

XXXII. OTDK

Biológia szekció

Kísérletesen létrehozott vaszkuláris demencia következtében kialakuló kognitív károsodások vizsgálata in vivo patkány modellekben

Készítette: Jánosi Barbara (Biológia MSc 2. évf.)

Küldő intézmény: Eötvös Lóránd Tudományegyetem

Kutatómunka helye: EGIS Gyógyszergyár Zrt.

Témavezető: Dr. Gacsályi István

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. Célkitűzések	4
3. Anyagok és módszerek.....	5
3.1 Állatok	5
3.2 Előkészítés, műtét.....	5
3.3 Spontán motoros aktivitás vizsgálat	5
3.4 Új tárgy felismerési teszt	6
3.5 Előkezelés során felhasznált anyagok	7
3.6 Statisztikai elemzés.....	7
4. Eredmények.....	8
4.1 Spontán motoros aktivitás	8
4.2 A közös fejverőér jobb oldali elzárásának hatása az új tárgy felismerési tesztben	8
4.3 Donepezil kezelés hatása	9
4.4 Memantine kezelés hatása	13
5. Diskusszió.....	16

1. Bevezetés

Napjainkban egyre nagyobb figyelem fordítódik az öregedés indukálta betegségekre. Az idősebb korosztályt érintő krónikus betegségek közül is kiemelkedő prevalenciájúak az összefoglaló néven öregkori demenciaként ismert működészavarok (Sousa és mtsai., 2009). Ezen betegségek vizsgálata központi fontosságú, hiszen a populáció öregedésének következtében a társadalom egyre nagyobb hányada válhat érintetté. Az időskori demenciák közül leggyakoribb az Alzheimer-kór, előfordulási gyakoriság szempontjából második helyen a vaszkuláris demencia áll (Korczyn és mtsai., 2012).

A vaszkuláris demencia nevű betegség világszerte minden huszadik 65 év feletti embert érint (Jiwa és mtsai., 2010). Egyéb kockázati tényezők (magas vérnyomás, inzulin rezisztencia stb.) is ismertek (Hayden és mtsai., 2006), azonban magát az öregedési folyamatot központi rizikófaktorként tartják számon ennél a zavarnál (Thong-asa és mtsai., 2013). A betegség hátterében a krónikus agyi hipoperfúzió áll, ami leggyakrabban agyi érelmeszesedés vagy „kisér-betegség” következménye (Hachinski és mtsai., 2006). A közös fejverőér (arteria carotis communis) elmeszesedése, vagy az egyoldali carotis szűkülete alig észrevehető kognitív romlást okozhat már viszonylag korai fázisban, akár évtizedekkel a kognitív diszfunkció klinikai diagnosztizálását megelőzően (Vermeer és mtsai., 2003). „Kisér-betegség” során, a fehérállományba benyúló arteriák és arteriolák szűkülete vezet krónikus hipoperfúzióhoz, melynek következtében léziók keletkeznek a fehérállományban, illetve kognitív hanyatlás jelentkezik (Pantoni és Garcia, 1997).

A betegség tanulmányozásához, gyógyszerfejlesztéshez szükséges egy olyan állatmodell létrehozása, ami a lehető leginkább hasonlít a humán populációban megjelenő zavarhoz. Korábban kifejezetten sokan alkalmazták a közös fejverőér permanens kétoldali elzárásával járó módszert, annak ellenére, hogy ennek a műtétnak két hátránya is ismert. Egyrészt a mortalitási ráta igen magas, 30-50 %-os, másrészt az agyi keringési mintázat eltérő az öregedő, demenciával rendelkező emberekben tapasztaltakhoz képest (Thong-asa és mtsai., 2013). 2008 óta alkalmazzák a Yoshizaki és munkatársai által kidolgozott módszert. Ebben az esetben a jobb oldali közös fejverőér elzárásával valósítható meg a krónikus agyi hipoperfúzió. A mortalitási ráta mindössze 5-10 %-os, és az agyi keringési mintázat alapján elmondható, hogy nagyban hasonlít az érelmeszesedés által okozott tünetmentes carotis elzáródáshoz (Yoshizaki és mtsai., 2008).

Az így megműtött állatok kognitív képességei különféle viselkedésfarmakológiai tesztek segítségével értékelhetők. A nem térbeli munkamemória vizsgálatára kiválóan alkalmas az új tárgy felismerési teszt (Ennaceur and Delacour, 1988). A teszt során az állat (általában patkány, vagy egér) feladata, hogy egy új tárgyat elkülönítsen (felismerjen) egy régi tárgytól, amivel (15-30 perccel, vagy akár egy nappal) korábban már találkozott. A teszt előnyei közé tartozik, hogy nem szükséges előzetes tanítás (Thoang-asa és mtsai., 2013), vagyis az egészséges patkány már a tárggyal való másodszori találkozásra felismeri azt (adott retenciós idő esetén), és az új tárggyal többen foglalkozik. Ezen módszer segítségével tehát a tanulásra való képesség mérhető fel (Jiwa és mtsai., 2010).

Nem jellemző, hogy kifejezetten vaszkuláris demencia kezelésére fejlesztenének új gyógyszereket, jellemzően az Alzheimer-kór terápiájában alkalmazott szereket használják ezen betegség esetében is (Korczyn és mtsai., 2012). Ilyen gyógyszerek közül két példa a donepezil, mely egy kolinészteráz inhibitor, illetve a memantine, mely egy nem kompetitív N-metil-D-aszpartát receptor antagonist. Mindkét farmakon sikeresnek bizonyult mind az Alzheimer-kór (Howard és mtsai., 2012), mind pedig a vaszkuláris demencia terápiájában (Black és mtsai., 2003; Orgogozo és mtsai., 2002).

