

Citoszkeletális változások vizsgálata neuropszichiátriai kórképekben

Záróbeszámoló

A stressz, mint rizikófaktor fontosságát a neurodegeneratív betegségek, köztük az Alzheimer-kór (AK) kialakulásában humán epidemiológiai vizsgálatok és állatkísérletek egyaránt valószínűsítik. A stressz, depresszió és AK közötti etiológiai kapcsolat további megismerése céljából jelen kutatásunk célja annak vizsgálata volt, hogy a különböző stressz típusok: immobilizációs stressz (IS), elektromos talp-sokk ingerlés (ETS), erőltetett úsztatás, pszichoszociális stressz hogyan befolyásolják az AK patomechanizmusában szerepet játszó, illetve a szinaptikus plaszticitásban, a neurodegenerációs folyamatokban részt vevő β -aktin, kofilin, amyloid prekursor protein (APP) és a mitogén-aktivált protein kináz-1 enzim (MAPK-1) transzkripcióját és translációját patkányok hippokampuszában és kortexében. A vér-agy-gát funkciózavar fontos faktor mind a neurodegeneratív betegségek és a stressz indukált pszichiátriai kórképek kialakulásában, ezért az alkalmazott stressz modell vér-agy-gát morfológiai jellemzőit is vizsgáltuk.

A különböző stressz típusokat 3 naptól 3 hétig alkalmaztuk Wistar patkányokon, majd hippokampusz és a kortex β -aktin, kofilin, APP és MAPK-1 mRNS és protein mennyiségét mértük.

IS hatására a β -aktin és kofilin mRNS expressziója jellegzetes U-alakú görbét mutatott a hippokampális mintákban. Az akut (3-napig tartó) és krónikus (21 napig tartó) IS 4-, illetve 10-szeres hippokampális β -aktin mRNS szint emelkedést eredményezett. A kofilin mRNS expresszió a 3, 7 és 21 napos IS következtében is megnövekedett. Az APP mRNS szint csak 21 nap után emelkedett szignifikáns mértékben. Fehérje szinten, a krónikus stressz egyaránt növelte a β -aktin, kofilin és APP szinteket a hippokampuszban. A β -aktin és kofilin mRNS expresszió változáshoz hasonlóan, az akut és krónikus stressz szintén szignifikáns emelkedést indukált a hippokampális MAPK-1 mRNS expresszióban. A növekedés mértéke 2-szeres volt az akut-, 2,7-szeres a krónikus stressz esetében, a MAPK-1 mRNS szint stressz indukált változása szintén U-alakú időfüggést mutatott. A kortikális régióban IS hatására nem tapasztaltunk szignifikáns változást a β -aktin, kofilin, APP illetve a MAPK1 mRNS gén expressziójában és fehérje szintjeiben sem.

Az IS bifázikus, dinamikus változást indukált a β -aktin, kofilin és MAPK-1 transzkripciójában és fehérje translációjában szelektíven, patkány hippokampuszban. Ez alapján feltételezhető, hogy az AK patomechanizmusában szerepet játszó mind a három gén

stresszindukált expressziós változásai hozzájárulnak a szinaptikus plaszticitás csökkenéséhez, valamint az aktin citoskeleton átrendeződés szabályozásához. Az IS hatás U-alakú kinetikai görbét mutat a vizsgált gének mRNS expressziójában, mely a stresszhatások időfüggésére illetve krónikus stressz esetén a kompenzációs mechanizmusok kimerülésére hívja fel a figyelmet.

A különböző stressz-típusok eltérő módon hatnak a β -aktin és kofilin mRNS expresszióra és fehérje szintekre. A 4 alkalmazott stressz típus közül az IS indukálta a legmarkánsabb változásokat. ETS esetében a β -aktin mRNS szintek az IS alkalmazása esetén tapasztalt bifázisos változáshoz képest némi különbséget, lassabb dinamikus változást mutattak a 3 hét alatt, különböző időtartamig alkalmazott stresszelést követően, mely a fehérje szintekben történő változásokban nem tükröződött.

