

Az Alzheimer-kór progressziójának feltárása szorongás, motoros diszfunkció és anyagcsere-változások kölsönhatása révén a 3xTg-AD egérmodellben

Doktori tázis
Szabó Adrienn

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Zelena Dóra DSc, egyetemi tanár, intézetigazgató

Hivatalos bírálók:

Dr. Iring András Ph.D, tudományos főmunkatárs

Dr. Várnainé Dr. Tóth Zsuzsanna Ph.D, tudományos
főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Varga Gábor DSc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Káldi Krisztina DSc, egyetemi tanár

Dr. Helyes Zsuzsanna DSc, egyetemi tanár

Budapest, 2024

1. Bevezetés

Az Alzheimer-kór (AD) a demencia egyik leggyakoribb formája, amely széles körben elterjedt, életkorhoz köthető neurodegeneratív betegség. Világszerte mintegy 50 millió embert érint, és évente hozzávetőlegesen 10 millió új esetet diagnosztizálnak. Klinikai szempontból elsősorban memóriazavarok jellemzik, míg patológiailag az agyban megjelenő béta-amiloid ($A\beta$) plakkokat és hiperfoszforilált tau (p-Tau) fehérje aggregátumok.

A korai diagnózis alapvető fontosságú a betegség előrehaladásának lassítása érdekében, amihez elengedhetetlen a kockázati tényezők és biomarkerek azonosítása. A terápiás lehetőségek azonban mai napig korlátozottak, ezért a preklinikai kutatások folytatása szükséges új gyógyszer célpontok.

A szorongás és a depresszió gyakran társul az AD-hoz (az AD-s betegek 42%-a szenved depresszióban, és 39%-uknál tapasztalható szorongás), ami bonyolítja mind a diagnózist, mind a kezelést. Ezek az állapotok nemcsak komorbiditások, hanem az AD kockázati tényezőiként is szolgálhatnak. Az AD, a szorongás és a depresszió kapcsolatának megértése kulcsfontosságú a komplex kezelési stratégiák kidolgozása szempontjából az életminőség javítása érdekében.

Az olfaktorikus diszfunkció is ígéretes biomarker az AD-ban, amely gyakran már a kognitív hanyatlás előtt jelentkezik.

A motoros zavarokat korábban a betegség késői szakaszában megjelenő tünetként tartották számon, azonban ma már elismert, hogy ezek is megjelenhetnek a korai stádiumban. Kutatások szerint az izomstruktúra változása és az izomerő csökkenése szorosan összefügg az AD fokozott kockázatával. Az izomműködés figyelemmel kísérése így fontos lehet az AD korai felismerésében és kezelésében.

Az anyagcsere-zavarok az AD patológiájának másik kritikus aspektusát képezik. Az összefüggés annyira szoros, hogy az AD-t szokás a 3. típusú cukorbetegséggént is említeni.

Az anyagcsere és energiafelhasználás szabályozásáért felelős hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy (HHP) tengely működési zavarait is megfigyelték AD-s betegeknél.

2. Célkitűzések

Egy állatmodell segítségével (háromszorosan transzgén egér: 3xTg-AD) a komorbiditások és esetleges korai diagnosztikus jelek progresszióját követtük nyomon három kérdéskörre fókuszálva:

- I. A szorongás időbeli megjelenése
- II. A motoros rendszer változásai
- III. Anyagcsere-változások

3. Módszerek

3.1. Állatok

Kísérletinket 3xTg-AD (B6;129-Tg (APP_{SWE} és tau_{P301L}) 1Lfa PSEN1tm1Mpm/Mmjax #034830-JAX) és kontroll (C57Bl6/J) egereken végeztük. Az egereket 3-5 fős csoportokban tartottuk, 12 órás világos-sötét ciklusban (világoskezdet: 22h), ahol a víz és a táplálék *ad libitum* állt a rendelkezésükre, kivéve a táplálék motivált tesztekénél, ahol annyira korlátoztuk a táplálékmennyiséget, amivel az egerek testsúlya a kiindulóérték 90%-án maradt. Ezt a beavatkozást két nappal a kísérlet előtt kezdtük.

A kísérletek az állatvédelmi bizottság engedélyével, az állatkísérletekre vonatkozó irányelvek (2010/63/EU) betartásával történtek (PE/EA/918-7/2019).

3.2. Kísérleti terv

3.2.1. *A veleszületett szorongás időbeli megjelenése*

1. kohorsz: Vizsgáltuk a rókaszag által kiváltott szorongásos viselkedést különböző életkorú egerekben, figyelembe véve a nemek közötti különbségeket. Ebben az esetben minden

korcsoporthoz külön csoportokat használtunk, hogy elkerüljük a rókaszag okozta hosszan tartó traumát.

2. kohorsz: Havi rendszerességgel mértük az általános mozgékonyosság és a szorongás változását nyílt tér teszt (OFT) során 2-11 hónapos kor között.

3. kohorsz: Az érzelmileg releváns agyterületeken (például az amigdalában és a szaglőrendszerben) immunhisztokémiával megerősítettük az A β és p-Tau fokozatos felhalmozódását (2 és 12 hónapos egerek).

3.2.2. Izom-ízületi és kisagyi változások a motoros elváltozások kontextusában

1. kohorsz: Izomerőt mértünk fogáserősségi teszt (grip teszt) segítségével, valamint motoros koordinációt vizsgáltunk a forgórúd (rotarod) teszt során.

2. kohorsz: A térbeli memória mérésének „arany standardjában”, a Morris-féle vízilabirintusban (MWM) a mozgásszervi képességekre helyeztük a hangsúlyt. Ez egy büntetés (víz) elkerülési tanulás-memória teszt.

