

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIA INTÉZET

*A DEHIDROEPIANDROSZTERON PROTEKTÍV HATÁSAINAK VIZSGÁLATA
NEUROTOXIKUS ALZHEIMER KÓROS EGÉRMODELLBEN*



Témavezetők: Prof. Dr. Zelena Dóra
Dr. Farkas Szidónia

Készítette: Sólyomvári Csenge
(URKQDU) Biológia MSc

Pécs, 2025

Tartalom

I.	Rövidítések	3
II.	Bevezetés	5
	I.1 Az Alzheimer-kór jellemzése	5
	I.2 Az Alzheimer-kór rizikó faktorai	5
	I.3 Kolinerg rendszer érintettsége	6
	I.4 A glia sejtek szerepe	8
	I.5 Neuroszteroid hormonok szerepe	9
III.	Célkitűzés	11
IV.	Eszközök és módszerek	11
	III.1 Kutatási terv	11
	III.2 Állatok	12
	III.3 Mikroinjekció, kezelés és perfúzió	12
	III.4 Immunhisztokémiai festések	13
	III.4.1 Kolin-acetil-transzferáz (ChAT) immunhisztokémia	14
	III.4.2 Acetil-kolin észteráz (AChE) immunhisztokémia	15
	III.4.3 Iba-1, GFPA fluoreszcens immunhisztokémia	15
	III.5 Statisztikai analízis	16
V.	Eredmények és kiértékelés	16
	IV.1 Morfológiai vizsgálatok a kolinerg rendszerben	16
	IV.2 Mikroglia és asztrocita sejtek morfológiai vizsgálata a kéreg területén	17
	IV.3 Mikroglia és asztrocita sejtek morfológiai vizsgálata az NBM területén	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
VI.	Következtetések	21
VII.	Folyamatban lévő tervek	24
VIII.	Hivatkozások	24

I. Rövidítések

ACh	Acetilcolin
AChE	Acetilcolin észteráz
AD	Alzheimer-kór
ADIOL	5-androszten-3 β ,17 β -diol
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid prekursor protein
A β	β -amiloid
BDNF	Agyi eredetű növekedési faktor
BEK	Bazális előagyi kolinerg rendszer
BNN27	Szintetikus DHEA(S) analóg
ChAT	Kolin-acetil-transzferáz
DAB	Diaminobenzidin
DHEA	Dehidroepiandroszteron
DHEAS	Dehidroepiandroszteron szulfát
GABA	γ -amino-vajsav
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HDB	Horizontális diagonális köteg
HS	Horse serum
i.p	Intraperitoneális
Iba-1	Ionized calcium-binding adaptor molecule 1
IDO	Integrált optikai denzitás
IFN	Interferon
IL	Interleukin
MAPT	Mikrotubulus asszociált protein tau
MS	Mediális septum
NGF	Idegi növekedési faktor
NMDA	N-metil-D-aszpartát
PFA	Paraformaldehid
PSEN1	Presenilin-1
PSEN2	Presenilin-2

pTau	Hiperfoszforilált tau fehérjék
SI/NBM	Nucleus basalis magnocellularis és substantia innominata komplex
SSC	Szomatoszenzoros kéreg
TNF	Tumor nekrosis faktor
TrkA	Tropomiozin receptor kináz
TX	Triton X
VDB	Ventrális diagonális köteg

II. Bevezetés

Az Alzheimer-kór (AD) a demenciák leggyakoribb formája, mely jelentős terhet ró a társadalomra és világgazdaságra egyaránt, ugyanis a hetedik helyet foglalja el a vezető halálozási okok listáján [1]. Az idősödő társadalmunk miatt az érintettek száma folyamatosan növekszik. Ennek köszönhetően, egyre sürgősebbé válik a betegség pontosabb megismerése, és hatékonyabb kezelési és megelőzési módszerek kidolgozása. A jelenlegi terápiák nem állítják meg a betegség lefolyását, csupán enyhítik a tüneteket, lassítják előre haladását [2]. A hatékony terápia hiánya tovább növeli a betegség kutatásának a fontosságát, ami indokolja témaválasztásomat [1, 3].

I.1 Az Alzheimer-kór jellemzése

A betegséget 1907-ben írták le először [4], de a pontos okait mai napig nem ismerjük. Az AD neuropatológiája szorosan összefügg a központi idegrendszer érő szerkezeti és funkcionális károsodásokkal. Kialakulásának hátterében két különböző szövettani elváltozást azonosítottak: a β -amiloid ($A\beta$) peptidekből álló amiloid plakkokat és a hiperfoszforilált tau fehérjékből (pTau) kialakuló neurofibrilláris kötegeket [2], melyek több módon is károsítják a neuronok működését. Energia deficitet okoznak, zavarják a kalcium (Ca^{2+}) ion háztartást, amely kulcsfontosságú a szinapszisok megfelelő működésében, így szinaptikus diszfunkciót idéznek elő. Emellett gátolják a glükóz transzportereket, ami az agy csökkent glükózellátottsághoz vezet [5].

Az AD egy progresszív neurodegeneratív betegség, vagyis az idő előre haladtával a tünetek fokozatosan súlyosbodnak. A betegség legjellemzőbb klinikai tünetei közé tartoznak a memória zavarok, a hangulat ingadozás, cirkadián ritmus felborulása, alvászavar, és a depresszió. Kezdetben általában a rövidtávú memória romlása figyelhető meg, amelyet gyakran az alvászavarok és a depressziós tünetek követnek [6, 7].

I.2 Az Alzheimer-kór rizikó faktorai

A kockázati tényezők között a legfontosabbak az életkor, a genetikai profil, a nem, valamint az életmód.

Az AD leginkább a 65 év feletti korosztályt érinti [7, 8], mivel az öregedés egy összetett, progresszív folyamat, amely többek között mitokondriális diszfunkcióval, valamint a koleszterin-homeosztázis zavarával hozható összefüggésbe, melyek hozzájárulhatnak $A\beta$ plakkok képződéséhez és a tau fehérjék hiperfoszforilációjához [9].

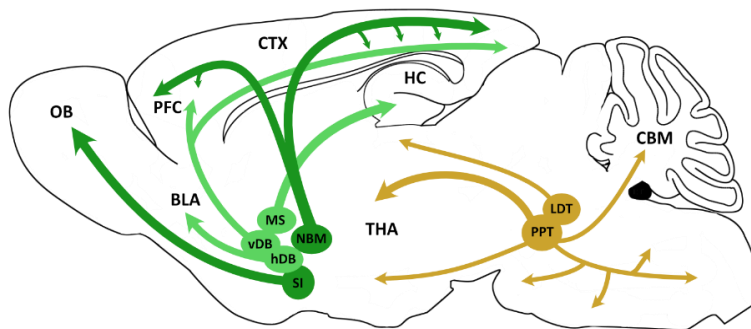
A kor mellett a genetikai tényezők is kiemelkedő kockázati faktort jelentenek. A genetikai eredetű AD-ra jellemző, hogy fiatalabb életkorban is megjelenhet. Öt fő gént azonosítottak, amelyek hozzájárulnak az AD kialakulásához: Apolipoprotein E (ApoE) ϵ 4 allélja, az amiloid prekursor protein (APP), presenilin-1 (PSEN1), presenilin-2 (PSEN2), és a mikrotubulus asszociált protein tau (MAPT). Ezen gének mutációi fokozzák a $A\beta$ és a pTau fehérje felhalmozódást [9, 10].

Az életkor és a genetikai profil mellett a nem is fontos kockázati tényező. Statisztikai adatok szerint az AD-s betegek közel kétharmada nő [11]. A betegség kialakulásában és lefutásában a nők és a férfiak különbséget mutatnak, ami összefüggésbe hozható a nemi hormonokkal és azok életkor során bekövetkező változásával [11]. A betegség kialakulásának a kockázata jelentősen növekszik a menopauzán átesett nők esetében. A menopauza során tapasztalható nemi hormonszint-változás elősegíti az AD-ra jellemző patológiás elváltozások kialakulását, mivel ezek a hormonok bizonyítottan neuroprotektív és anti-inflamatorikus hatással rendelkeznek [12-15].

Az életmódból eredő hatások megelőzhető AD faktorok. Ide tartozik többek közt a nem megfelelő táplálkozás, a dohányzás, vagy a csökkent fizikai aktivitás, melyek mind növelhetik a betegség kialakulásának valószínűségét [7].

I.3 Kolinerg rendszer érintettsége

A kockázati tényezők hatására bekövetkező $A\beta$ és a pTau felhalmozódásra a kolinerg sejtek különösen érzékenyek. A kolinerg rendszer az egyik legfontosabb és legkiterjedtebb neurotransmitter hálózat a központi idegrendszerben [16]. A legtöbb kolinerg neuron a bazális előagyban található (1.ábra, zölddel jelölt magok). A bazális előagyi kolinerg rendszer (BEK) négy anatómiai részből áll: A mediális septumból (MS), a Broca-féle ventrális és horizontális diagonális kötegből (vDB és hDB) valamint a substantia innominata és nucleus basalis magnocellularis komplexből (SI/NBM).



1.ábra: Sematikus ábra a bazális előagy kolinerg (BEK) neuronok projekcióiról. Rövidítések: MS: Mediális szeptum, vDB: Ventrális diagonális köteg, hDB: Horizontális diagonális köteg, SI: substantia innominata, NBM: Nucleus basalis magnocellularis, OB: Bulbus olfactorius (szaglógumó), HC: Hippokampusz, PFC: Prefrontális kéreg, CTX: Kéreg, BLA: Bazolaterális amigdala, THA: Talamusz, CBM: Cerebellum (kisagy), PPT: Pedunculo pontinus tegmentális mag, LDT: Laterodorzális tegmentális mag. Zöld színnel: Bazális előagy kolinerg magcsoport, Sárga színnel: Tegmentális területen elhelyezkedő kolinerg magok. Forrás: Farkas és mtsai. megjelenés alatt.

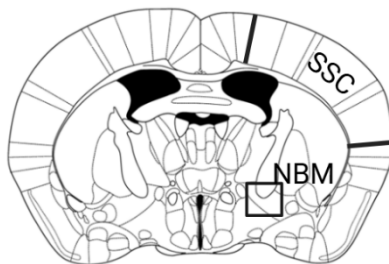
Az SI/NBM komplex kolinerg neuronjai az agykéregbe és az amigdalába küldik a rostjaikat [17]. Az SI/NBM unilaterálisan idegzi be az agykéreg szenzoros és motoros területeit [18], míg a MS területén található sejtek a hippocampusba proiciálnak [19].