2. Célkitűzések

A vaszkuláris demencia a jövőben várhatóan egyre több embert fog érinteni, így egyre nagyobb hangsúly helyeződik majd a gyógyszeres terápia fejlesztésére is. Éppen ezért jelen dolgozatban egy olyan állatmodell kidolgozása volt a cél, amely segítségével a potenciális gyógyszerek tesztelhetők. A modell kidolgozása során a célok a következők voltak:

1. Vaszkuláris demencia modellezése jobb oldali carotis communis elzárással. A műtét következtében fellépő kognitív hanyatlás kimutatása új tárgy felismerési teszt segítségével.
2. A műtét következtében fellépő kognitív hanyatlás javítása két referens anyaggal (donepezil, memantine), melyeket a klinikai gyakorlatban alkalmaznak kognitív képességek javítása érdekében.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Állatok

A műtéthez 200-250 g súlyú, Sprague-Dawley (SPRD) törzsbe tartozó (Charles River eredetű, az Egis Gyógyszergyár Zrt. által tenyésztett), normál fény-sötét ciklusú, hím patkányokat használtam. Az állatok a műtétet követően négyesével ketrecekbe helyezve a kísérleti szobába kerültek (fény ciklus 6:00-18:00, táplálékként standard táp és víz *ad libitum*). A táplálék megvonásra került az új tárgy felismerési tesztet megelőző 24 órában. A viselkedési vizsgálatokat a világos periódusban, sötétített fényviszonyok között végeztem.

3.2 Előkészítés, műtét

A műtét éteres altatásban történt, elszívó fülke alatt.

A nyaki régiónál a bőrt középvonalban bemetszettem, majd csipesszel óvatosan feltártam a vagus ideggel együtt futó közös fejverőeret. Elválasztottam az arteria carotis communis-t az idegtől, majd cérnával két helyen elkötöttem az eret. Ezután összevarrtam a sebet.

Álműtött állatok esetében is minden a leírtaknak megfelelően történt, azonban ekkor a közös fejverőeret nem kötöttem el.

Az állatok véletlenszerűen voltak a műtött, álműtött kategóriákba beosztva.

Közvetlenül műtét után a patkányok átkerültek abba a helyiségbe, ahol egy héttel a műtési procedúrát követően az új tárgy felismerési tesztet végeztem. A műtétet követő naptól kezdve az új tárgy felismerő tesztet megelőző napig az állatokat minden nap simogattam (kézhez szoktatás), így egy hét elteltével a kísérleti dobozba való behelyezés és kivétel nem okoz különösebb stresszt az állatok számára.

Minden kísérletben 8 - 14 db állat alkotta az egyes csoportokat.

3.3 Spontán motoros aktivitás vizsgálat

A műtött és álműtött állatok spontán motoros aktivitásának mérésére speciális kísérleti dobozokat használtam, melyeknek mérete $57 \times 20 \times 28$ cm. A doboz belsejét két párhuzamos infravörös fénysugár keresztezi, melyek a rövidebb oldallal párhuzamosak (a fénysugár kiindulópontja a

doboz sarkától 19 cm-re, 4 cm-es magasságban található). Az állat dobozban való mozgása a fényutak keresztezését eredményezi, a keresztezések száma a számlálóról leolvasható. A keresztezések száma arányos a motoros aktivitás mértékével.

A kísérleti szobában 6 db kísérleti doboz található, melyekbe a műtött és álműtött állatok (7-7 db) véletlenszerű sorrendben kerültek. A patkányok összesen 15 percet töltöttek a dobozokban. A mérés derengő fényben történt.

3.4 Új tárgy felismerési teszt

A kísérlet egy fekete, $70 \times 50 \times 40$ cm méretű forgáccsal kibélelt műanyag dobozban zajlott. A doboz a kísérleti szoba függönnyel elválasztható térrészében foglalt helyet. A doboz feletti kamera összeköttetésben állt a kísérleti szobában található televízióval, ahol a teszt folyamatos kiértékelése zajlott stopperórák segítségével. Felismerendő tárgyként, két háromszög alapú ($8,5 \times 5 \times 14$ cm), és két négyszög alapú ($5 \times 5 \times 14$ cm) fém hasáb szolgált.

A kísérlet előtti napon a patkányok egyenként 150 másodpercet töltöttek a forgáccsal bélelt dobozban, a tárgyak jelenléte nélkül (dobozhoz szoktatás). 24 órával később került sor az új tárgy felismerés tesztre. Mind a dobozhoz szoktatás, mind pedig a teszt (illetve esetlegesen az azt megelőző kezelés) félhomályban zajlott. A teszt során minden patkány két alkalommal találkozott a tárgyakkal (retenciós idő: 30 perc – szakirodalmi adatok alapján az ép kognitív képességű patkány felismeri az új tárgyat ennyi időt követően).

Az első alkalom (1. fázis) során a kísérleti dobozba két egyforma tárgyat helyeztem (vagy két háromszög alapú, vagy két négyszög alapú hasábot). Két stopperrel mértem, pontosan mennyi időt foglalkoznak külön-külön a jobb és a bal oldali tárgy felderítésével. Felderítő tevékenységnek számított, ha a patkány a tárgyat szaglászta, illetve ha közvetlenül megérintette, vagy közelítette úgy, hogy a patkány orra és tekintete a tárgy irányába nézett, és az orrhegye illetve a tárgy közötti távolság nem haladta meg a 1 cm-t. Az állatot kiemelttem a dobozból, amennyiben mindkét tárggyal már legalább 10-10 másodpercet foglalkozott, de maximum 5 perc elteltével.

30 perccel később (2. fázis) az egyik tárgyat kicseréltem egy eltérő tárggyra, és ezen második alkalommal 4 percen keresztül mértem két stopperrel, az új (new - N) és a régi (familiar - F) tárggyal való foglalkozás időtartamát.

A kísérlet során alapos vizes öblítéssel tisztítottam a tárgyakat, hogy az esetlegesen más egyedek által hagyott szagminta ne befolyásolja a következő mérendő állatot.