3. kohorsz: Az állatok egy általános mozgékonytságot mérő nyílt tér teszt után, különböző táplálékmotivált tanulási teszteken vettek részt (jutalomért, azaz pozitív megerősítésért dolgoznak az állatok), majd a viselkedés teszteket követően vér, izom és agyszövetet gyűjtöttünk.

In vitro vizsgáltuk az ízületek szerkezetét, a miosztatin és a follisztatin változásait az izomszövetekben, valamint az apoptotikus és mitokondriális markereket mind az izomban, mind a kisagyban. Tekintettel arra, hogy az intenzív viselkedési tesztelés és a motiváció növelésére alkalmazott éhezés tréningként működhet, az apoptotikus és oxidatív paramétereket összehasonlítottuk a natív és a "tréningezett" kísérleti állatcsoportokban.

3.2.3. *Anyagcsere változások*

Ezt a kísérlet sort az a megfigyelés motiválta, hogy a 3xTg-AD állatok paradox módon jobban teljesítettek, mint a kontrollok a jutalomfalat alapú kognitív tesztekben.

1. kohorsz: A 3.2.2. 2. kohorszában említett táplálék motiválta teszteket (nyolc karú labirintus, pellet elérés, lépcsőteszt) kiegészítettük az operáns kondicionálási tesztel.

2. kohorsz: Metabolikus fenotipizálást végeztünk 4 és 8 hónapos hím egereken. MRI-alapú berendezéssel vizsgáltuk a testösszetételt, és követtük az ételviszét és vízfélvételt, a respiratórikus hányadost és az energiafogyasztást.

In vitro elemeztük a legfontosabb metabolikus vérparamétereket (glükóz, triglicerid, koleszterin és FT3/FT4). Végül PCR-t alkalmaztunk metabolikusan releváns molekulák és receptorok génexpressziójának tanulmányozására a kritikus agyrégiókban.

3.3. Viselkedési Tesztek

3.3.1. *Ragadozó/Predátor Szag Teszt (I./1.)*

Egy átlátszó plexi aréna (43 × 27 × 19 cm) egyik sarkába 2-methyl-thiazoline (2MT)-al átitatott szűrőpapírt helyeztünk és 10 percig végeztük a megfigyelést egy elszívó fülke alatt. Hím egereken széles életkori tartományban (2 hónaptól 18 hónapos korig) vizsgáltuk az öröklött szorongást. Az elemzés során az arénát elkerülési és megközelítési zónákra osztottuk fel, és EthoVision XT 15 szoftverrel az alábbi paramétereket elemeztük ki:

- Megtett út (cm)
- Idő eltöltése a megközelítési zónában (s/m)
- Belépések száma a megközelítési zónába
- Idő eltöltése az elkerülési zónában (s/m)
- Belépések száma az elkerülési zónába
- Idő eltöltése mozdulatlanságban (s).

A nemek közötti különbségek azonosítására 2 és 15 hónapos hím és nőstény egereket használtunk, ahol további viselkedési változókat kézi értékelés alapján, Solomon Coder segítségével értékeltük ki:

- Fagyás (mozdulatlanság)
- Illatkonténer szagolása
- Függőleges mozgás (rearing).

3.3.2. Nyílt Tér Teszt (OFT) (I./2.)

A felfedező tevékenységet és a szorongásra utaló viselkedést közepes fényintenzitás mellett, egy nyílt arénában mértük. Az aréna méretét ($50 \times 45 \times 15$ cm vagy $40 \times 40 \times 30$ cm), színét és szagát havonta változtattuk. Az egereket 2 hónapos kortól 11 hónapos korig minden hónapban az aréna közepére helyeztük, majd 5 percig szabadon felfedezhették a teret; 11 hónapos korban a teszt időtartamát 30 percre növeltük. A fő paraméter a megtett távolság volt, míg az aréna belső 70%-ában eltöltött idő a szorongás indexeként szolgált.

3.3.3. Izomerő: Fogás Teszt (II./1.)

A 6 hónapos hím egerek elülső végtagi szorítóerejét a Pesola Medio-Line 40300 analóg erőmérővel mértük. Az egerek megragadták a rudat, majd lassan hátrafelé húztuk a farkukat. A maximum húzóerőt (g), amikor az egerek elengedték a rudat, rögzítettük. A hibás próbákat kizártuk (pl. csak egy mancs használata, elfordulás). Az eljárást egyenletes, lassú sebességgel végeztük, öt egymást követő mérés történt egyperces szünetekkel, és a mérések átlagával számoltunk.

3.3.4. Motoros Koordináció: Rotarod Teszt (II./1.)

Az egyensúlyt egy 3 cm átmérőjű, csúszásgátló felületű forgó rúdon (IITC Rotarod Series 8) mértük. A rotarod 5 fordulat/perces sebességgel indult, majd 300 másodperc alatt fokozatosan 25 fordulat/percre gyorsult. Az egerek leesését egyéni érzékelő platformok rögzítették. A kísérletet naponta háromszor, öt napon keresztül ismételtük. Az esés késleltetését,

az eséskori sebességet és az esésig megtett távolságot automatikusan mértük.

3.3.5. Nyílt Tér Teszt (OFT) (II./3. és 4.)

A tesztet a 3.3.2. pontban leírtakhoz hasonló módon végeztük és elemeztük, de itt csak 6 hónapos hím egereket vizsgáltunk. Az állatoknak 15 percük volt felfedezni a teret ($40 \times 36 \times 19$ cm).

A 4. kohorsz egereit 2,5 hónapos koruktól kezdve kézhez szoktattuk és környezeti gazdagítást kaptak, hogy csökkentsük a szorongást az OFT előtt. A lokomotoros tevékenységet 6 hónapos korukban teszteltük.

