskék számának változására irányuló vizsgálatainkkal támasztottuk alá. A vizsgált csoportok közül a 120 h, és a 168 h aggregációs idejű aggregátumok bizonyultak hatásosnak: 120 h/50 μM és 168 h/25 μM $\text{oA}\beta\text{1-42}$ injektálással szignifikáns mértékű dendrittüske csökkenést mutattunk ki a kezelt állatokban a kontroll csoporthoz viszonyítva. A 24 h $\text{oA}\beta\text{1-42}$ aggregátumok nem okoztak szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz képest.

LA1011 gyógyszerjelölt tesztelése APP/PS1 transzgenikus egér vonalon

A HSP-koindukáló LA1011 gyógyszerjelölt neuroprotektív hatását $\text{A}\beta$ túltermelő APPxPS1 tg és vad típusú egereken vizsgáltuk mind a MWM magatartás teszt, mind szövettani eljárások alkalmazásával.

Az egereket 6 napon keresztül napi egyszer kezeltük ip beadási módszert alkalmazva az LA1011 (3 mg/kg) oldatával illetve fiziológiás sóoldattal (NaCl). A kezelést követően, a 9 hónapos egereken végeztük el a magatartás tesztet. Szignifikáns

különbség mutatkozott az állatok teljesítményében a következő csoportok között: wt+NaCl vs. tg+NaCl, wt+NaCl vs. wt+LA1011, és tg+saline vs. tg+LA1011. Fontos megjegyezni, hogy mindamellett, hogy a tg+NaCl csoport állatai szignifikánsan hosszabb idő alatt találták meg a víz alá rejtett platformot a wt+NaCl csoporthoz képest, a 6 hónapig tartó napi LA1011 kezelést kapott tg állatokon felgyorsult tanulási képességet figyeltünk meg. Érdekes módon az LA1011 kezelés feljavította az állatok memóriaképző folyamatát, azaz prokognitív hatást mutatott: az LA1011 kezelt wt állatok gyorsabban teljesítettek a magatartás tesztben mint NaCl kezelt wt társaik.

Az agyszeleteken végzett krezilibolya festéssel a neuronok számát tekintve szignifikáns különbséget tapasztaltunk az egyes kezelési csoportok között. A vizsgálat szignifikánsan kevesebb élőneuronszámot mutatott ki a tg+NaCl csoportban a wt+NaCl csoporthoz viszonyítva. Az LA1011 magatartás tesztben tapasztalt neuroprotektív hatását a krezilibolya festéssel is igazoltuk: a tg egerek 6 hónapos LA1011 kezelése szignifikáns mértékben csökkentette az idegsejtek leépülését a tg+NaCl csoporthoz viszonyítva.

A tau-patológiára irányuló szövettani vizsgálatot ebben a kísérletben is elvégeztük, a neurofibrilláris kötegek megjelenésének tekintetében ebben esetben is szignifikáns különbséget találtunk a csoportok között. A tg+NaCl csoport állatainak HC területéről készített metszetei szignifikánsan nagyobb mennyiségű neurofibrilláris köteget jelenítettek meg az adott agyi területen a wt+NaCl csoporthoz viszonyítva. Fontos megjegyezni, hogy a HSP-koindukáló LA1011 kezelés hatására a tg állatokban mért neurofibrilláris kötegek mennyisége a wt csoport állataiban mért szintre csökkent.

A dendrittüskék számának változását az LA1011 gyógyszerjelölt hatásra irányuló kísérletsorozatunkban is felmértük Golgi-Cox metodika segítségével. A dendrittüskék számának megjelenésében szignifikáns különbséget találtunk a tg+NaCl kezelt csoportban a wt+NaCl csoporthoz viszonyítva. Megjegyzendő, hogy míg a wt állatokban az LA1011 kezelés nem hatott a dendrittüskék számára, jelentős dendrittüskeszám növekedést tapasztaltunk a tg csoportban a gyógyszerjelölt-kezelést követően.

A vizsgált metszeten anti-A β antitesttel történő kezelés után plakkszerű struktúrákat figyelhetünk meg. A jelenség a tg+NaCl csoport állatainak HC területén számottevő, míg az LA1011 kezelés hatására jelentős mértékben csökkent.

