SEMMELWEIS EGYETEM

DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2541.

BAGAMÉRY FRUZSINA

Experimentális és klinikai farmakológia

című program

Programvezető: Dr. Szökő Éva, az MTA doktora, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Tábi Tamás, Ph.D., egyetemi docens

Az Alzheimer-kór és a neuronális inzulin rezisztencia közötti kapcsolat tanulmányozása *in vitro* modellben

Doktori értekezés

Dr. Bagaméry Fruzsina

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Tábi Tamás, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Kanizsainé Dr. Minorics Renáta, PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Kató Erzsébet, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Takácsné Dr. Novák Krisztina, DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Sára, PhD, egyetemi docens
Dr. Ducza Eszter, PhD, egyetemi docens

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke 5
1. Bevezetés 8
1.1 Alzheimer-kór 8
1.2 Az Alzheimer-kór patofiziológiája 8
1.2.1 Neurofibrilláris változások 9
1.2.2 Acetilkolin hipotézis 10
1.2.3 Amyloid hipotézis 10
1.2.3.1 Az APP-t kódoló gén mutációja 11
1.2.3.2 A presenilineket kódoló gének mutációja 11
1.2.3.3 Az apolipoprotein E-t kódoló gén mutációja 13
1.2.3.4 Az amyloid hipotézis limitációi 14
1.2.4 A mitokondrium és oxidatív stressz szerepe Alzheimer-kórban 15
1.2.4.1 Katabolikus, bioenergetikai folyamatok változása Alzheimer-kórban 16
1.2.4.2 Az oxidatív stressz jelentősége a neurodegenerációban 17
1.2.4.3 Mitokondriális dinamika és morfológia változása a diszfunkció hatására 18
1.2.4.4 A kalcium homeosztázis zavara mitokondriális diszfunkció során 18
1.2.5 Az endoplazmás retikulum stressz és a demencia 19
1.2.5.1 Az ER stressz reakciói 19
1.2.5.2 Az ER stressz szenzorai 19
1.2.5.3 Az ER stressz és az Alzheimer-kór 20
1.2.6 A neuroinflammáció Alzheimer-kórban 21
1.2.6.1 A mikrogliák szerepe a gyulladásos folyamatban 21
1.2.6.2 Az asztrociták szerepe a gyulladásos folyamatban 23
1.2.6.3 A neuroinflammáció genetikai háttere 23

1.2.6.4 A szisztémás gyulladás szerepe a mikrogliális aktivációban 24
1.3 A centrális inzulin rezisztencia és Alzheimer-kór kapcsolata..... 25
1.3.1 Inzulin a központi idegrendszerben..... 25
1.3.2 Az inzulin jelátvitel a központi idegrendszerben 26
1.3.2.1 Az inzulin receptor aktiválása 26
1.3.2.2 Az inzulin és az autofágia kapcsolata..... 27
1.3.2.3 Az inzulin antiapoptotikus hatásai..... 27
1.3.2.4 Az inzulin hatása a GSK-3 jelátviteli útvonalra 28
1.3.3 Az inzulin centrális hatásai..... 30
1.3.4 Az inzulin, az inzulin receptor és az inzulin jelátvitel Alzheimer-kórban 30
1.3.4.1 Az inzulin és a Aβ metabolizmus kapcsolata Alzheimer-kórban..... 31
1.3.4.2 A neuroinflammáció és a PI3K-Akt/PKB jelátviteli út Alzheimer-kórban. 31
1.3.4.3 A GSK-3 és az Alzheimer-kór kapcsolata..... 33
1.3.5 Lehetőségek az Alzheimer-kór gyógyszeres kezelésére az inzulin rendszeren keresztül..... 33
1.3.5.1 Inzulin..... 34
1.3.5.2 Szulfonilureák..... 34
1.3.5.3 Metformin..... 34
1.3.5.4 Tiazolidindionok..... 35
1.3.5.5 Glukagon szerű peptid-1 (GLP-1) receptor agonisták..... 35
1.3.5.6 Dipeptidil peptidáz-4 gátlók 36
1.3.6 Összefoglalás..... 36
1.4 A sztreptozotocin 37
1.4.1 Sztreptozotocin indukálta 1-es típusú diabétesz..... 38
1.4.2 Sztreptozotocin indukálta 2-es típusú diabétesz..... 39
1.4.3 A sztreptozotocin intracerebroventrikuláris alkalmazása..... 40

1.4.3.1 Neurokémiai, strukturális és kognitív változások a kezelés hatására 40

1.4.3.2 A vegyület hatása az agyi inzulin jelátvitelre 41

1.4.4 A sztreptozotocin neuronális hatásának vizsgálata *in vitro* kísérletekben 42

2. Célkitűzések 43

3. Módszerek 44

3.1 Anyagok 44

3.2 Sejttenyésztés, differenciálás és kezelés 44

3.3 Reszazurin redukciós életképesség teszt 45

3.4 A laktát-dehidrogenáz enzim felszabadulásának mérése 46

3.5 Western blot analízis 46

3.6 ELISA mérés 46

3.7 Statisztikai elemzés 47

4. Eredmények 48

4.1 A sztreptozotocin hatása nem-differenciált SH-SY5Y sejtekre 48

4.2 Az inzulin citoprotektív hatása szérum csökkentett, illetve sztreptozotocin kezelés indukálta károsodással szemben 51

4.3 Az inzulin hatása a GSK-3 foszforilációra szérum csökkentett táppal és sztreptozotocinnal kezelt nem-differenciált SH-SY5Y sejteken 55

4.4 A sztreptozotocin hatása retinsavval differenciált SH-SY5Y sejtekre 57

4.5 Az inzulin citoprotektív hatása szérum csökkentett, illetve sztreptozotocin kezelés indukálta károsodással szemben retinsavval differenciált SH-SY5Y sejteken 59

4.6 Az inzulin hatása a GSK-3 foszforilációra szérum csökkentett táppal és sztreptozotocinnal kezelt retinsavval differenciált SH-SY5Y sejteken 61

4.7 Az exenatid előkezelés hatása az inzulin-indukálta GSK-3 foszforilációra retinsavval differenciált SH-SY5Y sejteken 62

5. Megbeszélés 64

5.1 A sztreptozotocin hatása a nem-differenciált SH-SY5Y sejtek életképességére .. 65

5.2 A sztreptozotocin hatása a glükóz és inzulin rendszerre nem-differenciált SH-SY5Y sejtek esetében 66

5.3 A sztreptozotocin hatása a retinsavval differenciált SH-SY5Y sejtekre 67

5.4 Az inzulin jelátvitel szerepe a sztreptozotocin hatásában retinsavval differenciált SH-SY5Y sejtekben 68

6. Következtetések 71

7. Összefoglalás 73

8. Summary 74

9. Irodalomjegyzék 75

10. Saját publikációk jegyzéke 97

11. Köszönetnyilvánítás 100

Rövidítések jegyzéke

Akt/PKB: protein kináz B

APOE: apolipoprotein E

APP: amyloid prekurzor protein

ASK1: apoptózis szignál-reguláló kináz 1

ATF6: aktiváló transzkripciós faktor-6

Aβ: β-amyloid

Bad: BH-3 domén

Bcl-2: B sejt limfóma-2

BDNF: agyi eredetű növekedési faktor

BiP: „binding immunoglobulin protein”

cAMP: ciklikus adenozin-monofoszfát

Cdk5: ciklin-dependens kináz

CREB: “cAMP respond element binding”

DLP1: „dynamin-like protein 1”

DMEM/F12: „Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12”

eIF2α: eukarióta iniciációs faktor 2α

ER: endoplazmás retikulum

ERAD: ER asszociált degradáció

FBS: fötális borjú szérum

FoxO: „forkhead box O”

GFAP: gliális fibrilláris savas protein

GLP-1: Glukagon szerű peptid-1

GLUT: glükóz transzporter

GSK-3: glikogén-szintáz kináz

icv: intrecerebroventrikuláris

IDE: inzulin degradáló enzim

IGF-1: Inzulin-szerű növekedési faktor

IL: interleukin

iNOS: indukálható nitrogén-monoxid szintáz

IR: inzulin receptor

IRE1: „inositol-requiring protein 1”

IRS: inzulin receptor szubsztrát

JNK: c-Jun N-terminális kináz

LS: szérum csökkentett táp

LTP: hosszú távú potenciáció

MAPK: mitogén-aktivált protein-kináz

mTORC1: „mammalian target of rapamycin complex 1”

NAD^+: nikotinamid-adenin-dinukleotid

NF-κB: nukleáris faktor-kappa B

NMDA: *N*-metil-D-aszpartát

NO: nitrogén-monoxid

NSC: neuronális őssejt

PBS: foszfáttal pufferelt sóoldat

PERK: pankreatikus ER kináz

PHF: páros helikális filamentum

PI3K: foszfatidilinozitol-3 kináz

PKA: protein kináz A

PS: presenilin

PTB: foszfotirozint kötő

PVDF: polivinilidén-fluorid

ROS: reaktív oxigén gyökök

SAPK: stressz-aktivált protein-kináz

SH2: Src-homológ 2

STZ: sztreptozotocin

TBST: TRIS-szel pufferelt sóoldat

TEMED: tetrametilén-diamin

TK: tirozin kináz

TNF-α: tumor nekrózis faktor-α

TRAF2: tumor-nekrózis-faktor-receptor-asszociált-faktor 2

TREM2: 2-es típusú myeloid sejteken expresszálodó triggering receptor

TRIS: tris-hidroximetil-aminometán

UPR: unfolded protein response

XOD: xantin-oxidáz

1. Bevezetés

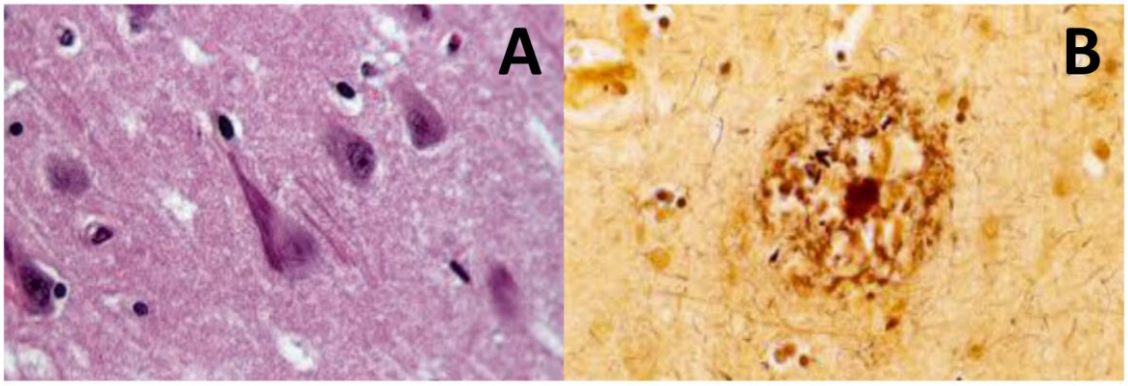
1.1 Alzheimer-kór

Napjainkban a várható élettartam folyamatos növekedése miatt a demencia prevalenciája kiemelkedően magassá vált. Több mint 45 millió embert érint, de 2050-re a becslések szerint ez a szám meg is háromszorozódhat. A demenciának több típusát is ismerjük, de az esetek körülbelül 60-80%-ban Alzheimer-kór fordul elő [1]. Az Alzheimer-kór korai tünetei a feledékenység, időérzék és tájékozódóképesség fokozatos elvesztése, de az idő haladtával a beteg már saját rokonait sem ismeri fel, nem tud magáról gondoskodni, teljes mértékben megváltozik a viselkedése, folyamatos segítségre szorul. Ez a beteg szeretteinek is rettenetes és nagyon megterhelő, főleg a betegség későbbi szakaszában, de a direkt és indirekt költségek miatt a társadalmat is sújtja [1, 2]. Jelenleg nincsen olyan kezelés, ami a betegség progresszióját lassítaná, vagy megállítaná [3]. A rendelkezésre álló terápiával csak időt nyerhetünk a betegnek, „visszaállíthatjuk a kognitív hanyatlás óráját" 6-12 hónappal [4]. Következésképpen nagyon fontos a lehetséges terápiás célpontok kutatása, amihez elengedhetetlen a betegség patofiziológiájának pontos megismerése.

1.2 Az Alzheimer-kór patofiziológiája

Alois Alzheimer 1901-ben találkozott egy 51 éves nőbeteggel, aki viselkedés és memória zavarban szenvedett. Kollégáival nyomon követték a nő állapotát és az évek során rendkívül gyors hanyatlást tapasztaltak a tünetekben. Öt évvel később a nő halála után vizsgálatokat végeztek az agyán és furcsa neurofibrilláris képleteket találtak, amit összefüggésbe hoztak a betegséggel. Ez a kezdeti felfedezés ma már számos információval bővült, így jobban érthetjük ezt a komplex kórképet. Ismert, hogy Alzheimer-kórban protein aggregátumok, azaz intracelluláris neurofibrilláris kötegek [5, 6], illetve extracelluláris szenilis plakkok keletkeznek (1. ábra). Továbbá, többek között a kolinerg neurotranszmisszió diszfunkcióját [7, 8], mitokondriális károsodást [9, 10], oxidatív és endoplazmás retikulum (ER) stressz kialakulását [11-13], emelkedett intracelluláris kalcium szintet [14], neuroinflammatórikus folyamatok felerősödését [15,

16] és a centrális inzulin szenzitivitás romlását is összefüggésbe hozták a betegség kialakulásával [17]. Ezeket a folyamatokat szeretném ismertetni.



1. ábra: **A neurofibrilláris kötegek (A) és szenilis plakkok (B) szerkezete [6]**

1.2.1 Neurofibrilláris változások

Michael Kidd Alzheimer-kórban szenvedő betegek cerebrális cortexből izolált sejtekben páros helikális filamentumokat (PHF) fedezett fel, ami két csavart filamentumból állt [18]. Nagy kihívást jelentett a strukturális komponens azonosítása, többek között rossz oldhatósága, proteáz-ellenállóképessége miatt [19], de 1983-ban Grundke-Iqbal és munkatársai jelentős eredményekre jutottak. Feltételezték, hogy a PHF-ok szerkezeti eleme a tau-protein lehet, illetve, hogy ez a fehérje Alzheimer-kórban jelentősen hiperfoszforilált. A hiperfoszforiláció hátterében protein-kinázok fokozott, illetve foszfatázok csökkent működését valószínűsítették [5]. A tau-protein fontos szerepet játszik az idegsejtek mikrotubulusainak szabályzásában, stabilizálásában [20], úgy, hogy hozzákapcsolódik, illetve leválik a komplexről a foszforiláltsága függvényében [21]. Ugyanakkor, hiperfoszforilált állapotban nem képes a mikrotubulusokhoz kötődni, elveszti funkcióját és aggregátumokat, PHF-kat, neurofibrilláris kötegeket képez, ami károsítja a mikrotubulusokat és idegsejteket [5, 6]. A fehérje számos foszforilációs helyet tartalmaz és oldatban nem alkot feltekeredett struktúrát, így ideális célpont a különböző kinázoknak. Többek között a ciklin-dependens kináz 5 (Cdk5), a glikogén-szintáz kináz 3 (GSK-3), a mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK), és a stressz-aktivált protein-kináz (SAPK) játszik szerepet a foszforilációjában, de magas intracelluláris koncentrációban ön-foszforilációra is hajlamos [6].

1.2.2 Acetilkolin hipotézis

Korábban már felfedezték, hogy Parkinson-betegségben a dopamin neurotranszmitter szintje jelentősen csökken, így számos kutatócsoport vizsgálta, hogy Alzheimer-kórban fennáll-e hasonló elváltozás. Mivel az acetilkolin szerepet játszik a memória kialakulásában, tanulmányozták a kolinerg neurotranszmissziót [6]. Bartus és munkatársai jelentős csökkenést találtak az acetilkolin szintéziséért felelő kolin-acetiltranszferáz aktivitásában olyan egyének agyában, akik Alzheimer-kórban szenvedtek. A mintákat hasonló korú, de ezzel a kórképpel nem diagnosztizált idős betegek mintáival hasonlították össze [22]. Hasonlóan, az acetilkolin-észteráz szintje is jelentős csökkenést mutatott. Az, hogy két fontos kolinerg transzmisszióban szerepet játszó enzim aktivitása csökkent, míg más, pl. a glutaminsav-dekarboxiláz, tirozin-hidroxiláz, monoamin-oxidáz enzimek szintjei nem változtak szelektív neurodegenerációs folyamatra utal [23]. A kolin-acetiltranszferáz és acetilkolin-észteráz aktivitásának legjelentősebb mérséklődését a cerebrális cortexben tapasztalták, ahol a legtöbb neurofibrilláris elváltozás észlelhető [6, 23]. Továbbá megfigyelték a nikotinos acetilkolin receptorok jelentős csökkenését a kortikális agyszövetben. Nordberg és munkatársai a jelenség kialakulását már a betegség korai szakaszában feltételezték és a kognitív hanyatlással is összefüggésbe hozták [24, 25].

1.2.3 Amyloid hipotézis

Az 1980-as években számos kutató dolgozott az amyloid aggregátumok, azaz a szenilis plakkok azonosításán. Ilyen plakkok a neuronokon kívül, extracellulárisan és a cerebrális erekben is megtalálhatók, az utóbbit Down-szindrómás betegek agyában is tapasztalták [6]. Glenner és munkatársai izolálták a képletet, tisztították és meghatározták az aminosav szekvenciáját. A pepidet β-amyloidnak (Aβ) nevezték el [26]. Egy évvel később a munkacsoporttól függetlenül Masters és munkatársai is ugyanerre az eredményre jutottak. Harminckilenc-42 aminosavat azonosítottak az Aβ felépítésében, amik összekapcsolódással, aggregációval létrehozzák a szenilis plakkokat [7, 27]. Később felfedezték, hogy az Aβ egy úgynevezett amyloid prekurzor protein (APP) fragmentuma. Az APP megtalálható a sejtek membránjában és hasítását különféle enzimek végzik. A kódolásáért felelős gén a 21-es kromoszómán található [28]. Az APP nagyjából 700 aminosavból áll és élettani körülmények között nagyon lassan képződik belőle a Aβ

peptid [29]. Ugyanakkor genetikai abnormalitás következtében nagymértékű Aβ felhalmozódás alakulhat ki. Ez a felfedezés vezetett az amyloid hipotézis megalkotásához, miszerint a szenilis plakkok lerakódása az Aβ extracelluláris akkumulációjához vezet, ami így károsítja az idegsejteket és neurofibrilláris kötegek termelődését váltja ki, ami neuronális károsodáshoz és pusztuláshoz vezet. Ezen folyamatok jelentősen hozzájárulnak a demencia kialakulásához [7, 8].

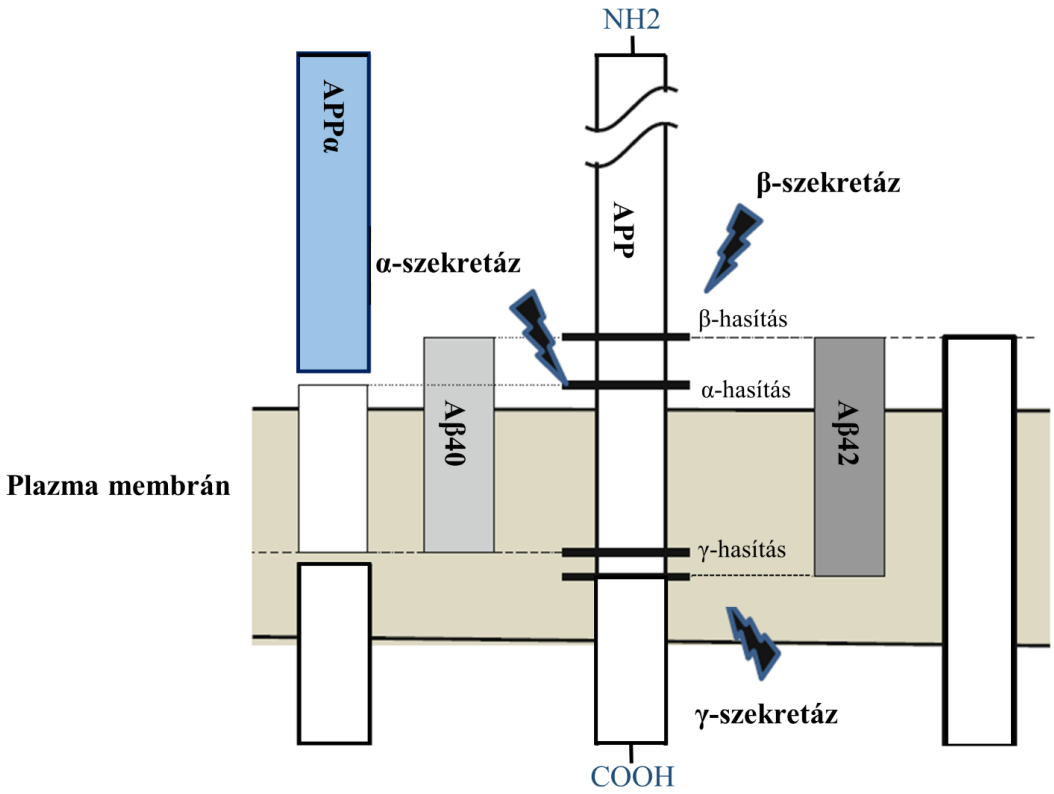
1.2.3.1 Az APP-t kódoló gén mutációja

Megkülönböztetünk időskori sporadikus és familiáris eredetű Alzheimer-kórt, az utóbbi ritkább, a betegek csupán 10%-át érinti, mégis sok kutató vizsgálta milyen genetikai eltérések állnak esetükben a betegség hátterében [6]. Az egyik első jelentős felfedezés az APP gén mutációja volt [30]. A kóros amyloid feldolgozás folyamatának egyik első lépcsőfoka az, hogy az APP-t hasítja a β-szekretáz enzim és ezáltal keletkezik egy nagy, szolubilis ektodomén, illetve egy membránhoz kötött C-terminális egység. A második lépés a γ-szekretáz aktivitásához köthető, ami hasítja az utóbbi fragmentumot, ezzel felszabadítva az Aβ peptidet az extracelluláris miliőbe és a megmaradt APP részt a citoplazmába. Mivel a γ-szekretáz számos helyen képes hasítani, így variábilis hosszúságú Aβ peptidek keletkeznek. Szintén hasítja az APP-t az α-szekretáz, ugyanakkor ez az enzim gátolja a Aβ-képződést eltérő hasítási pozíciója miatt. Az α-, és β-szekretáz verseng az APP hasításért [31] és élettani körülmények között 90%-ban az α-szekretáz hasítja a fehérjét [32]. A folyamatot a *2. ábra* foglalja össze. A betegséghez köthető APP legtöbb mutációja a hasítási helyeken, vagy azoknak közelében történik és a folyamat kedvez a β-, és γ-szekretáz működésének [8]. A keletkező szenilis plakkok nagyrészt 40 (Aβ40), illetve 42 (Aβ42) aminosavból álló Aβ peptidet tartalmaznak. A 42 aminosav tartalmú fragmens különösen hajlamos az aggregálódásra. Hardy és munkatársai felfedezték, hogy az APP mutációja erősen hajlamosít az Aβ42 képződésére, így már fiatal korban is megkezdődhet a progresszió [7].