3.5 Előkezelés során felhasznált anyagok

A kísérletek során két olyan anyagot használtam, melyek a vaszkuláris demencia terápiájában korábban már sikeresnek bizonyultak (Howard és mtsai., 2012). Ezek a Donepezil HCl (eredet: Egis Gyógyszergyár), illetve a Memantine HCl (eredet: Tocris). Ezen anyagokat fiziológiás sóoldatban oldva, különböző dózisokban (donepezil 0,1/0,3/1 mg/kg; memantine 1/3/10 mg/kg), intraperitoneálisan adtam be az állatoknak (beadási térfogat 2 ml/kg, előkezelési idő: 30 perc). (Kontroll-kezelés során tiszta fiziológiás sóoldatot használtam.)

3.6 Statisztikai elemzés

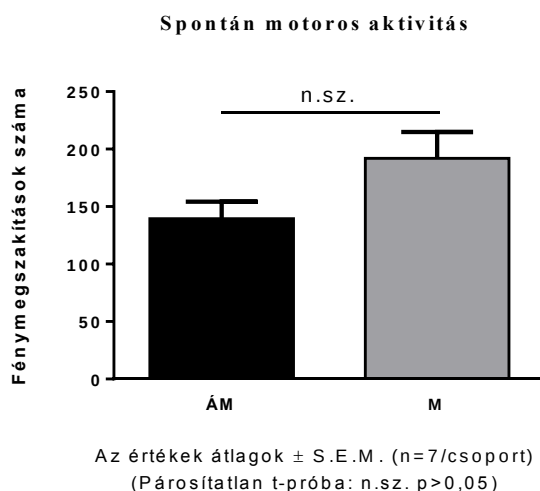
A kiértékeléshez, illetve az ábrákhoz a GraphPad Prism 5.0 programot (GraphPad Prism Inc, San Diego, USA) használtam.

Az új tárgy felismerési teszt során stopperóra segítségével (manuálisan) mértem első fázisban a két azonos (1. Tárgy, 2. Tárgy), majd második fázisban (30 perc elteltével), az új (N) és a régi (F) tárggyal való foglalkozás időtartamát. Ezen értékek statisztikai összehasonlításához kétszemponos variancia analízist (VA), majd Bonferroni tesztet alkalmaztam (explorációs időtartam az 1. és 2. fázisban). További két származtatott értéket is vizsgáltam, az új és régi tárgy explorációs időtartamának különbségét (N-F időtartam), illetve a diszkriminációs indexet (DI), melynek képlete a következő: $DI = (N-F) / (N+F)$. Ezen értékek összehasonlítása két különböző teszt segítségével történt. A fiziológiás sóoldattal kezelt álműtött és műtött csoportokat párosítatlan t-próba, míg a műtött állatokon belül a csak fiziológiás sóoldattal, illetve különböző dózisú gyógyszerekkel kezelt csoportok összehasonlítása, egyszemponos VA, majd azt követő Dunnett teszt segítségével történt.

4. Eredmények

4.1 Spontán motoros aktivitás

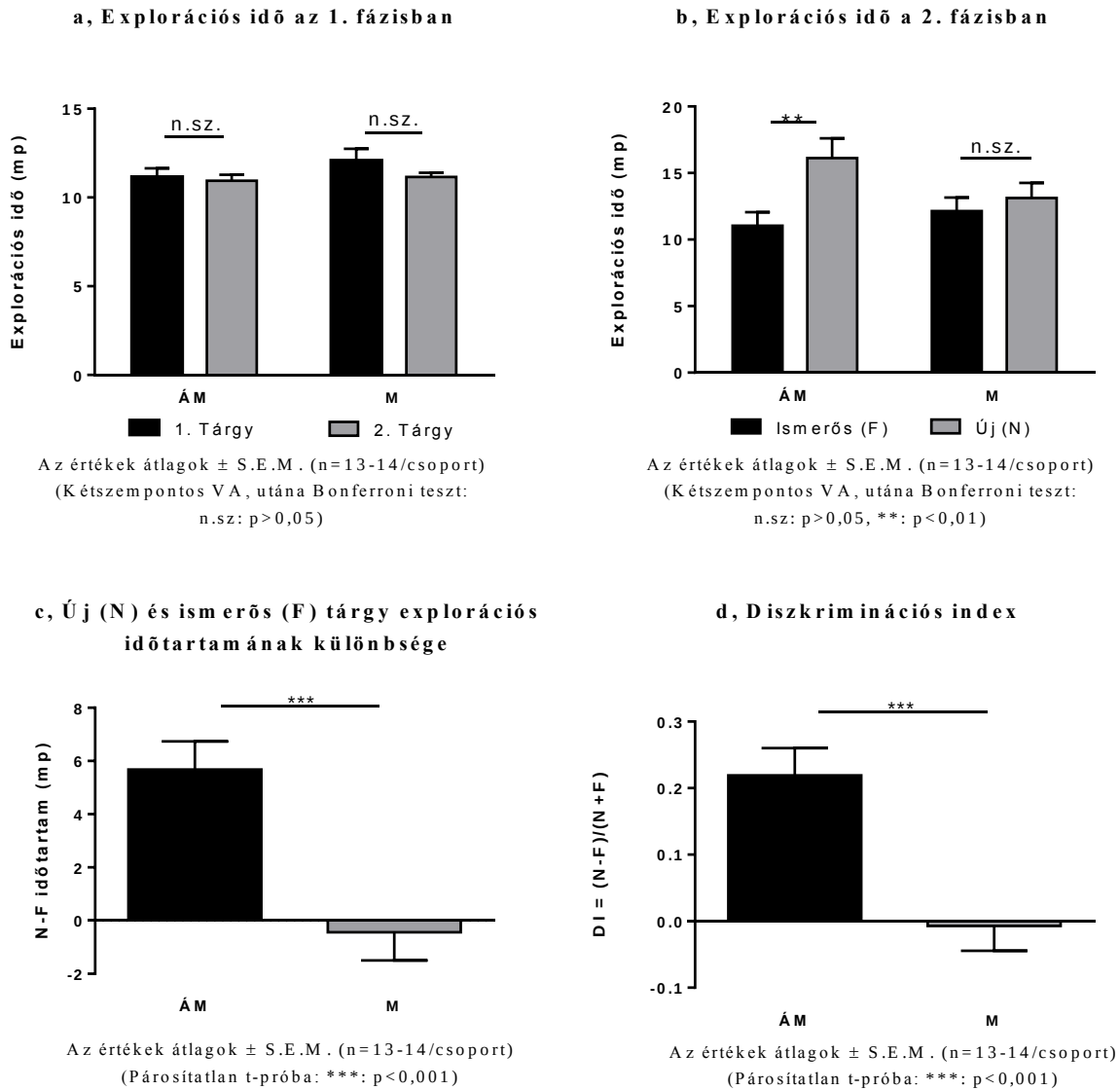
A spontán motoros aktivitást felmérő tesztben a műtött és álműtött csoport között nem volt szignifikáns különbség (1. ábra), azonban a műtött állatok nagyobb mértékű motilitására nézve felfedezhető egy tendencia.