3.3.6. Morris-féle Vízi Labirintus (MWM; II. /2.)

A kísérlethez egy 90 cm átmérőjű, 40 cm magas műanyag medencét használtunk, amelyet csapvízzel töltöttünk fel (24 ± 2 °C) és átláthatatlanná tettünk. A platform (6 cm átmérőjű) az egyik kvadráns közepén helyezkedett el a víz szintje alatt 1 cm-re, kivéve az első tanulási napon, amikor a platform a víz felett volt. Az egereknek 1 perc állt a rendelkezésükre, hogy megtalálják a platformot, ahol 10 másodpercet kellett tölteniük. A tanulási fázis 4 napon át zajlott, 5 körrel naponta, melyek között 30 perc telt el. Az 5. napon a platform eltávolítása után az egerek 1 percig keresték azt, és a megtett távolságot automatikusan rögzítettük Ethovision-nal.

3.3.7. Nyolckarú Labirintus (RAM; II./3.)

Az egereket egy nyolckarú labirintus ($25 \times 7,5 \times 6$ cm (karok), központi rész átmérője: 20 cm) középső részébe helyeztük 10 percre, hogy pelletet gyűjtsenek. Az első napon az egerek megismerték az üres labirintust, majd a második napon minden karba jutalom falatot helyeztünk. Ezt követően egy 5 napos tanulási fázis következett, amelyben három kar tartalmazott jutalom falatot. A 6. napon az üres labirintusban 5 perc alatt megtett távolságot mértük, hogy felmérjük a jutalom által indukált lokomóciót.

3.3.8. Pellet elérési teszt (II./3.)

A kísérlet során az egereket egy háromosztatú, átlátszó plexi dobozban teszteltük, ahol mindegyik kísérleti aréna jobb alsó sarkában egy 5 mm-es rés található. Az első napon a pelleteket közvetlenül a réseknél helyeztük el, majd a következő 5 nap során az állatoknak 5 mm-re kellett elérniük és begyűjteniük a pelleteket. Az egereknek 15 perc állt rendelkezésükre, hogy legfeljebb 15 pelletet gyűjtsenek össze. A kísérlet az összes pelletet begyűjtéséig tartott. A begyűjtött pelletek számát rögzítettük, és a videókat a Solomon Coder segítségével elemeztük, figyelembe véve az evéssel töltött időt.

3.3.9 Lépcső teszt (II./3.)

A lépcső teszt egy validált eszközben zajlott, amely széles indítórekeszből és keskeny folyosóból állt, középen emelvénnyel és mindkét oldalán lépcsőkkel. Az egereknek 15 perc állt rendelkezésükre, hogy pelleteket gyűjtsenek: az első napon az emelvényen, majd a következő 5 napon csak a lépcsőkön. A pelletek számát rögzítettük, és a próbálkozásokat, időtartamokat, valamint a sikeres és sikertelen próbálkozásokat a Solomon Coder segítségével elemeztük.

3.3.10 Operáns kondicionális teszt (III./1.)

A tesztet automatizált operáns kamrában végeztük, két orrnyílással. Az állatok 30 percig szabadon felfedezhették a környezetüket. Az egyik orrnyílásba való benyúlás jutalmat eredményezett, amit egy 25 másodperces időszak követett, amely során a kamra fénye felkapcsolt. A másik orrnyílás helytelen volt, és az ottani válaszokat nem jutalmaztuk, de rögzítettük. A teszt egy habituációs (1. nap) és tanulási (2-5. nap) szakaszból állt. A jutalom preferenciát kiszámítottuk, valamint rögzítettük a jutalmazott válaszok és a helytelen orrnyílásra való benyúlások számát.

3.3.11. In vivo metabolikus mérések (III./2.)

Az állatokat 3 napig akklimatizáltuk a tréningdobozokhoz. Testösszetételüket EchoMRI-700 készülékkel mértük meg. Ezt követően Phenomaster Metabolikus Fenotipizáló Rendszer (TSE Systems GmbH) metabolikus ketreceibe helyeztük őket, ahol 24 órán át rögzítettük a táplálék- és vízfogyasztást. Számításaink között szerepelt a légzéscsere arány (RER) és az energiafelhasználás (EE). Az adatokat háromórás időközönként összegeztük, illetve külön kiértékeljük a sötét és világos ciklusokat.

3.4. Immunhisztokémia (I./3.)

Az egereket ketamin-xilazin oldattal altattuk, majd jéghideg foszfát pufferrel (PBS) és 4%-os paraformaldehiddel (PFA) perfundáltuk. Az agyakat eltávolítást követően egy éjszakán át 4°C-on PFA-ban utófixáltuk, majd 30%-os szacharózoldatban inkubáltuk. Harminc mikrométeres koronális metszeteket készítettünk, amelyeket krioprotektív oldatban - 20°C-on tároltunk.

Festés előtt a megfelelő agyterületeket a Paxinos atlasz alapján választottuk ki. Az amiloid plakkok és hiperfoszforilált tau kimutatásához Ni-DAB alapú peroxidáz immunhisztokémiát alkalmaztunk, és a szakaszokat anti-A β 1–42 és anti-foszfo-Tau antitestekkel inkubáltuk. A másodlagos antitestekkel és avidin-biotin kezeléssel végzett festést követően Nikon mikroszkóppal rögzítettük a jelöléseket.

3.5. Az ízületek szövettani értékelése (II./3.)

A hátsó végtagokat preparálás után háromszor PBS-sel mostuk és abszolút etanol és 40%-os formaldehid 4:1 arányú keverékében fixáltuk. A mintákat 4%-os EDTA oldatban dekalcifikáltuk, majd dehidratálás után paraffinba ágyaztuk. Soros metszeteket készítettünk, amelyek vastagsága 7 μ m volt. Az ízületi porc vastagságát dimetil-metilénkék (DMMB) festéssel határoztuk meg, és a korábbi vizsgálatok alapján egyedi matematikai képlet segítségével elemeztük.

