

SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

A pályázat címe: "A nemi hormonok és neuroszteroidok neuroprotektív szerepe: in vivo és in vitro vizsgálatok."

Nyilvántartási szám: T 043436

Munkacsoportunk már hosszabb idő óta foglalkozik az idegrendszeri plaszticitás egy érdekes és eddig kevésé ismert formájával, a nemi hormonok által kiváltott reverzibilis szinaptikus átrendeződéssel. Kísérletesen igazoltuk, hogy ezek a hormonok nem csupán az egyedfejlődés korai szakaszában játszanak fontos organizáló szerepet, de hatással vannak a felnőtt idegi kapcsolatokra is. Az idegrendszer egyes területein hormonális hatásokra létrejövő szexuálisan dimorf struktúrák következményeként alakulnak ki a nemileg különböző, jellegzetes viselkedésformák, de a nemi különbségeknek van egy kevésbé közismert megnyilvánulása is. Statisztikus adatok világosan bizonyítják, hogy egyes neurológiai és pszichiátriai megbetegedések szignifikánsan eltérő módon érintik a férfiakat és a nőket. Nem csupán az esetszám mutat ilyen különbségeket, de a szimptomák súlyossága és a betegség lefolyása is különbözhet. Ugyanakkor számos megbetegedés jelentkezik ill. súlyosodik nagyobb hormonális változások időszakában (pubertás, szülés, menopauza) Ezek az adatok nyilvánvalóan azt jelzik, hogy oksági összefüggés van a hormonális környezet és ezen betegségek között. Már korábban feltételezték, hogy a hormonális hatások fontos szerepet játszhatnak a neuroprotekciónak és egyre több adat támasztja alá ezt a hipotézist, kimutatták, hogy nemi hormonok jelenléte csökkenti egyes neurodegeneratív betegségek kockázatát, késlelteti kialakulását és súlyosságát, és elősegíti a gyógyulást traumatikus idegrendszeri sérülések után.

Ezen gondolati előzmények alapján T 043436 sz. OTKA pályázatban 2003 és 2006 között elvégzett vizsgálatok célja azon sejt és molekuláris szintű mechanizmusok tanulmányozása volt, melyek az öregedésből ill. agyi sérülésekből adódó morfológiai és funkcionális károsodások enyhítését lehetővé teszik. Ez, a neuroprotekciónak nevezett jelenség, rendkívül komplex és annak háttérében lévő lehetséges sejt- és molekuláris szintű mechanizmusokról mindmáig keveset tudunk, annak ellenére, hogy a kérdésnek fontos klinikai vonatkozásai lehetnek..

Korábbi irodalmi adatokra támaszkodva, többen felvetették, hogy a nemi hormonok közül az ösztrogén játszhat kiemelt szerepet ebben a folyamatban és ezen hipotézis alapján különböző állatmodellekben vizsgáltuk a hormon hatását az idegi károsodást követő folyamatokra.

A neuroprotekciónak kifejezés nem egy egyszerű jelenséget fejez ki, mert az ösztrogén a neuronok funkcióját számos különböző szinten képes befolyásolni. Így pl. közvetlenül befolyásolja a sejtek túlélését, valamint gátolja az axonok és dendritek degenerációját, de fontos az a tény is, hogy morfológiai szinaptikus plaszticitást indukál, ami rendkívül fontos lehet a károsodott idegi kapcsolatok helyreállításában. Molekuláris szinten befolyásolhatja a transzmitterek, receptorok és másodlagos hírvivők szintjét és az átvivőanyagok metabolizmusának funkcionális regulációja ily módon, másodlagosan képes elősegíteni a neuronok túlélését és morfológiai differenciálódását.

Ennek megfelelően a pályázat keretében két irányban végeztünk vizsgálatokat és a kísérletek egyik részében arra kerestünk választ, hogy képes-e az ösztrogén, ill. annak prekürzora a dehidroepiandroszteron (DHEA), protektív hatást kifejteni az idegi sérülés különböző modelljeiben. Ezzel párhuzamosan a szinaptikus reorganizáció jelenségét, az

idegi kapcsolatoknak a hormonszint változása által kiváltott átrendeződését tanulmányoztuk. A pályázatban tervezett vizsgálatok elvégzésekor az idegi sérülés több állatmodelljét alkalmaztuk, ill. dolgoztuk ki.