1.2.3.2 A presenilineket kódoló gének mutációja

A kórképben további gének mutációját is azonosították. A presenilin (PS) 1-et kódoló gén a 14-es, míg a PS 2-t kódoló gén az 1-es kromoszómán található [33]. A familiáris

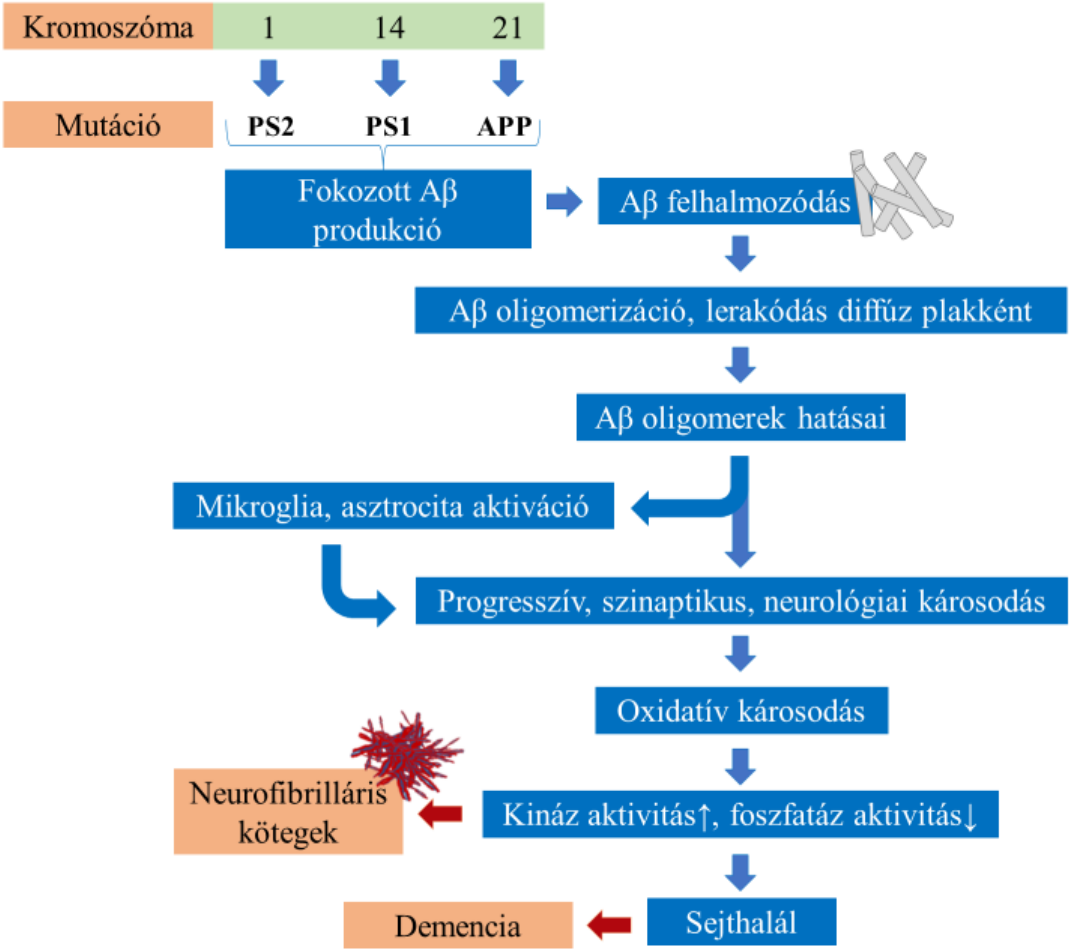
Alzheimer-kór kialakulásának egyik leggyakoribb oka ezen gének mutációja, különösen a PS 1-et kódoló gén fontos, melynek több, mint 130 mutációját ismerjük. A PS-ek fontos alkotóelemei a γ-szekretáz komplexnek [31, 34]. Abban az esetben, ha a PS géneken mutáció történik, megnő a valószínűsége az Aβ42 képződésének.



2. ábra: **Az amyloid prekurzor protein (APP) hasítása. A folyamatot szekretázok végzik. Amennyiben a fehérjét a β-, és γ-szekretáz hasítja, úgy β-amyloid peptidek keletkeznek, amik főként 40 (Aβ40) vagy 42 (Aβ42) aminosavból állnak. Ha az α-szekretáz hasítja a fehérjét, úgy az utóbbi peptidek nem jönnek létre [6].**

Ha az APP-t és PS géneket is érinti genetikai elváltozás a Aβ42 termelődés, oligomerizáció és diffúz plakkok lerakódása nagyon jelentősen megnőhet [35]. Továbbá, az amyloid hipotézis értelmében ezeknek az oligomereknek, plakkoknak jelentős aktiváló hatásuk van a mikrogliákra, asztrocitákra. Aktiválódik a komplement rendszer, gyulladásos citokinek, nitrogén-monoxid (NO), reaktív oxigén gyökök (ROS) szabadulnak fel. Ezen folyamatok és az Aβ oligomerek szintjének növekedése progresszív szinaptikus és neuronális károsodáshoz vezet. Megváltozik az idegsejtek ion homeosztázisa, oxidatív stressz alakul ki. Szintén változás következik be a kinázok,

foszfatázok aktivitásában, ami neurofibrilláris kötegek képződéséhez vezet. A kaszkád végeredményeként bekövetkezik az idegsejtek apoptózisa, ami az Alzheimer-kór tüneteinek fokozatos megjelenéséhez vezet (3. ábra).



3. ábra: **Összefoglaló ábra az amyloid kaszkád hipotézis lépéseiről Hardy és munkatársai munkája alapján [7]**

1.2.3.3 Az apolipoprotein E-t kódoló gén mutációja

A sporadikus Alzheimer-kór legjelentősebb rizikófaktora az időskor, 65 év alatt nagyon ritkán alakul kis a betegség. Egy másik nagyon gyakori tényező a késői kórképben az apolipoprotein E (APOE) E4-es alléljának (APOE4) jelenléte [36]. A populációban az APOE legyakoribb izoformái az E2, E3 és E4. Mindhárom izoforma hozzájárul az Aβ peptidek aggregációjához, mégis legjelentősebb hatása az APOE4 típusnak van az idegsejtekben és a cerebrális erekben is [37]. Az Aβ peptidek klírensze receptor-mediált módon történik, felmerült, hogy az APOE4 hordozóknál ez a mechanizmus sem működik

megfelelően, ami szintén hozzájárul a fokozott akkumulációhoz [38]. Továbbá a fehérjét a gyulladásos folyamatok felerősítésével is összefüggésbe hozták [32].

1.2.3.4 Az amyloid hipotézis limitációi

Az amyloid hipotézis évekig az Alzheimer-kór kutatásának alapjául szolgált, mégis az utóbbi években számos pontja megkérdőjeleződött.

Egy tanulmányban genetikailag módosított egerek agyában szenilis plakkok képződtek, ugyanakkor a kísérleti állatok központi idegrendszerében nem keletkeztek neurofibrilláris kötegek, illetve az idegsejtek apoptózisa sem következett be. Ez a felfedezés arra utalt, hogy az amyloid aggregátumok helyett az Aβ oligomerek fejtenek ki citotoxicitást [39].

Több vizsgálat arról számolt be, hogy egészséges, nem demens betegek agyában találtak amyloid lerakódásokat, míg Alzheimer-kórban szenvedő egyének agyában nem. Továbbá idős, de demenciában nem szenvedő betegek központi idegrendszerében jelentős mennyiségű szenilis plakk jelenlétét tapasztalták, ami összemérhető volt demens betegek eredményeivel [40-42].

Az is felmerült, hogy az Aβ42 termelődés és aggregáció mellett jelentősebb probléma az APP metabolizmusa során keletkező APP-C-terminális fragmentum. Többek között ezt a peptidet összefüggésbe hozzák a ciklikus adenozin-monofoszfát (cAMP) hidrolízisének fokozódásával, ami a cAMP/protein kináz A (PKA)/“cAMP respond element binding” (CREB) útvonal diszfunkciójához és neuronális károsodáshoz vezethet [32].

Összességében a legújabb irodalmi adatok alapján az Aβ lerakódások valószínűleg szükségesek, de nem elegendők az Alzheimer-kór kialakulásához, ugyanakkor a neurofibrilláris elváltozások jelentősebb mértékben járulnak hozzá a kognitív hanyatláshoz [43-45]. A tau-fehérje patológiás változásának fokozódása természetes következménye az idősödésnek, mégis elképzelhető, hogy ezt fokozzák az amyloid folyamatok. Fontos kiemelni, hogy a feltételezés mögött neuropatológiai és nem biokémiai vizsgáltok állnak [46-48].

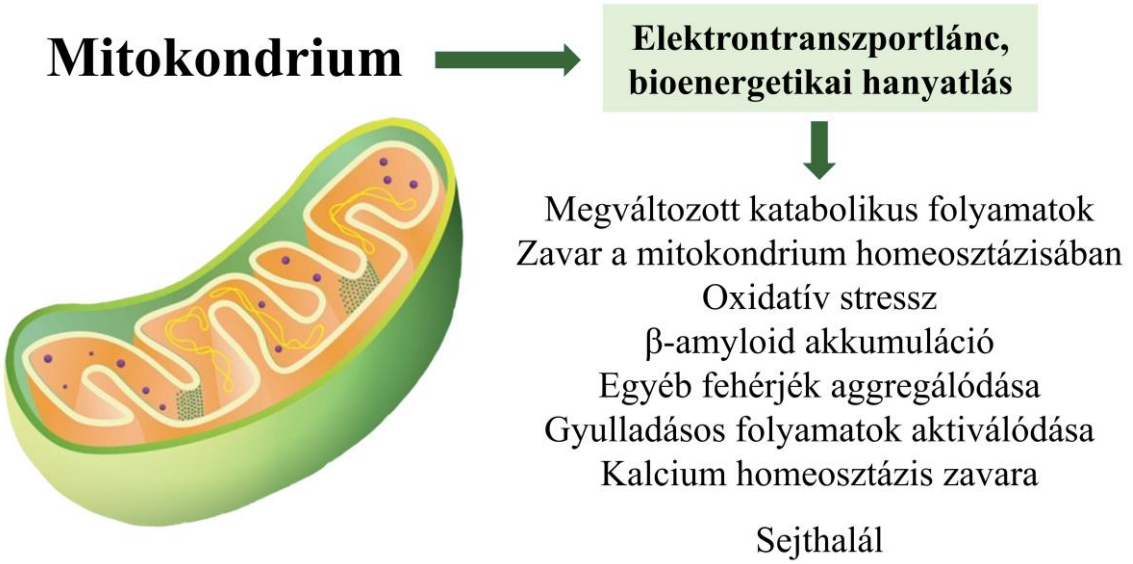
Egy másik evidencia, ami cáfolja, hogy az Aβ termelődés vezető tényező a betegség kialakulásában, hogy familiáris Alzheimer-kórban a betegek már születésüktől kezdve nagyobb mennyiségben termelik a kóros peptidet, mégis sok évnek kell eltelnie, hogy

megjelenjenek a tünetek. Ez önmagában nem zárja ki, hogy az Aβ citotoxikus hatású, de valószínűsíti, hogy egyéb folyamatok is szükségesek a neurodegenerációhoz [49]. Az amyloid hipotézis elleni egyik legnehezebben feloldható érv az, hogy egészséges egyének agyában is találtak szenilis plakkokat [40, 50], bár ez magyarázható azzal, hogy a Aβ-indukálta károsodáshoz idő kell. Ezen kívül biomarker vizsgálatok arra utalnak, hogy ezeknél az egyéneknél a demencia nagyjából négyszer valószínűbben kialakul, mint akiknél nem találhatók szenilis plakkok [51, 52]. Az is felmerült, hogy a kóros peptid jelenlétében a kognitív hanyatlás nagyobb mértékű és az agyi glukóz metabolizmus is rosszabb [53].

Annak ellenére, hogy a neurofibrilláris kötegek jelenlétét fontosabbnak tartják a tünetek kialakulásában, mégis találtak egyének agyában tau kötegeket normális kognitív funkció mellett. Ebből a tanulmányból arra lehet következtetni, hogy a tau-fehérje patológiás elváltozása sem elég egyedül ahhoz, hogy kialakuljon az Alzheimer-kór [54]. Azoknál a betegeknél, ahol mindkét típusú lerakódás észlelhető, ott valóban neurodegeneratív folyamatok játszódnak le az agy különböző területein, beleértve a hippocampust [55, 56]. Patológiai evidencia utal arra is, hogy az amyloid változások súlyossága korrelál a neurofibrilláris kötegek kialakulásának mértékével [46], így a neuronális apoptózissal és demencia stádiumával. Ugyanakkor, mindenképpen fontos kiemelni azt a korábban is említett tényt, hogy ahhoz, hogy kialakuljon Alzheimer-kór számos további folyamat járul hozzá. Ilyen nagyon fontos tényező például a központi idegrendszerben kialakuló mitokondriális károsodás, oxidatív stressz és gyulladásos mechanizmusok [49].

1.2.4 A mitokondrium és oxidatív stressz szerepe Alzheimer-kórban

Számos tanulmány utalt arra, hogy Alzheimer-kórban fontos biokémiai folyamatokban alakul ki diszfunkció, például a mitokondriális működésben [57, 58]. Érdekes, hogy ezek a változások függetlennek mutatkoznak az amyloid plakkok, vagy neurofibrilláris kötegek jelenlététől [59, 60]. Ez a felfedezés megalapozott egy új teóriát az Alzheimer-kór patomechanizmusában. A mitokondriális kaszkád hipotézis (4. ábra) értelmében az organellum károsodása már a betegség nagyon korai szakaszában kialakul és az egész neurodegeneratív folyamat és progresszió hajtóereje lehet [10].



4. ábra: **A mitokondriális kaszkád hipotézis Swerdlow és Khan munkássága alapján [10]**

1.2.4.1 Katabolikus, bioenergetikai folyamatok változása Alzheimer-kórban

Alzheimer-kórban kimutatták, hogy a katabolikus folyamatokban a glikolízisben, Krebs ciklusban jelentős csökkenés tapasztalható. Csökken elsősorban a piruvát-dehidrogenáz komplex, α-ketoglutarát-dehidrogenáz komplex és a mitokondriális elektrontranszportlánc enzimeinek, például a szukkcinát-dehidrogenáz (II. komplex) aktivitása [61]. Ezek jellemző változások Alzheimer kórban, de más neurodegeneratív betegségekben is bekövetkezhetnek [57]. A IV. komplex, azaz citokróm-oxidáz aktivitásában is kimutattak változásokat, aminek hátterében oxidatív foszforilációs alegységek génjeinek mutációja feltételezhető. Az irodalomban kérdéses, hogy az I-III. komplex aktivitása változik-e a betegségben, a II. komplex működésének csökkenése valószínűsíthető, ugyanakkor a IV. komplex esetében ez bizonyított [61]. Továbbá azt is leírták, hogy a teljes komplex rendszer organizálódása is zavart szenved Alzheimer-kórban, konformációs változások következnek be, ami hozzájárul a diszfunkcióhoz [62]. Számos vizsgálat kimutatta, hogy a bioenergetikai zavarok hozzájárulnak az Aβ és tau-protein aggregációjához, illetve amennyiben a lerakódások jelen vannak a bioenergetikai hanyatlás még nagyobb mértékű [63]. PC12 patkány pheochromocytoma sejteket Aβ peptid különböző koncentrációjával kezeltek és az elektrontranszportlánc funkcióvesztést tapasztaltak a glikolízis és az ATP képződés csökkenése mellett [64]. A Aβ szerepét más

vizsgálatban is igazolták. Cardoso és munkatársai Aβ-ot adtak humán neuronális NT2 sejtek tápoldatához, ami sejthalált eredményezett. Ha olyan NT2 sejteket kezeltek, amelyeknél depletálták a mitokondriális DNS-t, így azok nem termeltek kulcsfontosságú légzési lánc komponenseket, az Aβ nem váltott ki citotoxicitást. Eredményeikből következik, hogy a mitokondrium általánosan hozzájárul a sejthalálhoz, továbbá, hogy az Aβ-indukálta károsodás az elektrontranszportlánc csökkent működésével függ össze [9]. Több vizsgálat azt is igazolta, hogy az Aβ képes penetrálni a sejtmembránon át, de átjut a mitokondrium külső és belső membránján is. A mechanizmus nem teljesen tisztázott, de valószínűsíthetőleg transzlokáz enzimek segítségével zajlik a folyamat [63]. Feltételezték, hogy ezen transzlokázok egyes altípusait gátolni is tudják a kóros peptidek és ezzel csökken a IV. komplex alkotóelemeinek mitokondriális felvétele is [57].

1.2.4.2 Az oxidatív stressz jelentősége a neurodegenerációban

Alzheimer-kórban szenvedő betegeknél és kapcsolódó állat modellekben is igazoltak jelentős oxidatív stressz kialakulását. A folyamatért számos tényező, többek között az amyloid és tau-protein aggregátumok, gyulladásos folyamatok is felelnek, de az egyik legjelentősebb ROS forrás a mitokondrium. A mitokondriális diszfunkció során a citokróm-oxidáz működésében bekövetkező károsodás fokozza a ROS termelődést és csökkenti az energiaraktárakat. A mitokondriális szuperoxid-dizmutáz védi a mitokondriumot az oxidatív stressztől. APP/PS1 transzgénikus egerekben az enzim inaktiválódását tapasztalták, ami tovább ronthatja a sejtek oxidatív státuszát. Több vizsgálat is arra következtetett, hogy a ROS termelődés elsősorban a mitokondriális károsodás során, különösön az elektrontranszportlánc diszfunkciója révén fokozódik [11].

Korábban már említésre került, hogy az Aβ felhalmozódás nem feltétele a mitokondriális károsodásnak, de nagy mértékben fokozza azt. A Aβ kötődni képes az Aβ-kötő alkohol-dehidrogenázhoz, ami a rövidláncú dehidrogenáz-reduktáz enzim család tagja a mitokondriumban. Az enzim szintén szerepet játszik a ROS termelésben és neuronális apoptózisban [65].

Az emelkedett ROS koncentráció számos módon hozzájárulhat a betegség progressziójához. Az egyik ilyen folyamat a permeabilitási tranzíciós pórus nyitása, ami

a mitokondrium duzzadását, ruptúráját okozza, melynek során felszabadul többek között a citokróm-c, ami neuronális apoptózist vált ki. A fokozott ROS termelés továbbá helytelen protein feltekeredést idéz elő, ami szintén súlyosbítja az oxidatív státuszt, károsítja a mitokondriális DNS-t, fokozhatja átmeneti fémek agyi lerakódását, ami facilitálja a káros fehérjeaggregátumok keletkezését, valamint aktiválhatja a nukleáris faktor-kappa B (NF-κB) útvonalat, ami gyulladásos folyamatokat iniciál és károsítja a sejtek kalcium homeosztázisát [66].