A kollagén rostok elemzéséhez Picrosirius vörös festést alkalmaztunk, amely polarizált fényben megkülönbözteti a vastag (piros) és vékony (zöld) kollagén rostokat. A képeket Olympus Bx53 polarizációs mikroszkóppal rögzítettük, és az elemzést ImageJ programmal végeztük.

3.6. Vér és szérum paraméterek

3.6.1. Vércukorszint és egyéb vérparaméterek (II./3.)

A kísérlet sorozat végén az állatokat 2 órán keresztül éhezettettük, majd a dekapitáció során vércukor-, koleszterin-, triglicerid- és húgysavszinteket mértünk kereskedelmi forgalomban kapható mérőberendezéssel.

3.6.2. Enzimhez kötött immunszorbens vizsgálat (ELISA; II./3.)

A dekapitáció során vérmintákat vettünk, jégre helyeztük, és 4 °C-on 2500 g-n 30 percig centrifugáltuk. A szérumot -20 °C-on tároltuk az elemzésig. A szabad T4 (fT4) és szabad T3 (fT3) szintjét AccuLite ELISA fT3 és fT4 CLIA kittel mértük a gyártó protokollja szerint, a leolvasásokat iMARK™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad) készüléken végeztük. A mintákat két párhuzamosban futtattuk hat standard mellett egy 96 lyukű lemezen, az eredményeket ng/dl-ben adtuk meg.

3.7. Kvantitatív PCR (qPCR) (II./3. és III./3.)

Az egereket dekapitálással áldoztuk fel, majd agyukat, hipofizisüket és gastrocnemius izomzatukat szárazjégen gyorsan lefagyasztottuk, és -80°C-on tároltuk. A kisagyat szárazjégen félbevágtuk. A gastrocnemius izomból és a kisagy egyik feléből teljes RNS-t izoláltunk RNazol® RT segítségével. A kisebb agyterületeket (paraventrikuláris mag (PVN), mediobazális hipotalamusz (MBH)) mikro-punch technikával izoláltuk, majd a PVN, MBH és a hipofízis szöveteiből RNAesy Mini Kit-tel végeztük az RNS-extrakciót.

A reverz transzkripciót a High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit segítségével hajtottuk végre, az RNS tisztaságát és mennyiségét NanoPhotometer NP80-nal mértük. A cDNS-szintézist One Step PCR-rel igazoltuk, és 1,5%-os agarózzgelen DreamTaq Green PCR-rel analizáltuk. A qPCR-t SensiFAST SYBR Lo-ROX Kit-tel, Applied Biosystems QuantStudio 5 rendszeren végeztük, kétszeri párhuzamos reakcióval. Az adatokat "delta-delta Ct" módszerrel, a kontrollcsoportra normalizálva, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ alkalmazásával elemeztük. Referenciagénként glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)-t használtunk.

A primereket Primer-BLAST segítségével terveztük, és a Bio-Science Kft. biztosította.

3.8. Western blot (II./3. és III./3.)

A kisagy másik feléből fehérjéket izoláltunk, és a fehérjelizátumot RIPA pufferral készítettük el, amely proteáz- és foszfatáz-inhibitorokat tartalmazott. A mintákat 2x Laemmli pufferrel kevertük és 95°C-on denaturáltuk. Az így előkészített fehérjéket 15%-os poliakrilamid gélen választottuk szét, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránt 5%-os tejpor oldattal blokkoltuk, majd éjszakán át elsődleges antitestekkel inkubáltuk (pl. caspase3, COX IV, BAX, Bcl-2 és GAPDH). Mosás után 2 órán át másodlagos, peroxidáz-konjugált antitestekkel kezeltük. Az ECL kémilumineszcens reagens segítségével detektáltuk a fehérjéket Li-COR Imaging rendszerrel, és az optikai denzitásokat Image Studio™ szoftverrel elemeztük.

3.9. Statisztikai elemzés

Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában mutattuk be, és GraphPad Prism 6.0-val elemeztük. Két- és háromtényezős, valamint ismételt méréseken alapuló ANOVA-t alkalmaztunk különböző összehasonlításokra (pl. genotípus, nem, életkor). Post hoc elemzéshez Tukey HSD vagy Sidak tesztet, míg

párösszehasonlításokhoz Student t-tesztet vagy Mann-Whitney U-tesztet használtunk. A statisztikai szignifikancia szintje $p < 0,05$ volt. Az ábrákat BioRender, Adobe Affinity Design és Vectorsator Designer szoftverekkel készítettük.

4. Eredmények

4.1 A fokozott veleszületett szorongás időbeli megjelenése

4.1.1. Rókaszag elkerülési viselkedés

A 3xTg-AD egerek jelentősen kevesebbet mozogtak, mint a koruknak megfelelő kontroll egerek, azonban a genotípusok közötti jelentős különbségek csupán 2, 4 és 18 hónapos korban figyelhetők meg. Ezek az egerek több időt töltöttek mozdulatlanul, különösen fiatal és idősebb korukban.

Minden egér elkerülte a róka szagát, de a 3xTg-AD egerek erősebb elkerülési reakciót mutattak, amely szignifikánssá vált a mozgásbeli különbségek korrekciója után.

A 2 hónapos egerek között a 3xTg-AD állatok fokozott szorongást tanúsítottak, nem voltak jelentős nemi különbségek, bár a nőtények egyes mérésekben kifejezettebb változásokat mutattak.

15 hónapos korban a 3xTg-AD egerek kevesebbet mozogtak, ritkábban közelítették meg a róka szagát, több időt töltöttek az elkerülési zónában, és csökkentett szagolási viselkedést mutattak a kontroll egerekhez képest. A nemi különbségek ebben a korban kifejezettebbek voltak, mivel a nőtények kevesebbet mozogtak és több időt töltöttek a szagforrás közelében.