ERDEMÉNYEK:

1 Az ösztrogén és DHEA protektív hatása az idegi sérülés különböző kísérletes állatmodelljein.

1.1. A neurodegeneráció folyamatát és az idegi sérülést követő regenerációt befolyásoló mechanizmusokat patkány szaglógumóján tanulmányoztuk. Ez az agyszakasz a központi idegrendszer egyik legplasztikusabbnak tekinthető területe és az általunk használt kísérletes modellrendszer lehetővé teszi, hogy a fiziológiás körülmények között folyamatosan lejátszódó szinapszis átrendeződést szinkronizáljuk és így a változásokat könnyebben követhessük.

Hím patkányok szaglóhámját $ZnSO_4$ -el kezelve a primer érzékszervek szinkronizált lézióját értük el, majd immunhisztokémiai és Western blot módszerekkel vizsgáltuk a glomeruláris rétegében lejátszódó szinaptikus degenerációt ill. a reinnerváció folyamatát. Az idegrendszeri sérüléseket követő regenerációs folyamatokban az ösztrogén szerepét már korábban kimutatták (és intenzíven kutatják), ugyanakkor mellékhatásai miatt előtérbe került különböző neuroszteroidok lehetséges terápiás alkalmazása.

Jelen kísérletünkben a dehydroepiandrosteron (DHEA) szerepét tanulmányoztuk. Ez a neuroszteroid a koleszterin – ösztrogén bioszintézis egyik lépésében keletkezik és számos adat mutat arra, hogy befolyásolja a sérülést követő plasztikus idegrendszeri folyamatokat.

Az állatokat 7 nappal a deafferentációt után öltük meg dekapitálással vagy 4%-os paraformaldehid oldattal történő perfúziós fixálással. A GFAP mennyiségi változásait Western blot módszerrel, az asztrocita reakciókat GFAP és vimentin immunhisztokémiai eljárással követtük.

A deafferentáció eredményeként a szaglógumó glomeruláris rétegében reaktív gliózis mutatható ki, ezt a folyamatot jelzi a vimentin immunoreaktív asztrociták megjelenése és a GFAP festődés intenzív növekedése. Az immunhisztokémiai festődés jellegének változását Western blot vizsgálatokkal is igazoltuk. Kimutattuk, hogy mindkét dózisu (10 és 25 mg/kg) krónikus, valamint a magas koncentrációban adott (50 mg/kg) akut DHEA kezelés gátolta a deafferentáció utáni GFAP expresszió növekedést. Az aromataz gátló fadrozol jelenlétében a DHEA kezelés hatástalan volt, a GFAP expresszió nem csökkent.

Következtetés:

Eredményeink azt mutatják, hogy DHEA képes a deafferentációt követő reaktív gliózt csökkenteni és így befolyásolni a szaglógumó glomerulusaiban lejátszódó plasztikus gliális változásokat. A hatás valószínűleg nem közvetlen, mert azt nem maga a neuroszteroid, hanem az abból lokálisan szintetizálódó 17β -ösztradiol mediálja.

Publikáció:

Glia, 48(3): 207-216 (2004)

1.2. A neuroszteroidok lehetséges neuroprotektív hatásának igazolására végzett vizsgálataink során sikerült beállítanunk egy olyan kísérletes modellt, amelynek reprodukálhatósága megfelelő. Ezt alkalmazva igazoltuk, hogy a dehydroepiandrosteron (DHEA) képes kivédeni a hideg lézió hatását.

A kísérletekhez 2-3 hetes hím Wistar patkányokat használtunk. Ketavet/Rompun anesztéziában a koponyán fúrt nyíláson keresztül az elsődleges motoros kéregre 30 mp-re egy 2 mm átmérőjű -70°C -ra hűtött rézhengert helyeztünk. A lézió után egy órával az állatokat dekapitáltuk, az agyakat eltávolítottuk és Vibratommal 400 μm vastag metszeteket készítettünk. A hideg lézió hatását 2,3,5-triphenyltetrazolium kloriddal (TTC) vizualizáltuk, a metszeteket digitalizáltuk és, majd Origin 7.0 és SPSS12 szoftver segítségével meghatároztuk a sérült agyterületet kiterjedését.