Az AD neuropatológiájában kiemelkedő szerepet játszik a kolinerg idegrendszer zavara. Elsősorban a bazális előagy kolinerg sejtek csökkent működése és ezen sejtek pusztulása figyelhető meg [19-21]. Az acetilkolin (ACh) szintéziséért a kolin-acetil-transzferáz (ChAT) enzim felel, amely az acetyl-CoA-ból és kolinból állítja elő a neurotranszmittet. Az ACh nikotinos és muszkarinos receptorokon fejti ki hatását, mind a periférián mind a központi idegrendszerben. A folyamatban kulcsszerepet játszik az acetilkolin észteráz (AChE), ami a felesleges ACh-t hidrolizálja a szinaptikus résben [8, 22]. A ChAT és az AChE fontos molekuláris markerek a kolinerg neuronok központi idegrendszeri kimutatásában (A ChAT a sejttestet, míg az AChE az axonokat rajzolja ki).

Azáltal, hogy a kolinerg neuronok beidegzik az agykérget és a hippocampuszt, olyan fontos élettani folyamatokban játszanak szerepet, mint a memória, tanulás, alvás-ébrenlét szabályozása és különböző stresszfunkciók. A kolinerg sejtek pusztulása tehát szorosan összefügg a memória romlással, a cirkadián ritmus felborulásával, és a figyelemzavarral, melyek az AD kulcs tünetei [19-21, 23].

A BEK területek közül mi elsősorban az NBM-re (más néven Meynert mag) fókuszáltunk, mivel ez a terület humán adatok alapján kulcsfontosságú régió a betegség lefolyásában [24]. A mag vizsgálatát megkönnyíti, hogy unilaterális projekciót küld a kérgi területekre [25, 26], (elsősorban a szomatoszenzoros kéregbe, SSC) [25, 27]. Így az egyik oldali mag

befolyásolásának hatása ugyanazon állatban - az interindividuális különbségek elkerülésével - a két oldali projekciós terület összehasonlításával vizsgálható (2.ábra).



2.ábra: Az NBM (nucleus basalis magnocellularis) és a SSC (szomatoszenzoros kéreg) elhelyezkedése egér agyban, koronális metszeten. (kép: Paxinos Mouse Brain atlas 4. kiadása segítségével).

I.4 A glia sejtek szerepe

Bár a legtöbb tanulmány első sorban a neuronokat érő károsodásokra fókuszál, a legújabb kutatási eredmények arra utalnak, hogy a glia sejtek, különösen a mikroglia és asztrociták, összefüggésben állnak az AD patogenezisével. Ezek a glia sejtek új terápiás célpontok is lehetnek az AD kezelésében [28].

A mikroglia az idegrendszerben található makrofágok, az agy speciális immunsejtjei. Fontos szerepet játszanak az agyi immunvédekezésben, neurotoxikus anyagok eltávolításában, és a homeosztázis fenttartásában. Emellett részt vesznek a neurogenesisben, és a neuronok védelmében is [29].

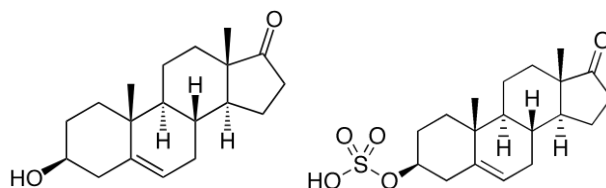
Az asztrociták a központi idegrendszer fehér és szürke állományában egyaránt jelen lévő dinamikus sejtek. Legfontosabb szerepük az idegrendszer homeosztázisának megőrzése. Segítik a neuronok működését, részt vesznek a szinapszisok kialakításában és fenntartásában, valamint az ion- és energiametabolizmus szabályozásában, azaz általánosságban a homeosztázis megőrzésében [30, 31]. Segítik a neurotranszmitterek felszabadulását és eliminálását, valamint szabályozzák a szinaptikus plaszticitást [31, 32]. Számos tanulmányban leírták, hogy hozzájárulnak az információfeldolgozáshoz és a memória kialakításához egyaránt [30, 33]. Végtalpaikkal körül veszik a vérereket alkotó endotélsejteket, ezáltal aktívan hozzájárulnak a vér-agy gát kialakításához és a szelektivitásának fenntartásához. A vér-agy gát maga is fontos szerepet tölt be a központi idegrendszer homeosztázisának megőrzésében, kulcsszerepet játszik a különböző molekulák transzportjában, megakadályozza, hogy bizonyos káros, toxikus anyagok jussanak be az idegszövetbe, és így biztosítja a szelektív permeabilitást [30, 34].

A mikroglia és asztrocita sejtek dinamikus struktúrák, a fiziológias és patológias változások hatására megváltozik a morfológiájuk [35]. Az agy normál fiziológias körülményei között a glia sejtek nyugalmi állapotban vannak. Ebben a formában jellemző rájuk a hosszú, elágazó nyúlványok jelenléte és a kis sejttest (szóma) méret [36]. Az idegrendszeret érő károsodások, valamint a kóros anyag lerakódások (pl: A β , pTau) mindkét glia típust aktiválják. A mikroglia aktivált állapotban több alakot is felvehetnek: fagocitózis során amőboid állapotba kerülnek (rövidebb nyúlványokkal rendelkeznek, miközben a szóma méretük növekszik); míg az idegrendszeret érő stressz hatására sokszorosán elágazó (hiper-ramifikált) nyúlványai lesznek; toxicitás vagy mechanikai sérülés következtében pedig hosszúkás, rúd alakot mutatnak [36, 37]. Az asztrociták aktiváció során hipertrófiát mutatnak, megnövekedik a méretük és nyúlványaik elágazásainak száma egy adott területen [30, 38]. Aktivált állapotban nemcsak a morfológiájuk, hanem a molekuláris profiljuk is megváltozik [35]: gyulladást elősegítő anyagokat (kemokineket, citokineket, reaktív oxigén és nitrogén gyököket) bocsátanak ki, ezáltal neuroinflammáció révén neuron diszfunkciót, apoptózist, szinapszis vesztesést és axonális degenerációt okozhatnak [39]. Ezzel tovább súlyosbítják a neurodegeneratív betegségek tüneteit [28, 40].

I.5 Neuroszteroid hormonok szerepe

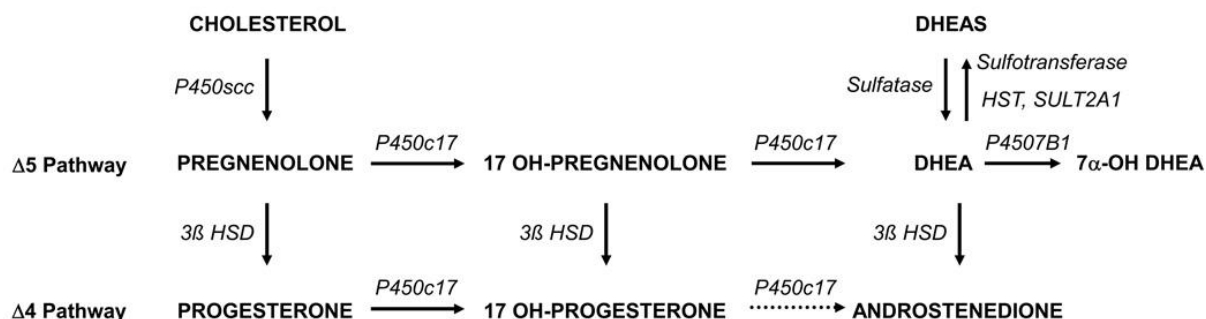
A károsodással szemben agyunk számos védő molekulát, köztük neuroszteroidokat termel, melyek a vérben is megtalálhatók. Elsősorban a mellékvesében és az ivarmirigyekben termelődve jutnak a keringésbe [28, 41].

A dehidroepiandrosteron (DHEA) egy endogén szteroid hormon, amely a tesztoszteronnak és az ösztrogénnek a prekursor vegyülete. Az emberi szervezetben a 17 β -ösztradiol, a progeszteron és az allopregnanolon mellett, a DHEA az egyik leggyakrabban előforduló szteroid típusú vegyület [41, 42]. A DHEA szteránvázasa szerkezettel rendelkezik (3.ábra), lipofil természetének köszönhetően könnyen áthatol a vér-agy gáton.



3.ábra: DHEA és szulfát sójának (DHEAS) szerkezeti képlete (forrás: Biorender (<https://biorender.com/>))

A neuroszteroidok koleszterinből szintetizálódnak. Első lépésben a koleszterin a mitokondriumba kerül, ahol egy mitokondriális enzim (P450_{scc}) segítségével pregnenolonná alakul. Ebben a formában elhagyja a mitokondriumot, és progeszteronná vagy 17 OH-pregnenolonná metabolizálódik. Az utóbbi vegyület képes DHEA-vá átalakulni (4.ábra) [43].



4.ábra: DHEA szintézise. Forrás:[43]

A szteroid szintézishez szükséges enzimek kifejeződnek a mellékvese kéregben, az ivarmirigyekben, valamint a központi idegrendszer különböző részein is. Expressziójuk sejt-, régió- és nemspecifikus [44]. A vegyületek szintézise a neuronokban és a glia sejtekben egyaránt végbe megy. Az asztrocita sejtek képesek pregnenolont, progeszteront, DHEA-t, tesztoszteront, öszttront és ösztradiolt is szintetizálni [42, 45]. Ugyan a mikroglia sejtek megfelelő enzimek hiányában nem képesek DHEA-t és progeszteront előállítani, azonban a sejtbe bekerülő DHEA-t képesek ADIOL-á (5-androszten-3β,17β-diol) alakítani, amely fontos szerepet játszik a gyulladáscsökkentő hatás kialakításában [42, 46].

A DHEA (in vitro adatok alapján), az ösztrogénhez hasonló neuroprotektív és anti-inflamatorikus hatással rendelkezik az idegrendszerben [41, 47], valamint befolyásolja a neuritok növekedését, és a neurogenézist [43, 48].

Számos tanulmány kimutatta, hogy a DHEA szintje jelentősen csökken a kor előre haladtával. Az AD-ban szenvedő betegek szérum DHEA szintje jóval alacsonyabb, mint a velük egykorú egészséges személyeké [48-51]. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a vegyület szintézisében történő változások egyértelműen kapcsolatban állnak az AD neuropatológiájával. A koncentráció csökkenés potenciális kiváltója lehet a kognitív károsodásoknak. Továbbá, a DHEA szteroid mivolta, anti-inflamatorikus hatásokra is enged következtetni.

A dehidroepiandroszteron szulfát (DHEAS) a DHEA-nak egy aktív metabolitja, mely a periférián visszametabolizálódik DHEA-vá. A DHEAS szulfát csoportja miatt vízdékony tulajdonságokkal rendelkezik, ennek köszönhetően könnyebb vele dolgozni, így kísérleteink során ezt a vegyületet alkalmaztuk.

Mindezek alapján a DHEA és DHEAS ígéretes terápiás lehetőséget nyújtanak a neurodegeneratív betegségekkel szemben [52, 53].