Az IS indukált kofilin és MAPK-1 mRNS és fehérje változásokat a többi stresszmodell esetében nem sikerült reprodukálni. Vagyis, sem az ETS, sem az erőltetett úsztatás és a pszichoszociális stressz sem okozott szignifikáns változásokat a kofilin és MAPK-1 mRNS és fehérje szintekben a kontroll állatokhoz képest egyik vizsgált agyrégióban és egyik időpontban sem. A 4 stressz típus citoskeletonális hatására vonatkozólag eredményeink alapján megállapítható, hogy az IS és az ETS indukált β -aktin transzkripció és transzláció változásai különböző mechanizmusok által reguláltak. Az IS az aktin dinamikát a kofilin és MAPK-1-re gyakorolt hatásán keresztül szabályozza, míg az ETS valamilyen más módon keresztül hat, mely mechanizmus feltérképezése még további vizsgálatokat igényel. Az erőltetett úsztatás a β -aktin mRNS expresszió átmeneti fokozódását eredményezte akut stresszhatást (3 nap) követően mindkét vizsgált agyi régióban, míg a pszichoszociális stressz hatására citoskeletonális változás nem következett be, melynek alapján kisebb fokú érzékenység feltételezhető ezen stressz típusokkal kapcsolatban.

Immunhisztokémiát követő konfokális mikroszkópiás vizsgálataink az endothel sejteket, ill. tight junction-t jelölő glükóz-transzporter-1, occludin, claudin-5 stressz-indukált fluoreszcencia intenzitás növekedését mutatták a hippokampusz és a frontális kortex területén, mellyel párhuzamosan a gliális marker, a GFAP intenzitása szignifikánsan csökkent. A β -aktin immunfestés intenzitása is megemelkedett a krónikus stresszkezelés hatására a hippokampális területeken.

Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy nemcsak a stressz, hanem az ateroszklerózis is befolyásolja az AK kialakulását. Transzgenikus egérmodellen végzett stressz kísérleteink egyrészt arra a kérdésre kerestek választ, hogy az ateroszklerózis és a stressz együttesen

milyen citoskeletális változásokat indukál. Ennek megválaszolására a rövid és hosszútávú IS β -aktin szignalizációra és regulációs faktoraira, valamint APP szintre gyakorolt hatását vizsgáltuk az atherosclerosis (humán apoB-100) és az AK (APP^{swe}/PS1^{deltaE9}) transzgenikus állatmodellek és vad típusú egerek agyában.

A β -aktin és kofilin mRNA expressziója a 3. napra szignifikánsan emelkedett a stressz hatására a hippocampusban, majd a 21. napra lecsökkent az ApoB transzgenikus állatoknál. Hasonló irányú változások jellemezték a MAPK1 mRNA kifejeződés idő-kinetikáját nemcsak a hippocampusban, hanem a kortexben. A vizsgált fehérjék kifejeződésében szintén megfigyelhető volt az emelkedés, majd csökkenés az idő függvényében. Az eredmények alapján valószínűsíthető, hogy az atherosclerosisnak szerepe lehet a stressz indukált citoskeletális változások módosításában. A citoskeletális mRNA és fehérje fordított U-alakú görbével jellemezhető expresszió változása krónikus stressz által aktiválódó adaptációs mechanizmust feltételez. Az AK transzgenikus egérmodellben a β -aktin és kofilin mRNA expressziója a frontális cortexben lecsökkent, hippocampusban megemelkedett. Az APP mRNA kifejeződést a stressz nem befolyásolta szignifikánsan egyik agyterületen sem, az APP fehérje szintek változásai viszont szintén régió specificitást mutattak mind a vad típusú, mind pedig az AK transzgen egértörzsben. A transzgen egérmodellen végzett vizsgálataink is megerősítik a stressz indukált β aktin citoskeleton és APP változások szerepét a neurodegeneráció és az AK kialakulásában.

Human beteganyagokon végzett vizsgálatunkban arra a kérdésre szeretnénk volna választ kapni, hogy az AK terápiájában jelenleg használt egyik acetilkolin-észteráz (AChE) gátló szer, a donepezil hogyan befolyásolja AK-ban a centrális lipidmetabolizmus zavaráért felelőssé tehető szérumban adipokin szinteket és a metabolikus paramétereket. Klinikailag diagnosztizált 26 enyhe és középsúlyos AK beteg önkontrollos vizsgálata során 10 mg/nap donepezil beállítása történt a szakmai protokoll elvárásai szerint. A vizsgálat kezdetén, valamint 3 és 6 hónap múlva szérumban adiponektin, leptin, LDL, HDL, triglicerid szinteket mértünk, valamint testtömeg (BMI) indexet és ApoE polimorfizmust határoztunk meg. A donepezil kezelést megelőző kiindulási értékekhez képest a szérumban adiponektin szintek tendenciaszerűen nőttek, a leptin értékek pedig tendenciaszerűen csökkentek a harmadik hónapban. A kezelés hatodik hónapjára az adiponektin szintek szignifikánsan nőttek, a leptin értékek pedig csökkentek. A BMI ($p < 0.001$) és a haskörfogat ($p = 0.017$) is szignifikáns mértékben csökkent a hatodik hónapban a kiindulási értékekhez képest.