A kombinált elemzés jelentős genotípus-hatásokat tárt fel a legtöbb változóban, és kiemelte az életkor hatását, különösen a megközelítési időre és az elkerülési zónába való belépés gyakoriságára. Ezek az eredmények hangsúlyozzák a 3xTg-AD egerek életkor, nem és genotípus közötti komplex interakciókat.

4.1.2. Nyílt tér teszt

Az ismételt nyílt tér tesztek során megfigyeltük, hogy a 3xTg-AD állatok általában kevesebbet mozogtak, és ez a genotípusbeli különbség különösen kifejezett volt a nőstények esetében. Míg a nőstények minden vizsgált hónapban jelentős genotípusbeli eltérést mutattak, a hímeknél ez 4 hónapos kortól nem volt kimutatható.

A 3xTg-AD egerek kevesebb időt töltöttek az aréna középső részén, és a nőstények, genotípustól függetlenül, kevesebbet tartózkodtak itt, mint a hímek. Szignifikáns különbségek azonban főként a nőstényeknél jelentkeztek, 7 hónapos kortól.

A hímek kezdeti testsúlya magasabb volt, és az életkor előrehaladtával növekedett, stabilizálódva körülbelül 8 hónapos korban. A kontroll csoport hímjei tartósan a legmagasabb testsúlyt mutatták, míg a nőstények közül a kontroll állatok testsúlya maradt a legalacsonyabb. Hat hónapos kortól a 3xTg-AD nőstények testsúlya meghaladta a kontrollokét, míg a hímeknél 7 hónapos kortól a kontrollok testsúlya volt magasabb a transzgenikus állatokénál.

A testsúlynövekedés és a mozgási paraméterek között a hímeknél nem találtunk szignifikáns összefüggést. Ezzel szemben a nőstények esetében szignifikáns korreláció mutatkozott: a kontroll nőstényeknél a testsúly növekedése összefüggött a megtett távolsággal, míg a 3xTg-AD nőstényeknél a középső részben eltöltött idővel.

11 hónapos korban a 3xTg-AD állatok jelentősen kevesebbet mozogtak, és a mozgás mértékét sem a nem, sem az idő nem befolyásolta. A kontroll állatok a 30 perc megfigyelési idő előrehaladtával egyre több időt töltöttek az aréna középső részén, ami a szorongás csökkenését jelezte, míg a 3xTg-AD egerek és a nőstények továbbra is szorongóbbnak bizonyultak.

4.1.3. A patológiai jellegzetességek időbeli megjelenésének immunhisztokémiai igazolása

A Ni-DAB immunhisztokémiai analízis megerősítette az AD hisztológiai jellemzőinek (A β és p-tau) fokozatos felhalmozódását az emlékezet és az érzelemszabályozás szempontjából kulcsfontosságú agyi régiókban, mint például a hippocampusban és az amigdalában. Ezek a lerakódások a két hónapos állatok esetében minimálisak voltak, de egy éves állatoknál jelentősen megnövekedtek, ami az AD patológia időbeli megjelenését és progresszióját hangsúlyozza az agyban.

4.2. A motoros rendszer változásai

4.2.1. Motoros változások viselkedési tesztekben

A fogásteszt szignifikáns izomerő-hiányt mutatott ki a 6 hónapos hím 3xTg-AD egereknél a kontrollokhöz képest, ami a korán kezdődő mozgásszervi károsodásra utal. A rotarod teszttel mért motoros koordinációban viszont nem észleltünk különbséget. A nyílt tér teszt során a 6 hónapos hím 3xTg-AD egerek szignifikánsan kevesebb mozgást mutattak, mint az azonos korú kontrollok, míg ez a különbség csökkent egy olyan csoportban, amelyet 2,5 és 6 hónapos koruk között kézhez szolgáltunk és gazdagított környezetben tartottunk.

További elemzés feltárta, hogy a 3xTg-AD egerek normál mobilitást mutattak negatív környezeti feltételek között, például a Morris-vízi labirintus (MWM) tesztben, ahol normális úszási képességet bizonyítottak. Ezzel szemben, a táplálék iránti motivációval végzett nyolckarú labirintus tesztben a 3xTg-AD egerek fokozottabb mozgást mutattak a kontrollokhöz képest.

Finommotoros tesztek során, ahol a táplálék motivációként szolgált, a transzgén egerek meglepő módon jobb teljesítményt nyújtottak. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a 3xTg-AD egerek csökkent mozgása valószínűleg inkább a fokozott szorongással magyarázható, mint belső motoros károsodással, mivel az élelem motiváló hatása mellett képesek normál vagy akár fokozott aktivitásra is.

4.2.2. Az ízületek szövettani értékelése

A Picrosirius-festés normális porc morfológiát mutatott mind a kontroll, mind a 3xTg-AD egerek térd-, intertarsalis, tarsometatarsalis és interphalangealis ízületeiben, ahol vastagabb kollagénrostok domináltak. A DMMB-festés alapján a hialin porc normál glükózaminoglikán-tartalmat mutatott; enyhe elvékonyodás csak a 3xTg-AD egerek metatarsalis porcában volt észlelhető a kontrollokhoz képest.

4.2.3. Molekuláris szintű változások

A 8 hónapos hím 3xTg-AD egerek gastrocnemius izomzatának molekuláris analízise nem mutatott szignifikáns különbséget a miosztatin, follisztatin, mitokondriális marker (COX4) vagy apoptotikus markerek (BAX és BCL2) mRNS expressziójában a kontrollcsoporthoz képest. Azonban akísérleti z ismételt magatartási tesztelés, amely tréningként is értelmezhető, a follisztatinszint és a BCL2/BAX arány változását eredményezte, ami adaptív válaszreakciókra utalhat az izomfiziológiában.