Kimutattuk, hogy a lézió mérete szignifikánsabban kisebb azoknál az állatoknál, melyeket a beavatkozás előtt, vagy közvetlen azután dehydroepiandrosteron szulfáttal kezeltünk. Lényeges volt tisztázni, hogy maga a neuroszteroid vagy annak ösztrogénné metabolizálódó formája hatásos. Ezt vizsgálándó, az állatok a konvertáló enzim (aromatáz) gátlószerét, letrazolt kaptak a DHEAS-al együtt. Ezek a kísérletek azt igazolták, hogy a letrazol blokkolja a DHEAS protektív hatását, ami arra utal, hogy a lokálisan szintetizálódó 17β -ösztradiol játszik szerepet a folyamatban.

Következtetés:

Azt a megfigyelésünket, hogy a trauma után alkalmazott neuroszteroid protektív hatása hatékonyabbnak bizonyult, mint az előkezelés, nagyon lényegesnek tartjuk, ennek további vizsgálata feltétlenül indokolt.

Publikáció:

Endocrinology. 147(2):683-6, (2006)

1.3. Tanulmányoztuk a szinapszis szám változással kapcsolatos folyamatokban, a szinaptikus kapcsolatok átrendeződésében, valamint az axon növekedésben és regenerációban szerepet játszó egyik fehérje, a GAP-43 (B-50, F1, pp46, P-57, neuromodulin) expresszióját. A GAP-43 nagy mennyiségben mutatható ki a fejlődő idegrendszerben, de néhány agyterület kivételével a legtöbb neuronban a szinaptogenezis befejeződése után nem (vagy csak nagyon kis mennyiségben) szintetizálódik. Irodalmi adatok szerint a GAP-43 gén expressziója nemi különbségeket mutat. Ezek alapján feltételeztük, hogy a GAP-43 jelenléte a nucleus arcuatusban és a bulbus olfactoriusban egyaránt kapcsolatos az ott megfigyelt plasztikus változásokkal.

A szaglógumó (bulbus olfactorius) jó modell a GAP-43 funkcionális szerepének tanulmányozásához, mivel ezen az agyterületen folyamatos szinaptikus átrendeződés zajlik. Az általunk kidolgozott bulbus olfactorius deafferentációs modellben igazoltuk azt is, hogy a sérülést követő struktúrális reorganizációt a GAP-43 szint növekedése kíséri.

Az általunk kapott eredmények szerint a GAP-43 mennyisége mindkét nemű állatban korfüggő módon csökken. Ezen általános tendencia mellett 30 napos korig a hímekben, az ivarérettség elérése után a nőstényekben találtunk magasabb értékeket. Kimutattuk, hogy a GAP-43 expressziója ciklikus változást mutat intakt nőstény patkányokban, míg ovariektomizált állatokban expressziója megnő 17β -ösztradiol kezelés követően.

Következtetés:

A szinaptikus kapcsolatok átrendezésében szerepet játszó GAP-43 expressziójának 17β -ösztradiol-al való befolyásolhatósága lehetőséget adhat az idegi sérülések utáni reorganizáció folyamatába való terápiás beavatkozásra.

Publikáció:

Clinical Neuroscience, 58: 58 (2005)

1.4. Az átlagéletkor növekedésével az időskori idegrendszeri megbetegedések és azok terápiája egyre fontosabb társadalmi probléma. A korrall járó, egyik legáltalánosabban előforduló idegrendszert érintő megbetegedés a memória funkció zavara, ennek szerkezeti és funkcionális okairól még nagyon hiányosak ismereteink. Ezzel a kérdéskörrel kapcsolatban egy munkahipotézist ill. egy erre épülő állapotmodell tanulmányoztunk. Igazoltuk azt a feltételezésünket, hogy idős patkányok esetében a napi ritmusban kimutatható változások jelezhetik a térbeli memória károsodását. Összefüggést tudtunk kimutatni az alvás/ébredés ritmus zavarai (non-REM alvás fragmentáció) és a térbeli memória teljesítmény között. Fény- és elektronmikroszkópos adataink szerint ezek a kor-függő károsodások az agytörzsi kolinerg rendszerrel függenek össze, degenerálódó neuronokat tudtunk kimutatni a pedunculo pontine tegmental nucleusban (PPT). Morfometriai méréseink azt mutatták, hogy a strukturális változások nem a mag egész területén, csupán annak kaudális részében (PPTp) jelennek meg. A gyenge teljesítményt mutató állatok esetében a PPTp területén csökkent a nagyobb méretű kolinerg neuronok száma és a sejtek károsodására utalt a lipofuscin granulomok mennyiségének növekedése is. A magatartási és morfológiai vizsgálataink mellett molekuláris biológiai méréseket is végeztünk, melyek azt igazolják, hogy a gyenge memória teljesítményt mutató idős patkányok esetében a neurodegenerációban szerepet játszó TGF β -Smad kaskád aktiválódik.