1. ábra: Spontán motoros aktivitás vizsgálata (ÁM=álműtött, M=műtött)

4.2 A közös fejverőér jobb oldali elzárásának hatása az új tárgy felismerési tesztben

Az új tárgy felismerési teszt első fázisában egyik csoport esetében sem volt szignifikáns különbség a két tárgy explorációs időtartamában (2.a ábra). Második fázisban a kontroll csoport esetében az új és a régi tárggyal való foglalkozás időtartama szignifikánsan különbözött (VA, majd Bonferroni poszt teszt $p < 0,01$), műtött állatok esetében nem volt szignifikáns ($p > 0,05$) különbség a két érték között (2.b ábra). A két származtatott érték ugyanezen megfigyelést támasztja alá: mind az N-F időtartam (2.c ábra), mind pedig a diszkriminációs index (2.d ábra) esetében szignifikáns különbség mutatkozott a két csoport között (párosítatlan t-próba, $p < 0,001$).



2. ábra: Új tárgy felismerési teszt jobb oldali közös fejverőér elzárását követően (ÁM=álműtött, M=műtött, n.sz.=nem szignifikáns)

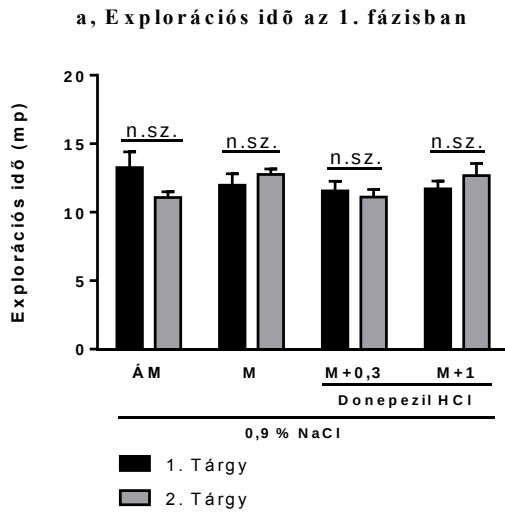
4.3 Donepezil kezelés hatása

Donepezil kezelés hatását két kísérletben vizsgáltuk. Mindkét esetben négy csoportot különítettünk el (fiziológiás sóoldattal előkezelt műtött, álműtött, illetve két eltérő dózisú gyógyszerrel előkezelt műtött).

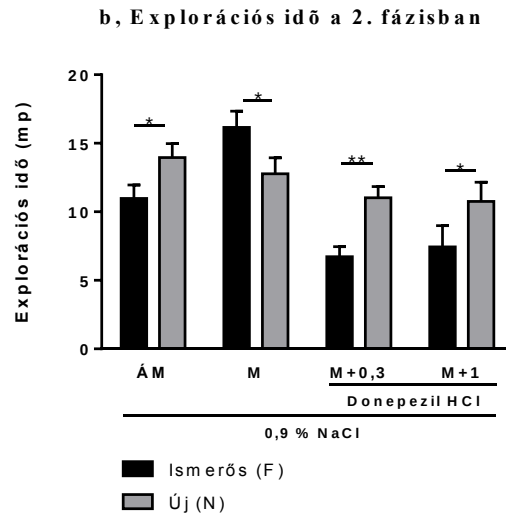
Az első vizsgálat során a donepezilt 0,3 mg/kg illetve 1 mg/kg dózisokban adtam be az

állatoknak. A viselkedési teszt első fázisában egyik csoport esetében sem mutatkozott szignifikáns különbség a két tárggyal való foglalkozás időtartamát tekintve (3.a ábra). Második fázisban (3.b ábra) a fiziológiás sóoldattal kezelt műtött csoport láthatóan többet foglalkozott (kétszemponos VA, majd Bonferroni poszt teszt $p < 0,05$) a már ismerős tárggyal, a másik három csoport felismerte az új tárgyat. Az álműtött, illetve 1 mg/kg dózissal kezelt csoport esetében a statisztikai szignifikanciaszint alacsonyabb ($p < 0,05$), a donepezil 0,3 mg/kg-os dózisban bizonyult a leghatékonyabbnak ($p < 0,01$). Az N-F időtartamokat (3.c ábra) és a diszkriminációs indexeket (3.d ábra) összehasonlítva jelentős különbség látszik a fiziológiás sóoldattal kezelt, álműtött és műtött csoportok között (párosítatlan t-próba, $p < 0,001$). A diszkriminációs index esetében kirajzolódik a 0,3 mg/kg dózisú kezelés kiemelkedő hatékonysága (egyszemponos VA, Dunnett poszt teszt $p < 0,001$), a magasabb dózisú (1mg/kg) gyógyszeres kezeléssel szemben ($p < 0,01$).