A kisagy elemzése a 8 hónapos hím 3xTg-AD egerekben emelkedett COX4 mRNS szintet mutatott, ami fokozott mitokondriális aktivitásra utal. A tréning jelentősen csökkentette a BAX mRNS szintjét és növelte a BCL2 mRNS mennyiségét, magasabb BCL2/BAX arányt eredményezve, amely a csökkent apoptózis irányába mutat. A Western blot megerősítette a magasabb COXIV fehérjeszintet a 3xTg-AD egerekben, amit a tréning nem befolyásolt. Az emelkedett BAX fehérje- és hasított kaszpáz-3 szint jelenléte a 3xTg-AD egerekben az apoptotikus folyamatok aktív jelenlétére utal, míg a pro-kaspáz-3 szint csökkent, tréninghatások nélkül.

4.3. Anyagcsere változások

4.3.1. Testösszetétel és anyagcsere-paraméterek változásai

Részletes testösszetétel-elemzés szerint sem a 4, sem a 8 hónapos korban nem mutatkozott szignifikáns testsúlykülönbség a kontroll és a 3xTg-AD egerek között, bár

mindkét csoportban nőtt a testsúly az öregedéssel. Négy hónapos korban a testzsír és a zsírmentes tömeg arányában sem mutatkozott eltérés. Nyolc hónapos korra azonban a 3xTg-AD egerek kevesebb zsírtömeget és magasabb zsírmentes tömeget mutattak, mint a kontrollok. A hidratációs arány mindkét genotípusban növekedett az életkorral, összhangban más vizsgált paraméterekkel, de genotípusfüggő különbség nem jelentkezett.

Az anyagcsere-aktivitás vizsgálata során mindkét genotípusnál jól megfigyelhető volt a rágcsálókra jellemző diurnális ritmus, a sötét fázisban intenzívebb aktivitás mutatkozott, míg a világos fázisban csökkent. Ez a ritmus megjelent az étel- és vízfogyasztásban, valamint a légzőcsere arány (RER) és az energiafelhasználás (EE) mintázataiban is. Az étel- és vízfogyasztás, valamint az RER értékek háromórás bontásban szignifikáns különbségeket mutattak mind a genotípus, mind az életkor függvényében.

Figyelemre méltó, hogy a kontrolloknál az életkor előrehaladtával az RER értékek csökkentek, ami a zsír alapú energiafelhasználás felé tolódást jelez, összhangban a nagyobb testzsírral. Ezzel szemben a transzgenikus egerekben az RER stabil maradt, ami eltérő anyagcsere-mintázatot sugall.

Az életkor előrehaladtával a genotípus hatása kifejezettebbé vált, a 8 hónapos 3xTg-AD egerek 24 óra alatt jelentősen több táplálékot és vizet fogyasztottak, mint a kontrollok. Paradox módon ez a magasabb fogyasztás nem eredményezett szignifikáns különbséget az energiafelhasználásban, amelyre inkább a napszak, az életkor és a genotípus összetett kölcsönhatása volt hatással.

4.3.2. Táplálék-motivált viselkedési tesztek

Az étkezési motivációt értékelő viselkedési tesztek fokozott teljesítményt mutattak ki 3xTg-AD egerekben, amelyet fokozott táplálékfogyasztás és jobb kognitív teljesítmény jellemez az olyan feladatokban, mint az elérési-, a lépcső-, az operáns

kondicionálás- és a nyolckarú labirintus tesztek. Ezek az eredmények a táplálékfelvétellel kapcsolatos megváltozott motivációs és kognitív válaszokra utalnak az AD modellben.

4.3.3. Vércukorszint és egyéb vérparaméterek

A 2 órás éheztetést követően mért koleszterin-, triglicerid- és húgysavszintek nem mutattak szignifikáns eltérést a kontroll és a 3xTg-AD egerek között. Ezzel szemben a transzgenikus egerek alacsonyabb vércukorszintje a glükóz homeosztázisban bekövetkező potenciális metabolikus változásokra utal.

4.3.4. A hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy tengely főbb tényezői

A HHP tengely vizsgálata a 3xTg-AD egerekben a kontrollokhoz képest magasabb tiroxinszintet (fT4), valamint a pajzsmirigyhormonokhoz kapcsolódó gének (TRH, TR β 2, TSH, MCT8, DIO enzimek) megváltozott expresszióját mutatta ki. Ezek az eredmények a pajzsmirigyhormon jelátviteli útvonalak szabályozásának zavarára utalnak, ami potenciálisan hatással lehet a metabolikus és neuroendokrin funkciókra.

4.3.5. A dehidrogén rendszer a hipofízisben és a mediobazális hipotalamuszban

A DIO enzimek mRNS-expressziója a hipofízisben és a MBH-ban régióspecifikus eltéréseket mutatott a 3xTg-AD egerekben, ami a génexpresszió szintjén jelentkező változásokra utal. Ezek a változások hozzájárulhatnak az AD egérmodellben megfigyelt metabolikus eltolódásokhoz és neuroendokrin diszregulációhoz.

4.3.6. A tápanyagfelvételt szabályozó gének expressziója az MBH-ban

Az MBH-ban található tápanyagfelvételt szabályozó gének (POMC, CART, NPY, AgRP) alacsonyabb mRNS-expressziót mutattak a 3xTg-AD egerekben a kontrollokhoz képest. Az orexigén (AgRP, NPY) és anorexigén (POMC, CART) gének összesített elemzése alapján feltételezhető, hogy a transzgen AD

egerekben a táplálékfelvételt gátló tényezők túlsúlyba kerültek. Ez arra utal, hogy a hipotalamusz szerepe a táplálékfelvétel és a metabolikus homeosztázis szabályozásában módosulhat ebben a modellben.