MEGBESZÉLÉS

Doktori munkám elsődleges céljául egy szisztematikusan megtervezett kísérletsorozattal az icv injektált oA β minták neurotoxikus hatásának meghatározását tűztem ki vad típusú patkány modellen. A munka folyamán a különböző A β 1-42 oligomer aggregátumok hatását a térbeli memóriát felmérő magatartás teszt mellett élőneuronokat, neurofibrillaris kötegeket, és dendrittüskéket megjelenítő szövettani eljárásokkal és LTP méréssel vizsgáluk. Céljaink között szerepelt egy icv adagolási eljárás kifejlesztése, mellyel elkerülhető a direkt injektált terület Hamilton fecskendő által okozott mechanikai sérülése és a generált gyulladáshoz és mikroglialis válaszreakciók megjelenése.

Mindenekelőtt fontos volt igazolnunk, hogy icv beadást követően az AMCA jelölt A β 1-42 oligomer formája a fibrillaris formában szemben - amely kiül a kamrafalra - átjut a glymphaticus rendszer közvetítésével az ependymán az agyi parenchymába. E tény tudatában kezdtük meg kísérleteinket a különböző oA β 1-42 aggregátumok hatásának vizsgálatára, ehhez 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M és 200 μ M koncentrációkban 24 h, 120 h és 168 h aggregációs idővel állítottunk elő oA β 1-42 mintákat. A kísérlet eredményéből arra következtettünk, hogy az A β 1-42 oligomerek aggregáltatási ideje befolyásolja azok toxikusságát. 25 μ M koncentrációban 168 h aggregációt követően toxikus, míg 24 h követően kevésbé toxikus aggregátumot kaptunk.

Erre a tényre építettük következő kísérletünket, melyben szisztematikusan vizsgáltuk a peptidkoncentráció és az aggregációs idő hatását az oA β 1-42 minták toxikus hatására. AFM mérésekkel jelentős különbségeket találtunk az egyes aggregátumok méretei között: a részecskék átmérőjének átlagos mérete 6,5 és 21,5 nm között változik. A jelentős méretkülönbség mellett az aggregátumok megjelenésükben morfológiai különbségeket is mutatnak: hosszabb aggregációs időt (168h) követően a szférikus oligomerek mellett protofibrillumok is megjelennek a 25 és 75 μ M koncentrációban. Feltételezzük, hogy az oligomer aggregátumok mérete és különböző konformációs megjelenése együttesen felel a toxicitásért, ezért a A β 1-42 oligomerek hatását tovább vizsgáltuk a tanulási képességeket felmérő magatartás tesztünkkel, szövettani és elektrofiziológiai módszerekkel.

Elsődleges célként bizonyítani akartuk patkány modellen az A β oligomerek térbeli memória zavaró hatását, valamint kerestük a toxikus oligomerek kialakulásához szükséges optimális körölményeket. Az 5 napos MWM tesztben az oA β 1-42-kezelt

állatok szignifikánsan hosszabb ideig keresték a rejtett platformot a kontroll csoporthoz viszonyítva, bizonyítva feltevésünket, hogy az A β 1-42 oligomerek zavart okoznak a térbeli memória kialakulásában. A legmagasabb szignifikancia (leghosszabb kereséssel eltöltött idő) a 24 h/200 μ M, 10 átmérőjű és a 168 h/25 μ M, 8 nm átmérőjű oA β 1-42-kezelt csoportnál mutatkozott a kontroll csoportéhoz képest.

Szövetteni vizsgálatokkal alátámasztottuk a magatartás teszt eredményét. Habár a 24 h aggregátumok esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között, egyértelmű tendencia mutatta az élősejtszám csökkenést. A szignifikáns különbség a csoportok között az élőneuronszám tekintetében a 168 h aggregátumokkal kezelt esetben jelenik meg. A HC területén végzett szövetteni vizsgálatok a neurofibrilláris kötegek megjelenésének mértékét tekintve hasonló eredményt mutattak: a rövidebb aggregációs idővel csak a 24 h/200 μ M oA β 1-42 okozott szignifikáns mértékű NFT növekedést, míg a 168 h aggregációs idővel a 25 és 75 μ M koncentrációk bizonyultak toxikusnak. A 168 h/200 μ M aggregátum nem növelte meg az adott terület NFT mértékét. Eredményeink alátámasztják a toxikusság összefüggését az oA β 1-42 aggregátumok méretével és morfológiájával.