1.2.4.3 Mitokondriális dinamika és morfológia változása a diszfunkció hatására

A mitokondriális intakt struktúra elengedhetetlen feltétele az elektrokémiai grádiens fenntartásának. Elektronmikroszkópon jól látható, hogy Alzheimer-kórban szenvedő betegek agyából biposziával vett sérült neuronokban nagyobb méretű mitokondriumok találhatóak és jóval kevesebb organellum észlelhető az egészséges neuronokhoz képest [67]. A mitokondriumok méretét és számát a mitokondriális dinamika, azaz a fúzió és hasadás folyamata határozza meg [68]. Számos szabályzó fehérje, többek között a „dynamin-like protein 1" (DLP1), Mitofuzin1 és Mitofuzin2 is szerepet játszik a hasadás-fúzió dinamikájában [12]. Alzheimer-kórban kimutatták, hogy fokozott a DLP1 szintje és a hasadás mértéke, ami összefüggésben van a morfológiai változásokkal [12].

1.2.4.4 A kalcium homeosztázis zavara mitokondriális diszfunkció során

Alzheimer-kórban zavar alakul ki a centrális kalcium homeosztázisban. A citoszol kalcium tartalma befolyásolja a neurotranszmissziót, neuronális plaszticitást, és gén transzkripciót a központi idegrendszerben [66]. A betegségben a zavar az intracelluláris kalcium szintben számos káros következménnyel járhat. Többek között hozzájárulhat a mitokondriális diszfunkció, valamint az oxidatív stressz kialakulásához és progressziójához. Fokozhatja kinázok, például a GSK-3β aktivitását, ami a tau-fehérje foszforilációja révén facilitálja a neurofibrilláris kötegek kialakulását, illetve down-regulálja az agyi eredetű növekedési faktort (BDNF). A hosszú távú potenciáció (LTP) szabályozásában fontos szerepet játszó foszfatázok működésében is zavart okozhat. Összességében olyan intracelluláris kaszkádot indíthat be, ami szinaptikus diszfunkcióhoz, sejthalálhoz vezet [14]. A mitokondrium kiemelkedő jelentőséggel bír a

citoszol kalcium koncentrációjának szabályozásában. A mitokondrium kalcium pufferelő kapacitása jelentősen csökken károsodása során, így kiváltó oka és elszenvedője is lehet a megnövekedett kation szintnek [66]. Ugyanakkor a mitokondrium mellett az ER is kulcsfontosságú szerepet játszik az intracelluláris kalciumszint szabályzásában [6].

1.2.5 Az endoplazmás retikulum stressz és a demencia

Az ER fontos szerepet tölt be a fehérjék összeszerelésében, megfelelő feltekerésében, poszttranszlációs módosításában. Továbbá észleli a nem megfelelő szerkezetű proteineket is. Intracelluláris stresszorok, például a kalcium homeosztázis, az oxidációs-redukciós folyamatok felborulása, túlzott fehérje termelődés, glükóz metabolizmus zavara ER stresszt okoznak és növelik a hibás szerkezetű fehérjék szintjét. Azért, hogy ne szabaduljanak fel ezek a károsodott termékek az ER rendelkezik egy „minőségbiztosító" folyamattal, az úgynevezett unfolded protein response-zal (UPR) [6].

1.2.5.1 Az ER stressz reakciói

A sejtek 3 különféle mechanizmussal próbálják leküzdeni az ER stresszt, ezeket összefoglalóan UPR-nek nevezzük. Az egyik ilyen mechanizmus a transzláció általános gátlása, ami által csökken a hibás szerkezetű fehérjék szintje is. Ezt a folyamatot egy transzláció iniciációs faktor, az eukarióta iniciációs faktor 2α (eIF2α) foszforilálása irányítja [69]. A második folyamat során a sejtben intracelluláris szignál transzmissziós folyamatok indukálódnak az ER-ból a sejtmag felé, ami chaperon fehérjék expresszióját fokozza. Ilyen fehérjék a „binding immunoglobulin protein" (BiP), calnexin és calreticulin. Ezek a chaperonok javító funkciót látnak el, feltekerik a hibás szerkezetű fehérjéket az ER-ban [70]. A harmadik folyamat az ER asszociált degradáció (ERAD). Ha a hibás szerkezetű fehérjék akkumulálódtak az ER-ban a proteoszómákba szállítódnak és ott lebontásra kerülnek [71].

1.2.5.2 Az ER stressz szenzorai

Az UPR a hibás szerkezetű fehérjék észlelése után kezdődhet meg. Ezekhez különböző szenzorok szükségesek. Az egyik ilyen komponens a pankreatikus ER kináz (PERK), ami

az ER membránjában helyezkedik el. Luminális doménje ER stressz szenzor, a C-terminális része szerin/treonin kináz aktivitással rendelkezik és foszforilálja a eIF2α-t [69, 72]. Normál esetben BiP kötődik a PERK-hez, de ER stressz hatására a BiP disszociál és ezáltal aktiválódik a PERK. Az eIF2α foszforiláció következtében számos fehérje termelődése csökken [72]. Másik ilyen fehérje az aktiváló transzkripciós faktor-6 (ATF6), ami szintén az ER membránban helyezkedik el és ehhez is kötődik a BiP meggátolva az ER-Golgi transzport szignált. ER stressz során a BiP disszociál és BiP és calreticulin chaperon fehérjék indukálódnak [73, 74]. Az „inositol-requiring protein 1" (IRE1) is ER transzmembrán fehérje, egy szerin/treonin kináz., melynek endoribonukleáz aktivitása is van. ER stressz hatására az őt szintén gátló BiP leválása után ugyancsak chaperon fehérjéket és ERAD-hoz kapcsolódó faktorokat indukál [6]. Kötődhet továbbá a tumor-nekrózis-faktor-receptor-asszociált-faktor 2 (TRAF2) fehérjéhez és ezáltal aktiválni képes proinflammatórikus és proapoptotikus folyamatokat a NF-κB, az apoptózis szignál-reguláló kináz 1 (ASK1) és c-Jun N-terminális kináz (JNK) útvonalon keresztül [75, 76].

1.2.5.3 Az ER stressz és az Alzheimer-kór

Fontos kiemelni, hogy az ER stressz kialakulásának nem feltétele az Alzheimer-kórban jellemző protein aggregátumok megjelenése [77, 78], ugyanakkor, ha neuronális sejteket Aβ oligomerekkel, vagy fibrillumokkal kezeltek jelentős változást tapasztaltak az ER kalcium homeosztázisában, ami nem megfelelő fehérje feltekeredést váltott ki [79]. További vizsgálatok szerint az Aβ oligomerek interakciója neuronális *N*-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorokkal károsította a sejtek kalcium egyensúlyát, oxidatív stresszt és ER-dependens sejthalált idézett elő [80]. Szintén Aβ oligomerek emelkedett szintjével hoztak összefüggésbe gátolt proteaszóma működést, ami ER stressz mediált ASK1 és JNK aktivációhoz, apoptózishoz vezetett [13]. A tau-fehérjét az ERAD útvonal gátlásával hozták összefüggésbe, ami hibás szerkezetű fehérje akkumulációval járt az ER lumenében [81]. A korábban említett mitokondriális diszfunkció és ROS termelés is jelentősen hozzájárul az ER stressz kialakulásához, főként az ER fehérjék oxidációja révén [82].

Számos vizsgálat igazolta az ER stressz jelenlétét az Alzheimer-kórban szenvedő betegek agyában. A különböző patofiziológiás markerek mennyisége jól korrelál a betegség

súlyosságával. Számos eltérés tapasztalható a betegeknél, többek között a PERK és eIF2α, IRE1 fokozott foszforilációja, a BiP és számos egyéb chaperon fehérje túlzott expressziója és proapoptotikus transzkripciós faktorok emelkedett szintje [13]. A komplex mechanizmus jelentősen hozzájárul a neurodegeneratív betegség progressziójához, a szinaptikus plaszticitás károsodásához, így a demencia kialakulásához. Fokozódik az amyloid plakkok és neurofibrilláris kötegek mennyisége, utóbbi folyamatban fontos szerepet játszik a krónikus UPR-mediált fokozott GSK-3β aktiváció. Továbbá csökken a protektív autofágia mértéke is, így toxikus proteinek eltávolítására nem kerül sor, ezzel fokozva az apoptózis mértékét, ami már említett mechanizmusok miatt is jelentősebb mértéket ölt, mint egészséges neuronokban. A fokozott ER stressz szintén fontos tényező a már említett károsodott kalcium homeosztázisban és a mitokondriális diszfunkció kialakulásában és/vagy fokozódásában is kiemelkedő szerepet játszik. Elsősorban a JNK útvonal aktiválásával a gyulladásos folyamatokat is facilitálja a túlzott UPR, ami egy további tipikus jellemzője az Alzheimer-kór patomechanizmusának [83].

1.2.6 A neuroinflammáció Alzheimer-kórban

A neuroinflammáció a központi idegrendszer egyik reakciója a neuronális károsodásra. A folyamatban elsősorban mikrogliák és asztrociták vesznek részt [15]. Jelentősége van a gyulladásos citokineknek, az apoptózisban fontos szerepet játszó kaszpázoknak, a komplement rendszernek és a prosztaglandinoknak is [15].

1.2.6.1 A mikrogliák szerepe a gyulladásos folyamatban

A mikrogliák makrofág jellegű sejtek, melyek nagyjából a központi idegrendszer sejtpopulációjának 10%-át képezik. Fontos feladatuk van a neurogenezisben, a neuronális plaszticitásban, a regenerációban, de szintén rendkívül fontos a szerepük az immunvédelemben bármilyen agyat károsító behatás esetén. Képesek sejtkárosító ágensek fagocitózisára, toxikus faktorok kibocsájtására és antigén-prezentáló sejtekké is alakulhatnak [16]. A mikrogliák általában nyugalmi állapotban vannak, csak stimulus hatására válnak aktívvá. Ekkor változik a morfológiájuk és képesek a károsodás helyszínére migrálni [84]. Hosszú ideig képesek megtartani az aktivált fenotípust,

eközben gyulladásos citokineket és egyéb neurotoxikus faktorokat szekretálhatnak, ezzel súlyosbítva a neuronális károsodást. Megkülönböztethetünk két különböző fenotípust: az M1 és M2 formát. Az M1 típus lipopoliszacharid és interferon-γ hatására masszív gyulladásos választ vált ki, számos gyulladásos citokint és fehérjét, többek között interleukin-1β (IL-1β), IL-12-t, tumor nekrózis faktor-α (TNF-α) és indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) termel. Az M2 fenotípus aktivációja alternatív. Az M2a általában gyulladáscsökkentő funkciójú, főként IL-4 és IL-13 stimulusra keletkezik. Az M2b immunkomplexek, „toll-like" receptor vagy IL-1β hatására képződik. Az M2c reprezentálja a deaktiválódott makrofágokat és a gyulladásos citokinek csökkentéséért felel [85, 86]. Az M2 fenotípus képes átalakulni M1 formába [87].

Abban az esetben, ha a központi idegrendszerben akut gyulladás alakul ki kezdetben a glia sejtek védő funkciót töltenek be és a szövetkárosodás visszaállításáért felelnek. Ugyanakkor, ha ez a stimulus permanensé válik, az idegsejtek működése károsodik, a folyamat neuronális diszfunkcióhoz és sejthalálhoz vezet [88]. Alzheimer-kórban szenvedő betegek *postmortem* agyszövet vizsgálatakor számos reaktív mikroglia csoportosulást fedeztek fel az amyloid plakkok közvetlen közelében [89]. Számos amyloid peptid, neurofibrilláris köteg és az APP is potens aktivátora a mikrogliáknak [90]. Továbbá az Aβ képes stimulálni a NF-κB-dependens útvonalat, kötődve a mikrogliális sejtfelszínhez aktiválni a MAPK útvonalat ezzel fokozva a proinflammatórikus gének expresszióját [91].

Az utóbbi évtizedben számos tanulmány publikálta, hogy a neurodegeneráció jelentősen összefügg a gyulladással. Alzheimer-kórban szenvedő betegek esetében jelentősen magasabb TNF-α és IL-6 szérum és agyi szintet mértek a kontroll csoporthoz képest [92, 93]. Sok vizsgálat a cerebrospinális folyadék gyulladásos citokin tartalmát vetette össze egészséges és Alzheimer-kórral diagnosztizált egyének között, de ezekből nem egyértelmű eredmények születtek. Összemérhető citokin szintekről (IL-10, IL-12, IL-6, IL-8, Il-1β) és demenciában emelkedett koncentrációról (TNF-α, IL-6, IL-8) is beszámoltak a különböző elemzések [94]. A korábban említett mikroglia és amyloid plakk kolokalizáció [89], az Aβ lerakódása T-sejtekben és a fokozott számú aktivált mikroglia és asztrocita az Alzheimer-kórban szenvedő betegek agyában is alátámasztja a feltételezést [95].

1.2.6.2 Az asztrociták szerepe a gyulladásos folyamatban

Az asztrocitáknak is számos feladata van, többek között a szinaptogenezisben, a neurogenezisben és a neurotranszmisszióban játszanak fontos szerepet, felelősek a vér-agy gát kialakulásáért és fenntartásáért, és részt vesznek az agyi metabolizmus és ionháztartás szabályozásában [15]. Alzheimer-kórban az asztrociták patológiás elváltozását, asztrogliózist is tapasztaltak. Ennek mértéke összefüggést mutatott a kognitív hanyatlás súlyosságával, ugyanakkor mutattak ki asztrogliózist olyan agyi területeken is, ahol Aβ-akkumuláció nem volt jelen. Aktivációjukban szerepet játszhatnak a gyulladásos citokinek az asztrociták kemokin receptorainak stimulálásán keresztül [16].

Normális esetben a mikrogliák fagocitálják és bontják az Aβ peptideket és ezeknek klírenszében fontos szerepet játszanak az asztrociták is [96]. Alzheimer-kórban szenvedő betegek cortexéből izolált asztrocitákban akkumulálódott Aβ42 peptideket találtak, ami alátámasztja az említett feltételezést [97].

Valószínűsíthető, hogy az asztrociták is hozzájárulnak a krónikus neuroinflammációhoz és expresszálnak iNOS-t is, ami hozzájárul a NO-mediált toxicitáshoz [96].

A direkt neurotoxicitás mellett az aktivált mikrogliák és asztrociták, a neuronális gyulladás következtében fokozhatják az amyloid plakkok képződését [98]. A gyulladásos citokinek, mint a TNF-α, fokozzák a β-szekretáz mRNS expressziót és enzimaktivitást [95] az NF-κB jelátvitel stimulálása révén [99]. Ugyanakkor a neuroinflammáció a tau-fehérje hiperfoszforilációjának is kedvez. Az IL-6 a Cdk5, az IL-1 a MAPK, míg a TNF-α a JNK, majd GSK-3 jelátvitel révén fokozza a tau-foszforilációt, és a NO is hozzájárul a progresszióhoz [85]. Összességében az egész folyamat nagyon komplex és ördögi körnek tekinthető, mert kimutatták, hogy a már említett Aβ oligomerek és aggregátumok, továbbá az elpusztult neuronokból felszabadult tau kötegek is fontos szerepet játszanak a mikrogliák aktivitásában, ami már jóval a demencia kialakulása előtt bekövetkezik [15].

1.2.6.3 A neuroinflammáció genetikai háttere

Genetikai vizsgálatok is megerősítik, hogy a neuroinflammáció az egyik elsődleges oka az Alzheimer-kór kialakulásának. Több teljes genom asszociációs vizsgálat érdekes

kapcsolatot fedezett fel a veleszületett immunrendszer komponensei és a sporadikus Alzheimer-kór incidenciája között, alátámasztva a neuroinflammáció és demencia szoros kapcsolatát [100]. A betegségben szenvedő egyének között nagyobb prevalenciával fordult elő néhány heterozigóta variáns a 2-es típusú myeloid sejteken expresszálodó triggering receptor (TREM2) génben. A TREM2 receptort myeloid sejtek és mikrogliák expresszálják és szerepe van a fagocitózis stimulálásában és citokin termelődés, így a gyulladás szuppressziójában [101]. Génmódosított, TREM2-t nem expresszáló egerekben jelentősen magasabb TNF-α és IL-6 és alacsonyabb gyulladásgátló IL-10 szinteket mértek. Az állatoknál neuronális és szinaptikus károsodást is kimutattak a neuroinflammáció eredményeként, változatlan Aβ és tau-protein koncentrációk mellett [102]. Humán vizsgálatokban azt találták, hogy a variáns TREM2 gén jelenléte háromszoros rizikót jelent a sporadikus Alzheimer-kór kialakulásában [101]. A neuroinflammáció hátterében nemcsak a TREM2 gén mutációját bizonyították, számos egyéb gént is azonosítottak és a jövőben is várható további felfedezés ezen az intenzíven kutatott területen [15].

1.2.6.4 A szisztémás gyulladás szerepe a mikrogliális aktivációban

Korábban azt feltételezték, hogy a vér-agy gát teljesen elválasztja egymástól a központi és perifériás immunrendszert, a citokinek sem jutnak át rajta. Ugyanakkor ma már sokféle útvonalat ismerünk, ami lehetővé teszi a barrier-menti kommunikációt. Megfigyelték, hogy egyes citokinek, főként a TNF-α, IL-6 és IL-1β befolyásolhatják a vér-agy gát integritását, ami így áteresztővé válhat a mediátorokra, illetve leukociták agyi migrációja is lehetségessé válik. Még intakt vér-agy gát esetében is a citokinek stimulálhatják az endotheliumot, ami a szignált továbbíthatja a perivaszkuláris makrofágok irányába, ami mikroglia aktivációhoz vezethet. Továbbá aktív transzport rendszer is segítheti a citokinek agyi penetrációját [85].

Egy iker vizsgálat 1999-ben kimutatta, hogy annak a betegnek, akinek anamnézisében szerepelt komoly szisztémás gyulladás, korábban alakult ki Alzheimer-kór, mint testvérénél [103]. Szintén egy nagy eset-kontroll vizsgálat 2005-ben összefüggést mutatott a demencia és a fertőző betegségek között idősebb korban [104]. Egy másik tanulmányban 300 enyhe és súlyos demenciában szenvedő beteget vizsgáltak és arra

jutottak, hogy az akut szisztémás gyulladásos események fokozott kognitív hanyatlást eredményeztek, továbbá ennek a mértéke nagyjából négyszerese volt azoknál a betegeknél, akiknél magas szisztémás TNF-α koncentrációt mértek [105].

Az akut gyulladás mellett a krónikus gyulladás is hozzájárul a kognitív károsodáshoz. Több vizsgálatban kimutatták már a metabolikus változások, például elhízás, inzulin rezisztencia és a krónikus gyulladásos állapot közötti összefüggést [90, 106, 107]. Ma már ismert, hogy az elhízás előidézhet gyulladásos citokin felszabadulást és inzulin rezisztenciát is [108]. Az adipociták képesek gyulladásos citokinek termelésére, amik a már említett mechanizmusokkal neuronális károsodást okozhatnak. A zsírszövet-eredetű leptin, ami az éhségérzet csökkenéséért, így kalóriabevétel szabályzásáért felel, de neuroprotektív hatása is ismert. Elhízás esetén hiperleptinémia és leptin rezisztencia alakulhat ki, ami viszont neuronális gyulladásos szignálként szolgálhat [106]. Újabban egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak a betegség hátterében az inzulin rezisztenciának is, így ennek pontos ismerete is nagyon fontos az esetleges terápiás célpontok kutatásában.

1.3 A centrális inzulin rezisztencia és Alzheimer-kór kapcsolata

Ma már számos preklinikai és klinikai vizsgálat összefüggésbe hozza a sporadikus Alzheimer-kór és agyi inzulin rezisztencia kialakulását. Évekig az agyszövetet inzulin inszenzitív szövetnek gondolták, de mára már tudjuk, hogy a polipeptid hormon elengedhetetlen metabolikus, neuromodulátor és kognitív feladatokat lát el [109].

1.3.1 Inzulin a központi idegrendszerben

Margolis és Altszuler 1967-ben elsőként fedeztek fel immunoreaktív inzulint kutyák cerebrospinális folyadékában, ami felvetette, hogy a keringő inzulin képes átjutni a vér-agy gáton [110]. Megállapításukat tovább erősítették Havrankova és munkatársai, akik 1978-ban agyi inzulin receptorokat is találtak patkányokban [111]. Az agyi inzulin legjelentősebb hányada a perifériáról származik, a hasnyálmirigy β-sejtjei szekretálják. A vér-agy gáton telíthető transzport mechanizmussal jut át [112], ugyanakkor az is felmerült, hogy kis mennyiségben a hormon az agyban is termelődik [113]. Az inzulin

gén expresszióját és inzulin szintézist is kimutattak éretlen és érett emlős neuronális sejtekben is [114]. Az inzulin mRNS agyi eloszlása neuron specifikus, a glia sejtekben sem inzulin mRNS, sem inzulin fehérje nem észlelhető [115].