4.4. A tanulmány korlátai

Az egérmodellek széleskörű alkalmazásuk ellenére nem képesek teljes mértékben visszaadni az emberi betegségek összetettségét, és ez különösen igaz az AD-ra. A sporadikus AD modellezése különösen nagy kihívást jelent, mivel a betegség genetikai és környezeti tényezők komplex kölcsönhatásának eredménye, amelyeket nehéz reprodukálni állatmodellekben. Ezzel ellentétben a genetikai eredetű familiáris AD a betegség előfordulásának kevesebb mint 5%-át teszi ki. Humán génmutációk beültetésével azonban lehetőség nyílik a betegség progressziójának nyomon követésére transzgenikus egértörzsekben, mint például a 3xTg-AD egérmodell. Ez az egérmodell három humán mutációt hordoz, amelynek köszönhetően az A β és p-tau progresszióját követhetjük nyomon, elősegítve az AD mechanizmusainak mélyebb megértését.

A kontrollként használt C57Bl/6 törzs ugyanakkor genetikailag eltér a 3xTg-AD modelltől, mivel nem hordozza a transzgenikus kazettát. A pontosabb összehasonlítás érdekében a Kísérleti Orvostudományi Intézet (Budapest) egy új, azonos kazettát tartalmazó kontroll törzset fejlesztett ki, amelynek tesztelése jelenleg is zajlik.

A kis mintaelemszám szintén korlátozza a vizsgálatok lehetőségeit, különösen az AD előrehaladásában részt vevő komplex rendszerek tanulmányozását. Ezenfelül, az mRNS-szintek qPCR-rel történő elemzése nem mindig tükrözi a fehérjék szintjét, mivel a poszttranszlációs módosulások és különféle szabályozó mechanizmusok (például szabályozó RNS-ek, riboszóma hozzáférhetőség és fehérjelebontás) jelentős hatással vannak a fehérjék funkciójára és stabilitására.

5. Konklúzió

5.1. A fokozott veleszületett szorongás időbeli megjelenése

5.1.1. Korai szorongás és az AD patológia kapcsolata

A 3xTg-AD egerek csökkent mobilitást mutattak szorongásos helyzetekben, például ragadozószagok és az nyílt tér tesztnek való kitettség során. Ez inkább fokozott szorongást tükröz, semmint motoros károsodást. A nőstény 3xTg-AD egerek kifejezettebb félelemreakciókat mutattak, ami összhangban van az emberi tulajdonságokkal, ahol a nőknél tapasztalt magasabb szorongásszint figyelhető meg. Ezenkívül nem-specifikus összefüggéseket figyeltek meg a testsúly és a szorongásos viselkedés között, ami arra utal, hogy fiziológiai tényezők befolyásolják a szorongásos megnyilvánulásokat az AD-ban.

Megfigyeltük, hogy a szorongás már két hónapos korban fokozott ezekben az egerekben, párhuzamosan az A β és p-tau felhalmozódásával az érzelmek feldolgozásáért felelős agyi területeken, különösen az amigdalában. Ez az eredmény összhangban van a humán tanulmányokkal, amelyek szerint a szorongás az AD egyik korai tünete lehet, és arra utal, hogy ez a korai szorongás felgyorsíthatja az AD patológiai folyamatát, egy olyan visszacsatolási hurkot létrehozva, amely hozzájárul a betegség súlyosbodásához. Az A β és p-tau lerakódások 12 hónapos korra jelentősen fokozódnak, tükrözve e patológiák progresszív természetét.

5.1.2. Szagláshiány, mint lehetséges biomarker

A szaglászavarok megjelenése szintén a betegség korai szakaszában kezdődik a 3xTg-AD egerekben, amit az A β - és pTau-lerakódások jelentős jelenléte támaszt alá a szaglógumóban és a piriform kéregben. Ez a megfigyelés összhangban áll az emberi adatokkal, amelyek szerint a szaglás romlása előre jelezheti a demenciát és hozzájárulhat a kognitív hanyatláshoz. Az idősebb 3xTg-AD egereknél ugyan szintén

megfigyelhetőek szaglási diszfunkciók, ám ezek nem magyarázzák teljesen a ragadozó szagának elkerülésében mutatkozó csökkenést. Az eltemetett táplálék megtalálásának tesztjét befolyásolhatják a metabolikus és motivációs tényezők, amelyek eltérhetnek a 3xTg-AD modellben, és a szaglási teljesítményt a szexuális motiváció is módosíthatja. A szaglás, a szorongás és az AD patológia közötti bonyolult kapcsolat további vizsgálatokat igényel, hogy pontosabban megértsük ezek kölcsönhatásait és az AD patológia kialakulásában játszott szerepüket.

5.2. A motoros rendszer változásai

5.2.1. Mozgásszervi károsodások és izomerő

A 3xTg-AD egerek esetében jelentős mozgásszervi károsodások figyelhetők meg, azonban ezek mértéke motivációs tényezők által befolyásolható. Ez a megállapítás arra utal, hogy a megfigyelt hipolokomóció főként szorongásos állapotok következménye, amely összhangban van eddigi kutatási eredményeinkkel. Ezen kívül kimutattuk az izomerő csökkenését a 3xTg-AD egerekben, ami megerősíti az AD modellekben korábban megállapított izomsorvadásra vonatkozó eredményeket.

Érdekes módon a rotarod teszt során nem tapasztaltunk jelentős mozgáskoordinációs zavarokat a 3xTg-AD egermodell esetében.

Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy a mozgásszervi hiányosságok mögött összetett, specifikus neurobiológiai útvonalak állhatnak.