Következtetés:

Az alvás-ébredés ciklussal összefüggő időskori memória zavar általunk leírt patofiziológiai mechanizmusa új terápiás megközelítéseket tehet lehetővé.

Publikáció:

Neurobiol Aging, 27:1848-582, (2006)

2. Az idegi károsodást követő szerkezeti reorganizáció lehetséges mechanizmusai

Az idegrendszeri sérülések utáni funkcionális regenerálódás fontos eleme az, hogy a szöveti károsodást követően milyen mértékben képesek az idegi hálózatok helyreállni. Ebből a szempontból fontos annak vizsgálata, hogy a nemi hormonok, valamint a neuroszteroidok milyen módon befolyásolják a szinapszisok kialakulását és átrendeződését. Számos irodalmi adat, valamint saját vizsgálataink igazolták, hogy az ösztrogén szint változása szinaptikus átrendeződést indukál több hypothalamikus magban és a hippocampus CA1 régiójának tüske szinapszisaiban. Ez a morfológiai szinaptikus plaszticitás funkcionális szempontból nagy jelentőségű, ugyanakkor ellentmondóak azok a közlések, melyek a változásokat kiváltó hormon koncentrációjára vonatkoznak. Felmerült az a lehetőség, hogy a helyben szintetizálódó (így lokálisan magas hormon szintet elérő) ösztrogén szerepe az elsődleges, ennek eldöntésére végeztünk kísérleteket a nucleus arcuatusban.

2.1. Ovariektimizált nőstény patkányokat ösztrogén prekurzorral, dehydroepiandrosteron-nal (DHEA) kezeltünk, majd morfometriai méréseket végeztünk és meghatároztuk a különböző típusú szinapszisok sűrűségét a nucleus arcuatus területén. Postembedding immuncitokémiai festéssel azonosítottuk a GABAerg (gátló) szinapszisokat és ezt követően a számolás a Sterio f. disector módszerrel történt. Megállapítottuk, hogy DHEA kezelés után a neuronokon található GABAerg axo-szomatikus szinapszisok száma szignifikánsan csökkent, a dendro-dendritikus kapcsolatok esetében nem találtunk eltérést, míg az un. tüske szinapszisok sűrűsége növekedett. Ha a DHEA-val egyidőben az állatokat

letrazollal, a 17 β -ösztadiol-t szintetizáló enzim (aromatáz) gátlószerével kezeltük, akkor nem tudtunk kimutatni változást a szinapszisok számában.

Más kísérletekben - korábbi eredményeinket alátámasztva - igazoltuk, hogy ciklizáló nőstény patkányokban az ösztrogén szint fiziológias változása ciklikus szinapszis átrendeződést indukál.

Következtetés:

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a szinaptikus átrendeződés indukálásához nem feltétlenül szükséges magas koncentrációjú ösztrogént a keringésbe juttani, mert a DHEA aromatzálódása lokálisan biztosítja a hatás eléréséhez szükséges hormon szintet. A szinaptikus kapcsolatokban történő változások számos neurodegeneratív és pszichiátriai kórképben játszanak szerepet, így adataink lehetőséget adnak új stratégiák kidolgozására, melyek segíthetik ezen betegségek elleni, minimális idegrendszeri mellékhatással rendelkező hormonalapú gyógyszerek tervezését.

Publikáció:

Neuroscience. 138:977-85, (2006)

Neuroscience. 2006 Dec 7; [Epub ahead of print]

2.2. A regeneráció során fontos szerepet játszhatnak a sérült területre bevándorló sejtek, jelen pályázatban ezen sejtek aktivitásának, valamint magának a neurogenesisnek hormonfüggését tanulmányoztuk.

