



University of Groningen

## Glutamate and related substances in the brain

Jaarsma, Dick

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1993

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Jaarsma, D. (1993). Glutamate and related substances in the brain: histochemical methodology and Alzheimer's pathology. Groningen: s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## SAMENVATTING

De studies in dit proefschrift hebben betrekking op de vraag of er bij de ziekte van Alzheimer (AD) afwijkingen zijn in pre- en postsynaptische merkers van glutamaterge neurotransmissie. AD is de belangrijkste oorzaak van dementie bij veroudering, en wordt gekenmerkt door amyloïd-afzettingen en neurofibrillaire degeneratie in de hersenen. De afgelopen jaren is veel onderzoek gedaan naar afwijkingen in neurotransmitter systemen bij AD, onder andere met het oog op een 'neurotransmitter-gerichte' medicamenteuze behandeling. Er zijn verschillende afwijkingen in glutamaterge neurotransmissie gepostuleerd voor AD: enerzijds zijn er aanwijzingen voor een aanzienlijk verlies van glutamaterge neuronen en eindigingen in de cortex en de hippocampus, welke mogelijk bijdragen aan de cognitieve stoornissen van AD. Anderzijds is bekend dat glutamaat onder bepaalde condities neurotoxische effecten heeft, waardoor het zou kunnen bijdragen aan de neuronale degeneratie bij AD. Door veranderingen in pre- en postsynaptische merkers in AD hersenweefsel te analyseren, kan meer inzicht worden verkregen in de rol van glutamaat afwijkingen in AD. Het eerste deel van hoofdstuk 1 bevat algemene informatie over glutamaat als neurotransmitter en neurotoxine en over AD, alsmede een overzicht van literatuur over glutamaterge merkers in hersenweefsel van AD patiënten. Het tweede deel van hoofdstuk 1 bevat een algemene discussie van de experimentele studies beschreven in de volgende hoofdstukken (hoofdstuk 2-10). Deze studies zijn ten dele van methodologische aard, ten dele studies met *post-mortem* hersenweefsel van AD patiënten.

In verschillende laboratoria, waaronder het laboratorium Biologische Psychiatrie in Groningen, zijn de gehalten van vrije aminozuren in AD hersenweefsel bepaald. In het algemeen waren deze gehalten onveranderd ten opzichte van controle weefsel. In sommige studies is echter een selectieve daling van het glutamaatgehalte gevonden in de hippocampus en enkele delen van de cortex, hetgeen wijst op degeneratie van glutamaterge zenuweindigingen in deze regio's. Om een vollediger beeld te krijgen van de aminozuur-afwijkingen in AD hersenweefsel zijn in de studie beschreven in hoofdstuk 2 de gehalten van twee metabool verwante aminozuurderivaten, die in zeer hoge concentraties in de hersenen voorkomen, t.w. N-acetylaspartaat (NAA) en N-acetylaspartylglutamaat (NAAG), bepaald. Verlaagde gehalten van NAA en NAAG werden gevonden in de hippocampus (respectievelijk -38 en 24%) en de amygdala (-28 en -22%), maar niet in de twee andere

onderzochte gebieden, nl. de cerebellaire cortex en de bulbus olfactorius. De hippocampus en de amygdala vertonen in tegenstelling tot het cerebellum en de bulbus olfactorius veel neuronale pathologie in AD. De verlaging in NAA en NAAG is daarom mogelijk het gevolg van neuronale degeneratie. NAA kan goed gemeten worden met proton magnetische resonantie spectroscopie. Magnetische resonantie spectroscopie kan misschien toegepast worden om de verdeling van neuropathologische veranderingen bij AD *in vivo* te bepalen.

In hoofdstuk 3, 4 en 5 is getracht een geschikte lichtmicroscopische merker te vinden om glutamaterge eindigingen in *post-mortem* hersenweefsel zichtbaar te maken. Drie potentiële presynaptische merkers zijn onderzocht: (i) autoradiografie van natrium-afhankelijke [<sup>3</sup>H]D-aspartaat binding, (ii) de Timm's kleuring en (iii) adenosine A1-receptor autoradiografie.

(i) In aanwezigheid van natrium-ionen bindt [<sup>3</sup>H]D-aspartaat selectief aan het glutamaattransporteiwit op de cytoplasma-membraan. Natrium-afhankelijke [<sup>3</sup>H]D-aspartaat binding is veel gebruikt als merker voor glutamaterge eindigingen in *post-mortem* studies met membraanpreparaten van AD hersenweefsel. Hierbij werd doorgaans een verlaging in hoeveelheid binding in de hippocampus en enkele delen van de cortex gevonden. In hoofdstuk 3 is onderzocht of natrium-afhankelijke binding van [<sup>3</sup>H]D-aspartaat ook toepasbaar is in de *in vitro* receptor autoradiografische procedure. De bindingseigenschappen in de autoradiografische procedure bleken gelijk aan die van binding in membraanpreparaten. Experimenten waarin specifieke glutamaatprojecties werden beschadigd, toonden echter aan dat autoradiografische [<sup>3</sup>H]D-aspartaat binding niet is geassocieerd met glutamaterge eindigingen, maar met gliacellen. [<sup>3</sup>H]D-aspartaat autoradiografie is daarom niet toegepast bij humaan materiaal.