Az elektrofiziológias méréseink is alátámasztják az állatok térbeli memóriát vizsgáló magatartás tesztben mutatott eredményit. Habár jelentős LTP csökkenést csak a 24 h/200 μ M oA β 1-42-kezelés okozott a rövidebb ideig aggregáltatott oligomerek közül, a koncentráció függő tendencia a többi oA β 1-42-kezelt csoportnál is megfigyelhető. Ez a tendencia fordított arányt mutat a hosszabb ideig aggregáltatott oligomerek kezelését követően: a 25 és 75 μ M oA β 1-42 aggregátumok nagy mértékű LTP csökkenést okoztak, míg a 200 μ M koncentráció nem okozott ilyen mértékű változást.

Első kísérlet sorozatunk eredményei alapján egyértelműen kijelenthetjük, hogy az oA β 1-42 aggregátumok neurotoxikus hatása a méret és a morfológia függvénye. Egy részről kimutattuk, hogy létezik egy optimális oA β 1-42 méret (8-10 nm), mely nagy mértékű neurotoxikus hatást okoz (24 h/200 μ M, 168 h/25 μ M és 168 h/75 μ M), más részről azt is megállapítottuk, hogy a túl kis illetve túl nagy méretű aggregátumok (24 h/25 μ M, 24 h/75 μ M, 168 h/200 μ M) neurotoxikus hatása elenyésző. Annak ellenére, hogy az oA β 1-42 peptid pontos térszerkezete (konformációja) ismeretlen és szinte megállapíthatatlan, feltételezzük, hogy a toxikusnak bizonyuló aggregátumok hasonló méretük mellett hasonló szerkezeti struktúrákat is alkotnak. Az aggregációnak a béta-

redőzött rétegek kialakulása kedvez, valószínűleg ez a szerkezet a meghatározó az oligomereknél is. Feltételezésünk bizonyításához és az eddigi eredmények végső alátámasztásához elvégeztünk egy utolsó kísérletet a hasonló konformációjú és méretű (8,5 nm) 120 h/ 50 μ M oA β 1-42 peptid icv adminisztrációjával. Sikerrel kimutattuk az oligomer neurotoxikus hatását, mivel szignifikáns különbséget okozott a térbeli memória kialakulásában illetve a dendrittüse szám is szignifikánsan csökkent az oA β 1-42-kezelt állatokban a kontroll csoporthoz viszonyítva.

Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a meghatározott méretű és struktúrájú oA β aggregátumok, illetve A β protofibrillumok patkányba történő icv injektálást követően csökkentik az élő neuron- és a dendrittüske számot, növelik a NFT-k megjelenését, valamint zavart okoznak a térbeli memória kialakulásában. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a jól jellemzett A β 1-42 oligomerek alkalmazásával sikerült feljavítanunk az "icv A β -injektált" patkány modellt.

Doktori munkám második céljaként az AK korai fázisában feltételezhetően sikerrel alkalmazható gyógyszerjelölt tesztelését tűztük ki. Fülöp F. és munkatársai által előállított 1,4-dihidro-piridin származék sorozatából választottuk ki az LA1011 jelzésű HSP-koindukáló gyógyszerjelöltet *in vivo* vizsgálatainkhoz. A gyógyszerjelölt neuroprotektív hatása mellett enyhe prokognitív hatást is ki tudunk mutatni magatartás tesztünkkel és szövettani vizsgálatainkkal. A HSP indukció szignifikáns mértékű HSP túltermelődést okozott, az LA1011 vegyület valószínűleg ezáltal csökkentette a sejtek működését zavaró krónikus stressz mértékét.

*Mivel az LA1011 a HSP expressziót csak stresszes körülmények között növeli, az 1,4-dihidro-piridin származékok terápiás alkalmazása optimális lehetőségét nyújthat az AK kezelésére. Az LA1011 gyógyszerjelölt *in vivo* kísérleteinkben figyelemre méltó neuroprotektív hatást mutatott, ezért a jövőben gyógyszerfejlesztési kísérletekben tesztelik tovább.*

ÖSSZEGZÉS

Doktori munkám tudományos eredményei összefoglalva:

1. Bizonyítottuk, hogy a fluoreszcensen jelölt A β 1-42 oligomer icv injektálást követően penetrál az agyi parenchymába.

2. Meghatároztuk a toxikus $\alpha\beta$ 1-42 minták előállításához szükséges koncentráció és aggregációs idő tartományokat. Kísérleteink alapján kijelenthetjük, hogy az AFM felvételeken látható közepes méretű (8-10 nm) $\alpha\beta$ 1-42 aggregátumok tartalmazzák a legtoxikusabb β 1-42 oligomer formákat.
3. Bemutattuk a frissen előállított neurotoxikus $\alpha\beta$ 1-42 aggregátummal icv injektált új patkány modellünket. Alkalmasságát magatartás teszttel (MWM) és azt követő szövettani vizsgálatokkal (élősejtszám, neurofibrilláris kötegek, dendrittüskeszám mérések) és LTP méréssel igazoltuk.
4. Bizonyítottuk a HSP-koindukáló LA1011 1,4-dihidro-piridin származék neuroprotektív és enyhe prokognitív hatását az AK egyik tg (APPxPS1) egér modelljén.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek és mentoromnak Prof. Dr. Penke Botondnak a doktori tanulmányaim során nyújtott szakmai útmutatásaiért, véget nem érő segítőkészségéért és a lehetőségért, hogy részt vehettem a laboratóriumában folyó kutatásokban.

Szeretném kifejezni köszönetemet Dr. Fülöp Líviának, Dr. Bozsó Zsoltnak és Csete Klárának a kísérletek elvégzéséhez szükséges β 1-42 oligomerek biztosításáért és a kutatásokat elősegítő AFM mérésekért. Hálás vagyok Dr. Szegedi Viktornak és Dr. Juhász Gábornak a kísérletekhez tartozó LTP mérésekért és Dr. Kurunczi Anitának az AMCA-jelölt kísérletekben nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Siklós Lászlónak segítőkészségét, szakmai útmutatásait.

Hálás vagyok Dr. Szűcs Máriának a kézirat gondos átolvasásáért s hasznos megjegyzéseseiért.

Köszönettel tartozom Dr. Penke-Verdier Zsuzsának és Borbély Emőkének a szakosodásom kezdetétől nyújtott szakmai útmutatásaiért, Frank Zsuzsinak, Horváth Jánosnak és Dr. Sipos Eszternek a közös munkáért és a kellemesen együtt töltött időért.

Nem utolsó sorban köszönettel tartozom férjemnek, családomnak, barátaimnak a munkám során tanúsított segítségükért, türelmükért és véget nem érő támogatásukért.

A kísérleteket az FP-7 201159 (Memoload) és a TÁMOP-4.2.2-11/1/KONV-2012-0052 támogatta.

A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK:

I. Studies for improving rat model of Alzheimer`s disease: icv administration of well-characterized β -amyloid 1-42 oligomers induce dysfunction in spatial memory

Á. Kasza, B. Penke, Z. Frank, Z. Bozsó, V. Szegedi, Á. Hunya, K. Németh, G. Kozma, L. Fülöp (2017) *Molecules* **22**,

II. Dihydropyridine derivatives modulate heat shock responses and have a neuroprotective effect in a transgenic mouse model of Alzheimer`s disease

Á. Kasza, Á. Hunya, Z. Frank, F. Fülöp, Z. Török, G. Balogh, M. Sántha, Á. Bálind, S. Bernáth, K. L.I.M. Blundell, C. Prodromou, I. Horváth, HJ Zeiler, P.L. Hooper, L. Vigh, B. Penke (2016) *Journal of Alzheimer`s Disease* **53**: 557–571.

III. Controlled in situ preparation of A β (1–42) oligomers from the isopeptide “iso-A β (1–42)”, physicochemical and biological characterization

Z. Bozso, B. Penke, D. Simon, I. Laczkó, G. Juhász, V. Szegedi, Á. Kasza, K. Soós, A. Hetényi, E. Wéber, H. Tóháti, M. Csete, M. Zarándi, L. Fülöp (2010) *Peptides* **31**: 248-56.

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT:

Alulírott, Dr. Bozsó Zsolt hozzájárulok, hogy Kasza Ágnes felhasználja a

Zsolt Bozsó, Botond Penke, Dóra Simon, Ilona Laczkó, Gábor Juhász, Viktor Szegedi, Ágnes Kasza, Katalin Soós, Anasztázia Hetényi, Edit Wéber, Hajnalka Tóháti, Mária Csete, Márta Zarándi, Livia Fülöp: **Controlled in situ preparation of A β (1-42) oligomers from the isopeptide "iso- A β (1-42)", physicochemical and biological characterization**, *Peptides* (2010) **31**, 248-256

közleményünket a Szegedi Tudományegyetem Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola keretében a PhD fokozat eléréséért benyújtott dolgozatához. A szóban forgó közleményben a jelölt a magatartás vizsgálatokat végezte. A jelölt által végzett kísérleteket és azok eredményeit, sem én, sem más társszerző nem használta fel tudományos fokozat megszerzéséhez.

Szeged, 2012-05-29



Dr. Bozsó Zsolt