1.3.2 Az inzulin jelátvitel a központi idegrendszerben

Az inzulin az agyban inzulin receptorhoz (IR) kötődik, ami a központi idegrendszerben nagy számban fordul elő és eloszlása régió specificitást mutat. A kötődés gyors és specifikus. Az IR tetramer szerkezetű, 2 extracelluláris α-, és 2 intracelluláris β-alegység alkotja. A periférián található IR-hoz képest az α-, és β-alegységnek is enyhén alacsonyabb a molekulasúlya [116], ami az alternatív mRNS hasítás és eltérő receptor glikoziláció eredménye lehet [117]. További különbség, hogy a centrális IR esetében inzulin stimuláció hatására down-reguláció nem következik be [116]. Az inzulin az IR mellett az inzulin-szerű növekedési faktor-1 (IGF-1) receptorhoz is kötődik. Ez a folyamat is fontos az inzulin jelátvitelben, ugyanakkor csekélyebb jelentőségű, mint az inzulin-IR útvonal mind fiziológiás, mind patológiás körülmények között [118].

1.3.2.1 Az inzulin receptor aktiválása

Az inzulin-IR jelátvitel első lépése, az inzulin molekulák kötődése a receptor α-alegységeihez, amit konformáció változás követ. Az IR β-alegységei tirozin egységeket tartalmaznak, ami inzulin-IR kötődés hatására autofoszforilálódik az 1158, 1162 és 1163 helyeken, ami aktiválja a receptor tirozin-kináz funkcióját. A receptor aktivitást a foszforilációs állapota határozza meg. Az inaktiváció létrejöhet foszfotirozin-foszfatáz enzimek hatására, amik defoszforilálják a receptort, illetve szerin- és treonin-kinázok hatására, amik a szerin 1305, 1306 és a treonin 1348 részeken képesek foszforilálni a β-alegységet. Enzimaktiváció hatására többek között két fő párhuzamos útvonal aktiválódik, a foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K) és a klasszikus MAPK jelátviteli kaszkád. Dolgozatomban az előbbi útvonalat szeretném részletesen bemutatni (5. ábra).

Inzulin-IR kötődés és receptor autofoszforiláció hatására Src-homológ 2 (SH2) és foszfotirozint kötő (PTB) doméneket tartalmazó fehérjék kötődhetnek az intracelluláris régióhoz. Több fehérje is részt vesz a folyamatban, mégis az egyik legjelentősebb

képviselő az inzulin receptor szubsztrát (IRS). Az IRS fontos szerepet játszik az IR és a celluláris jelátviteli kaszkád összekapcsolásában, kimutatták, hogy számos agyi területen IR, IRS ko-expresszió figyelhető meg [116, 117]. Az IR aktiváció IRS aktivációval, azaz tirozin foszforilációval jár, aminek hatására további pl. SH2-vel rendelkező fehérjék kötődhetnek a komplexhez. Az egyik ilyen fontos molekula a PI3K, ami foszforilációval aktiválódik és a protein kináz B (Akt/PKB) szerin/treonin kinázt aktiválja [119]. Az Akt/PKB aktiváció fokozza bizonyos glükóz transzporterek (GLUT), elsősorban a GLUT4 transzlokációját a plazmamembránba és a sejt glükóz felvételét [119, 120]. Ugyanakkor megemlítendő, hogy a központi idegrendszerben az endotél sejtek és asztrociták esetében elsősorban GLUT1 expresszió dominál, míg a neuronokban a leggyakoribb transzporter a GLUT3. A GLUT1 és GLUT3 működése is független az inzulin jelátviteltől [120]. Az Akt/PKB útvonal aktiválódása jelentős szabályozó, neuroprotektív hatással is bír [117].

1.3.2.2 Az inzulin és az autofágia kapcsolata

A PI3K/Akt/PKB útvonal aktiválja a „mammalian target of rapamycin complex 1" (mTORC1) komplexet. A folyamat hatására csökken az autofágia és fokozódik a neuronális protein szintézis. Fiziológiás körülmények között ez fontos egyensúlyt teremt a két folyamat között, továbbá feltételezhető, hogy a szinaptikus plaszticitás és memória kialakulásában, fenntartásában is fontos szerepet játszik [121, 122].

1.3.2.3 Az inzulin antiapoptotikus hatásai

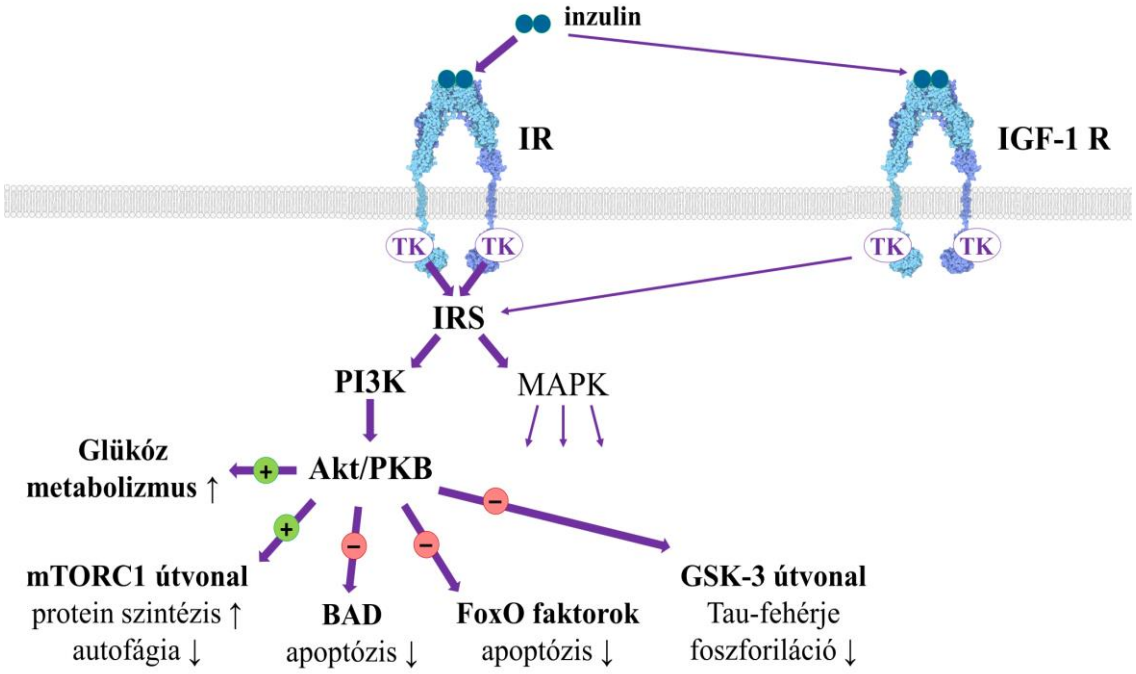
Az Akt/PKB aktiválása a proapoptotikus fehérjék gátlása révén az apoptózistól is védi a sejteket. Ilyen fehérje a B sejt limfóma-2 (Bcl-2) család tagja, a BH-3 domén (Bad), illetve az apoptózisban fontos szerepet játszó kaszpázok közül, az egyik legfontosabb iniciátor kaszpáz, a kaszpáz-9 [117].

Az inzulin egy további neuroprotektív hatása a PKB/Akt aktiválása révén a „forkhead box O" (FoxO) transzkripciós faktor család inaktiválásával magyarázható. A FoxO faktorok számos funkcióval rendelkeznek, de neuronokban azt találták, hogy elsősorban proapoptotikus proteinek indukációjában játszanak fontos szerepet, így inzulin-mediált gátlásuk védi a neuronokat a sejthaláltól [123].

1.3.2.4 Az inzulin hatása a GSK-3 jelátviteli útvonalra

A GSK-3 enzim szerepét elsőként a glikogén metabolizmusban írták le [124], de ma már tudjuk, hogy számos szubsztrátja és funkciója van. Két eltérő formáját ismerjük, ezek az α és β enzimek, melyek két eltérő gén termékei. Jelentős homológiát mutatnak a katalitikus doménjüknél, de különböznek az N-, és C-terminális szakaszukban. A GSK-3 konstitutívan aktív, jelentős mértékben expresszálja számos szövet, de kiemelkedő a szintje az agyban [125]. Az enzim aktivitását speciális régiók foszforilációja határozza meg. A legfontosabb ilyen folyamat a GSK-3α esetében a szerin 21 és a GSK-3β esetében a szerin 9 foszforilációja, ami inaktiválja a kináz aktivitását. Számos kináz képes a szerin 21/9 foszforilációjára, többek között az Akt/PKB, protein kináz A és C is. Következésképpen az inzulin jelátvitel fontos szabályozó szerepet játszik a GSK-3 enzim aktivitásában a kináz gátlása révén. A GSK-3 tirozin foszforilációja az aktiválódáshoz szükséges, ezt különféle tirozin kinázok végzik, de autofoszforilációval is létrejöhet [126].

A GSK-3 jelentőségét már számos tanulmány igazolta. Transzgénikus egér kísérleteken kimutatták, hogy az eltérő izoformák különböző neurológiai károsodáshoz vezetnek. Állatokban a GSK-3β delációja letális, ugyanakkor a heterozigóta egyedek túlélnek, de fokozott szorongást és csökkent felfedező készséget mutatnak [127, 128]. A neuron-specifikus kiütése a GSK-3α enzimnek az állatokban csökkent szorongással, mozgékonysággal és agresszióval jár [129]. Egyéb vizsgálatok azt is igazolták, hogy a GSK-3 aktivitás szükséges a neuronális fejlődéshez, többek között a neurogenezishez, migrációhoz, az axonális növekedéshez és szabályzásához, továbbá a szinaptikus plaszticitás megfelelő működéséhez [130]. Az enzim túlzott aktivitása viszont számos patológiai folyamattal, például a már említett tau-fehérje hiperfoszforilációjával függ össze, így Alzheimer-kór kialakulásához vezethet [126].



5. ábra: **Az inzulin jelátvitel sematikus ábrázolása. Az inzulin kötődik az inzulin receptorhoz (IR) és az inzulin-szerű növekedési faktor-1 receptorhoz (IGF-1R), amelyek tirozin kináz (TK) aktivitással rendelkeznek. Aktiválódásuk során inzulin receptor szubsztrátot (IRS) foszforilálnak és ezáltal aktiválnak. Az IRS többek között aktiválja a mitogén-aktivált protein kinázt (MAPK) és a foszfatidilinozitol-3 kinázt (PI3K). A PI3K további foszforiláció révén aktiválja a szerin/treonin kináz protein kináz B-t (Akt/PKB), aminek számos célpontja ismert. Fokozza a glükóz transzporter 4 transzlokációját a plazmamembránba, és ezáltal a glükóz metabolizmust, serkenti a „mammalian target of rapamycin complex 1" (mTORC1) útvonalat, ami fokozza a protein szintézist és csökkenti az autofágiát. Antiapoptotikus hatást is kivált a BH-3 domén (BAD) proapoptotikus fehérje gátlásával, illetve a többek között proapoptpikus fehérjék indukciójáért felelős „forkhead box O" (FoxO) transzkripciós faktor család inaktiválásával. Az enzim a glikogén-szintáz kináz-3 (GSK-3) szerin foszforilációjával inaktiválja azt, ezzel megakadályozva a túlzott mértékű tau-fehérje foszforilációt [116, 117, 122, 130].**

1.3.3 Az inzulin centrális hatásai

Az inzulin a központi idegrendszerben elsősorban a kognitív funkciókban játszik fontos szerepet, főként a memória és tanulási folyamatokban. Egy *in vivo* vizsgálatban kimutatták, hogy patkányok hippocampusába injektált inzulin dózis-függően befolyásolta az állatok mentális képességeit. Alacsony inzulin koncentráció rontotta, közepes nem befolyásolta és magas dózis pedig javította azt [131]. Még nem tisztázott, hogy miként fokozza az inzulin ezeket a folyamatokat, de feltételezhető, hogy a háttérben a glükóz metabolizmus és a neurotranszmisszió befolyásolása áll. Ahogy korábban már említésre került, az inzulin fokozza a GLUT4 transzlokációját, többek között a hippocampus területén, ahol korábban már összefüggésbe hozták a kognitív folyamatok serkentésével [132]. Ezen kívül felmerült, hogy az inzulin fokozhatja az LTP-t PI3K mediált módon. Az LTP kialakulásában és fenntartásában kiemelkedő szerepe van az NMDA-receptor kapcsolt ioncsatornának. Az aktivált PI3K facilitálja a csatorna működését, így mindkét faktor pozitívan befolyásolja a szinaptikus plaszticitást, LTP-t. Az inzulin további centrális hatásai között felmerült, hogy csökkentheti az acetilkolin blokádot, továbbá magas koncentrációban csökkentheti a neuronális noradrenalin visszavételt is [117].

1.3.4 Az inzulin, az inzulin receptor és az inzulin jelátvitel Alzheimer-kórban

Az inzulin jelátvitel zavarát már a periférián és a központi idegrendszerben is megfigyelték Alzheimer-kórban, diabéteszben és öregedés során [133, 134]. Idős korban csökken az agyi inzulin koncentráció és a receptorok száma is, ezeket a változásokat, az inzulin jelátvitel diszfunkciójával is összefüggésbe hozták, így már 1998-ban Frolich és munkatársai az Alzheimer-kórt „Inzulin rezisztens cerebrális állapot” jelzővel írták le [134]. Később több vizsgálat után azt is megállapították, hogy a neurodegeneratív kórképben csökken, többek között az agyi inzulin, az IR, a PI3K és az Akt/PKB mRNS és fehérje szintje. Mivel ezek mind jelentős képviselői az inzulin szignál transzdukciójának, így sokan III-as típusú diabétesznek nevezték az állapotot [135]. Ahogy már a fentiekben tárgyalásra került, az Alzheimer-kór kialakulása egy nagyon komplex folyamat következménye, az inzulin és annak jelátviteli zavara számos ponton kapcsolódik a betegség patomechanizmusához.

1.3.4.1 Az inzulin és a Aβ metabolizmus kapcsolata Alzheimer-kórban

Az inzulin közvetlenül modulálja a központi idegrendszer neuronjait, szabályozza a sejtek életképességét, a szinaptikus plaszticitást, ugyanakkor közvetetten is befolyásolja ezeket, többek között az inzulin degradáló enzimen (IDE) keresztül [117]. Az IDE megtalálható a sejtek citoplazmájában, peroxiszómájában és ER-ban is. Az inzulin lebontása mellett szubsztrátjai közé tartozik az IGF-1, IGF-2, amylin, glukagon, β-endorfin és nem utolsó sorban az Aβ is. A szubsztrátok közül az inzulint a 2-es típusú diabétesszel, az Aβ-ot az Alzheimer-kór patológiájával hozták összefüggésbe [136]. Az IDE gén a 10-es kromoszómán található, különböző variánsait és a 2-es típusú diabétesz kapcsolatát már számos populációban megfigyelték [137], továbbá a jelenséget késői Alzheimer-kórban is kimutatták. Állatkísérletek alátámasztották a feltételezést, miután korai és fokozott Aβ akkumulációt tapasztaltak olyan patkányoknál, akiknél depletálták az IDE gént [138]. Továbbá a fokozott IDE aktivitás az IDE és APP duplán transzgénikus egerekben csökkentette a Aβ termelődést és aggregációt [139].

Megfigyelték, hogy az IDE szubsztrátjai versengenek az enzimért, de eltérő affinitást mutatnak, így a szubsztrátok közötti egyensúly felborulása a metabolikus és neuronális patogenezist is befolyásolhatja. Egy sejtkultúra modellben az inzulin növekvő koncentrációja specifikusan gátolta az IDE Aβ lebontását. Ez magyarázható azzal, hogy az inzulin affinitása nagyjából 20-szor nagyobb az enzimhez, mint az Aβ-é [140]. Egy *in vivo* tanulmányban is csökkentette az Aβ lebontását a növekvő inzulin szint patkányok agyában [141].

1.3.4.2 A neuroinflammáció és a PI3K-Akt/PKB jelátviteli út Alzheimer-kórban

Krónikus, alacsony szintű gyulladás tipikus jellemzője a 2-es típusú diabétesznek és az Alzheimer-kórnak [122]. Gyulladásos citokinek, például TNF-α emelkedett koncentrációját kimutatták Alzheimer-kórban szenvedő betegek agyában és vérében, továbbá diabéteszes egyének perifériás szöveteiben. Korábban már említésre került, hogy a perifériás és központi idegrendszert érintő gyulladást nem lehet egyértelműen elkülöníteni, ez összefüggésben állhat azzal a ténnyel, hogy a 2-es típusú diabéteszben szenvedő betegeknek 2-4-szer nagyobb valószínűséggel alakul ki a neurodegeneratív kór [142]. A TNF-α kiemelt szerepet játszik a perifériás inzulin rezisztencia kialakulásában.

A JNK útvonal aktiválásával fokozza az IRS szerin foszforilációját, ami gátolja annak működését, következésképpen az egész kaszkádot [143]. Alzheimer-kórban már korábban említésre került, hogy a neuroinflammációnak kiemelkedő szerepe van. A folyamat során megfigyelhető a krónikus mikroglia aktiváció, ami fokozott TNF-α és egyéb gyulladásos citokinek termelődésével jár, ami ugyancsak a JNK útvonal aktivációjához vezethet más patológiás, a betegség progresszióját fokozó mechanizmusok mellett [15]. Egy tanulmányban az inzulin magas, akut dózisa fokozhatta az agyi gyulladásos választ az egyébként egészséges egyének cerebrospinális folyadékjában tapasztalt megemelkedett gyulladásos citokin szintek alapján. Ugyanebben a vizsgálatban a hiperinzulinémia a plazmában magasabb Aβ koncentrációt eredményezett. Ezek arra utalnak, hogy a magas inzulin szint a neuronális gyulladással és a károsodott Aβ metabolizmussal is összefüggésbe állhat, az utóbbi feltehetően a már említett IDE enzimért való kompetíció miatt [140]. Bomfim és munkatársai a Aβ oligomerekről is kimutatták, hogy fokozzák a JNK útvonalat Aβ plakkot termelő transzgénikus egerek agyában és Alzheimer-kórban szenvedő betegek *postmortem* agyszövetében, így neuronoknál ez a folyamat is az IRS gátlását eredményezheti [144]. Az IRS gátlása következtében Alzheimer-kórban csökken az inzulin-PI3K-Akt/PKB jelátviteli folyamat komponenseinek foszforilációja is, ami számos káros következménnyel jár [135].

Az egyik következmény az mTORC1 csökkent aktivitása. Alzheimer-kórban megfigyelték, hogy a neuronokban nagyobb számban fordulnak elő autofagoszomális vezikulumok, de az még nem tisztázott, hogy az mTORC1 aktivitás csökkenése miatt fokozódik az autofagoszómák termelődése, vagy az autofágia későbbi lépéseinek, például a lizoszomális klírensz zavarával magyarázható a jelenség [145]. Mindenesetre a jól működő autofágia protektív folyamat, ennek károsodása a toxikus faktorok eliminációjának csökkenéséhez és következésképpen fokozott apoptózishoz vezet. Mivel az inzulin-PI3K-Akt/PKB útvonal gátolja bizonyos proapoptotikus fehérjék keletkezését, így annak károsodása szintén fokozza a betegségben amúgy is jellemző fokozott programozott sejthalált [122]. Egészséges egyéneknél, az inzulin jelátvitel eredménye, hogy csökken a GSK-3 aktivitása, de természetesen agyi inzulin rezisztenciánál ez a folyamat is zavart szenved.

1.3.4.3 A GSK-3 és az Alzheimer-kór kapcsolata

Ahogy már korábban említésre került, a tau-fehérjét számos kináz képest foszforilálni, de ezek közül az egyik legjelentősebb a GSK-3 β-izoformája. A tau-fehérjének 85 foszforilációs helye ismert, ezek közül 40 olyan, ami az oldhatatlan formájában foszforilálva lehet és 23, amit a GSK-3β foszforilálni tud [146]. Transzgénikus egerekkel végzett vizsgálatok kimutatták, hogy túlexpresszált GSK-3β neurodegenerációt idézett elő az állatokban és az enzim foszforilálta a tau-fehérjét Alzheimer-kórra jellemző foszfoepitópokon [147, 148]. Továbbá transzgénikus *Drosophila* modellben a GSK-3β és tau-fehérje ko-expressziója jelentősen növelte a tau-protein foszforilációját és neuronális pusztulást váltott ki [149]. A GSK-3 gátlása csökkentette a kóros fehérje foszforilációját, aggregációját [150, 151]. Alzheimer-kórban szenvedő betegek agyának vizsgálatából kimutatták a GSK-3β és a neurofibrilláris kötegek kolokalizációját [152], továbbá aktív GSK-3β jelenlétét neuronális citoplazmában a tau-hiperfoszforiláció kezdeti szakaszában is [153]. Újabban leírták, hogy a GSK-3 enzim polimorfizmusa jelentős rizikófaktora lehet a sporadikus kórképnek [154].

A tau-fehérje mellett a Aβ plakkok keletkezésében is szerepet játszik a GSK-3 enzim. A GSK-3α szelektív gátlásával Phiel és munkatársai több, mint 40%-os csökkenést tapasztaltak az Aβ40 és Aβ42 mennyiségében kínai hörcsög ovárium sejtekben, ami stabilan expresszált APP-t [155]. Továbbá a GSK-3β enzim szerepét is kimutatták az APP metabolizmusában és így a fokozott Aβ produkcióban [155]. Ezek alapján elmondható, hogy a GSK-3 fokozott aktivitása is nagyon jelentős szerepet játszik a betegség összetett, bonyolult patomechanizmusában.