A második kísérletben a donepezilt kisebb, 0,1 mg/kg, illetve 0,3 mg/kg dózisokban alkalmaztam. Az első fázis eredménye (4.a ábra) megegyezett az első kísérletben tapasztalttal (nem volt szignifikáns különbség az értékek között). Második fázisban a műtött kontroll csoporton kívül az állatok felismerték az új tárgyat (4.b ábra). Az N-F időtartamokat (4.c ábra), illetve a diszkriminációs indexeket (4.d ábra) ábrázoló grafikonon látszik, hogy a fiziológiás sóoldattal kezelt álműtött és műtött csoport szignifikánsan különbözött egymástól (párosítatlan t-próba: N-F időtartam: $p < 0,001$, diszkriminációs index: $p < 0,0001$), illetve donepezil kezelés az értékek növekedtek a kontroll csoporthoz képest.

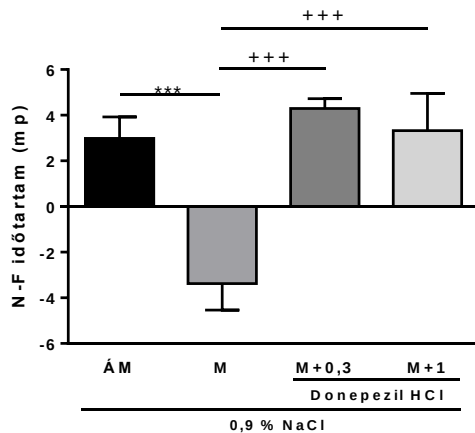


Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=11-12/csoport)
(Kétszemponos VA, utána Bonferroni teszt:
n.sz.: $p > 0,05$)



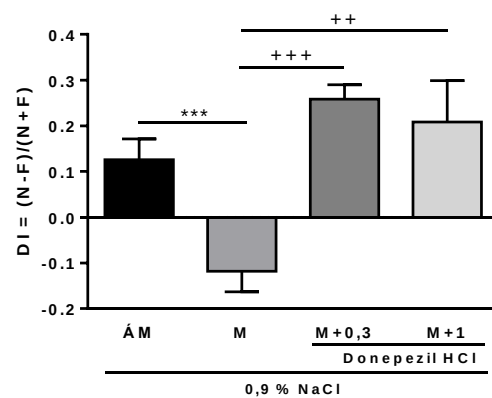
Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=11-12/csoport)
(Kétszemponos VA, utána Bonferroni teszt:
* : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$)

c, Új (N) és ismerős (F) tárgy explorációs időtartamának különbsége



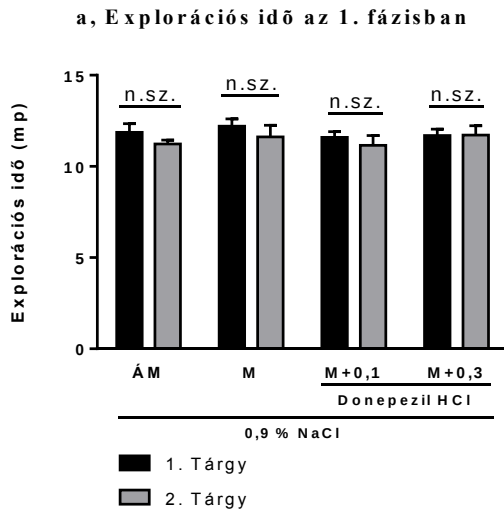
Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=11-12/csoport)
(Párosítatlan t-próba: ***: $p < 0,001$; Egymintás VA,
utána Dunnett teszt: +++: $p < 0,001$)

d, Diszkriminációs index

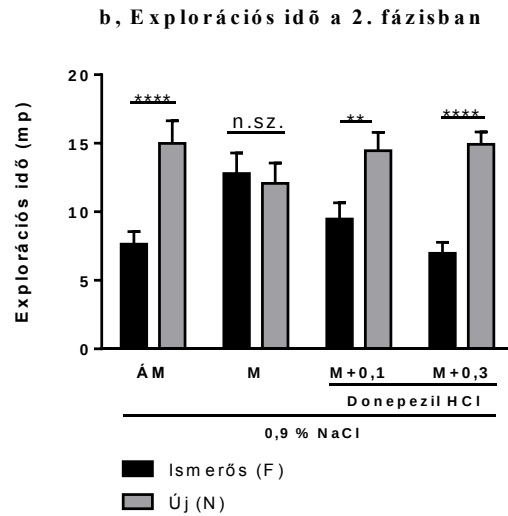


Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=11-12/csoport)
(Párosítatlan t-próba: ***: $p < 0,001$; Egymintás VA,
utána Dunnett teszt: ++: $p < 0,01$, +++: $p < 0,001$)

3. ábra: Új tárgy felismerési teszt jobb oldali közös fejverőér elzárását követően, donepezil előkezeléssel
(ÁM=álműtött, M=műtött, n.sz.=nem szignifikáns M+03=műtött, 03 mg/kg dózisú hatóanyaggal kezelt M+1=műtött, 1 mg/kg dózisú hatóanyaggal kezelt)

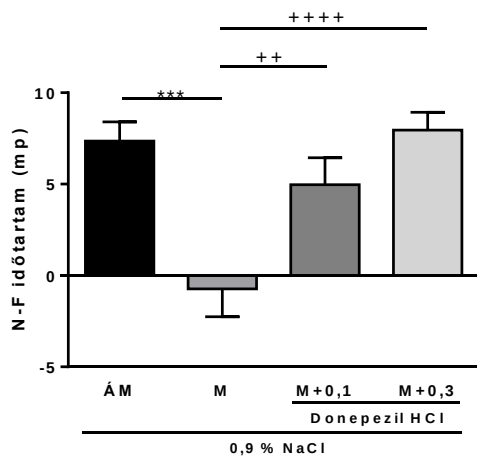


Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=12-14/csoport)
(Kétszemponos VA, utána Bonferroni teszt:
n.sz.: $p > 0,05$)