III. Célkitűzés

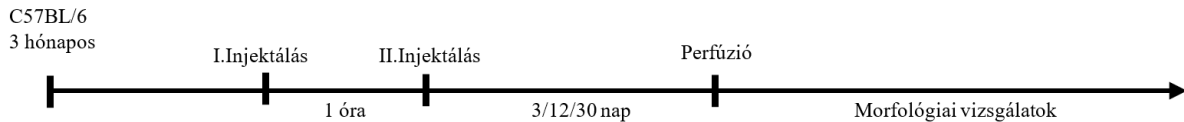
Projektünk elsődleges célja, hogy átfogó képet kapjunk az A β által kiváltott neurotoxicitás hatásmechanizmusairól, különös tekintettel a kolinerg idegrendszer sérülékenységére, valamint a mikroglia és asztrociták aktivációs mintázataira. Ezen felül kiemelt figyelmet fordítunk a DHEAS neuroprotektív potenciáljára, amelynek hatásait a mikroglia, asztrocitákra és a kolinerg rendszer sejtjeire kívánjuk feltárni.

Hosszú távú célunk, hogy a kapott eredmények hozzájáruljanak az AD mechanizmusainak mélyebb megértéséhez, a mikroglia és asztrociták szerepéhez és potenciális terápiás célpontok azonosításához, különös tekintettel a DHEAS alkalmazási lehetőségeire.

IV. Eszközök és módszerek

III.1 Kutatási terv

Jelen munkánkban egy neurotoxikus modellt alkalmaztunk, melyhez 3 hónapos hím (C57BL6/J) egereket használtunk. A modell létrehozásához A β sztereotaxiás unilaterális mikroinjekciója segítségével kolinerg neuron léziót hoztunk létre az NBM területén. Ezen a területen vizsgáltuk a sejtek számában történő változást (ChAT immunhisztokémia), valamint a sejtek projekciós területén (SSC) a kolinerg rostok denzitását (AChE hisztokémia). Az állatokat a mikroinjekciót követő 1 órában DHEAS-el kezeltük intraperitoneálisan (i.p.) az A β -indukálta patológiás változások kivédésére. A DHEAS kezelést követően különböző időpontokba áldoztuk fel az egereket (3;12;30 nap elteltével, transzkardiális perfúzióval), hogy pontosabb képet kapjunk a gliasejtek aktivációjának időbeli lefutásáról. A morfológiai vizsgálatok során négy féle immunhisztokémiai festést alkalmaztunk: A kolinerg rendszer vizsgálatára (1) ChAT illetve (2) AChE festéseket végeztünk. A mikroglia sejtet (3) Iba-1 (mikroglia/makrofág specifikus ionizált kalcium kötő (**b**inding) **a**dapter molekula), míg az asztrocitákat (4) GFAP (**g**liális **f**ibrilláris savas (**a**cidic) fehérje (**p**rotein)) jelöléssel tettük láthatóvá (5.ábra). Jelen beszámoló csak a 12 nap elteltével perfundált egerek eredményeit tartalmazza, mely időpont munkacsoportunk korábbi vizsgálata alapján a kolinerg rostpusztulás maximuma [54].



5.ábra: Kutatási terv időbeosztása

III.2 Állatok

A 3 hónapos hím C57BL6/J egerek a PTE ÁOK Élettani Intézet saját tenyészetéből származtak. Azért hím állatokon végeztük a kísérleteinket, mivel a nőstény egerek hormonális ciklusa jelentős mértékben befolyásolja az állatok viselkedését, és fiziológiás állapotukat, így morfológiai különbségeket is mutatnak. A hormonális ciklushoz való alkalmazkodás, és az állatok közötti variabilitás nagy mértékben megnehezítette volna az időintervallumok pontos betartását (3-12-30 nap).

Az egerek életkora megfelel egy fiatal felnőtt ember életkorának. Az állatokat fordított világossötét ciklusban tartottuk (8-20:00ig sötétbe voltak), a vizsgálatokra az állatok sötét, aktív ciklusának elején került sor. Az állattartó helységek hőmérséklete 22 ± 2 C° volt, az egerek számára a rágcsáló táp és csapvíz *ad libitum* elérhető volt. Minden vizsgálatot jóváhagyott az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (engedélyszám: BA02/2000-84/2022) és a European Communities Council Directive laboratóriumi állatok gondozására és felhasználására vonatkozó ajánlásai (2010/63/EU) szerint végeztük el.

III.3 Mikroinjekció, kezelés és perfúzió

A modell létrehozásához az egerek jobb oldali NBM-jébe (injektálás koordinátái: AP: -0,70mm, ML: 2,00mm, DV: 3,75-4,75mm) sztereotaxiás készülék és 10-15µm átmérőjű üvegapilláris, valamint nanobeadó segítségével ketamin-xylazin altatásban (intraperitoneálisan (i.p.) 25mg/kg xylazine és 125mg/kg ketamine 0,9% NaCl-ben 10ml=kg mennyiségben) 100µl (10 x10µl-es mennyiségben a DV koordináta mentén) Aβ₁₋₄₂ oldatot (300nM, steril pH=7,14 TRIS pufferben oldva, és 5 napig előinkubálva) vagy TRIS puffert (0,05M, pH=7,14 (steril)) injektáltunk [27, 54].

Az állatokat a mikroinjekciót követő 1 órában 10 mg/kg DHEAS-el vagy fiziológiás sóoldattal (10ml/kg, oldószer) kezeltük i.p..

A morfológiai vizsgálatokhoz 3-12-30 nappal a kezelést követően az állatokat ketamin-xilazin altatásban (lásd előbb) transzkardiálisan perfundáltuk (előbb fiziológiás sóoldattal, majd 4% paraformaldehiddel (PFA)). Az eltávolított agyakat, egy éjszakán át 4%-os PFA oldatban post-

fixáltuk, majd 30% cukor oldatban víztelenítettük, és 30 µm vastagságú koronális metszeteket készítettünk fagyasztó mikrotommal (Leica SM2010 R). A metszeteket fagyálló folyadékban, 20°C-on tároltuk felhasználásig.

3 csoportot hasonlítottunk össze:

1. NBM TRIS + i.p. sóoldat
2. NBM Aβ + i.p. sóoldat
3. NBM Aβ + i.p. DHEAS

III.4 Immunhisztokémiai festések

A kolinerg rendszer vizsgálata esetén, mivel az ACh kis molekulájú neurotranszmitter, a kolinerg sejtek azaz a sejttestek azonosítása a ChAT enzim kimutatásán alapul. Ugyanakkor a sejtek projekciói AChE enzim jelölésével vizsgálhatóak. A ChAT pozitív kolinerg sejtek az NBM területén NiDAB-os immunhisztokémiai módszerrel jelöltük, míg a kolinerg rostok denzitását a szomatoszenzoros kéregben mértük, (AChE) hisztokémiát követően.

A kész mintákat Nikon Eclipse E1 (Nikon, Tokyo, Japán) mikroszkóppal digitalizáltuk. A számítógépes kvantitatív képanalízishez az immunhisztokémiával festett metszetet a ImageJ/Fiji szoftver segítségével elemeztünk ki. Az AChE immunhisztokémia esetében optikai denzitást számoltunk (IOD), míg a ChAT esetében leszámoltuk a jelölt sejtek mennyiségét.

A mikroglia és asztrocita sejtek esetében fluoreszcens immunhisztokémiai jelölést alkalmaztunk. A mikroglia sejtek jelöléséhez Iba-1 markert használtunk. Az asztrociták esetében GFAP specifikus antitestel jelöltük a sejteket. A kész metszeteken első sorban az alábbi paramétereket vizsgáltuk: sejtszám, sejtek által lefedett terület, sejtek kerülete (perimeter), nyúlványok száma és hossza, fluoreszcens jel intenzitás. A sejtek aktivációjának mértéke összefügg bizonyos fehérjék expressziójának mennyiségével [30], ennek köszönhetően a fluoreszcens jel intenzitásából következtethetünk az aktivitás mértékére. Minden metszetet ugyan azon a beállításon digitalizáltunk, így a fluoreszcens intenzitás nem függ a mikroszkóp beállításának paramétereitől. Az asztrocita sejtek esetében az egyes sejtekre vonatkozó részletes paraméterek elemzése jelenleg is folyamatban van, így ezekből statisztikai eredményeket még nem tudunk bemutatni.

A kész mintákat Nikon Eclipse Ti2-E mikroszkóppal és Nikon C2 konfokális detektorral digitalizáltuk. A ChAT sejtszámok meghatározásához és az AChE IOD mérésére ImageJ/Fiji-

t, illetve mikrogliaák esetében az egyes sejtekre vonatkozó paraméterek elemzéséhez CellProfiler programot használtunk.

Festést követően az állatok két agyféltekéjét (lézió oldala és intakt oldal) összehasonlítottuk ugyanazon állaton belül, és a különbséget százalékban fejeztük ki, mivel a SI/NBM komplex vetülete csak az ipszilaterális SSC-re korlátozódott. A kisebb különbség neuroprotektív hatást jelez.

III.4.1 Kolin-acetil-transzferáz (ChAT) immunhisztokémia

A kolinerg sejtek festéséhez állatonként 6 metszetet válogattunk ki, mely tartalmazza az NBM régiót (Bregma -0.47mm és -0.83mm között). Az immunhisztokémiás festések során minden lépés után 3x10 percen keresztül TRIS-el (pH=7,6) mostuk a mintákat. Az első mosás után 15 perces endogén peroxidáz gátlást alkalmaztunk, melynek célja, hogy a későbbiekben elkerüljünk az endogén peroxidáz által adott keresztreakciókat. A peroxidáz gátló elegy a következőket tartalmazta: 300 µl H₂O₂, 4ml metanol, 6ml TRIS. Ezt követően szobahőmérsékleten, rázópadon, 2 órán át egy háttér blokkoló/permeabilizáló elegyet alkalmaztunk a mintákon (összetétele: TRIS, 2% triton X (TX)/ 10% Horse serum (HS)), hogy meggátoljuk keresztreakciók kialakulását, amelyek metszeteink „háttérét” növelnék, valamint növeljük a metszeteink permeabilitását és az antitest könnyebb bekötődését. Ezután az elsődleges antitestet tartalmazó elegyet pipetáztuk a mintákra, (összetétele: 1:1000, ChAT, kecske antitest, #AB144P, Millipore; 0,02% TX; 5% HS, TRIS-ben oldva) Az elsődleges antitesttel a mintákat 72 óráig 4 C°-on, rázópadon inkubáltuk. Az elsődleges antitest lemosása után egy másodlagos, biotinilált antitest oldatba (1:200, TBS/5% HS/0,02% TX anti-kecske, #705-065-147, ImmunoResearch) helyeztük a mintákat 2 órára szobahőmérsékleten. Az ezt követő 3x10 perces mosás után, avidin-biotin komplexet (VESCTASTAIN ABC-peroxidáz kit, Vector Laboratories, 10 ml TBS/ 5% HS/ 0,02% TX) pipetáztunk a metszetekre, majd 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az előhívást egy nikkel-diaminobenzidint (Ni-DAB) és glükóz-oxidázt tartalmazó oldattal végeztük. Első lépésként készítettünk egy oldatot, amely tartalmazott 25 ml nátrium acetátban oldott 1,25 g nikkel-szulfátot. Ezt követően az elegybe egyenként feloldottunk 200 mg glükózt, majd 40 mg ammónium kloridot, majd szűrőpapírral leszűrjük egy sötét üvegű edénybe. Következő lépésben 12,5 mg diaminobenzidin-t (DAB) feloldottunk 25 ml desztillált vízben (dH₂O). Majd az egész oldatot szűrőpapírral leszűrve beleöntöttük a sötét üvegű edénybe. Utolsó lépésként a kész oldatba feloldottunk még 1,5 mg glükóz-oxidázt. Festőkádba öntöttük a Ni-DAB oldatot, majd a metszeteket egyszerre behelyeztük. A lilás szín megjelenését követően egy 3x10 perces TRIS mosással leállítottuk

a reakciót. Mintáinkat zselatinózott tárgylemezre húztuk és szintetikus gyanta elegyes (tartalma: disztirén, lágyítószer és xilol, DPX) fedéssel fixáltuk.