1.3.5 Lehetőségek az Alzheimer-kór gyógyszeres kezelésére az inzulin rendszeren keresztül

Az Alzheimer-kór kezelése sajnos a mai napig meg nem oldott probléma. Számos gyógyszer áll rendelkezésünkre, ami csökkenti a tüneteket, de valós javulást egyelőre egyik sem biztosít. Mivel az Alzheimer-kór és a 2-es típusú diabétesz patomechanizmusában sok hasonlóság van, így az utóbbi terápiájában alkalmazott gyógyszerek hatása előnyös lehet a neurodegeneratív betegség kezelésében is [156].

1.3.5.1 Inzulin

Az inzulin terápia, feltehetőleg az inzulin/PI3K/Akt/PKB útvonalon keresztül csökkenti a kognitív hanyatlást és javítja a memóriát felnőtt, Alzheimer-kórban szenvedő betegeknél. Ugyanakkor szisztémás adagolás esetén kevéssé penetrál az agyba és fokozza a hipoglikémia kockázatát. Emiatt számos vizsgálatban tesztelték az intranazális inzulint, ami jelentősebb centrális koncentrációt eredményez [157]. *In vitro* körülmények között az inzulin csökkentette az apoptózist, *in vivo* pedig szabályozta a tau-foszforilációt, az APP metabolizmust és az Aβ klírenszet [158]. Egészséges, enyhe kognitív hanyatlásban és Alzheimer-kórban szenvedő betegeknél az intranazális inzulin javította a memóriát és a betegek hangulatát. Ezek a hatások dózis-függőnek mutatkoztak és az APOE genotípus is befolyásolta a hatást [156, 157].

1.3.5.2 Szulfonilureák

A szulfonilureák fokozzák az inzulin szekréciót a hasnyálmirigy β-sejtjeiből az ATP-érzékeny K^+-csatorna gátlásával. Preklinikai vizsgálatokban ígéretes eredmények születtek, a vegyületek neuroprotektív hatást fejtettek ki [156]. Egy 8 éves klinikai prospektív vizsgálatban a betegek szulfonilureát és metformint (lsd. később) kaptak kombinációban és esetükben csökkent a demencia kialakulásának rizikója, ugyanakkor egy eset-kontroll vizsgálat azt találta, hogy a krónikus szulfonilurea terápiának nincs kognitív rizikócsökkentő hatása [159].

1.3.5.3 Metformin

A metformin csökkenti a glükóz termelődést a májban, mérsékli az inzulin rezisztenciát és elsővonalbeli szer 2-es típusú diabéteszben. A hatóanyag gyorsan átjut a vér-agy gáton és számos agyi területen eloszlik. Humán neuronális őssejteken neuroprotektív hatást fejtett ki, javította a mitokondriális funkciót [160]. A metformin neurodegeneratív betegségekre kifejtett hatásai ellentmondásosak. Egy *in vitro* kísérletben csökkentette a tau-foszforilációt [161], de volt olyan tanulmány is, ahol növelte a sejtek Aβ termelését [162]. Humán megfigyeléses vizsgálatokban a szer csökkentette a demencia mértékét olyan betegeknél, akik inzulin rezisztencia indikációban metformin kezelés alatt álltak [163]. Ugyanakkor egy másik tanulmányban, ahol Alzheimer-kórban szenvedő betegeket

vizsgáltak, a vegyület fokozta a kognitív hanyatlást, feltehetőleg a metformin-indukált B12 vitamin hiány miatt. Ez a hatás mérséklődött a vitamin pótlása után [164]. Következésképpen további vizsgálatok szükségesek, hogy el lehessen dönteni, alkalmas-e a hatóanyag a demencia megelőzésére, kezelésére.

1.3.5.4 Tiazolidindionok

A tiazolidindionok potens és szelektív agonistái a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor-γ nukleáris receptornak, ami fokozza az inzulin szenzitivitást az izomban, zsírszövetben és májban. Továbbá a vegyületek rendelkezhetnek neuroprotektív hatással, csökkentik az inflammatórikus gének expresszióját, aminek nagy jelentősége van Alzheimer-kórban [156]. A csoport egyik képviselője a pioglitazon, ami képes átjutni a vér-agy gáton és csökkenteni tudta a gliális aktivációt [165]. Egy egér kísérletben a pioglitazon 4 hónapos kezelés után javította az Akt/PKB jelátvitelt, így csökkentette, többek között, a tau-foszforilációt [166]. Egy másik vizsgálatban leptinnel kombinálva az Aβ szintet is csökkentette [167]. Humán vizsgálatban 2-es típusú diabétesz indikációban adagolt pioglitazon javította a kognitív funkciót és fokozta a cerebrális vérkeringést [168], de egy nem-diabéteszes, ugyanakkor Alzheimer-kórban szenvedő betegeket vizsgáló tanulmányban nem tapasztaltak mentális javulást a szer hatására [169].

1.3.5.5 Glukagon szerű peptid-1 (GLP-1) receptor agonisták

Az antidiabetikumok egy másik fontos csoportja a GLP-1 analógok. A GLP-1 egy intesztinális inkretin peptid, ami a glükóz-dependens inzulin szekréciót fokozza és gátolja a glukagon szekréciót. Trófikus hatása is van, stimulálja a β-sejtek neogenezisét, növekedését, differenciálódását és gátolja az apoptózisukat [156]. A GLP-1 analógok, például a liraglutid és az exenatid átjutnak a vér-agy gáton és a centrális GLP-1 receptorokhoz is kötődnek. Az agonistáknak neuroprotektív tulajdonságuk van. Alzheimer-kór egér modellben a hatóanyagok csökkentették az apoptózis mértékét, gátolták az oxidatív stresszt és az Aβ további káros hatásait, a tau-hiperfoszforilációt, valamint javították a szinaptikus plaszticitást, a mitokondriális funkciót és a fizikai aktivitást [170-172]. Hatásukban fontos tényező lehet a centrális inzulin rezisztencia javítása, amit szintén több kísérletben kimutattak [17, 173]. Még további vizsgálatok

szükségesek, hogy meg lehessen állapítani, hogy alkalmasak-e ezek a szerek a neurodegeneratív betegségek kezelésére, de mindenképpen előnyös tulajdonságuk, hogy nem befolyásolják a normál vércukorszintet, így biztonságos az alkalmazásuk nem diabéteszes betegeknek is [156].

1.3.5.6 Dipeptidil peptidáz-4 gátlók

A dipeptidil peptidáz-4 a GLP-1 bontásáért felel, így gátlásával az endogén GLP-1 hatás fokozható. Neuroprotektív hatásuk így valószínűleg az inkretineken keresztül érvényesül. Alzheimer-kór állatmodellben csökkentették a tau-hiperfoszforilációt, az Aβ képződést és javították a memóriát [174]. Idős betegek esetében, akiket 2-es típusú diabétesz indikációban kezeltek a szerekkel azt tapasztalták, hogy csökkent vagy elmaradt a kognitív hanyatlás [175].

1.3.6 Összefoglalás

Az Alzheimer-kór egy nagyon komplex betegség, jelenleg lehetetlen meghatározni, hogy mi az első kiváltó tényező, hisz a különböző patológiás folyamatok egymással összefüggenek, egymást erősítik. Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a nem megfelelő életmód, a kevés mozgás, a túlzott kalória bevitel jelentős rizikófaktor az idős kor mellett. Ennek oka lehet, hogy ezek elhízáshoz és inzulin rezisztenciához vezethetnek, ami jelentős szerepet játszik a neurodegeneratív betegség kialakulásában. Az, hogy az inzulin szenzitivitást célzó gyógyszerkészítmények ígéretes eredményeket mutatnak a kognitív funkció javításában szintén bizonyítja a folyamat fontosságát. Így a centrális inzulin rezisztencia pontos ismerete, megfelelő modellezése hozzájárulhat ahhoz, hogy a jövőben megelőzhető, kezelhető legyen ez a súlyos neurodegeneratív betegség. Sok *in vitro* és *in vivo* tanulmány vizsgálja a patológiás jelenséget és a lehetséges preventív, valamint protektív terápiás megoldásokat. Számos módszert fejlesztettek ki, amivel jól modellezhető a központi inzulin szenzitivitás zavara. A sok diabetogén vegyület közül az egyik leggyakrabban vizsgált hatóanyag a sztreptozotocin, amelyet mind *in vivo* és *in vitro* kísérletekben is alkalmaznak [116]. A továbbiakban ezt a vegyületet szeretném ismertetni.

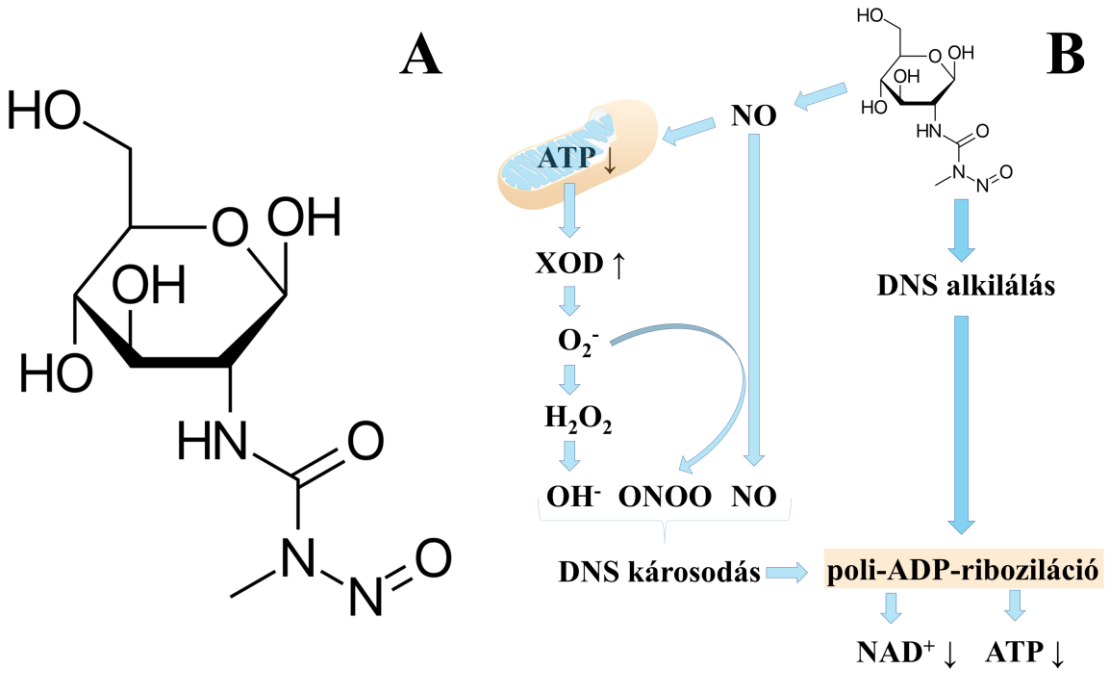
1.4 A sztreptozotocin

A molekulát eredetileg a *Streptomyces achromogenes* mikroorganizmusból izolálták. Szerkezetét tekintve a vegyület egy glükózamin-nitrozourea (6a. ábra), mely nagy affinitással rendelkezik a sejtfelszíni GLUT2 transzporterhez, ami elsősorban a hasnyálmirigy β-sejtjein található, így a molekula szelektív toxicitást mutat erre a sejttípusra [176]. A transzporter szerepét a sejtkárosító hatásban igazolta, hogy inzulinóma sejtvonalon a csökkent GLUT-2 expresszió mérsékelte a sztreptozotocin toxikus hatását [177]. Intracellulárisan a vegyület károsítja a DNS-t és a sejtek szétesését eredményezi [178]. A folyamat hátterében főként a DNS aliklezése áll, ami a molekula nitrozourea részével magyarázható. Ez elsősorban a guanin O^6 pozícióban történik, de a sztreptozotocin injekció hatására különbözően metilált purinokat találtak patkányok szöveteiben [179].

A sztreptozotocin NO donor is, ami szintén hozzájárul a sejtek destrukciójához. A vegyület nem spontán NO donor, intracelluláris metabolizmus útján szabadul fel a mediátor, a NOS enzim nem játszik szerepet a termelődésében [180].

A DNS károsodása a ROS-ok fokozott keletkezésével is magyarázható, ami részben a sztreptozotocin mitokondriális hatásával részben a fokozott xantin-oxidáz aktivitásával magyarázható. Azt találták, hogy a szer gátolja a Krebs ciklust és következésképpen csökkenti a mitokondrium oxigén fogyasztását. Ez jelentősen csökkenti az ATP termelést, amihez az emelkedett intracelluláris NO koncentráció is hozzájárul. A fokozott ATP defoszforiláció növeli a xantin-oxidáz szubsztrát ellátását és így több húgysav keletkezik, és olyan folyamatok játszódnak le, amivel növekszik celluláris szuperoxid-anion produkció [181].

A sztreptozotocin elsősorban a DNS alkilálásával fejti ki toxikus hatását, de a NO és ROS mediált DNS-károsodás is nagyon fontos tényező. Ezek a folyamatok egyaránt hozzájárulnak a poli-ADP-ribozilációhoz, ami szerepet játszik a celluláris nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD^+) szint csökkenésében, ami szintén csökkent ATP termeléshez vezet (6b. ábra) [182, 183].



6. ábra **A sztreptozotocin szerkezete (A) [176] és hatásmechanizmusa (B) [181]. A sztreptozotocin főként a DNS alkilálásával fejti ki citotoxikus hatását. Ez poli-ADP-ribozilációhoz vezet, ami csökkent nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD^+) és ATP szinthez vezet. A vegyület továbbá emeli a nitrogén monoxid (NO) szintet, ami mitokondriális károsodást és csökkent ATP termelést eredményez. A folyamat következtében aktiválódik a xantin-oxidáz (XOD), ami fokozza az intracelluláris szabadgyök termelődést. Ez az útvonal is DNS károsodáshoz és poli-ADP-ribozilációhoz vezet [181].**

A sztreptozotocint alkalmazzák citotoxikus hatása miatt daganat terápiában, neuroendokrin tumorok kezelésében [184], de *in vitro* és *in vivo* modellekben is széles körben használják. Állatkísérletekben az adagolási protokoll függvényében a vegyület alkalmas 1-es és 2-es típusú diabétesz kiváltására is, sőt intrecerebroventrikuláris (icv.) injektálás esetén agyi inzulin rezisztenciát is okozhat [116].

1.4.1 Sztreptozotocin indukálta 1-es típusú diabétesz

Ahogy már említésre került a sztreptozotocin szelektíven képes elpusztítani a hasnyálmirigy β-sejtjeit, ami inzulin hiányt, hiperglikémiát, polidipsziát és poliúriát idéz elő, ezzel jól utánozva a humán 1-es típusú cukorbetegséget [185]. A vegyület hatására

számos faj érzékeny, például a patkány, az egér, a nyúl és a majom is. Leggyakrabban patkány és egér kísérletben alkalmazzák a hatóanyagot. Patkányok esetében általában egyszeri intravénás vagy intraperitoneális injekcióban, 40-70 mg/kg dózisban adagolják a vegyületet, 8-10 hetes állatoknak. A legtöbb kutatócsoport a 65 mg/kg dózist tartja a kórkép kiváltására a legmegfelelőbbnek. Egér esetében egyszeri, nagy dózisú (200 mg/kg) intraperitoneális injekció 48 óra alatt teljes β-sejt nekrózist és diabéteszt okoz, ugyanakkor ez a kezelési módszer nagyon toxikus az állatok számára, így sokkal elterjedtebb a többszöri, 5 napon keresztül zajló, alacsonyabb dózisú (40 mg/kg) sztreptozotocin kezelés intraperitoneális injekció formájában. Számos munkacsoport igazolta, hogy az állatok neme is befolyásolja a diabétesz kialakulását, ugyanis a nőstény egyedek kevésbé érzékenyek a sztreptozotocin hatására. Továbbá az is kihívást jelent, hogy a kezelés hatására az állatok egy része rögtön a kezelés után elpusztul a nagy mennyiségű inzulin felszabadulás és következésképpen létrejövő súlyos hipoglikémia miatt a fokozott β-sejt nekrózis során [186].

1.4.2 Sztreptozotocin indukálta 2-es típusú diabétesz

Több módszer ismert, amivel 2-es típusú diabétesz modellezhető, a sztreptozotocin gyakran a protokoll része. Gyakori és könnyen kivitelezhető a magas zsírtartalmú diéta és a vegyület kombinálása patkány és egér modellekben. A módszer hátterében az áll, hogy az állatok szervezetében a zsírban gazdag étrend hatására inzulin rezisztencia alakul ki, majd az alacsony dózisú sztreptozotocin kezelés elpusztít annyi β-sejtet, hogy konstans hiperglikémiás állapot is bekövetkezzen [187]. Elsőként ezt a módszert Reed és munkatársai alkalmazták, ők Sprague-Dawley patkányokat 7 hétig etettek magas zsírtartalmú táppal, majd kezelték őket 50 mg/kg sztreptozotocinnal intraperitoneálisan. Az állatoknál kialakult az inzulinrezisztencia, hiperglikémia és jól reagáltak antidiabetikumokra, például metformin kezelésre [188]. A modellt számos kutatócsoport alkalmazza, de kisebb eltérések vannak a kezelés időtartamába és a sztreptozotocin dózisában. Általánosságban a diéta kalóriatartalmának 40-50%-a lipidekből származik és 4-8 hétig tart a táplálás, a vegyület dózisa 20-50 mg/kg között változik. Néhányan azt tapasztalták, hogy 20 mg/kg még nem fejtette ki a kívánt hatást, míg 40 mg/kg már toxikusnak mutatkozott, sok állat elpusztult az injekció beadását követő napokban. A glükóz és inzulin metabolizmus károsodásán kívül diabéteszes neuropátiát is kimutattak

a kezelés hatására. Összességében elmondható, hogy ez a módszer alkalmas a 2-es típusú diabétesz megfelelő modellezésére a preklinikai vizsgálatokban [187]. Önmagában alacsony vagy közepes dózisú sztreptozotocin rövid távú alkalmazását is vizsgálták és azt tapasztalták, hogy a kezelés hatására romlik az inzulin szenzitivitás, az IR számának és autofoszforilációjának csökkenésével [116].

1.4.3 A sztreptozotocin intracerebroventrikuláris alkalmazása

Kiindulva abból, hogy az inzulin és az inzulin receptor is megtalálható a központi idegrendszerben kifejlesztettek egy modellt az agyi inzulin rezisztencia tanulmányozására [189]. Ehhez a szisztémás adagoláshoz képest jóval alacsonyabb dózisban, leggyakrabban 1-3 mg/kg sztreptozotocinnal kezeltek patkányokat intracerebroventrikulárisan adott, egy- vagy kétoldali injekcióval [116]. A kezelés hatására számos változást figyeltek meg.

1.4.3.1 Neurokémiai, strukturális és kognitív változások a kezelés hatására

Változott az agyi glükóz és energia metabolizmus. Három héttel a sztreptozotocin beadása után szignifikánsan nőtt a cerebrális glükóz, ADP és glikogén szint, továbbá a glükóz felhasználás több, mint 40%-al csökkent [189, 190]. A glükóz metabolizmusban jelentős javulást hozott, ha az állatokat 5-9 nappal az icv. sztreptozotocin után 2 hétig orális pioglitazonnal kezelték, ami feltehetőleg javítja az inzulin szenzitivitást és neuroprotektív tulajdonsággal bír [190].

A kolinerg transzmisszióban is változást észleltek. Egy héttel a vegyület beadása után a patkányok agyában szignifikánsan csökkent a kolin-acetiltranszferáz szintje és ez a változás még 3 hét múlva is észlelhető volt [191]. Az acetilkolin-észteráz aktivitásában növekedést tapasztaltak, de mindkét enzim esetében a változás megelőzhető volt az antioxidáns hatású koenzim Q10 krónikus, intraperitoneális adagolásával [192].

Jelentősen fokozta az agyi oxidatív stressz kialakulását, NO szintet a hatóanyag 1-8 héttel a beadást követően, de kiindulva a szer hatásmechaizmusából ez nem meglepő változás [116, 181]. Továbbá ennek mértéke szintén csökkenthető volt krónikus koenzim Q10 krónikus kezeléssel [192].

Morfológiailag is jelentős változásokat tapasztaltak a különböző munkacsoportok már 1 héttel a szer beadását követően a kezelt állatok korától függetlenül [116]. Sztreptozotocin hatására jelentős növekedést tapasztaltak az asztrogliózis markere, a gliális fibrilláris savas protein (GFAP) szintjében, mely az asztrociták tipikus reakciójára utal a neuronális károsodás hatására [193]. A kezelés hatására fokozódtak továbbá az inflammatórikus folyamatok, a mielin és axonális neurotoxicitás és a sejtpusztulás [193].