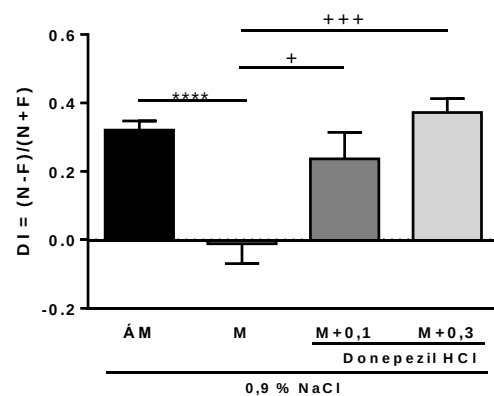
Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=12-14/csoport)
(Kétszemponos VA, utána Bonferroni teszt:
n.sz.: $p > 0,05$, ** : $p < 0,01$, ****: $p < 0,0001$)

c, Új (N) és ismerős (F) tárgy explorációs időtartamának különbsége



Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=12-14/csoport)
(Párosítatlan t-próba: ***: $p < 0,001$; Egymintás VA, utána Dunnett teszt: ++: $p < 0,01$ ++++: $p < 0,0001$)

d, Diszkriminációs index



Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=12-14/csoport)
(Párosítatlan t-próba: ****: $p < 0,0001$; Egymintás VA, utána Dunnett teszt: +: $p < 0,05$, +++: $p < 0,001$)

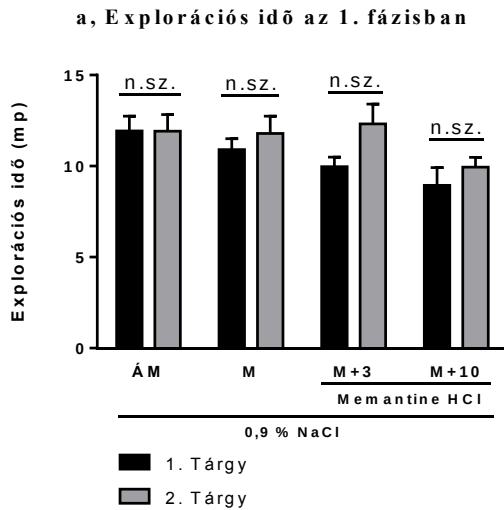
4. ábra: Új tárgy felismerési teszt jobb oldali közös fejverőér elzárását követően, donepezil előkezeléssel
(ÁM=álműtött, M=műtött, n.sz.=nem szignifikáns M+0,1=műtött, 0,1 mg/kg dózisú hatóanyaggal kezelt M+0,3=műtött, 0,3 mg/kg dózisú hatóanyaggal kezelt)

4.4 Memantine kezelés hatása

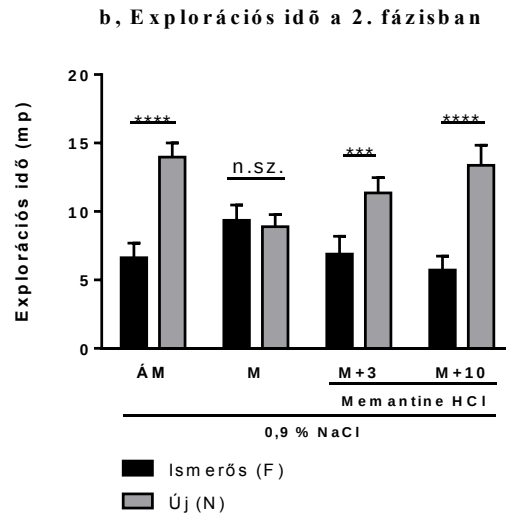
Két kísérletben vizsgáltuk a memantinnal való kezelés hatékonyságát. Ezen anyaggal való kezelés esetében is négy csoportot különítettünk el (fiziológias sóoldattal előkezelt műtött, álműtött, illetve két eltérő dózisu gyógyszerrel előkezelt műtött).

Az első kísérlet során 3 mg/kg, illetve 10 mg/kg dózisu memantine-kezelést alkalmaztam. Az első fázis esetében egyik csoport esetében sem volt szignifikáns különbség az explorációs időtartamok között (5.a ábra). A 30 perccel később elvégzett mérés alapján jól látható a memantine kezelés hatékonysága (5.b ábra). A műtött fiziológias sóoldattal kezelt állatok N illetve F értékei között nem volt szignifikáns különbség, míg a többi csoport tagjai egyértelműen felismerték az új tárgyat. A műtött 10 mg/kg dózisu memantinnal kezelt, és az álműtött csoportok explorációs időtartamok közötti szignifikanciaszintje megegyezik (VA, majd Bonferroni poszt teszt, $p < 0,0001$), illetve a 3 mg/kg dózisu kezelt csoport esetében is szignifikáns különbség mutatkozik a két összehasonlított érték között ($p < 0,001$). Az N-F időtartamok (5.c ábra) és a diszkriminációs indexek (5.d ábra) is ezen megállapításokat támasztják alá.

A második kísérlet során alacsonyabb, 1 mg/kg illetve 3mg/kg memantine dózisokat alkalmaztam. Az első fázis eredménye megegyezik az előző kísérletekkel, vagyis egyik csoportban sem jelentkezett szignifikáns eltérés a két tárgy explorációs időtartamát tekintve (6.a ábra). A második fázisban már nem csak a kontroll, hanem az 1 mg/kg dózisu gyógyszerkezelésben részesülő műtött csoport sem ismerte fel az új tárgyat (6.b ábra). A másik két csoport szignifikánsan több időt töltött az új tárgy felfedezésével (VA, majd Bonferroni poszt teszt, álműtött: $p < 0,01$, 3 mg/kg memantine-előkezelés: $p < 0,0001$). A diszkriminációs indexeket (6.c ábra), illetve az N-F időtartamokat (6.d ábra) ábrázoló grafikonokon is jól látszik, hogy az 1 mg/kg dózisu anyaggal kezelt műtött patkányok explorációs értékei nem térnek el szignifikánsan a műtött, gyógyszerrel nem kezelt csoport értékeitől. Mindkét ábrán látható, hogy az álműtött, és műtött fiziológias sóoldattal kezelt csoportok értékei szignifikánsan különböznek (párosítatlan t-próba, $p < 0,05$). Továbbá ezen grafikonon is kirajzolódik a 3 mg/kg dózisu kezelés hatékonysága (VA, majd Dunnett poszt-teszt, N-F időtartam: $p < 0,0001$; DI: $p < 0,001$).