III.4.2 Acetilkolin észteráz (AChE) immunhisztokémia

A kolinerg rostok vizsgálatához a metszeteket a következő koordinátákból választottuk ki: Bregma +0,50 mm és -1,06 mm között. A festés első lépése egy 5x1 perces nátrium-acetát (0,1M, pH=6) mosás volt. Ezt követően 2x45 percre inkubációs puffert helyeztünk a mintákra (összetétele: 16,25 ml 0,1M-os nátrium-acetát/ 1 ml, 0,1M-os nátrium-citrát/ 2,5 ml 0,03M réz-szulfát/ 4,75ml desztillált víz/ 0,5ml 0,005M kálium-ferricianid/ 12,5mg acetiltiokolin-iodid). Az inkubációt egy 5x1 perces Na-acetát mosás követte. A mosás után a metszeteket 2 percre 1%-os ammónium szulfid oldatba (22,8 ml Na-acetát/ 1,2 ml ammónium-szulfid) helyeztük, majd 5x1 percig mostuk nátrium-nitráttal (NaNO₃). Következő lépésben a mintákra 1%-os ezüst-nitrát (12 mg AgNO₃ feloldva 12 ml NaNO₃) oldatot pipettáztunk, majd 2 perc után egy újabb 5x1 perces NaNO₃-mosást végeztünk. Végül egy újabb 5x1 perces Na-acetát mosást követően a mintákat felhúzásig TRIS-ben tároltuk, zselatinózott tárgylemezre húztuk és DPX-el fedtük.

III.4.3 Iba-1 és, GFPA fluoreszcens immunhisztokémia

A mikrogliá és asztrocita morfológia vizsgálatához a beadás helyét választottuk (NBM: Bregma -0.47mm és -0.83mm között). Nemcsak a kolinerg sejtesteket, hanem a mikroinjektálás okozta mechanikai sérüléseket is vizsgáltuk a kérgi területeken. Az immunhisztokémiai festések során minden lépés után 3x10 percen keresztül TRIS-el (pH=7,6) mostuk a mintákat. Az első mosás után szobahőmérsékleten, rázópadon, 2 órán át egy háttér blokkoló/ permeabilizáló elegyet alkalmaztunk (összetétele: TRIS, 2% TX/ 10% HS) a mintákon. Majd a második mosást követően, az elsődleges antitestet tartalmazó elegyet pipetáztuk a mintákra, amely két különböző antitestet tartalmazott (Iba-1: 1:1000 nyúl antitest, #019-1974, FujiFilm Wako; 0,02% TX; 5% HS; TRIS-ben oldva; GFAP: 1:1000 csirke antitest, #NBP1-05198, Novus Biologicals; 0,02% TX; 5% HS, TRIS-ben oldva). A mintákat 72 óráig 4 °C-on, rázópadon inkubáltuk. Az elsődleges antitest lemosása után egy másodlagos antitest oldatba (1:2000 TBS/5% HS/0,02% TX, Iba-1 esetében Alexa647 anti-nyúl, míg GFAP esetében Alexa488 anti-csirke) helyeztük a mintákat 2 órára szobahőmérsékleten. A másodlagos fluoreszcens antitestek fényérzékenysége miatt a mintákat alufóliával letakarjuk. A 2 óra inkubáció elteltével 3x10 perces mosás után, Hoechst (DAPI) antitestet tartalmazó elegyet pipetáztunk a mintára (1:10000, TRIS-ben oldva). Az oldatot 5 percig hagyjuk a mintákon, majd 3x10 percig mossuk

a mintákat. A kész metszeteket ProLong Gold Antifade reagenssel fedtük, száradás után 4 C°-on sötétbe tároljuk.

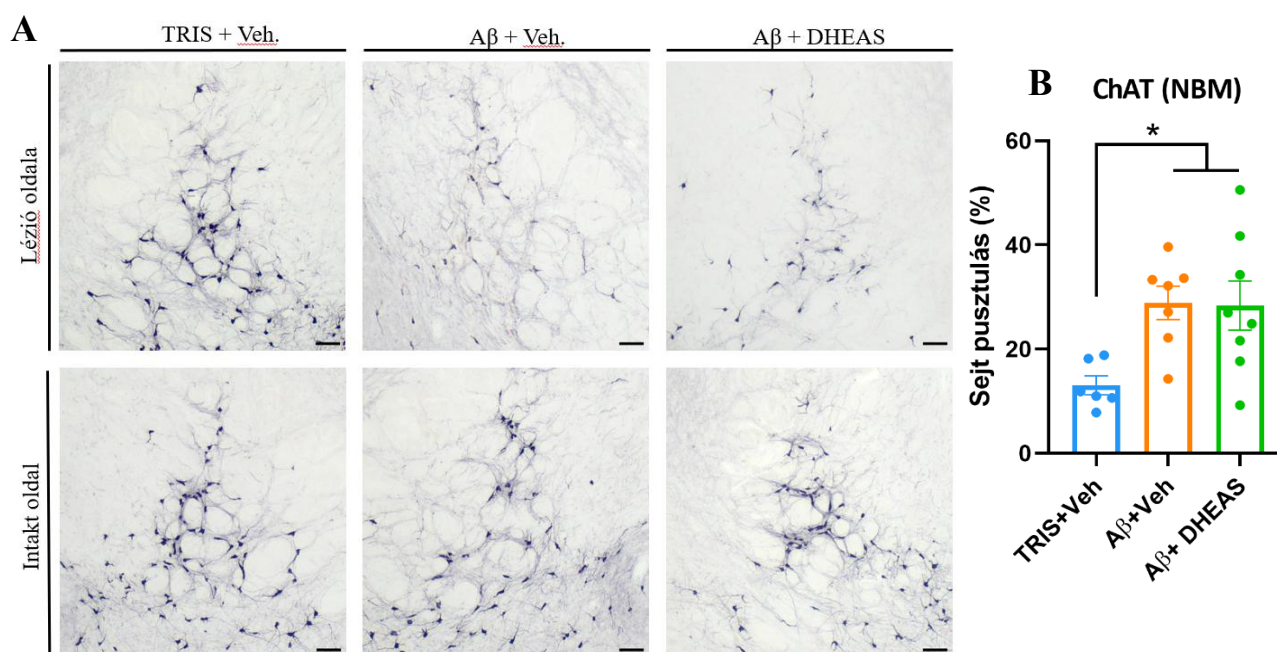
III.5 Statisztikai analízis

A statisztikai analízisekhez és a hozzá tartozó ábrák elkészítéséhez a GraphPad Prism (verzió 6.0) programot használtuk. A csoportok összehasonlítására egyutas ANOVA tesztet és a post-hoc elemzésnél Tukey HSD alkalmaztunk. Az adatok a 3 csoport (TRIS + Veh; A β + Veh; A β + DHEAS) átlagai közti különbséget mutatják, az adatokat átlag $\pm$ SEM-ként tüntettük fel. A szignifikáns különbséget $p < 0,05$ esetén fogadtuk el.

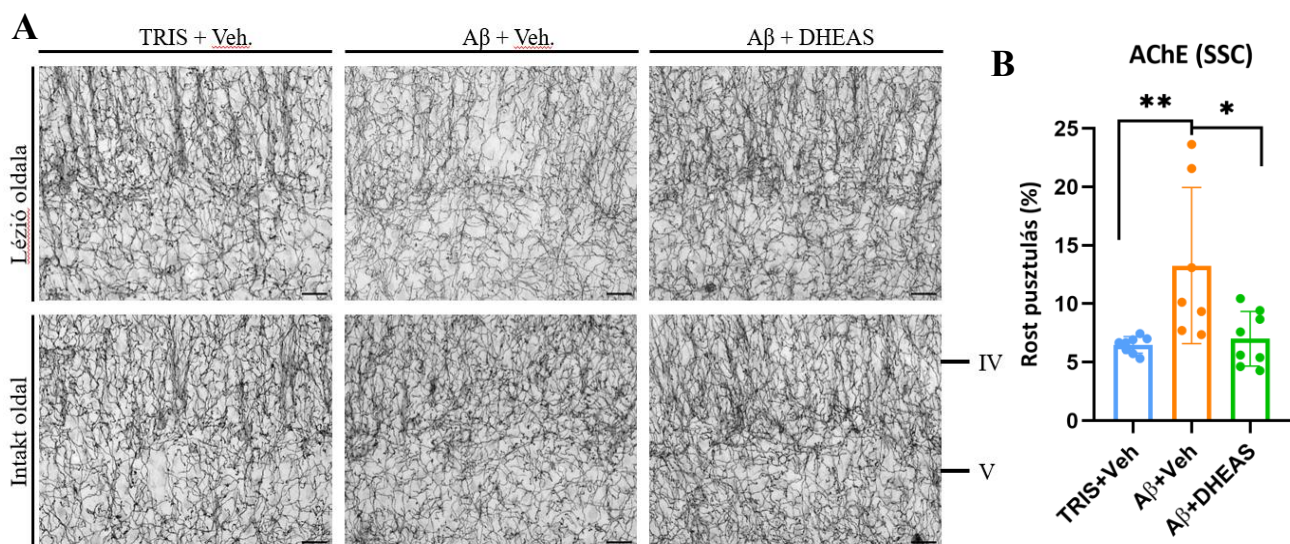
V. Eredmények és kiértékelés

IV.1 Morfológiai vizsgálatok a kolinerg rendszerben

A kolinerg rendszer esetében különbséget találtunk a csoportok között (ChAT: $F_{(2, 18)} = 5.263$, $p = 0.0159$; AChE: $F_{(2, 20)} = 8.155$, $p = 0.0026$). Az A β injektálás neurotoxikus volt, ugyanis csökkentette az NBM területén a ChAT pozitív neuronok számát ($p = 0.0264$) (6.ábra), valamint az SSC területén az AChE pozitív rostok sűrűségét ($p = 0.0025$) (7.ábra). A DHEAS kezelés nem volt hatással a ChAT sejtek számára (6.ábra), azonban szignifikánsan csökkentette a rost pusztulást mértékét ($p = 0.0272$) (7.ábra).