(ii) Een subpopulatie van glutamaterge eindigingen bevat synaptische blaasjes gevuld met zink-ionen. Deze zink pool kan selectief zichtbaar gemaakt worden met de zilversulfide methode van Timm. Hoofdstuk 4 beschrijft een modificatie van de Timm's kleuring, die de methode geschikt maakt voor toepassing op *post-mortem* hersenweefsel. In de hippocampus van de mens werd met deze methode hetzelfde karakteristieke kleuringspatroon van het neuropil gevonden als bij de rat, aap en andere zoogdieren. De Timm's kleuring is zeer geschikt om subregio's van bijvoorbeeld de hippocampus en de amygdala te identificeren. Een studie met een serie

AD en controle hippocampi toonde dat er kleine verschillen in het Timm's kleuringspatroon waren tussen de twee groepen (zie Appendix 2).

(iii) Fysiologische en biochemische studies hebben laten zien dat op veel glutamaterge eindigingen adenosine A1-receptoren zitten. Voor drie glutamaterge projecties, waaronder de entorhino-hippocampale vezels (ook wel de perforante pad vezels; zie hieronder) is door middel van laesies aangetoond dat de A1 receptoren in het projectie gebied specifiek zijn gekoppeld aan de eindigingen van deze projecties. Voor deze projecties is de adenosine A1 receptor daarom een goede presynaptische merker. Om na te gaan of de adenosine A1 receptor gebruikt kan worden als meer algemene merker voor glutamaat eindigingen, zijn in hoofdstuk 5 een aantal andere glutamaterge projecties gelaedeerd. Voor geen van deze projecties bleek de adenosine A1 receptor een geschikte merker.

Er zijn vier subklassen glutamaatreceptoren, de NMDA, de AMPA en de kaïnaat en de 'metabotrope' receptoren. In het Alzheimer onderzoek is vooral aandacht besteed aan de verdeling en dichtheid van de NMDA receptor omdat deze receptor een belangrijke schakel is in glutamaat neurotoxiciteit.

In hoofdstuk 6 wordt een methode beschreven om de NMDA receptor autoradiografisch te labelen met de antagonist [<sup>3</sup>H]CGP39653. In deze methode wordt gebruik gemaakt van het enzym glutamaatdehydrogenase om endogeen glutamaat, dat in hoge mate in het weefsel aanwezig is en de binding van [<sup>3</sup>H]CGP39653 verhindert, af te breken. Uit deze studie bleek dat toevoeging van glutamaatdehydrogenase [<sup>3</sup>H]CGP39653 binding aanzienlijk verbetert.

In Hoofdstuk 7 wordt de verdeling van NMDA en AMPA receptoren in laag IV van de primaire somatosensorische cortex (het 'barrel' veld) van de rat onderzocht. Deze studie is gedaan om meer inzicht te krijgen in de anatomische relatie tussen de NMDA en AMPA receptoren, omdat fysiologische studies suggereren dat in de meeste glutamaterge synapsen de NMDA als AMPA zijn gecolocaliseerd (zie ook appendix 3). Het 'barrel' veld wordt gekenmerkt door een karakteristieke cytoarchitectonische organisatie, en een specifieke verdeling van eindigingen van glutamaterge projecties. In het 'barrel' veld bleken de NMDA en AMPA receptor een verschillende verdeling te hebben: De lokalisatie van NMDA receptoren kwam overeen met de 'barrel hollows', het projectiegebied van primair sensorische afferenten uit de thalamus, terwijl de AMPA receptoren niet specifiek waren verdeeld.

In Hoofdstuk 8, 9, 10 wordt de verdeling van de

adenosine A1 receptor en NMDA receptor in respectievelijk de hippocampus, de amygdala en de bulbus olfactorius van AD patiënten bestudeerd met behulp van receptor autoradiografie. In de studie met de hippocampus lag de nadruk op de adenosine receptor als presynaptische merker voor entorhino-hippocampale projecties (zie hierboven). Deze verbinding zorgt voor de aanvoer van corticale informatie naar de hippocampus en is essentieel voor het functioneren van de hippocampus in geheugenprocessen. Aangezien in AD de dichtheid van A1 receptoren sterk verlaagd was in het deel van de hippocampus waar de entorhinale cortex vezels projecteren, en onveranderd was in de overige delen van de hippocampus, kan worden aangenomen dat de entorhino-hippocampale verbinding aanzienlijk is beschadigd in AD. Ook in de amygdala was er een lichte daling van het aantal adenosine receptoren in een subnucleus, die entorhinale cortex input ontvangt.

In overeenstemming met eerdere studies, was de dichtheid van NMDA receptoren onveranderd in het projectiegebied van de entorhinale cortex in de hippocampus. De concentratie van NMDA receptoren was echter aanzienlijk verlaagd in het CA1 gebied, dat daarnaast veel neuronale pathologie vertoonde (zie hoofdstuk 8). In de amygdala van patiënten met AD was er geen verlaging in NMDA receptordichtheid, ondanks de aanwezigheid van een aanzienlijke hoeveelheid neuronale pathologie (hoofdstuk 9). Een voorwaarde om te kunnen postuleren dat glutamaat neurotoxiciteit een rol speelt bij de veroorzaking van neuronale pathologie in AD is dat de aanwezigheid van neuronale pathologie samenvalt met een afname van de glutamaatreceptor dichtheid. Dus op grond van de resultaten van hoofdstuk 9 kan de conclusie worden getrokken dat tenminste in de amygdala 'NMDA-receptor gemiddelde glutamaat neurotoxiciteit' geen rol van betekenis speelt bij AD.

12964/93