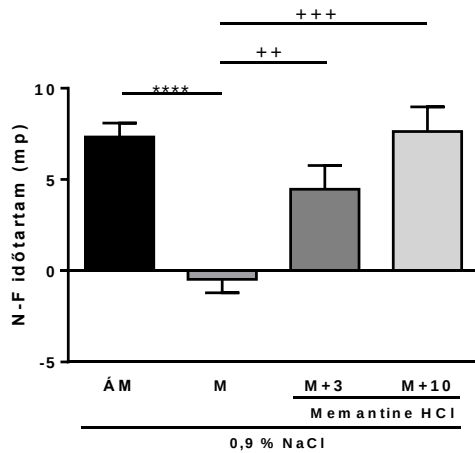


Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=8-9/csoport)
(Kétszemponos VA, utána Bonferroni teszt:
n.sz.: $p > 0,05$)



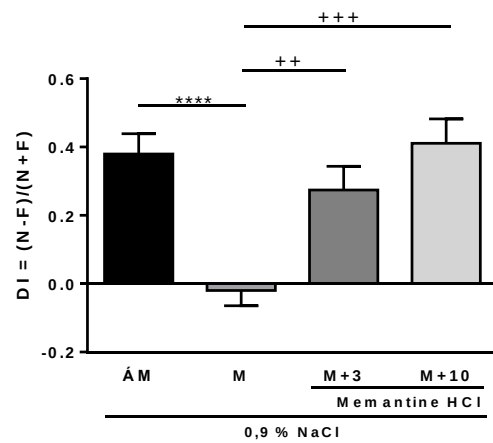
Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=8-9/csoport)
(Kétszemponos VA, utána Bonferroni teszt:
n.sz.: $p > 0,05$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$)

c, Új (N) és ismerős (F) tárgy explorációs időtartamának különbsége



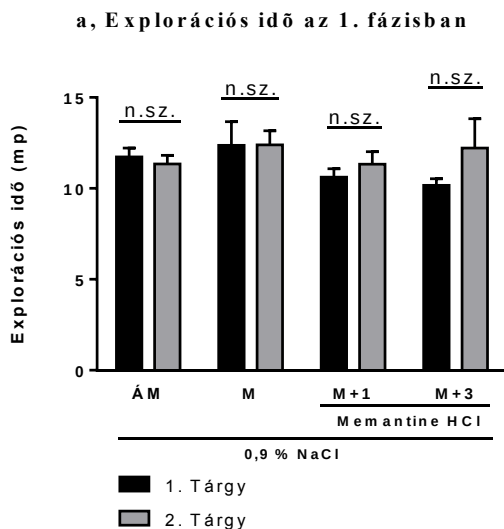
Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=8-9/csoport)
(Párosítatlan t-próba: ****: $p < 0,0001$; Egymintás VA, utána Dunnett teszt: ++: $p < 0,01$ +++: $p < 0,001$)

d, Diszkriminációs index

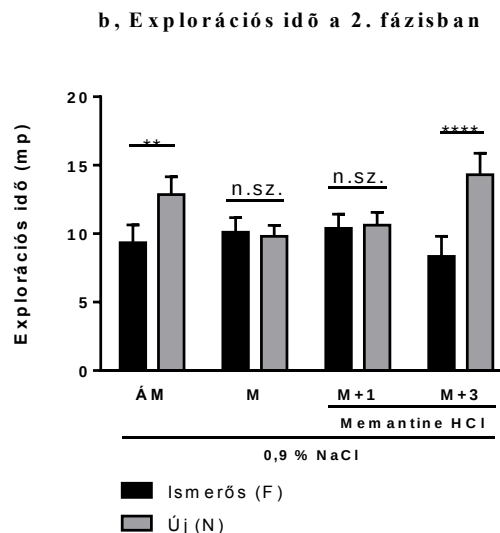


Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=8-9/csoport)
(Párosítatlan t-próba: ****: $p < 0,0001$; Egymintás VA, utána Dunnett teszt: ++: $p < 0,01$ +++: $p < 0,001$)

5. ábra: Új tárgy felismerési teszt jobb oldali közös fejverőér elzárását követően, memantine előkezeléssel
(ÁM=álműtött, M=műtött, n.sz.=nem szignifikáns M+3=műtött, 3 mg/kg dózisú hatóanyaggal kezelt M+10=műtött, 10 mg/kg dózisú hatóanyaggal kezelt)

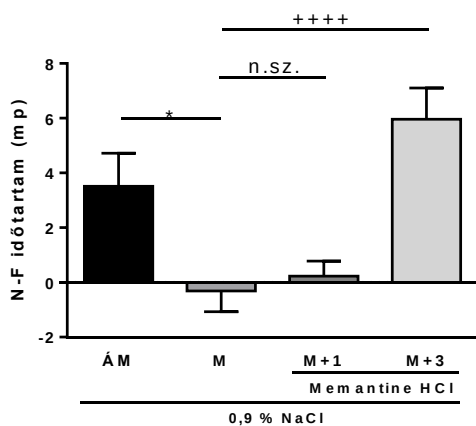


Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=8-9/csoport)
(Kétszemponos VA, utána Bonferroni teszt:
n.sz.: $p > 0,05$)