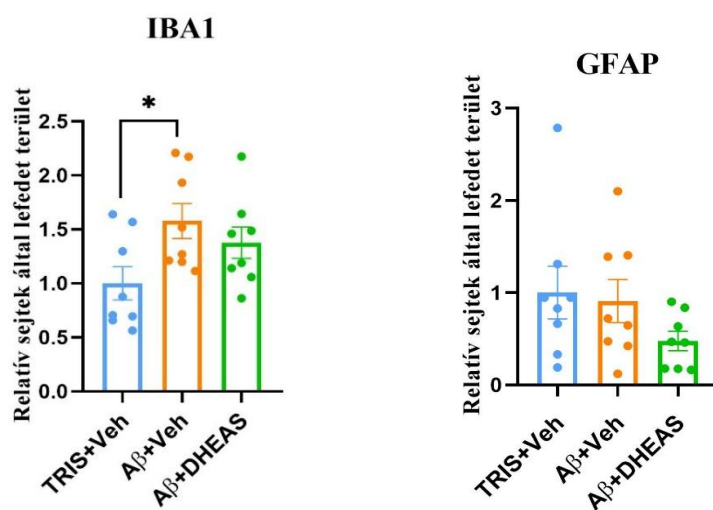
6.ábra: A kolinerg sejtek immunhisztokémiai festésének eredményei az NBM területén. (A) Reprezentatív képek a ChAT pozitív sejtek immunhisztokémiai festéseiből (NiDAB-al jelölve) a léziós és intakt oldalon. (B) Sejtek számában történő változások a különböző kezelést kapott csoportok esetében. Csillaggal (*) a Tukey HSD tesztek eredménye látható, $*p < 0,05$. Az adatok átlag $\pm$ SEM-ként vannak feltüntetve. Skála: 50 μ m.



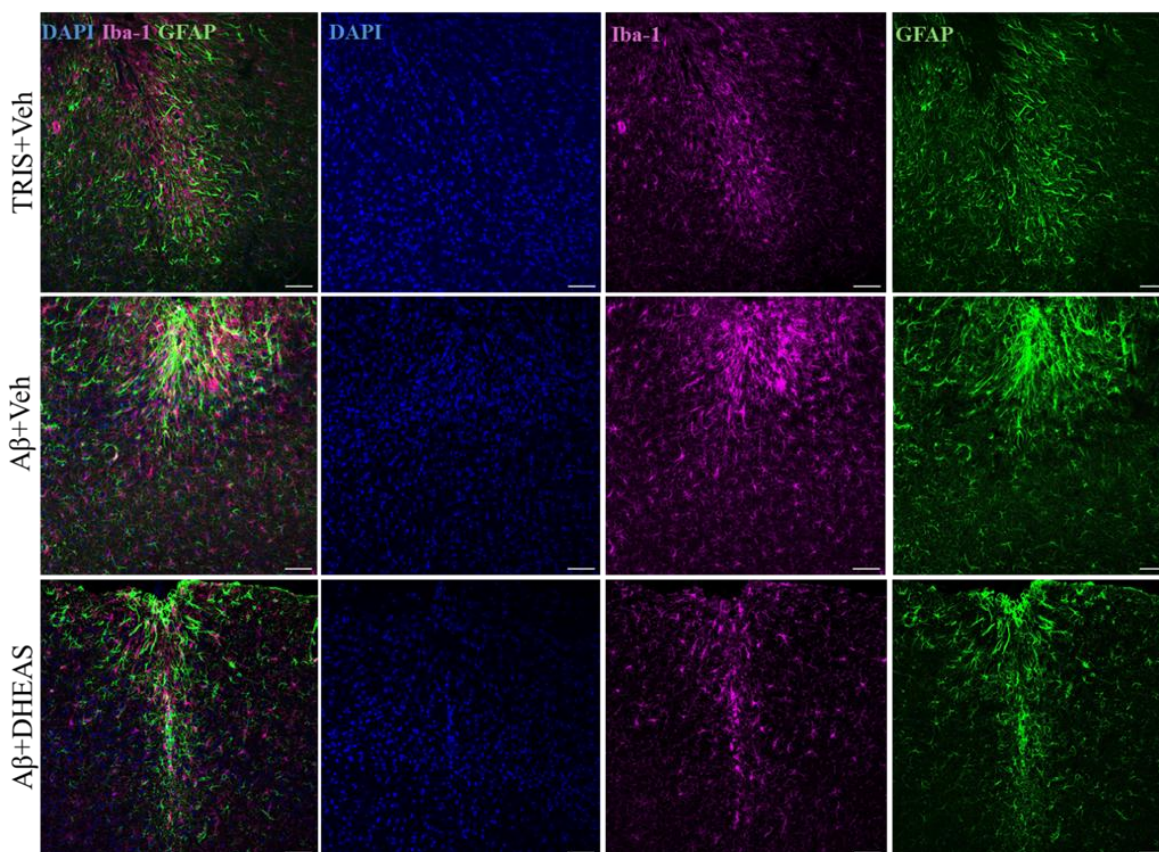
7.ábra: AChE pozitív rostok hisztokémiai festésének eredményei az SSC területén. (A) Reprezentatív képek az AChE rostok festéseiről a IV és V rétegben. (B) AChE rost pusztulás mértéke a különböző kezelést kapott csoportok között (%-ban kifejezve). Csillaggal (*) a Tukey HSD tesztek eredménye látható, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Az adatok átlag $\pm$ SEM-ként vannak feltüntetve. Skála: 20 μ m.

IV.2 Mikroglia és asztrocita sejtek morfológiai vizsgálata a kéreg területén

A glia sejtek morfológiai elemzése során, a kéreg területén megvizsgáltuk a mikroinjektálás okozta mechanikai sérüléseket. A csoportok között a mikroglia által elfoglalt területben különbségeket tapasztaltunk ($F_{(2,21)}=3,635$, $p=0,0441$). Az A β injektálása szignifikánsan növelte a Iba1+ sejtek által lefedett területet ($p=0,0377$), mikroglia aktivációt okozott, melyet a DHEAS kezelés nem befolyásolt. Az asztrocita sejtek által lefedett területben nem találtunk különbséget a csoportok között (8.ábra).



8.ábra: Glia sejtek fluoreszcens immunhisztokémiai festéseinek eredményei a kéreg területén. Iba-1 és GFAP pozitív sejtek által lefedet terület. Csillaggal (*) a Tukey HSD tesztek eredménye látható, * $p < 0,05$. Az adatok átlag $\pm$ SEM-ként vannak feltüntetve.



9.ábra: Reprezentatív képek a mikroinjekció okozta mechanikai sérülésről, DAPI, Iba-1, GFAP markerekkel jelölve. Skála: 200 μ m.

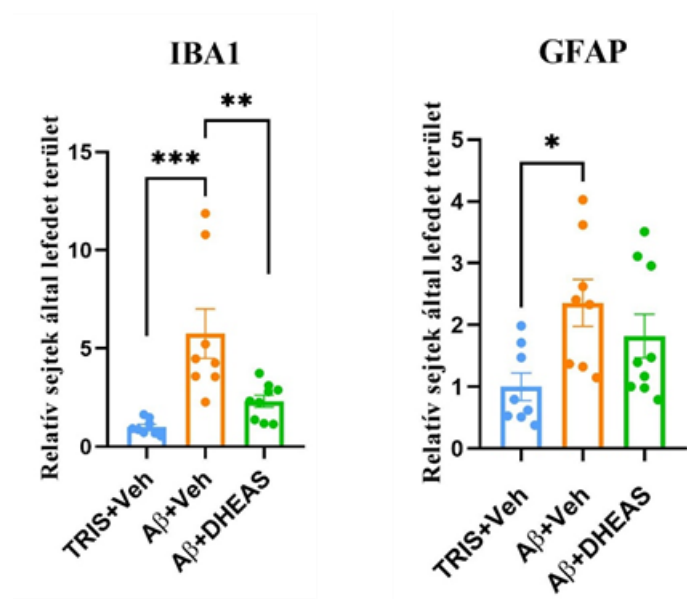
A kéreg területén az egyes mikroglia sejtekre vonatkozó részletes morfológiai paraméterek esetében (lásd 1.táblázat) nem találtunk különbséget a csoportok között.

Paraméter	Átlag $\pm$ SEM		ANOVA	Tukey HSD teszt	
Sejtek száma	TRIS+Veh.	1,067 $\pm$ 0,1423	F(2, 19)=2,121 p=0,1474	TRIS+Veh. vs. A β +Veh.	p=0,1605
	A β +Veh.	2,548 $\pm$ 0,9287		TRIS+Veh. vs. A β +DHEAS	p=0,9344
	A β +DHEAS	1,330 $\pm$ 0,2119		A β +Veh. vs. A β +DHEAS	p=0,2574
Sejtek kerülete	TRIS+Veh.	1,368 $\pm$ 0,2262	F(2,19)=1,792 p=0,1936	TRIS+Veh. vs. A β +Veh.	p=0,2046
	A β +Veh.	2,787 $\pm$ 0,9274		TRIS+Veh. vs. A β +DHEAS	p=0,9340
	A β +DHEAS	1,641 $\pm$ 0,2738		A β +Veh. vs. A β +DHEAS	p=0,3221
Nyúlványok száma	TRIS+Veh	1,337 $\pm$ 0,1417	F(2,20)=1,007 p=0,3830	TRIS+Veh. vs. A β +Veh.	p=0,4018
	A β +Veh	1,710 $\pm$ 0,2569		TRIS+Veh. vs. A β +DHEAS	p=0,9640
	A β +DHEAS	1,410 $\pm$ 0,1604		A β +Veh. vs. A β +DHEAS	p=0,5267
Teljes nyúlványhossz	TRIS+Veh	1,630 $\pm$ 0,2393	F(2,21)=0,1893 p=0,8290	TRIS+Veh. vs. A β +Veh.	p=0,9451
	A β +Veh	1,724 $\pm$ 0,2278		TRIS+Veh. vs. A β +DHEAS	p=0,9534