Mivel az adiponektinnek kedvező hatása van a sporadikus AK olyan rizikófaktorokkal szemben, mint az inzulinrezisztencia, diabetes mellitus, elhízás, vaszkuláris sérülés,

atheroszklerózis, és metabolikus szindróma, a donepezil kezelés hatására bekövetkező adiponektin szint emelkedés is előnyös az AK progressziója szempontjából. Másrészt a donepezil kezelés a szérumban lévő leptin szintet csökkenti AK-s betegekben, és mivel a csökkent leptinszint amiloidogén hatású, az AChE gátló kezelés az AK amiloid metabolizmus patomechanizmusának vonatkozásában közvetlenül vagy közvetve kedvezőtlen hatású lehet. A pontos hatásmechanizmus feltérképezéséhez azonban még további kutatások szükségesek. Vizsgálatunk arra is felhívja a figyelmet, hogy a krónikus AChE gátló kezelés testsúlycsökkenést okozhat és a kezelésnek ezt a szempontját is figyelembe kell vennünk az AK betegek hosszú távú terápiája során.

Az AK-ban szenvedő betegek tudományos kísérletekbe történő bevonásának egyik alapkritériuma kognitív státuszuk minél pontosabb meghatározása. Ennek érdekében végeztük el az Alzheimer's Disease Assessment Scale kognitív mérőskála (ADAS-Cog) magyar verziójának validálását. 66 enyhe és közép súlyos stádiumú, klinikailag diagnosztizált AK-s beteget és 47 kontrollszemélyt vontunk be a vizsgálatba. A kognitív státust az ADAS-Cog magyar változatának és a Mini-Mental Teszt (MMT) felvételével állapítottuk meg. A diszkriminációs validitást, az ADAS-Cog életkortól és iskolázottságtól függő kapcsolatát, a teszt szenzitivitás- és specificitás értékeit határoztuk meg.

Mind a MMT, mind az ADAS-Cog szignifikánsan elkülönítette az enyhe és közép súlyos AK-s betegeket és a kontrollcsoportot. Az ADAS-Cog tesztpontszám nagyon erős negatív korrelációt mutatott a MMT pontszámával az enyhe és közép súlyos AK-s csoportban. Az ADAS-Cog teszt az iskolázottság és a mért kognitív teljesítmény között gyenge negatív kapcsolatot mutatott, míg az életkor és az ADAS-Cog tesztpontszám közötti pozitív korreláció csak a kontrollcsoportban volt bizonyítható. A ROC-görbe analízise szerint az ADAS-Cog teszt szenzitivitás- és specificitásértékei igen magasak.

Az ADAS-Cog teszt magyar verziója nagy megbízhatóságú, valid skála, amelynek alapján alkalmazása ajánlható az AK-ban szenvedő betegek állapotának meghatározására és nyomon követésére.

25 AK beteg és 25 kontroll személy liquor mintáinak proteomikai összehasonlító vizsgálatát is elvégeztük ultraszenzitív peptid mikroarray módszer segítségével. 7 fehérje mutatott csökkent relatív koncentrációt AK esetében. Nevezetesen a neuron pusztulás elleni protektív funkciókkal rendelkező POLG, MGMT, parkin és ApoD mennyisége csökkent az AK betegek cerebrospinális folyadékában, valamint további 3 olyan fehérje (PAR-4, granzyme B, Cdk5) mennyisége is, melyek a neuronális sejtpusztulást triggerelik. Vizsgálataink révén a POLG és a granzyme B pathogén szerepét AK-ban korábban

még nem írták le. Eredményeink nem csupán potenciális új markereket szolgáltathatnak, hanem hozzájárulnak az AK patomechanizmusának pontosabb megértéséhez.