Az állatok kognitív képességei is csökkentek már 2 héttel a vegyület beadása után. A változás krónikusnak és progresszívnek bizonyult, 12 héttel a kezelés után is megfigyelhető volt, abban az esetben is, ha csak egyszeri injekciót kaptak. Ez a jelenség nem mutatkozott kor-függőnek, ugyanakkor azt tapasztalták, hogy alacsonyabb dózisok mérsékeltebb romlást eredményeztek [116, 194]. A hatás pontos mechanizmusa nem tisztázott, de vélhetően az energiametabolizmus, a kolinerg transzmisszió zavara, az oxidatív stressz és a direkt neurotoxicitás egyaránt szerepet játszik a jelenségben [116].

1.4.3.2 A vegyület hatása az agyi inzulin jelátvitelre

Kevés tanulmány vizsgálta az icv. sztreptozotocin injekció hatását az inzulin jelátvitelre, de azt kimutatták, hogy az agyban terület specifikusan változás tapasztalható az inzulin rendszerben és a 12 hetes vizsgálat során jelentős progressziót is megfigyeltek [194, 195]. A hippocampus és forntoparietális cortexben is csökkent az inzulin és az IR gének expressziója. A PI3K jelátvitel is régió specificitást mutatott, a hippocampus területén 4 hét után nem volt változás az Akt/PKB expresszióba, de 12 hét után mérséklődött, a frontoparietális részen 4 hét után csökkenést, majd 12 hét múlva növekedést lehetett tapasztalni az expresszió mértékében. A teljes GSK-3 szint nem változott, de a hippocampusban 12 hét elteltével csökkent a foszfo-GSK-3/GSK-3 arány, ami a GSK-3 fokozott aktivitására utal. Az icv. sztreptozotocin kezelés után 4 és 12 héttel is nőtt a tau-fehérje expressziója és foszforilációjának mértéke. Aβ-szerű aggregátumok 4 hét után nem, de 12 hét után megfigyelhetőek voltak [194, 195]. A tanulmány alapján következtethetünk arra, hogy a sztreptozotocin alkalmas lehet *in vivo* körülmények között a centrális inzulin rezisztencia és Alzheimer-kór kapcsolatának modellezésére.

1.4.4 A sztreptozotocin neuronális hatásának vizsgálata *in vitro* kísérletekben

Az állatkísérletek mellett számos kutatócsoport alkalmazta a sztreptozotocin kezelést neuronális sejteken celluláris Alzheimer-kór modellezésére, tanulmányozására. A vizsgálatok alapján egységesen megállapítható, hogy a vegyület koncentrációfüggő citotoxicitást fejt ki a sejtekre általánosan millimoláris koncentráció tartományban. A neuronális sejtek típusa nagyban meghatározza, hogy mekkora koncentráció milyen mértékű károsodást vált ki [196-199]. A sejttípus mellett a sejt érettsége is befolyásolja a toxicitás mértékét. Isaev és munkatársai primer patkány cerebelláris granula sejteket vizsgált és azt tapasztalta, hogy a 2-3 napos, éretlen sejtkultúra jelentős része elpusztul 3-4 mM sztreptozotocin hatására, ugyanakkor, ha a kezelés előtt 7-8 napot vártak, az érettebb sejtek már sokkal kevésbé voltak érzékenyek [200]. Ezzel a jelenséggel más munkacsoport is foglalkozott és arra a megállapításra jutottak, hogy a neuronális differenciálás, fokozza a sejtek ellenálló képességét különböző neurotoxinokkal szemben [201, 202].

A koncentrációfüggő toxicitás hátterében számos olyan folyamat feltételezhető, ami jól korrelál az Alzheimer-kór és/vagy az inzulin rezisztencia patomechanizmusával. Megfigyeltek a sztreptozotocin hatására mitokondriális membrán depolarizációt [199, 203], oxidatív stressz [204], neuroinflammáció kialakulását [204]. Az Aβ fokozott termelődését [204] és nagyobb mértékű tau-protein foszforilációt is kimutattak [203].

Jelenleg nem ismert olyan kutatás, ami egyértelműen vizsgálja a sztreptozotocin hatását az inzulin szenzitivitásra neuronális sejteken, de Biswas és munkatársai neuronális sejtvonalon és asztrocitákon is csökkent glükóz felvételt mutatott ki [203, 205]. Ezen kívül a GLUT transzporterek expressziójának csökkenését is megfigyelték [205, 206]. A jelátviteli kaszkád vizsgálatával kisebb mértékű IRS-1 expressziót [207] és alacsonyabb foszfo-GSK-3 szintet mértek [196, 204]. Több vizsgálatban az inzulin kezelés protektívnek bizonyult a sztreptozotocin-indukált károsodás ellen [199, 204].

2. Célkitűzések

Munkám során célul tűztem ki az Alzheimer-kór és inzulin rezisztencia kapcsolatának vizsgálatát *in vitro* sejtes modellben, ehhez az alábbi kísérletek elvégzését terveztem:

- A sztreptozotocin hatásának vizsgálata nem-differenciált, illetve retinsavval differenciált SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtek életképességére.
- Az inzulin hatásának vizsgálata a sztreptozotocinnal kezelt nem-differenciált és retinsavval differenciált sejtek életképességére.
- A nem-differenciált és retinsavval differenciált sejtek érzékenységének összehasonlítása a károsodással, illetve a protektív kezeléssel szemben.
- Annak tanulmányozása, hogy sztreptozotocin kezelés hatására kialakul-e inzulin rezisztencia a nem-differenciált és retinsavval differenciált sejtek esetében, illetve, hogy az inzulin érzékenysége fokozható-e GLP-1 agonistával.

3. Módszerek

3.1 Anyagok

A sejtkultúra tápoldatát (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, DMEM/F12) a Corning (Tewksbury, MA, USA), a fötális borjú szérumot (FBS) a Biosera (Nuaille, France) cégek szállították. A stabilizált glutamin és nem esszenciális aminosav oldatok a Pan Biotech (Aidenbach, Németország) cégtől származtak.

Az inzulint, a reszazurin kitet (TOX8) a Triton X-100-at, a foszfatáz inhibitort, az exenatidot a Sigma (St. Louis, MO, USA) szállította. A CytoTox-ONE laktát-dehidrogenáz kit a Promega (Madison, WI, USA) cégtől származott. A sztreptozotocint a Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) biztosította, ezt közvetlenül a sejtek kezelése előtt, frissen oldottuk fel citrát-pufferben (0,1 M, pH 4,5) majd a tápoldathoz adtuk.

A Western blot reagenseket és a puffer komponenseket úgy, mint az akrilamid/biszakrilamid 30% oldatot, az ammónium-perszulfátot, a tetrametilén-diamint (TEMED), a tris-hidroximetil-aminometánt (TRIS), a glicint és a tricint a Sigma biztosította. A DuoSet IC, Phospho-GSK-3-α/β (S21/S9) és a GAPDH primer antitestek az R&D Systems GmbH (Wiesbaden, Németország) cégtől származtak. A Pierce ECL Western blot szubsztrátot és az anti-egér szekunder antitestet a ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) biztosította.

A Western blot technikához használt polivinilidén-fluorid (PVDF) transzfer membránt és a röntgenfilmeket a Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) szállította.

3.2 Sejttenyésztés, differenciálás és kezelés

A kísérleteinkhez SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtvonalat használtunk, melyet a European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK) szállított. A sejteket 1% stabilizált glutamin, 1% nem esszenciális aminosav oldattal és antibiotikummal kiegészített, 10%-os FBS tartalmú DMEM/F12 tápoldatban tenyésztettük 37 ^{o}C, 5% CO_2 körülmények között. A differenciáláshoz Jahn és munkatársai módszeréhez hasonlóan [208], a sejtek tápoldatához 50 μM retinsavat adtunk

a 0. napon, a 3. napon cseréltük a tápoldatot és újból retinsavat adtunk a sejtekhez, a differenciálás 5 napig tartott.

Az életképesség tesztekhez egy nappal a kezelés előtt a sejteket 24 lyukú sejttenyésztő lemezekre raktuk ki (10^4 sejt/lyuk), majd 24 óra elteltével a tápközeget csökkentett szérum tartalmú tápoldatra cseréltük, amely 1% FBS-t tartalmazott. A sejteket különböző koncentrációjú sztreptozotocinnal (0, 0,3, 1, 3, 5, 7, 10 mM) kezeltük. Az inzulin hatásának vizsgálatához a szérum csökkentett táppal vagy sztreptozotocinnal kezelt sejtek tápoldatához különböző koncentrációjú inzulint (0, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 nM) adtunk. A sztreptozotocint egyszer, a kezelés első napján adtuk a médiumhoz, de a tápoldatot naponta cseréltük és ekkor az inzulin kezelést is ismételtük.

A Western blot és ELISA mérésekhez a sejteket 10 cm-es Petri-csészékbe raktuk ki ($6x10^5$ sejt/csésze) és a 80-90%-os konfluencia szint elérése után végeztük a kezeléseket. A sejteket szérum csökkentett táppal vagy sztreptozotocinnal kezeltük, majd 24 óra múlva inzulin kezelést végeztünk különböző koncentrációban (0, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 nM) 30 percen keresztül, majd a sejteket feldolgoztuk jég hideg lízis pufferben (1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 6 M karbamid foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS) oldva), ami foszfatáz inhibitort is tartalmazott. Egyes kísérletekhez exenatid előkezelést végeztünk. Közvetlenül a szérum csökkentett tápcserét követően, 1 órával a sztreptozotocin kezelés előtt 100 nM exenatidet adtunk a sejtekhez, majd ezt a feldolgozás előtt az inzulin kezeléssel párhuzamosan is megismételtük.

3.3 Reszazurin redukciós életképesség teszt

A reszazurin redukció mértékét a gyártó utasításai alapján végeztük. Röviden 24, 48, 72 óra után a sejtek tápoldatát új, 10% reszazurin oldatot (0,15 mg/ml PBS-ben) tartalmazó médiumra cseréltük és 4 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd a keletkezett fluroeszcens rezorufin koncentrációját Fluoroskan Ascent FL Microplate fluoriméterrel mértük (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) 530/590 nm-en.

3.4 A laktát-dehidrogenáz enzim felszabadulásának mérése

A laktát-dehidrogenáz kibocsátást a gyártó utasításai alapján mértük. Huszonnégy, 48, 72 óra után a sejtek tápoldatát összegyűjtöttük az enzim mennyiségének meghatározásához. Az utolsó napon az intracelluláris laktát-dehidrogenáz tartalom méréséhez lizáltuk a sejteket 1% Triton X-100 alkalmazásával. A laktát-dehidrogenáz aktivitást megállapításához a fluoreszcens terméket 590 nm-en detektáltuk microplate fluoriméterrel, 530 nm-es gerjesztés mellett, a gyártó utasításai alapján.

3.5 Western blot analízis

A minták teljes fehérje mennyiségének meghatározásához a Bradford módszert alkalmaztuk [209]. A lizált sejtekhez Laemmli puffert (0,1% 2-merkaptoetanol, 0,0005% brómfenolkék, 10% glicerin, 2% SDS, 63 mM Tris-HCl (pH 6,8)) adtunk és a mintákat denaturáltuk 5 percig 97°C-on tartva. A mintákat 10%-os SDS-poliakrilamid gélen választottuk el. Az elektorforézist követően a fehérjéket PVDF membránra blottoltuk át. A membránt 0,1% Tween 20-at tartalmazó TRIS-szel pufferelt sóoldatban (TBST) oldott 5% sovány tejporral blokkoltuk egy órán keresztül. A membránokat 0,005 µg/mL GAPDH, 0,5 µg/mL anti-GSK-3, illetve 0,25 µg/mL biotinált anti-foszfo-GSK-3 primer antitestet tartalmazó 5%-os sovány tejpor oldatban inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán keresztül. Másnap a membránokat TBST-vel háromszor 10 percig mostuk, ezt követően sztreptavidinnel, illetve 1:1000-hez hígításban alkalmazott anti-egér másodlagos antitesttel konjugált tormaperoxidázzal inkubáltuk szobahőmérsékleten egy órán át. A specifikus fehérjéket TBST-vel történő háromszor 10 percig tartó mosást követően kemilumineszcens technikával, röntgenfilmen tettük láthatóvá Pierce ECL Western blot reagens alkalmazásával. Eredményeinket GAPDH-specifikus sávokra normalizáltuk.

3.6 ELISA mérés

A GSK-3 foszforiláció kvantitatív meghatározásához ELISA mérést végeztünk a gyártó utasításai alapján. Röviden 100 µL sejt lizátumot pipettáztunk a 4 µg/mL anti-GSK-3-mal bevont ELISA lemezre, 4 °C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Másnap mostuk a lemezt és 4 óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten 0,1 µg/mL anti-foszfo-GSK-3 antitestet tartalmazó oldatban. Mosást követően sztreptavidinnel konjugált

tormaperoxidázzal inkubáltuk szobahőmérsékleten 40 percig, majd a szubsztrát oldat hozzáadása után 450 és 550 nm-en határoztuk meg az optikai denzitást Multiskan Ascent ELISA olvasó (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) segítségével. Az eredményeinket a minták fehérjetartalmával korrigáltuk.

3.7 Statisztikai elemzés

Az eredményeinket átlag ± átlag standard hibája formában adtuk meg minimum három párhuzamos mérés értékei alapján. Az eredményekeinket a kontroll károsodáshoz, a szérum csökkentett körülményeknél mért értékekhez hasonlítottuk. Az EC50 és E_{Max} értékeket a nemlineáris regresszióval illesztett koncentráció-hatás görbék alapján becsültük meg. A statisztikai különbségek elemzésére egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk, majd a különböző adatok összehasonlítására Dunnett *post-hoc* tesztet használtunk. Az értékelésnél a különbséget akkor tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak, ha $p < 0,05$ volt. A statisztikai analízis a Prism 8.0 szoftver (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) segítségével készült. A számításokhoz és az ábrák készítéséhez a Microsoft Excel, Power Point (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), Prism 8.0 és az Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) programokat alkalmaztuk. Az egyes kísérleteket egyenként legalább háromszor megismételtük. Az ábrák az összes elvégzett kísérlet eredményeinek átlagát mutatják.

4. Eredmények

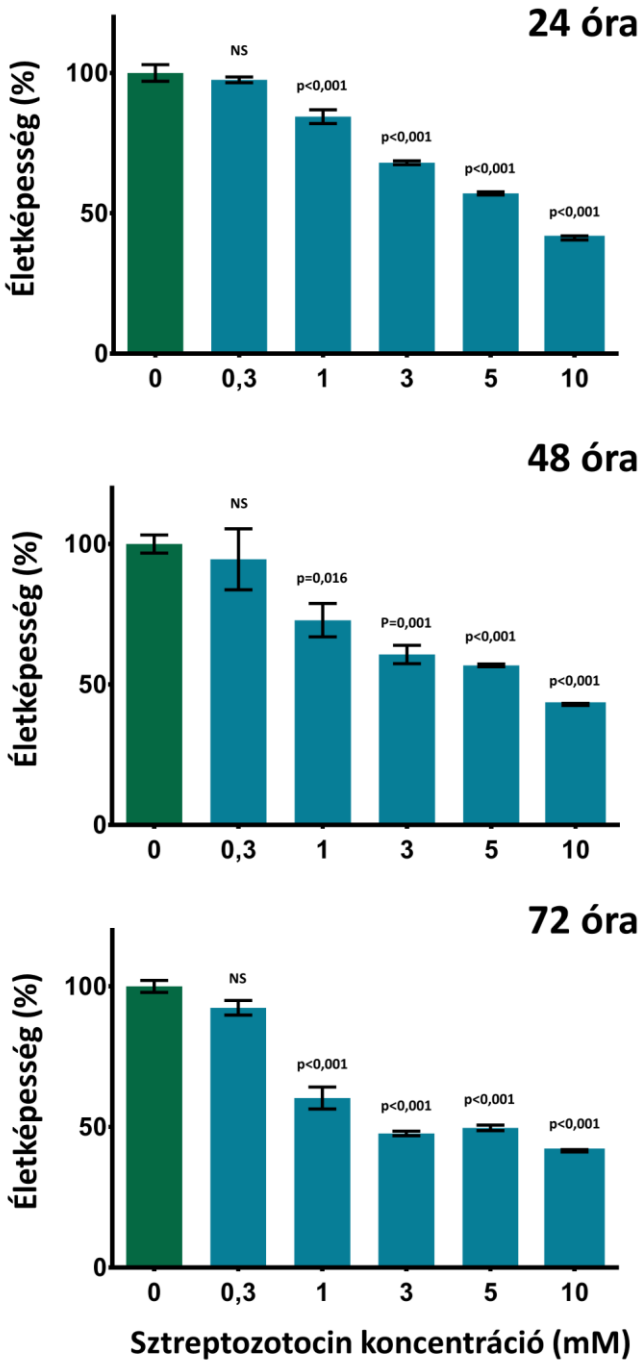
4.1 A sztreptozotocin hatása nem-differenciált SH-SY5Y sejtekre

Összehasonlítottuk a sztreptozotocin citotoxikus hatását a szérum csökkentett táp indukált károsodáshoz képest. A nem-differenciált sejteket szérum csökkentett tápban 0,3, 1, 3, 5, 10 mM sztreptozotocinnal kezeltük és a sejtek életképességét reszazurin redukciós teszttel vizsgáltuk, illetve meghatároztuk az laktát-dehidrogenáz enzim kibocsátásának mértékét 24, 48 és 72 óra után.

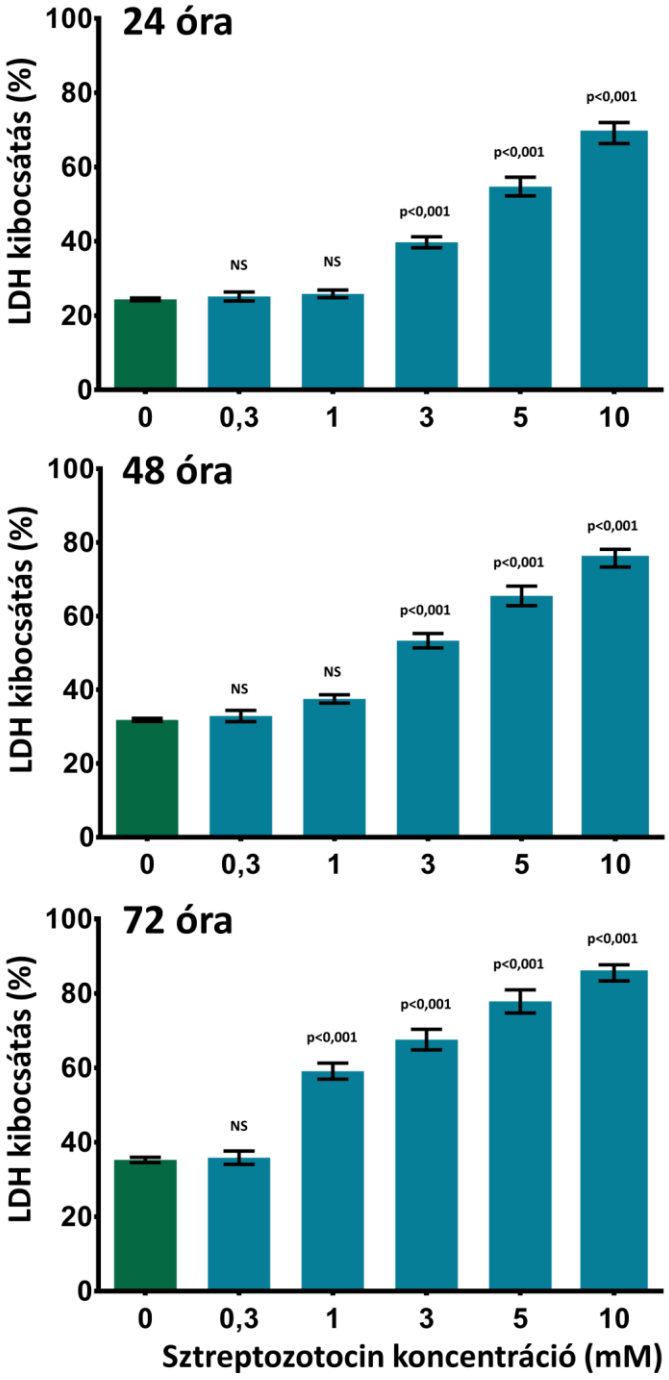
Az alacsony sztreptozotocin koncentráció (0,3 mM) enyhe, nem szignifikáns csökkenést eredményezett a metabolikusan aktív sejtek számában, míg magasabb koncentrációk (3, 5, 10 mM) jelentősen rontották a reszazurin redukáló képességet már 24 óra után is. Az 1 mM-os koncentráció enyhe, ugyanakkor szignifikáns akut citotoxicitást eredményezett, ami fokozatosan erősödött 2, illetve 3 nap után, ezzel megfelelően modellezve a progresszív, neurodegeneratív folyamatokat (7. ábra).

Laktát-dehidrogenáz kibocsátási tesztet végeztünk az eredményeink megerősítéséhez és azt tapasztaltuk, hogy szérum csökkentett táp, illetve 0,3 mM sztreptozotocin kezelés hatására a sejtmembrán integritás csak kis mértékben csökkent a 3 nap alatt. A vegyület 1 mM-os koncentrációban lassan, fokozatosan okozott károsodást, 3 nap után szignifikáns mértékűnek bizonyult. A magasabb koncentrációkkal végzett kezelés (3-10 mM) a reszazurin mérésnél tapasztaltakhoz hasonlóan, már 24 óra elteltével is szignifikáns membránkárosodást okozott (8. ábra).