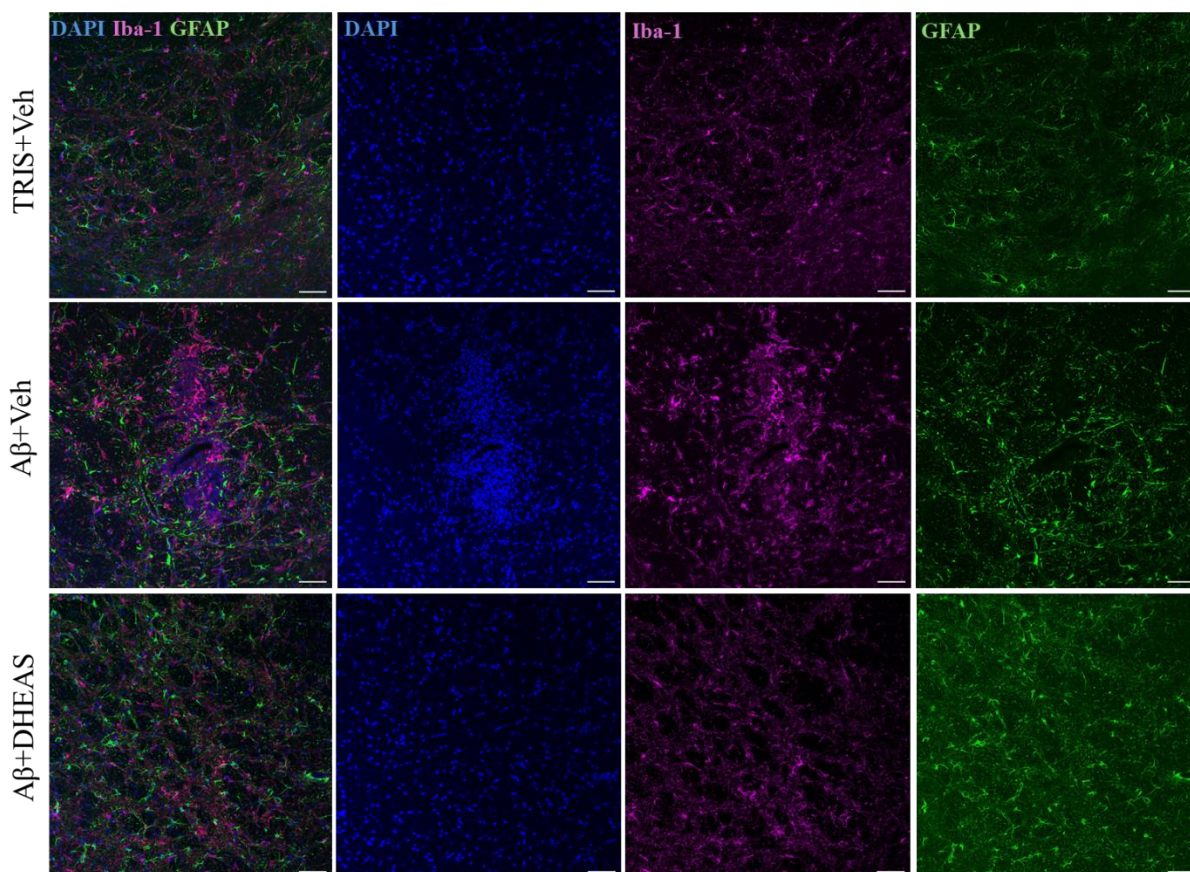
	A β +DHEAS	1,543 $\pm$ 0,1451		A β +Veh. vs. A β +DHEAS	p=0,8136
Intenzitás	TRIS+Veh	2,521 $\pm$ 0,3958	F(2,21)=0,5123 p=0,6064	TRIS+Veh. vs. A β +Veh.	p=0,5782
	A β +Veh	2,039 $\pm$ 0,2990		TRIS+Veh. vs. A β +DHEAS	p=0,8889
	A β +DHEAS	2,300 $\pm$ 0,3072		A β +Veh. vs. A β +DHEAS	p=0,8489

IV.3 Mikroglia és asztrocita sejtek morfológiai vizsgálata az NBM területén

Az NBM régióban mind a mikroglia, mind az asztrociták által elfoglalt területben különbségeket tapasztaltunk (Iba1: $F_{(2, 22)}=11,03$, $p=0,0005$; GFAP: $F_{(2, 22)}=4,172$, $p=0,0291$). Az A β injektálása szignifikánsan növelte, mind a mikroglia ($p=0,0005$), mind az asztrocita ($p=0,0234$) sejtek által lefedett területet, glia sejt aktivációt okozott. Az Iba1+ sejtek aktivációját a DHEAS szignifikánsan csökkentette ($p=0,0073$). Az GFAP+ sejtek esetében a DHEAS-el kezelt csoport egy csökkenő tendenciát mutatott, ugyanis nem különbözött szignifikánsan a kontroll csoporttól. Azaz a DHEAS bizonyos mértékig meggátolta az A β injektálás által indukált aktivációs folyamatokat (10.ábra).

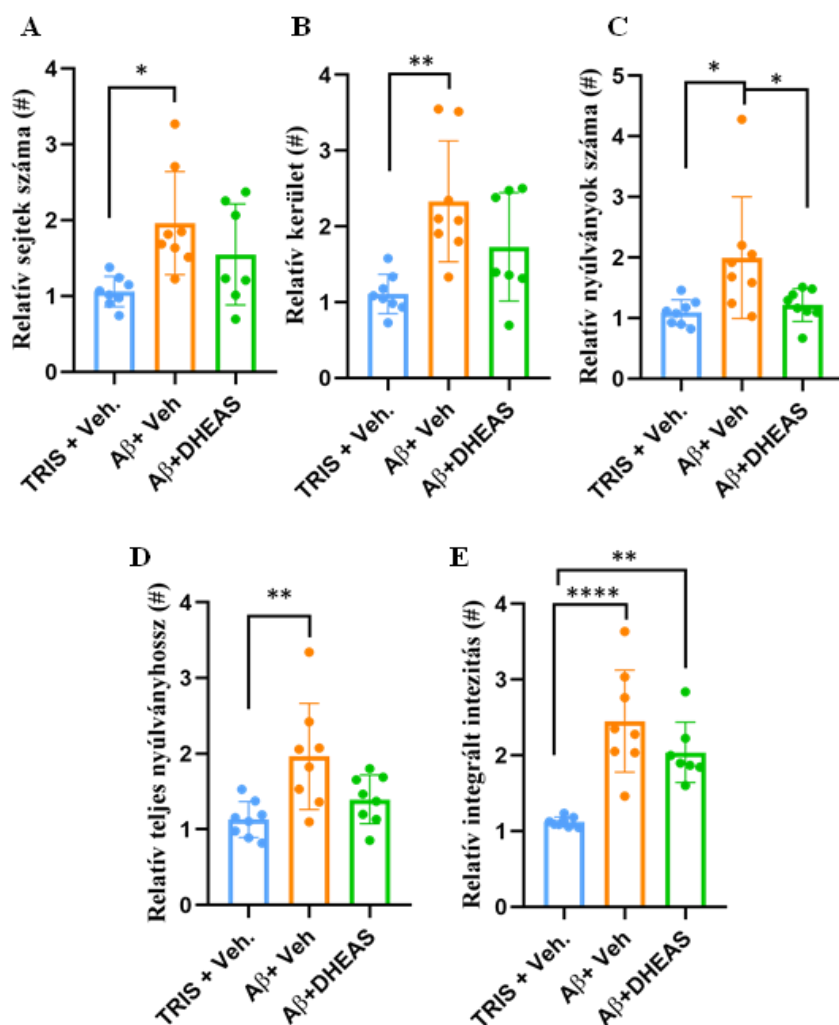


10.ábra: Glia sejtek fluoreszcens immunhisztokémiai festéseinek eredményei az NBM területén. Mikroglia (Iba-1) és Asztrocita (GFAP) sejtek által lefedett terület. Csillaggal (*) a Tukey HSD tesztek eredménye látható, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Az adatok átlag $\pm$ SEM-ként vannak feltüntetve.



11.ábra: Reprezentatív képek az NBM területén a $A\beta$ injektálás okozta glia sejt aktivációról. DAPI, Iba-1, GFAP markerekkel jelölve. Skála: 200 μ m.

Az NBM területén az egyes sejtek részletesebb morfológiai elemzése során is azt tapasztaltuk, hogy a $A\beta$ injektálás növelte a mikroglia sejtek aktivációjára jellemző paramétereket (sejtek száma: $p=0,0107$; sejtek kerülete: $p=0,0027$; nyúlványok száma: $p=0,0195$; teljes nyúlványhossz: $p=0,0049$; intenzitás $p<0,0001$) a kontroll csoporthoz képest (12.ábra). A kezelés szignifikánsan csökkentette a mikroglia sejtek nyúlványainak számát ($p=0,0457$), illetve a teljes nyúlványhosszban is csökkenő tendenciát mutatott ($p=0.0599$). A DHEAS-nek bár a többi paraméterre nem volt szignifikáns hatása, azonban fontos megemlíteni, hogy az intenzitás mértékét leszámítva, a kezelt csoportok nem különböztek a kontroll csoporttól. Vagyis az $A\beta$ a DHEAS-el kezelt állatok esetében nem okozott gliális aktivációt (12.ábra).



12.ábra: Az Iba1+ mikroglia sejtek részletesebb morfológiai elemzése az NBM területén. (A) Sejtek száma; (B) Sejtek kerülete; (C) Nyúlványok száma; (D) Teljes nyúlványhossz; (E) Intenzitás. Csillaggal (*) a Tukey HSD tesztek eredménye látható, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0.0001$. Az adatok átlag $\pm$ SEM-ként vannak feltüntetve.

VI. Következtetések

Az A β_{1-42} mikroinjekció egy széles körben használt módszer az AD modellezésére, mivel lehetővé teszi egy adott agyterület szerepének szelektív vizsgálatát a betegség progressziójában [55]. Az Ábrahám laboratórium korábbi kutatásai kimutatták, hogy az N-metil-D-aszpartát (NMDA, ionotróp glutamát receptor agonista) SI/NBM-ba történő befecskendezése helyi kolinerg sejtpusztulást és az ipszilaterális SSC-ben kolinerg rostvesztést eredményezett a kontralaterális oldalhoz képest, melynek maximuma 12 nappal az injekció után jelentkezik [27]. Egyetlen neuroszteroid (az ő esetükben 17 β -ösztadiol) injekció nem befolyásolta a kolinerg sejtek pusztulását az SI/NBM-ben, de növelte a kolinerg rostok sűrűségét az SSC-ben. Ezeket az eredményeket később egy A β_{1-42} injekciós modellel egészítették ki, amelyben a 17 β -ösztadiol, hasonló protektív hatást mutatott [54]. Ugyanezen modell segítségével mi is

igazoltuk, hogy az A β ₁₋₄₂ mikroinjekció kolinerg sejt pusztulást okoz az NBM régióban, mely AChE pozitív rostpusztulást eredményez a SSC-ben 12 nappal az injekciót követően. A 17 β -ösztradiolhoz hasonlóan az általunk alkalmazott neuroszteroid, a DHEAS is protektív hatást mutatott a rostok denzitására, és nem befolyásolva a ChAT pozitív sejtek számát. Ezek az eredmények egy közös vagy hasonló hatásmechanizmusra engednek következtetni.