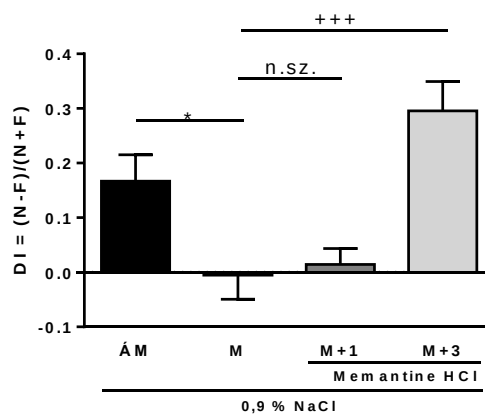
Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=8-9/csoport)
(Kétszemponos VA, utána Bonferroni teszt:
n.sz.: $p > 0,05$, ** : $p < 0,01$, ****: $p < 0,0001$)

c, Új (N) és ismerős (F) tárgy explorációs időtartamának különbsége



Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=8-9/csoport)
(Párosítatlan t-próba: * : $p < 0,05$; Egymintás VA, utána Dunnett teszt: n.sz.: $p > 0,05$ +++++: $P < 0,0001$)

d, Diszkriminációs index



Az értékek átlagok $\pm$ S.E.M. (n=8-9/csoport)
(Párosítatlan t-próba: * : $p > 0,05$; Egymintás VA, utána Dunnett teszt: n.sz.: $p > 0,05$, +++: $p < 0,001$)

6. ábra: Új tárgy felismerési teszt jobb oldali közös fejverőér elzárását követően, memantine előkezeléssel
(ÁM=álműtött, M=műtött, n.sz.=nem szignifikáns M+1=műtött, 1 mg/kg dózisú hatóanyaggal kezelt M+3=műtött, 3 mg/kg dózisú hatóanyaggal kezelt)

5. Diszkusszió

Kísérleteink során egy olyan modell kidolgozása volt a cél, amely alkalmas a potenciális vaszkuláris demencia gyógyszerek tesztelésére. A vaszkuláris demencia patkány-modell létrehozására azt a módszert választottuk, mely során az agyi hipoperfúziót a jobb oldali közös fejverőér elzárása eredményezi (Yoshizaki és mtsai., 2008).

Az első kísérletben mindösszesen két csoportot (műtött, kontroll) különítettünk el, annak megállapítására, hogy a kiválasztott műtét valóban kognitív hanyatlást eredményez-e. A kognitív képességek felmérésére az új tárgy felismerési tesztet választottuk (Ennaceur és Delacour, 1988). A mérés eredménye a vártak megfelelő volt, a műtött állatok a műtét után egy héttel nem tudtak különbséget tenni az új és régi tárgy között, míg a kontroll állatok kognitív funkciói épek voltak, az új tárgy explorációjával szignifikánsan több időt töltöttek ($P < 0,01$).

A műtött állatok esetében az új tárgy felismerési teszt 2. fázisában mért statisztikailag nem különböző explorációs időtartamokat motoros károsodás is eredményezhetné. Ennek kizárására vizsgáltuk a spontán motoros aktivitást. A műtött és álműtött csoportok motoros aktivitása nem mutat szignifikáns eltérést, így a mért értékek valóban a kognitív károsodásnak tulajdoníthatók. Bár az eltérés nem szignifikáns, azonban felfedezhető a műtött állatok hipermotilitásának tendenciája, mely valószínűleg a műtét következménye. Mongol futóegerekben korábban már leírták az agyi ischémia következtében fellépő hipermotilitást (Katsuta és mtsai., 2003).

Következő lépésben két olyan gyógyszer hatását vizsgáltuk a tesztben, amelyek korábban már hatásosnak bizonyultak vaszkuláris demencia terápiájában (Black és mtsai., 2003; Orgogozo és mtsai., 2002). Mind a donepezil, mind a memantine-t 3-3 különböző dózisban alkalmaztuk, összesen négy különböző kísérletben. Mindegyik kísérletben teljesült az alapfeltétel, vagyis az új tárgy felismerési teszt 1. fázisában egyik esetben sem volt szignifikáns különbség a két egyforma tárgy explorációs időtartamát tekintve. Továbbá kritériumként szabtuk a hatóanyag nélküli fiziológiás sóoldattal kezelt műtött és álműtött csoportok szignifikáns statisztikai elkülönülését, ami szintén minden kísérletben teljesült. Mindkét általunk vizsgált hatóanyagról elmondható, hogy megfelelő dózisban képes helyrehozni a féloldali közös fejverőér elzárásának következtében jelentkező kognitív hanyatlást az alkalmazott modellben.

Donepezil esetében a 0,3 mg/kg-os dózis bizonyult a leghatásosabbnak. Ilyen dózisú kezelés

hatására az állatok műtét következtében kialakult kognitív hanyatlása, az álműtött csoporthoz viszonyítva helyreállt, vagy javult. Kisebb (0,1 mg/kg) és nagyobb (1 mg/kg) dózisban csekélyebb mértékű javulást tapasztaltunk.

Memantine kezelés során az 1 mg/kg-os dózis volt a legalacsonyabb, amely nem bizonyult elegendőnek a kognitív funkciójavítás szempontjából (ez a csoport nem ismerte fel második alkalommal az új tárgyat). Nagyobb dózisban alkalmazva a hatóanyagot, egyre inkább nőtt az új, és csökkent az ismerős tárggyal kapcsolatos explorációs időtartam a teszt második fázisában. A 3 mg/kg-os dózis már egyértelműen fokozza a tanulásra való képességet a műtött csoportban, azonban a 10 mg/kg-os dózis esetén még nagyobb a javulás mértéke.

A kísérletek során tehát modelleztük a vaszkuláris demenciát egy olyan módszer segítségével, ahol a modell-állat mortalitási rátája korábbi eredmények alapján nagyon alacsony (Yoshizaki és mtsai., 2008), saját kísérleteink során egyetlen állat sem pusztult el. Bemutattuk, hogy az általunk alkalmazott műtét után valóban tapasztalható kognitív hanyatlás. Ezután donepezil és memantine hatását vizsgáltuk, és bizonyítottuk, hogy ezen anyagokkal helyreállítható a kognitív hanyatlás. Mivel ezen anyagok már korábban hatásosnak bizonyultak vaszkuláris demencia terápiában (Black és mtsai., 2003; Orgogozo és mtsai., 2002), arra következtettünk, hogy a modell jól alkalmazható a potenciális vaszkuláris demencia gyógyszerek tesztelésére.