A további vizsgálatokhoz 1 mM-os sztreptozotocin kezelést választottunk lassan kialakuló, fokozódó citotoxicitása miatt.



7. ábra: **A sztreptozotocin koncentráció- és időfüggő módon csökkentette a nem-differenciált SH-SY5Y sejtek életképességét. A szérum csökkentett körülményt tekintettük kontroll károsodásnak, ez 37,6-44,1%-os csökkenést okozott a sejtek reszazurin redukáló aktivitásában a 3 nap alatt. Az ábrán a különböző sztreptozotocin koncentráció (0,3, 1, 3, 5, 10 mM) életképességre kifejtett hatása látható a szérum csökkentett körülményhez képest (0 mM sztreptozotocin), 1, 2 és 3 nap után. A p értékek a megfelelő szérum csökkentett körülményhez viszonyított adatok, NS: nem szignifikáns.**



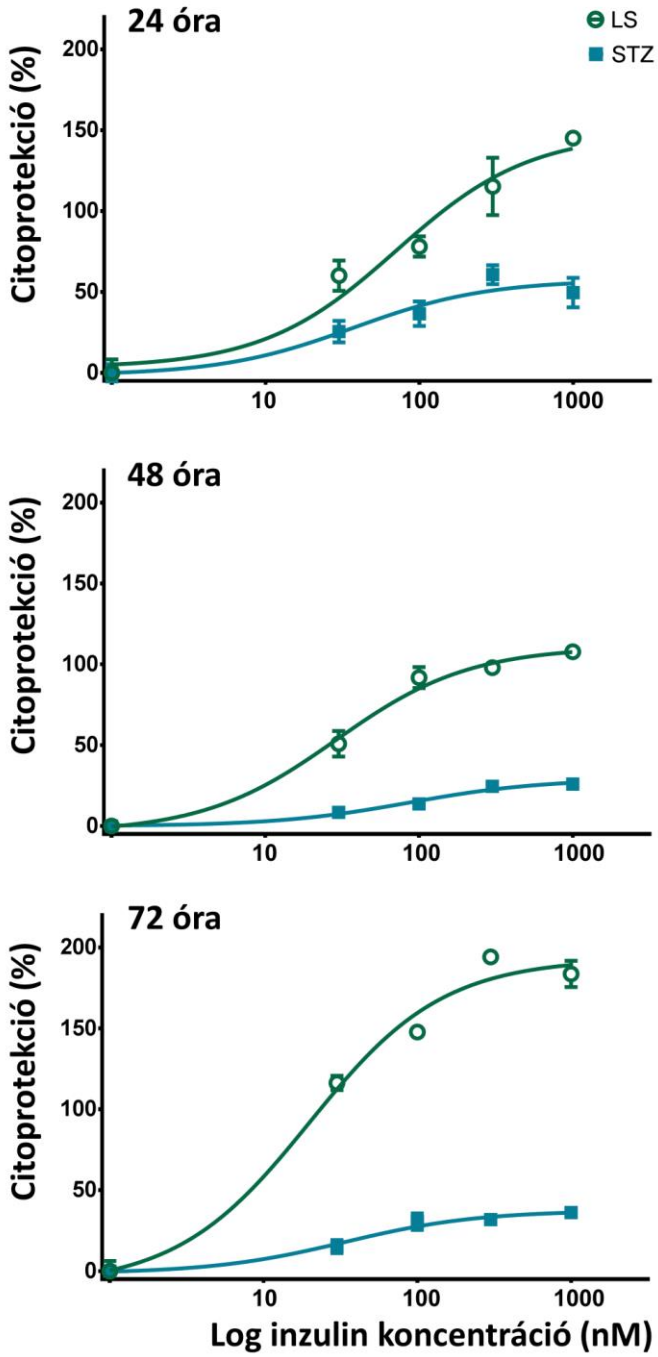
8. ábra: **A sztreptozotocin koncentráció- és időfüggő módon károsította a sejtmembrán integritását a nem-differenciált SH-SY5Y sejtek esetében. A szérum csökkentett körülményt tekintettük kontroll károsodásnak (0 mM sztreptozotocin). Az ábrán a különböző sztreptozotocin koncentrációk (0,3, 1, 3, 5 és 10 mM) laktát-dehidrogenáz felszabadulásra kifejtett hatását ábrázoltuk 1, 2 és 3 nap után. A p értékek a megfelelő szérum csökkentett körülményhez viszonyított adatok, NS: nem szignifikáns.**

4.2 Az inzulin citoprotektív hatása szérum csökkentett, illetve sztreptozotocin kezelés indukálta károsodással szemben

Különböző inzulin koncentrációk (30, 100, 300, 1000 nM) protektív hatását vizsgáltuk 1-3 napon keresztül szérum csökkentett táppal, illetve 1 mM sztreptozotocinnal kezelt nem-differenciált sejteken. Reszazurin redukciós méréseink alapján, az inzulin koncentrációfüggő módon enyhítette a sejtkárosodást. A szérum csökkentet táppal kezelt sejtek esetében a károsodást az inzulin kezelés teljes mértékben kivédte minden időpontban, úgy, hogy a 3. napra az életképes sejtek majdnem megduplázódtak a kontroll csoport sejtszámához képest. A sztreptozotocinnal kezelt sejteknél csak részleges protekciót tapasztaltunk, a kontroll csoporthoz képest az életképes sejtek aránya 25-50% között tetőzött (9. ábra). Az eltérő maximális hatás elérésére az 50%-os hatás eléréséhez szükséges inzulin koncentráció nem különbözött a két csoportban (1. táblázat).

1. táblázat: **Az inzulin protektív koncentráció-hatás görbéinek becsült E_{Max} és EC50 értékeinek összehasonlítása szérum csökkentett táppal és 1 mM sztreptozotocinnal kezelt, nem-differenciált SH-SY5Y sejteken a reszazurin redukciós teszt eredményei alapján.**

	E_{Max}				
	Szérum csökkentett táp		**Sztreptozotocin kezelés**		**p**
	Becsült érték	**95% CI**	**Becsült érték**	**95% CI**	
1. nap	148,3	121,30-175,30	57,5	42,59-72,39	0,0015
2. nap	110,1	102,00-119,70	29,1	25,41-32,72	0,0006
3. nap	193,1	179,80-206,40	37,4	30,80-43,97	0,0011
	EC50				
	Szérum csökkentett táp		**Sztreptozotocin kezelés**		**p**
	Becsült érték	**95% CI**	**Becsült érték**	**95% CI**	
1. nap	70,9	30,08 - 167,30	37,5	9,461-148,30	0,4715
2. nap	28,9	17,51 - 47,93	86,7	50,04-150,20	0,0843
3. nap	19,9	12,73 - 31,20	33,9	13,05-87,78	0,4950

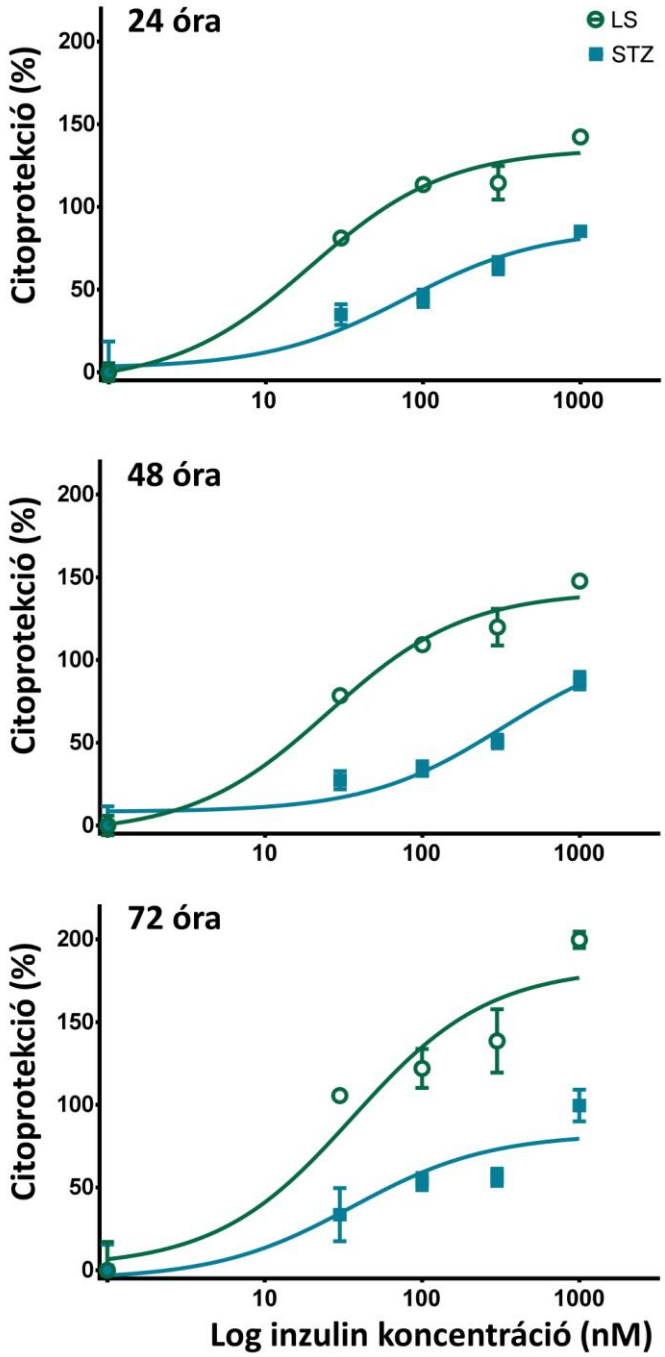


9. ábra: **Az inzulin koncentráció- és időfüggő módon javította a szérum csökkentett táppal (LS), illetve 1 mM sztreptozotocinnal (STZ) kezelt, nem-differenciált SH-SY5Y sejtek metabolikus aktivitását. Az ábrán a különböző inzulin koncentrációk (30, 100, 300, 1000 nM) hatását ábrázoltuk a szérum csökkentett táppal, illetve sztreptozotocinnal kezelt sejtek reszazurin redukáló aktivitására 1, 2 és 3 nap után.**

Hasonlóan a reszazurin redukciós teszt eredményeihez, az inzulin koncentrációfüggő módon csökkentette a sejtmembrán integritás károsodásának mértékét is az laktát-dehidrogenáz kibocsátási teszt alapján. A szérum csökkentett táp indukálta laktát-dehidrogenáz felszabadulást az inzulin teljesen kivédte, ugyanakkor a sztreptozotocinnal kezelt sejtek esetében részleges volt a protekció (10. ábra). Továbbá, az 1. és 2. napon az inzulin koncentráció-hatás görbéi jobbra tolódtak, szignifikáns különbséget mutatva az inzulin hatáserősségében (2. táblázat).

2. táblázat: **Az inzulin protektív koncentráció-hatás görbéinek becsült E_{Max} és EC50 értékeinek összehasonlítása szérum csökkentett táppal és sztreptozotocinnal kezelt, nem-differenciált sejteken, laktát-dehidrogenáz kibocsátási teszt eredményei alapján.**

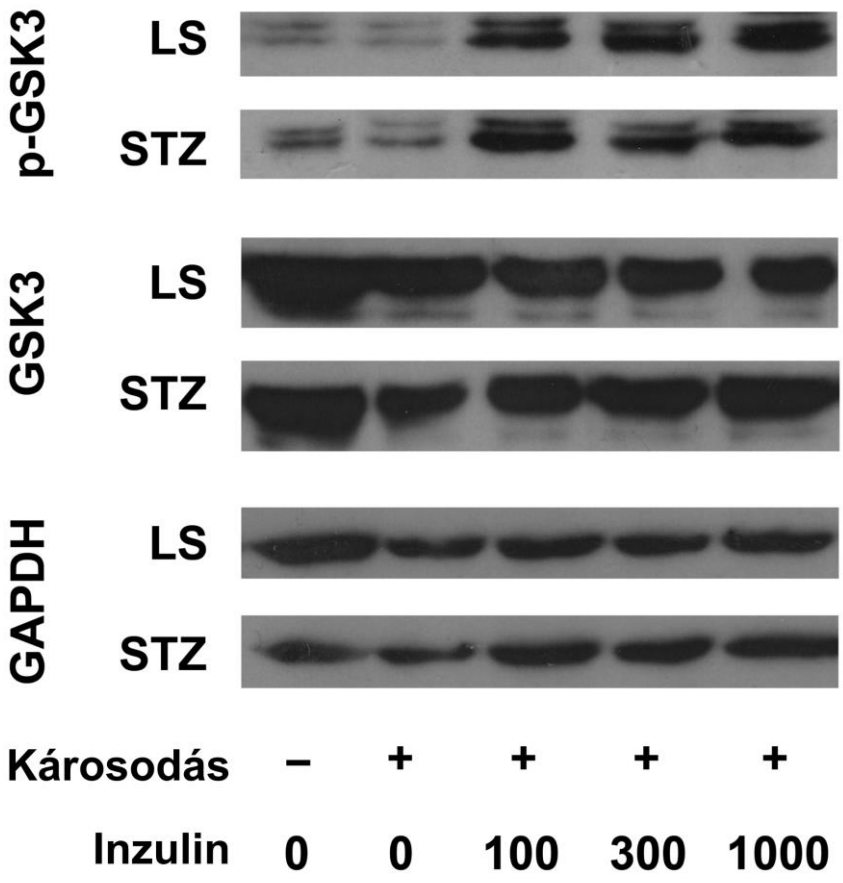
	E_{Max}				
	Szérum csökkentett táp		**Sztreptozotocin kezelés**		
	Becsült érték	**95% CI**	**Becsült érték**	**95% CI**	**p**
1. nap	135,3	123,60-147,10	86,7	70,74 - 102,60	0,0036
2. nap	141,5	128,70-154,30	110,4	65,44 - 155,40	0,3582
3. nap	178,3	145,90-210,60	100,1	62,36 - 137,90	0,2604
	EC50				
	Szérum csökkentett táp		**Sztreptozotocin kezelés**		
	Becsült érték	**95% CI**	**Becsült érték**	**95% CI**	**p**
1. nap	19,3	10,91-34,22	77,7	33,05-182,60	0,0205
2. nap	25,3	14,69-43,38	326,1	90,31-1178,00	0,0019
3. nap	28,8	10,00-82,62	117,1	23,44-584,80	0,3003



10. ábra: **Az inzulin koncentráció- és időfüggő módon javította a szérum csökkentett táppal (LS), illetve 1 mM sztreptozotocinnal (STZ) kezelt, nem-differenciált SH-SY5Y sejtek membránjának integritását. Az ábrán a különböző inzulin koncentrációk (30, 100, 300, 1000 nM) hatását ábrázoltuk az laktát-dehidrogenáz felszabadulás mértékére szérum csökkentett táppal, illetve sztreptozotocinnal kezelt sejteken 1, 2 és 3 nap után.**

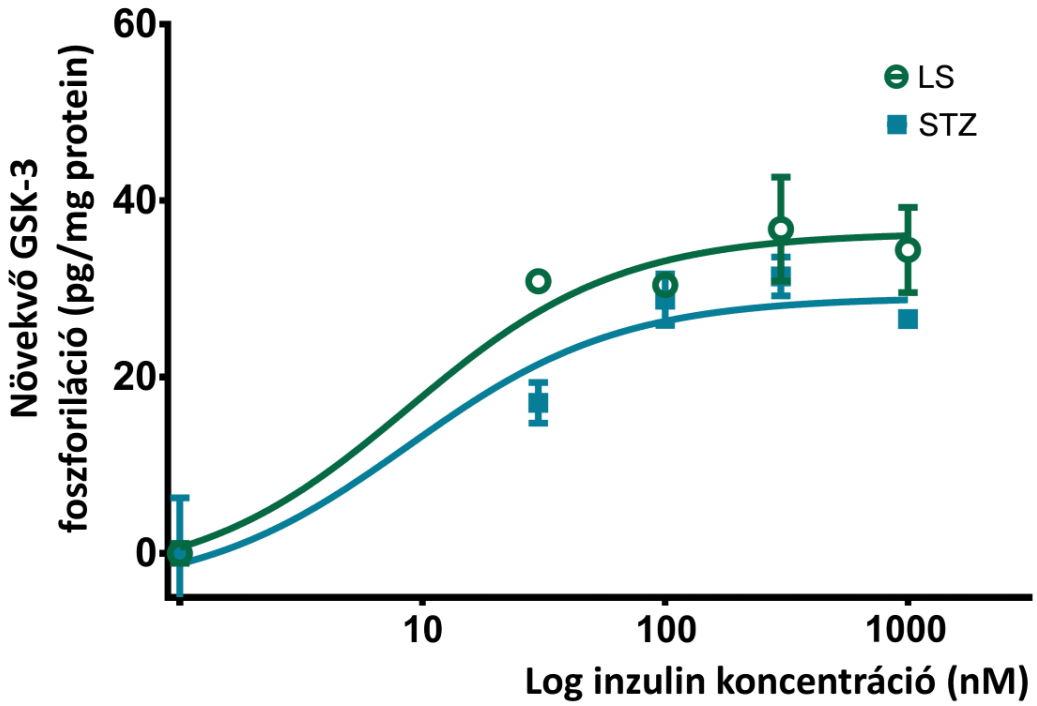
4.3 Az inzulin hatása a GSK-3 foszforilációra szérum csökkentett táppal és sztreptozotocinnal kezelt nem-differenciált SH-SY5Y sejteken

Az inzulin jelátvitel tanulmányozásához vizsgáltuk az inzulin GSK-3 foszforilációjára kifejtett hatását szérum csökkentett táppal, illetve sztreptozotocinnal kezelt nem-differenciált SH-SY5Y sejteken. A Western blot analízis során megállapítottuk, hogy a sztreptozotocin kezelés nem befolyásolta az inzulinra adott választ. A foszfo-GSK-3 szintek hasonlóak voltak a két csoport között 100, 300, 1000 nM inzulin kezelés hatására (11. ábra).



11. ábra: **Az inzulin különböző koncentrációi (100, 300, 1000 nM) egyaránt fokozták a GSK-3 foszforilációjának mértékét a szérum csökkentett táppal (LS), illetve 1 mM sztreptozotocinnal (STZ) kezelt, nem-differenciált SH-SY5Y sejtek esetében. Az inzulin stimulációt 30 perccel a sejtek feldolgozása előtt végeztük, majd Western blot technikával detektáltuk a fehérjéket.**

Kvantitatív meghatározáshoz ELISA technikával is mértük a GSK-3 foszforiláció mértékét, foszfo-GSK-3 specifikus antitest alkalmazásával. Az inzulin kezelés a szérum csökkentett táppal és 1 mM sztreptozotocinnal kezelt sejtek esetében hasonlóan, koncentrációfüggő módon fokozta a GSK-3 foszforilációt (12. ábra). Az inzulin koncentráció-hatás görbéi se hatáserősségben, se hatékonyságban nem különböztek szignifikánsan egymástól a két csoportban (3. táblázat).