Bár a szteroidok túlnyomórészt genomikus útvonalakon keresztül fejtik ki hatásukat, a DHEA-nak és a DHEAS-nak nincs specifikus azonosított nukleáris receptora, így nem genomikus célpontokon is hatnak [56]. Mindazonáltal a DHEA(S) mint előanyag androgén- és ösztrogénszármazékokká történő metabolikus átalakulása révén is kifejti hatásait [43]. Ezen túl közvetlen, nem specifikusan kötődik a szteroidreceptorokhoz is, mint az ösztrogén vagy androgénreceptorok [57-59]. Továbbá a DHEA(S) agyi közvetlen hatásai több neurotranszmittert érintenek, elsősorban a glutamát- és γ -amino-vajsav (GABA)-rendszereket. A DHEA(S) az NMDA receptorok pozitív modulátoraként működik, és serkenti a glutamáterg neurotranszmissziót [60-62]. A leggyakrabban dokumentált hatás a DHEA(S) alloszterikus modulációja a GABA-A receptoron, ahol antagonistaként működik [63, 64], azonban kötődési helyet még nem azonosítottak. A felsorolt hatások a DHEA(S) neuroprotektív potenciáljára utalnak. A kísérleteinkben látott védő hatás azonban az NGF (idegi növekedési faktor), és BDNF (agyi eredetű növekedési faktor) molekuláknak is lehet tulajdonítható. Ugyanis a DHEA(S) stimulálja az NGF és BDNF-et kortikális neuronokon, növelve ezek proliferációját [65]. Valamint kötődik plazmamembrán receptorokhoz, például a tropomiozin receptor kináz (Trk)-A és a p75 neurotrofin receptor (p75NTR), melyek szintén fontos szerepet játszanak a proliferációban és neuroprotekciónban [47]. Illetve egy új DHEA(S) származék, a BNN27, ellensúlyozta a szkopolamin által kiváltott memóriazavarokat patkányokban [66]. A felsorolt hatások magyarázhatják a DHEA(S) protektív hatását az arborizációra a kolinerg rendszerben.

A mikroinjektálás okozta mechanikai sérüléssel egy kisebb, akut traumás agysérülést idéztünk elő, amely fokozta a glia sejt aktivációt a tű behatolásának kortikális területén. Kísérletsorozatunkban a kéreg területén mechanikai sérülésről beszélhetünk, ugyanis itt a tű csak áthaladt, az anyagbeadás az NBM régióba történt. A kéregben a sérülés által kiváltott mikrogliá aktivációt tapasztaltunk, ugyanis itt minden esetben a beadás oldalán volt magasabb az aktiváció a kontroll, nem injektált oldalhoz képest (elfoglalt terület, sejtszám, sejtek kerülete, nyúlványok száma, teljes nyúlványhossz, intenzitás). Szignifikáns különbséget csak a Iba+ mikrogliák által elfoglalt területben találtunk a csoportok között, amelyet a kapillárison maradt A β ₁₋₄₂ eredményezhetett. A csoportok egyéb paraméterekben nem mutattak eltérést egymáshoz

képest, ami azt jelenti, hogy a mechanikai sérülés hatására kialakult mikroglia aktiváció mindhárom esetben azonos mértékű volt. GFAP+ asztrociták esetében sem találtunk különbséget a sejtek által elfoglalt területben a különböző kezelési csoportok között. A traumás agysérülések neuronális pusztulást, és axonális károsodást okoznak [67]. A kezdeti patogenezist később biokémiai folyamatok követik, amit elsősorban a glia sejtek aktivációja okoz. A túlzott, nagy mértékű aktiváció tovább fokozza a degeneráció mértékét, és a pro-inflammatorikus citokin termelést [68, 69]. Mivel a gliális aktiváció mind a korai, neuronpusztuláshoz vezető lépések, mind a késői, regenerációs lépések során fontos lehet, ezért terjesztettük ki vizsgálatainkat 3 és 30 napos időintervallumra is.

Az NBM-ben már az A β ₁₋₄₂ mikroinjekció és a DHEA(S) kezelés hatását mértük. Kísérletsorozatunkban azt tapasztaltuk, hogy az A β injekció fokozta a mikroglia aktivitását ugyanis megnövelte a sejtek által elfoglalt területet, a sejtek számát, a sejtek kerületét, a nyúlványok számát és összhosszát, valamint a gliális festések intenzitását. A mikroglia sejtek morfológiai plaszticitását már Río-Hortega is felismerte az 1919-ben a mikroglia témájában írt tanulmányai során (összefoglalva: [70]). Ezek a tanulmányok vezettek ahhoz a feltételezéshez, hogy a mikroglia két különböző állapotban létezik: „Nyugalmi”, amelyet erősen elágazó morfológia és korlátozott fagocitózis és migrációs aktivitás jellemez, valamint „Aktivált”, amelyre amőboid forma, nagyfokú mozgékonyág, fagocitózis és proliferatív képességek jellemzőek. A múlt század nagy részében ezt a „kétállapot-paradigmát” széles körben elfogadták, ami hozzájárult ahhoz a tévhithez, hogy az egészséges agyban a mikroglia funkcionálisan inaktív vagy nyugalmi állapotban van valamint ahhoz, hogy az aktivált mikroglia csakis amőboid alakot vehet fel. Ebből kifolyólag jelenleg aktív kutatott terület a különböző kórképekben feltérképezni a mikroglia morfológiáját [37, 71, 72].

A mi kutatásunkban is az A β beadást követően nem amőboid állapotot tapasztaltunk, hanem hiper-ramifikációra utaló jeleket (megnövekedett nyúlványok száma és azok hossza a kontroll oldalhoz képest). Hasonló elváltozásokat korábban stressz hatására tapasztaltak állatmodellekben [37, 73, 74]. Ebből kifolyólag további terveink között szerepel a pontosabb morfológiai meghatározás és a sejtek egyenkénti kategorizálása, valamint az időbeli lefolyás és esetleges morfológiai időbeli változások feltérképezése AD egérmodellekben (3,12,30 napos csoport).

A DHEA(S) kezelés során anti-inflammatorikus hatásokat láttunk ugyanis csökkentette az A β és vehikulummal kezelt csoporthoz képest a toxicitás mértékét (sejtek által elfoglalt terület, nyúlványok száma és hossza). A további paraméterek esetén (sejtek száma, sejtek kerülete) az

A β +DHEAS csoport szintén a kontrollhoz hasonló értékeket mutatott bár, ez nem különbözött szignifikánsan a csak A β kezelt csoporttól sem. Neuroszteroid molekulaként a DHEA(S) rengeteg gyulladáscsökkentő hatással bír [42]. Többek között TrkA receptorhoz kötődve aktiválja az AKT/CREB útvonalat, így közvetetten gátolja a gyulladást elősegítő gének kifejeződését. Ennek köszönhetően csökken a mikroglia pro-inflammatorikus citokin (pl.: tumor nekrosis faktor- α (TNF α), interleukin-6 (IL-6)) szekréciója [41]. A DHEAS oligodendrociták által csökkenti a demielinizációt és az axonvesztést, valamint az IL-1 β és az interferon-gamma (IFN γ) szintjét a gerincvelőben [75]. Továbbá ADIOL-á alakulva szelektíven modulálja az ösztrogén receptor β -t, így elnyomja a mikroglia és asztrociták gyulladásos válaszait [46, 76]. A DHEA(S) továbbá gátolja a mikroglia nitrogén-oxid termelését ezáltal is csökkentve a gyulladásos folyamatokat [77].

Összeségében tehát, az A β neurotoxikus volt, ugyanis csökkentette a ChAT+ sejtek számát az NBM-ben és ezek projekcióit az SSC-ben, továbbá glia aktivációhoz vezetett az NBM területén. A DHEAS protektív hatással volt a kolinerg rostokra és anti-inflammatorikus hatásokkal rendelkezett a mikroglia esetében. Úgy gondoljuk, hogy a DHEA és szulfát sója ígéretes terápiás lehetőséget nyújthatnak az AD kezelésében és a kutatásuk hozzájárulhat betegség pathomechanizmusának alaposabb feltérképezéséhez.

VII. Folyamatban lévő tervek

A jövőben tervezzük befejezni a 3 és 30 nappal a kezelés után perfundált csoportok elemzését. Az immunhisztokémiai festések és a kész metszetek digitalizálása már készen van, jelenleg az adatok elemzése és statisztikai kiértékelése folyik. Emellett dolgozunk az asztrocita sejtek részletes morfológiai elemzésén is. Továbbá a perfundálás során eltett vérmintákon szeretnénk DHEA, DHEAS, tesztoszteron és ösztrogén szintet mérni, hogy egy részletes képet kapjunk az állatok vérének hormon szintjéről a DHEAS kezelést követően.

VIII. Hivatkozások

1. Organization, W.H. *The top 10 causes of death*. 2024 7 August 2024 [cited 2000; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>].
2. Passeri, E., et al., *Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(22).
3. Lane, C.A., J. Hardy, and J.M. Schott, *Alzheimer's disease*. Eur J Neurol, 2018. **25**(1): p. 59-70.
4. Bondi, M.W., E.C. Edmonds, and D.P. Salmon, *Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future*. J Int Neuropsychol Soc, 2017. **23**(9-10): p. 818-831.
5. Guo, Y., et al., *Functions of amyloid precursor protein in metabolic diseases*. Metabolism, 2021. **115**: p. 154454.
6. LaFerla, F.M. and S. Oddo, *Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction*. Trends Mol Med, 2005. **11**(4): p. 170-6.
7. *2024 Alzheimer's disease facts and figures*. Alzheimers Dement, 2024. **20**(5): p. 3708-3821.