5.2.2. Cerebelláris diszfunkciók

A 3xTg-AD egerek kisagyában a Bcl-2/BAX arány jelentős csökkenését figyelhetjük meg, ami a pro-apoptotikus folyamatok fokozott aktivitására utal. Ezen kívül a mitokondriális COXIV fehérje szintjének emelkedése a 3xTg-AD állatok cerebellumában jobb mitokondriális funkciót jelez,

amely valószínűleg kompenzálja a fokozott apoptózist, ezáltal fenntartva a normál motoros egyensúlyt.

A korai AD stádiumában már korábban észlelt mitokondriális anomáliák, amelyek beavatkozással javíthatók, a funkcionális zavarok és degeneráció csökkentésének lehetőségét vetítik előre. Eredményeink azt sugallják, hogy a 3xTg-AD egerek cerebelláris diszfunkciója nem klasszikus motoros koordinációs problémákban nyilvánul meg, hanem összetett interakciók állnak a háttérben.

5.2.3. Fizikai aktivitás és neuroprotekcio

A kísérletben való részvételt fizikai aktivitásként értelmeztük, amely neuroprotektív hatásokat mutatott, különösen a kisagy szintjén. A rendszeres fizikai aktivitás hozzájárul az anti-apoptotikus állapotok fokozódásához, ezzel ellensúlyozva az apoptózist, amely hangsúlyosabbá válik fizikai aktivitás hiányában. E hatások folyamatosan csökkentik a neuropatológiai terheket és a kognitív hanyatlást AD esetén. Továbbá, a fizikai aktivitás előnyei a perifériás rendszerekre is kiterjednek, mint például az izomműködés és a vese teljesítménye.

5.3. Anyagsere változások

5.3.1. Testösszetétel és súlyváltozások

A testzsír mennyisége az életkor előrehaladtával növekszik; azonban a kontroll csoporthoz viszonyítva a 3xTg-AD egerek 8 hónapos korban szignifikánsan alacsonyabb zsírszintet mutattak. Azaz az AD-ral kapcsolatos genetikai faktorok különböző módon befolyásolják a zsírfelhalmozódást a kontroll egerekhez képest, amely összefüggésben állhat a neurodegeneratív folyamatokkal. Ezen túlmenően, a 3xTg-AD egerek alacsonyabb testzsír- és magasabb sovány tömeg fenntartása a metabolikus diszfunkciók mértékére és a tápanyagokkal való gazdálkodás eltérő mechanizmusaira utalhat, amely kihat a betegség progressziójára és a viselkedési fenotípusokra.

5.3.2. *Metabolikus dinamika és HHP tengely*

A metabolikus analízis eredményei azt mutatják, hogy a 3xTg-AD egerek RER értéke stabil marad, míg a kontroll egerek esetében az életkor előrehaladtával megfigyelhető a glükózzal és zsírsavak metabolizmusára való eltolódás. Ez a megfigyelés azt jelzi, hogy a 3xTg-AD egerek metabolikus stratégiája eltér az egészséges kontrolloktól, ami lehetséges alkalmazkodást mutat a metabolikus stresszhez.

A 3xTg-AD egerek megnövekedett táplálék- és vízbevitel, a HHP tengely diszfunkciója, valamint az MBH megváltozott génexpressziója összetett metabolikus adaptációkra utal, amelyek befolyásolhatják a táplálékkereső viselkedést és az energiaháztartást az AD patológiájával összefüggésben.

Ezek a megállapítások hangsúlyozzák a 3xTg-AD egerek szerepét a neurodegeneratív megbetegedések anyagcsere-diszfunkcióinak megértésében, és új irányokat nyitnak a jövőbeni kutatások számára az AD-vel összefüggő metabolikus zavarok feltárására.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

Szabo A, Farkas S, Fazekas CL, Correia P, Chaves T, Sipos E, Makkai B, Torok B, Zelena D. Temporal Appearance of Enhanced Innate Anxiety in Alzheimer Model Mice. *Biomedicine*. 2023;11(2). (IF: 3.9)

Farkas S, **Szabo A**, Torok B, Solyomvari C, Fazekas CL, Banrevi K, Correia P, Chaves T, Zelena D. Ovariectomy-induced hormone deprivation aggravates A β 1-42 deposition in the basolateral amygdala and cholinergic fiber loss in the cortex but not cognitive behavioral symptoms in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:985424. (IF: 5.2)

Varkonyi D, Torok B, Sipos E, Fazekas CL, Banrevi K, Correia P, Chaves T, Farkas S, **Szabo A**, S. Martinez-Bellver, B. Hangya, and D. Zelena. Investigation of Anxiety- and Depressive-like Symptoms in 4- and 8-Month-Old Male Triple Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23(18). (IF: 5.6)

A disszertáció témájától független publikációk

Farkas S, **Szabo A**, Hegyi AE, Torok B, Fazekas CL, Ernszt D, Kovacs T, Zelena D. Estradiol and Estrogen-like Alternative Therapies in Use: The Importance of the Selective and Non-Classical Actions. *Biomedicines.* 2022;10(4). (IF: 4.7)

Fazekas CL, **Szabo A**, Torok B, Banrevi K, Correia P, Chaves T, Daumas S, Zelena D. A New Player in the Hippocampus: A Review on VGLUT3+ Neurons and Their Role in the Regulation of Hippocampal Activity and Behaviour. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2). (IF: 5.6)

Szabo A, Schlett K, Szucs A. Conventional measures of intrinsic excitability are poor estimators of neuronal activity under realistic synaptic inputs. *PLoS Comput Biol.* 2021;17(9):e1009378 (IF: 4.779)

Torok B, Fazekas CL, Szabo A, Zelena D. Epigenetic Modulation of Vasopressin Expression in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17). (IF: 6,208)

Chaves T, Fazekas CL, Horvath K, Correia P, **Szabo A**, Torok B, Banrevi K, Zelena, D. Stress Adaptation and the Brainstem with Focus on Corticotropin-Releasing Hormone. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16). (IF: 6.208)

ΣIF: 42.195