Kimutattuk, hogy egyes hypothalamikus magvakban a c-fos aktivitás szexuálisan dimorf és nőstény állatokban ciklikus változásokat mutat.

Megvizsgáltuk, hogy a krónikus ösztrogén kezelés befolyásolja-e az ujonnan integrálódó interneuronok túlélését felnőtt nőstény patkányok szaglógumójában. Ovariektomizált patkányokat (250-300 gr) hat napon keresztül szesám olajban oldott 17- β ösztadiollal kezeltünk (i.p., 100 μ g/ 100 g testsúly), majd ezt követően az állatok 8 óra alatt 5 alkalommal kaptak 5-bromo-2-deoxyuridine injekciót (BrdU, i.p., 50 mg/ kg ts.). Huszonegy napos túlélés után a patkányokat perfundáltuk és immunfestést követően meghatároztuk a BrdU-pozitív sejtek számát a járulékos, valamint a fő szaglógumóban. A járulékos szaglógumó szemcsesejt- és gromerlárius rétegében a BrdU-immunoreaktív sejtek száma szignifikánsan alacsonyabb volt a 17- β ösztadiollal kezelt állatokban, a fő szaglógumóban ilyen különbséget nem találtuk.

Következtetés:

Eredményeink azt mutatják, hogy a periglomeruláris és szemcsesejtek azonos módon reagálnak a hormonkezelésre, de a hatás régió-specifikus. A járulékos szaglógumó esetében – amely a feromonok érzékelésében és ilyen módon a szexuális viselkedés szabályozásában játszik szerepet – a 17- β ösztadiol hatására csökken a neurogenesis, míg a szaglórendszer első átkapcsoló állomásának tekinthető fő szaglógumóban ilyen jellegű hormonhatás nem mutatható ki.

Publikáció:

Neuroscience, 124(3): 695-707, (2004)

Neuroscience. 141:1919-24, (2006)

2.3. Kifejlesztettünk és jellemeztünk egy, a krónikus higanymérgezés központi idegrendszeri hatásának tanulmányozására alkalmas állatmodellt.

Publikáció:

Environmental Toxicology and Pharmacology, 19: 785-796, (2005)

A pályázat futamideje alatt az eredeti kísérleti tervet – a kísérleti eredményekhez folyamatosan illeszkedően – néhány ízben módosítottuk, így, egyebek mellett, egyszerűbb, jobban definiálható, és hatékonyabban alkalmazható állatmodellekre tértünk át.

Számos molekula expressziójának hormonhatásra történő változásait is vizsgáltuk, ezek közül a GAP-43, egyes sejtadhéziós molekulák és a kalciumkötő fehérjék esetében kapott eredmények egy részét már publikáltuk.

A pályázat legköltségesebb részét érintő kísérleteket (a szövettényészeteken végzett vizsgálatokat) a költségvetési megszorítások miatt átütemeztük és 2006-tól, egy másik pályázat részbeni támogatásával folytatjuk.

3. Gyakorlati hasznosítás lehetősége:

A klinikai statisztikus adatok mellett számos kísérleti eredmény igazolja a nemi hormonok és neuroszteroidok neuroprotektív tulajdonságát, ennek jelentőségét az is jelzi, hogy néhány molekula esetében a vizsgálatok már eljutottak a klinikai fázisig. Ezt figyelembevéve, nyilvánvaló, hogy a hormonoknak a neurodegeneráció és neuroprotektív molekuláris mechanizmusaira gyakorolt hatásának tanulmányozása során szerzett alapkutatási eredmények innovációs lehetőségei rendkívül fontosak lehetnek. Ilyen szempontból legígéretesebb az a megfigyelésünk, hogy a hideg léziót követő károsodást a sérülést követően adott DHEAS is protektív hatású. Ez a klinikai szempontból döntő fontosságú, ún. "terápiás ablak" kiszélesítését tenné lehetővé, ezért tartjuk indokoltnak a jelenség további vizsgálatát.

A kutatás időtartama alatt tartott előadások (posztterek) száma:	19
Megjelent publikációk száma:	8
A publikációk összesített impakt faktora	
$\Sigma IF_{(2005)}$:	29,45