8. Ferreira-Vieira, T.H., et al., *Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System*. Curr Neuropharmacol, 2016. **14**(1): p. 101-15.
9. Riedel, B.C., P.M. Thompson, and R.D. Brinton, *Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2016. **160**: p. 134-47.
10. Hori, Y., et al., *Role of Apolipoprotein E in beta-Amyloidogenesis: ISOFORM-SPECIFIC EFFECTS ON PROTOFIBRIL TO FIBRIL CONVERSION OF Abeta IN VITRO AND BRAIN Abeta DEPOSITION IN VIVO*. J Biol Chem, 2015. **290**(24): p. 15163-74.
11. Pike, C.J., *Sex and the development of Alzheimer's disease*. J Neurosci Res, 2017. **95**(1-2): p. 671-680.
12. Yue, X., et al., *Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(52): p. 19198-203.
13. Roof, R.L. and E.D. Hall, *Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone*. J Neurotrauma, 2000. **17**(5): p. 367-88.
14. Cersosimo, M.G. and E.E. Benarroch, *Estrogen actions in the nervous system: Complexity and clinical implications*. Neurology, 2015. **85**(3): p. 263-73.
15. Kramar, E.A., et al., *Estrogen promotes learning-related plasticity by modifying the synaptic cytoskeleton*. Neuroscience, 2013. **239**: p. 3-16.
16. Lewis, P.R. and C.C. Shute, *The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest*. Brain, 1967. **90**(3): p. 521-40.
17. Boegman, R.J., et al., *Excitotoxic lesions of rat basal forebrain: differential effects on choline acetyltransferase in the cortex and amygdala*. Neuroscience, 1992. **51**(1): p. 129-35.
18. Kitt, C.A., et al., *Fiber pathways of basal forebrain cholinergic neurons in monkeys*. Brain Res, 1987. **406**(1-2): p. 192-206.
19. Agostinelli, L.J., J.C. Geerling, and T.E. Scammell, *Basal forebrain subcortical projections*. Brain Struct Funct, 2019. **224**(3): p. 1097-1117.
20. Zaborszky, L., et al., *The basal forebrain corticopetal system revisited*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **877**: p. 339-67.
21. Zaborszky, L., et al., *Specific Basal Forebrain-Cortical Cholinergic Circuits Coordinate Cognitive Operations*. J Neurosci, 2018. **38**(44): p. 9446-9458.
22. Rees, T.M. and S. Brimijoin, *The role of acetylcholinesterase in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Drugs Today (Barc), 2003. **39**(1): p. 75-83.
23. Wu, D., et al., *Medial septum tau accumulation induces spatial memory deficit via disrupting medial septum-hippocampus cholinergic pathway*. Clin Transl Med, 2021. **11**(6): p. e428.
24. Hanna Al-Shaikh, F.S., et al., *Selective Vulnerability of the Nucleus Basalis of Meynert Among Neuropathologic Subtypes of Alzheimer Disease*. JAMA Neurol, 2020. **77**(2): p. 225-233.
25. Navarro, G., et al., *Homodimerization of CB(2) cannabinoid receptor triggered by a bivalent ligand enhances cellular signaling*. Pharmacol Res, 2024. **208**: p. 107363.
26. Pearson, R.C., et al., *The projection of the basal nucleus of Meynert upon the neocortex in the monkey*. Brain Res, 1983. **259**(1): p. 132-6.
27. Koszegi, Z., et al., *Postlesion estradiol treatment increases cortical cholinergic innervations via estrogen receptor-alpha dependent nonclassical estrogen signaling in vivo*. Endocrinology, 2011. **152**(9): p. 3471-82.
28. Uddin, M.S. and L.W. Lim, *Glial cells in Alzheimer's disease: From neuropathological changes to therapeutic implications*. Ageing Res Rev, 2022. **78**: p. 101622.
29. Casali, B.T. and E.G. Reed-Geaghan, *Microglial Function and Regulation during Development, Homeostasis and Alzheimer's Disease*. Cells, 2021. **10**(4).
30. Dossi, E., F. Vasile, and N. Rouach, *Human astrocytes in the diseased brain*. Brain Res Bull, 2018. **136**: p. 139-156.
31. Zhou, B., Y.X. Zuo, and R.T. Jiang, *Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases*. CNS Neurosci Ther, 2019. **25**(6): p. 665-673.
32. Sofroniew, M.V., *Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity*. Trends Immunol, 2020. **41**(9): p. 758-770.
33. Navarrete, M., et al., *Astrocyte calcium signal and gliotransmission in human brain tissue*. Cereb Cortex, 2013. **23**(5): p. 1240-6.
34. Acosta, C., H.D. Anderson, and C.M. Anderson, *Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease*. J Neurosci Res, 2017. **95**(12): p. 2430-2447.
35. Singh, D., *Astrocytic and microglial cells as the modulators of neuroinflammation in Alzheimer's disease*. J Neuroinflammation, 2022. **19**(1): p. 206.
36. Reddaway, J., et al., *Microglial morphometric analysis: so many options, so little consistency*. Front Neuroinform, 2023. **17**: p. 1211188.

37. Vidal-Itriago, A., et al., *Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 997786.
38. Pekny, M., U. Wilhelmsson, and M. Pekna, *The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis*. Neurosci Lett, 2014. **565**: p. 30-8.
39. Al-Ghraiyyah, N.F., et al., *Glial Cell-Mediated Neuroinflammation in Alzheimer's Disease*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(18).
40. Wu, Y. and U.L.M. Eisel, *Microglia-Astrocyte Communication in Alzheimer's Disease*. J Alzheimers Dis, 2023. **95**(3): p. 785-803.
41. Alexaki, V.I., et al., *DHEA inhibits acute microglia-mediated inflammation through activation of the TrkA-Akt1/2-CREB-Jmjd3 pathway*. Mol Psychiatry, 2018. **23**(6): p. 1410-1420.
42. Yilmaz, C., et al., *Neurosteroids as regulators of neuroinflammation*. Front Neuroendocrinol, 2019. **55**: p. 100788.
43. Maninger, N., et al., *Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS)*. Front Neuroendocrinol, 2009. **30**(1): p. 65-91.
44. Compagnone, N.A. and S.H. Mellon, *Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators*. Front Neuroendocrinol, 2000. **21**(1): p. 1-56.
45. Zwain, I.H. and S.S. Yen, *Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain*. Endocrinology, 1999. **140**(8): p. 3843-52.
46. Saijo, K., et al., *An ADIOL-ERbeta-CtBP transrepression pathway negatively regulates microglia-mediated inflammation*. Cell, 2011. **145**(4): p. 584-95.
47. Lazaridis, I., et al., *Neurosteroid dehydroepiandrosterone interacts with nerve growth factor (NGF) receptors, preventing neuronal apoptosis*. PLoS Biol, 2011. **9**(4): p. e1001051.
48. Tang, J., L.R. Chen, and K.H. Chen, *The Utilization of Dehydroepiandrosterone as a Sexual Hormone Precursor in Premenopausal and Postmenopausal Women: An Overview*. Pharmaceuticals (Basel), 2021. **15**(1).
49. Hampl, R. and M. Bickova, *Neuroimmunomodulatory steroids in Alzheimer dementia*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **119**(3-5): p. 97-104.
50. Aldred, S. and P. Mecocci, *Decreased dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) concentrations in plasma of Alzheimer's disease (AD) patients*. Arch Gerontol Geriatr, 2010. **51**(1): p. e16-8.
51. Hillen, T., et al., *DHEA-S plasma levels and incidence of Alzheimer's disease*. Biol Psychiatry, 2000. **47**(2): p. 161-3.
52. Maggio, M., et al., *DHEA and cognitive function in the elderly*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2015. **145**: p. 281-92.
53. Arbo, B.D., F.S. Ribeiro, and M.F. Ribeiro, *Astrocyte Neuroprotection and Dehydroepiandrosterone*. Vitam Horm, 2018. **108**: p. 175-203.
54. Kwakowsky, A., et al., *Treatment of beta amyloid 1-42 (Aβeta(1-42))-induced basal forebrain cholinergic damage by a non-classical estrogen signaling activator in vivo*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 21101.
55. Calvo-Flores Guzman, B., et al., *The Interplay Between Beta-Amyloid 1-42 (Aβeta(1-42))-Induced Hippocampal Inflammatory Response, p-tau, Vascular Pathology, and Their Synergistic Contributions to Neuronal Death and Behavioral Deficits*. Front Mol Neurosci, 2020. **13**: p. 522073.
56. Weng, J.H. and B.C. Chung, *Nongenomic actions of neurosteroid pregnenolone and its metabolites*. Steroids, 2016. **111**: p. 54-59.
57. Webb, S.J., et al., *The biological actions of dehydroepiandrosterone involves multiple receptors*. Drug Metab Rev, 2006. **38**(1-2): p. 89-116.
58. Chen, F., et al., *Direct agonist/antagonist functions of dehydroepiandrosterone*. Endocrinology, 2005. **146**(11): p. 4568-76.
59. Teng, Y., et al., *Dehydroepiandrosterone-induces miR-21 transcription in HepG2 cells through estrogen receptor beta and androgen receptor*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **392**(1-2): p. 23-36.
60. Johansson, T., et al., *Allosteric modulation of the NMDA receptor by neurosteroids in rat brain and the impact of long term morphine administration*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **401**(4): p. 504-8.
61. Bergeron, R., C. de Montigny, and G. Debonnel, *Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors*. J Neurosci, 1996. **16**(3): p. 1193-202.
62. Zoupa, E., A. Gravanis, and N. Pitsikas, *The novel dehydroepiandrosterone (DHEA) derivative BNN27 counteracts behavioural deficits induced by the NMDA receptor antagonist ketamine in rats*. Neuropharmacology, 2019. **151**: p. 74-83.
63. Demirgoren, S., et al., *Receptor binding and electrophysiological effects of dehydroepiandrosterone sulfate, an antagonist of the GABAA receptor*. Neuroscience, 1991. **45**(1): p. 127-35.

64. Svob Strac, D., et al., *Modulation of recombinant GABA(A) receptors by neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate*. Pharmacology, 2012. **89**(3-4): p. 163-71.
65. Rahmani, A., et al., *Dehydroepiandrosterone stimulates nerve growth factor and brain derived neurotrophic factor in cortical neurons*. Adv Pharmacol Sci, 2013. **2013**: p. 506191.
66. Pitsikas, N. and A. Gravanis, *The novel dehydroepiandrosterone (DHEA) derivative BNN27 counteracts delay-dependent and scopolamine-induced recognition memory deficits in rats*. Neurobiol Learn Mem, 2017. **140**: p. 145-153.
67. Greenhalgh, A.D., S. David, and F.C. Bennett, *Immune cell regulation of glia during CNS injury and disease*. Nat Rev Neurosci, 2020. **21**(3): p. 139-152.
68. Jassam, Y.N., et al., *Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift*. Neuron, 2017. **95**(6): p. 1246-1265.
69. Corps, K.N., T.L. Roth, and D.B. McGavern, *Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury*. JAMA Neurol, 2015. **72**(3): p. 355-62.
70. Sierra, A., et al., *The "Big-Bang" for modern glial biology: Translation and comments on Pio del Rio-Hortega 1919 series of papers on microglia*. Glia, 2016. **64**(11): p. 1801-40.
71. Beynon, S.B. and F.R. Walker, *Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology*. Neuroscience, 2012. **225**: p. 162-71.
72. Walker, F.R., et al., *Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: a review of the models, the signals and the mechanisms*. Brain Behav Immun, 2014. **37**: p. 1-14.
73. Smith, K.L., et al., *Microglial cell hyper-ramification and neuronal dendritic spine loss in the hippocampus and medial prefrontal cortex in a mouse model of PTSD*. Brain Behav Immun, 2019. **80**: p. 889-899.
74. Hinwood, M., et al., *Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex*. Cereb Cortex, 2012. **22**(6): p. 1442-54.
75. Boghoozian, R., et al., *Suppressed oligodendrocyte steroidogenesis in multiple sclerosis: Implications for regulation of neuroinflammation*. Glia, 2017. **65**(10): p. 1590-1606.
76. Aggelakopoulou, M., et al., *ERbeta-Dependent Direct Suppression of Human and Murine Th17 Cells and Treatment of Established Central Nervous System Autoimmunity by a Neurosteroid*. J Immunol, 2016. **197**(7): p. 2598-609.
77. Barger, S.W., J.A. Chavis, and P.D. Drew, *Dehydroepiandrosterone inhibits microglial nitric oxide production in a stimulus-specific manner*. J Neurosci Res, 2000. **62**(4): p. 503-9.