12. ábra: **Az inzulin koncentrációfüggő módon fokozta a GSK-3 foszforilációjának mértékét a szérum csökkentett táppal (LS), illetve 1 mM sztreptozotocinnal (STZ) kezelt, nem-differenciált SH-SY5Y sejtek esetében. Az inzulin stimulációt különböző koncentrációkban (30, 100, 300, 1000 nM) 30 perccel a sejtek feldolgozása előtt végeztük, majd ELISA módszerrel állapítottuk meg a foszforilált GSK-3 mennyiségét.**

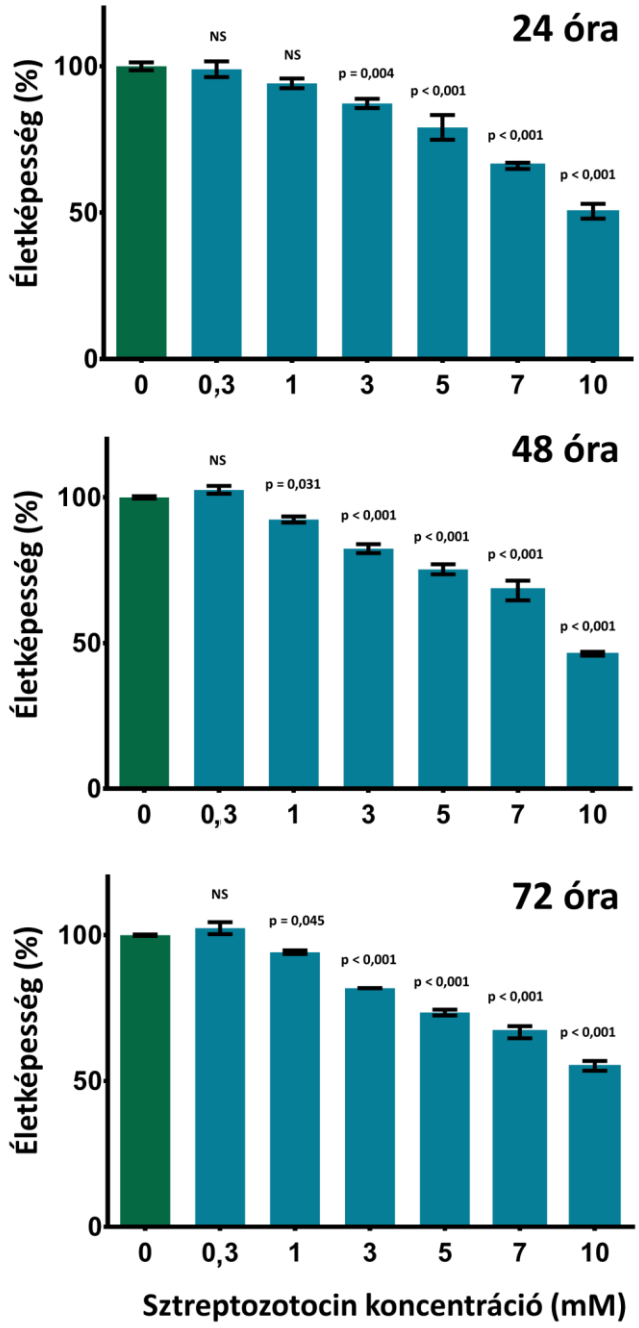
3. táblázat: **Az inzulin GSK-3 foszforilációt indukáló koncentráció-hatás görbéinek becsült E_{Max} és EC50 értékeinek összehasonlítása szérum csökkentett táppal és 1 mM sztreptozotocinnal kezelt, nem-differenciált SH-SY5Y sejteken.**

E_{Max}				
Szérum csökkentett táp		**Sztreptozotocin kezelés**		**p**
Becsült érték	**95% CI**	**Becsült érték**	**95% CI**	
2,3	1,97-2,66	2,3	1,90-2,60	0,7646
EC50				
Szérum csökkentett táp		**Sztreptozotocin kezelés**		**p**
Becsült érték	**95% CI**	**Becsült érték**	**95% CI**	
3,3	0,16-71,65	14,9	4,76-46,40	0,1819

4.4 A sztreptozotocin hatása retinsavval differenciált SH-SY5Y sejtekre

Ötven μM retinsavval differenciált SH-SY5Y sejtek esetében is megvizsgáltuk, hogy különböző sztreptozotocin koncentrációk (0,3, 1, 3, 5, 7, 10 mM) hogyan befolyásolják a sejtek életképességét a szérum csökkentett táp károsító hatásához viszonyítva. Ehhez reszazurin redukciós tesztet használtunk 1, 2, 3 nap után.

Hasonlóan a korábbi eredményeinkhez a sztreptozotocin koncentrációfüggő módon csökkentette tovább a metabolikusan aktív sejtek számát a szérum csökkentett körülményhez képest, ugyanakkor a differenciált sejtek kevésbé voltak érzékenyek a kezeléssel szemben. Alacsonyabb koncentrációk nem okoztak szignifikáns csökkenést a sejtek életképességében (0,3 mM), vagy csak enyhén rontották azt (1 mM). Ismételten a magasabb koncentrációk (7, 10 mM) már jelentős akut citotoxicitást is eredményeztek. A 3, illetve 5 mM-os sztreptozotocin kezelés számottevő, mégis mérsékelt sejtpusztulást váltott ki, így mindkét koncentráció alkalmasnak bizonyult a neurodegeneratív folyamat modellezésére a differenciált sejtvonalon. A további kísérleteinkhez az 5 mM-os koncentrációt választottuk (13. ábra).



13. ábra: **A sztreptozotocin koncentrációfüggő módon csökkentette a retinsavval differenciált SH-SY5Y sejtek életképességét. A szérum csökkentett körülményt tekintettük kontroll károsodásnak, ez 38,7-54,2%-os csökkenést okozott a sejtek reszazurin redukáló aktivitásában a három nap alatt. Az ábrán a különböző sztreptozotocin koncentrációk (0,3, 1, 3, 5, 7, 10 mM) életképességre kifejtett hatása látható a szérum csökkentett körülményhez képest (0 mM sztreptozotocin), 1, 2 és 3 nap után. A p értékek a megfelelő szérum csökkentett körülményhez viszonyított adatok, NS: nem szignifikáns.**

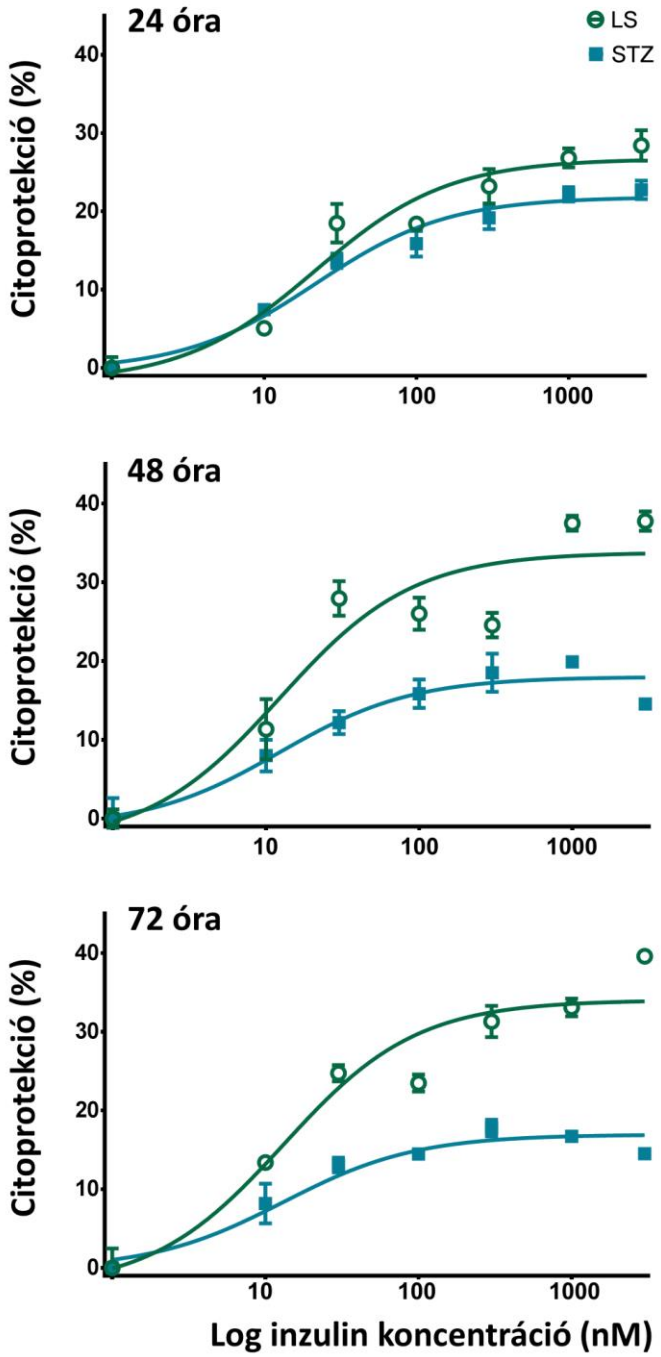
4.5 Az inzulin citoprotektív hatása szérum csökkentett, illetve sztreptozotocin kezelés indukálta károsodással szemben retinsavval differenciált SH-SY5Y sejteken

Reszazurin redukciós teszttel vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a differenciált, szérumcsökkentett médiummal, vagy emellett 5 mM sztreptozotocinnal kezelt sejtek életképességét a különböző koncentrációjú (10, 30, 100, 300, 1000, 3000 nM) inzulin kezelés 1, 2 és 3 nap után.

Az inzulin citoprotektív, koncentrációfüggő hatása a differenciált sejteknél is érvényesült, de kisebb mértékben, mint a nem-differenciált sejtek esetében. A szérum csökkentett csoportban az inzulin maximális sejtvédő hatása 25-40% közé esett, ez szignifikánsan magasabb volt, mint a sztreptozotocinnal kezelt csoportban, ahol 10-25%-os volt a citoprotekció (14. ábra). Az inzulin hatáserőssége nem különbözött szignifikánsan a két csoportban (4.táblázat).

4. táblázat: **Az inzulin protektív koncentráció-hatás görbéinek becsült E_{Max} és EC50 értékeinek összehasonlítása szérum csökkentett táppal és 5 mM sztreptozotocinnal kezelt, retinsavval differenciált SH-SY5Y sejteken a reszazurin redukciós teszt eredményei alapján.**

	E_{Max}				
	Szérum csökkentett táp		**Sztreptozotocin kezelés**		**p**
	Becsült érték	**95% CI**	**Becsült érték**	**95% CI**	
1. nap	26,8	24,14-29,50	21,7	20,10-23,26	0,0019
2. nap	33,9	29,82-39,79	17,8	15,58-20,07	<0,0001
3. nap	34,4	31,38-37,44	16,4	14,99-17,77	<0,0001
	EC50				
	Szérum csökkentett táp		**Sztreptozotocin kezelés**		**p**
	Becsült érték	**95% CI**	**Becsült érték**	**95% CI**	
1. nap	22,8	11,64-44,78	19,8	11,77-33,16	0,7586
2. nap	12,8	5,24-31,20	10,7	3,99-28,53	0,8123
3. nap	15,5	8,10-29,67	7,4	3,57-15,25	0,2147



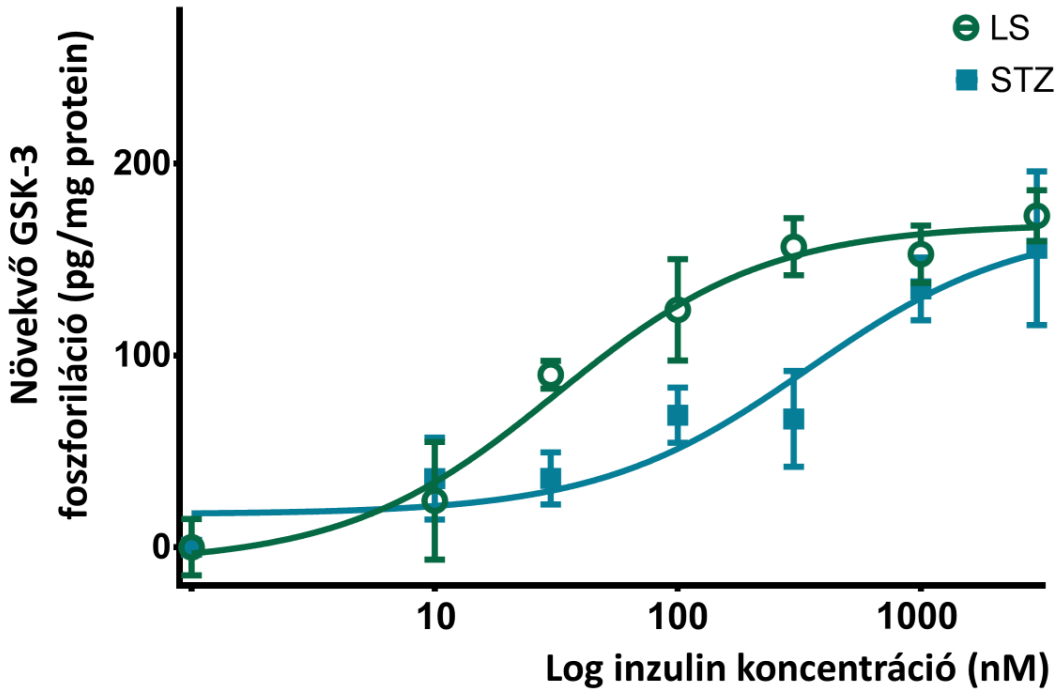
14. ábra: **Az inzulin koncentráció- és időfüggő módon javította a szérum csökkentett táppal (LS), illetve 5 mM sztreptozotocinnal (STZ) kezelt, retinsavval differenciált SH-SY5Y sejtek metabolikus aktivitását. Az ábrán a különböző inzulin koncentrációk (10, 30, 100, 300, 1000, 3000 nM) hatását ábrázoltuk a szérum csökkentett táppal, illetve sztreptozotocinnal kezelt sejtek reszazurin redukáló aktivitására 1, 2 és 3 nap után.**

4.6 Az inzulin hatása a GSK-3 foszforilációra szérum csökkentett táppal és sztreptozotocinnal kezelt retinsavval differenciált SH-SY5Y sejteken

Hasonlóan a nem-differenciált sejteknél tapasztaltaknál, az inzulin koncentrációfüggő módon indukálta a GSK-3 foszforilációját mind a szérum csökkentett, mind az 5 mM sztreptozotocinnal kezelt csoportban. Az inzulin maximális hatásában nem tapasztaltunk különbséget, ugyanakkor az inzulin koncentráció-hatás görbéje szignifikánsan jobbra tolódott a sztreptozotocinnal kezelt differenciált sejtek esetében (5. táblázat), ami az inzulin rezisztencia kialakulására utalhat (15. ábra).

5. Táblázat: **Az inzulin GSK-3 foszforilációt indukáló koncentráció-hatás görbéinek becsült E_{Max} és EC50 értékeinek összehasonlítása szérum csökkentett táppal és 5 mM sztreptozotocinnal kezelt, retinsavval differenciált SH-SY5Y sejteken.**

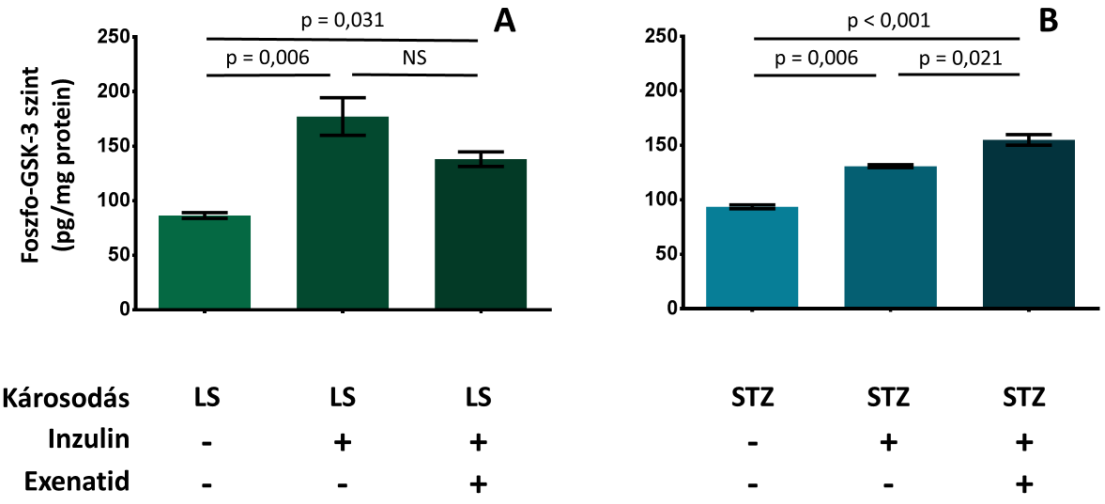
E_{Max}				
Szérum csökkentett táp		**Sztreptozotocin kezelés**		**p**
Becsült érték	**95% CI**	**Becsült érték**	**95% CI**	
168,20	145,30–191,20	172,50	112,70–232,30	0,9021
EC50				
Szérum csökkentett táp		**Sztreptozotocin kezelés**		**p**
Becsült érték	**95% CI**	**Becsült érték**	**95% CI**	
31,39	11,62–84,79	373,30	92,74–1502,00	0,0183



15. ábra: **Az inzulin koncentrációfüggő módon fokozta a GSK-3 foszforilációjának mértékét a szérum csökkentett táppal (LS), illetve 5 mM sztreptozotocinnal (STZ) kezelt, retinsavval differenciált SH-SY5Y sejteken. A sztreptozotocinnal kezelt sejtek esetében az inzulin koncentráció-hatás görbéje jobbra tolódott. Az inzulin stimulációt különböző koncentrációkban (10, 30, 100, 300, 1000, 3000 nM) 30 perccel a sejtek feldolgozása előtt végeztük, majd ELISA módszerrel állapítottuk meg a foszforilált GSK-3 mennyiségét.**

4.7 Az exenatid előkezelés hatása az inzulin-indukálta GSK-3 foszforilációra retinsavval differenciált SH-SY5Y sejteken

A hipotézisünk megerősítéséhez vizsgáltuk, hogy az exenatid előkezelés, hogyan befolyásolja az inzulin indukálta GSK-3 foszforilációt a differenciált sejtek esetében. Azt tapasztaltuk, hogy a 24 órás 100 nM exenatid előkezelés eltérően befolyásolta a GSK-3 foszforilációt inzulin hatására. A szérum csökkentett csoportban az előkezelés nem okozott szignifikáns változást a 100 nM inzulin kezelés indukálta GSK-3 foszforilációban, ugyanakkor a sztreptozotocinnal kezelt csoportnál szignifikánsan fokozódott a foszforiláció mértéke (16. ábra).



16. ábra: **Huszonnégy órás, 100 nM exenatid előkezelés szérum csökkentett táppal (LS) kezelt, retinsavval differenciált sejteken nem fokozta a 100 nM inzulin indukálta GSK-3 foszforilációjának mértékét, ugyanakkor szignifikáns növekedést tapasztaltunk az 5 mM sztreptozotocinnal (STZ) kezelt csoportban. Az inzulin stimulációt 30 perccel a sejtek feldolgozása előtt végeztük, majd ELISA méréssel állapítottuk meg a foszforilált GSK-3 mennyiségét. NS: nem szignifikáns**

5. Megbeszélés

Számos irodalmi adat összefüggésbe hozta az Alzheimer-kórt és centrális inzulin rezisztencia kialakulását. A kapcsolat pontos megértéséhez és terápiás lehetőségek fejlesztéséhez sok *in vitro* és *in vivo* modellt fejlesztettek ki az elmúlt években. A sztreptozotocin egy széleskörben alkalmazott diabetogén vegyület, állatkísérletekben 1-es és 2-es típusú diabétesz kiváltására is alkalmas, valamint lokális agyi injektálásával centrális inzulinrezisztenciát idéz elő [116]. *In vitro* kísérletekben neuronális sejtkultúrákon is vizsgálták, hogyan hat a szer a sejtek életképességre, celluláris folyamatokra, ugyanakkor nem áll rendelkezésünkre olyan kutatás, ami egyértelműen azt tanulmányozza, hogyan befolyásolja a vegyület a sejtek inzulin érzékenységét. Az értekezésben bemutatott munka során célunk volt vizsgálni a sztreptozotocin hatását és annak hátterében az inzulin jelátvitel szerepét humán neuroblasztóma sejtvonalon. Kimutattuk, hogy a vegyület koncentrációfüggő módon fejt ki citotoxicitást nem-differenciált és differenciált sejteken. Továbbá, hogy a sejtek differenciálása érettebb neuron fenotípus irányába, jelentősen csökkenti a sejtek érzékenységét a károsító ágenssel szemben. Mindkét sejttípusban az inzulin kezelés koncentrációfüggő módon mérsékelte a sztreptozotocin-indukálta károsodást. Az inzulin protektív hatását és az inzulin jelátvitelében fontos GSK-3 enzim inzulin-indukálta foszforilációjának mértékét egy kontroll károsodás hatásával hasonlítottuk össze, ami csökkentett FBS tartalmú körülmény volt. A kísérletek alapján megállapítottuk, hogy nem-differenciált sejtek esetében nem alakul ki inzulin rezisztencia, ugyanakkor a differenciált sejtek inzulin szenzitivitása jelentősen romlik sztreptozotocin kezelés következtében. Az utóbbi eredményünket az is alátámasztotta, hogy a sejtek előzetes kezelése az inzulin szenzitivitásra pozitívan ható exenatid hatóanyaggal, javította az inzulin jelátviteli folyamatot sztreptozotocin kezelés után. Annak ellenére, hogy a differenciált neuroblasztóma sejtek esetében a vegyület feltehetőleg inzulin rezisztenciát okozott, mégis arra a következtetésre jutottunk, hogy egyéb, nem-specifikus károsító hatások jelentősebbek a toxicitás hátterében, így a sztreptozotocin kezelés nem jó modell az *in vitro* centrális inzulin rezisztencia tanulmányozására, ugyanakkor lassú, progresszív citotoxicitása miatt jól modellezi a neurodegeneratív változásokat.

5.1 A sztreptozotocin hatása a nem-differenciált SH-SY5Y sejtek életképességére

Kísérleteinkben a sztreptozotocin koncentráció- és időfüggő módon csökkentette a sejtek életképességét a reszazurin redukciós és laktát-dehidrogenáz kibocsátási vizsgálatok alapján. Kimutattuk, hogy 1 mM-os koncentráció lassan progrediáló, de szignifikáns károsodást eredményez a nem-differenciált neuroblasztóma sejteken, ezzel jól utánozva a neurodegeneratív kórképekben jellemző sejtpusztulást. Egy korábbi tanulmányban, szintén nem-differenciált SH-SY5Y sejteken 0,8 mM sztreptozotocin kezelést alkalmaztak a neurodegeneráció kiváltására, ami jól korrelál az általunk alkalmasnak vélt koncentrációval. Eredményeink jól párhuzamban vonhatók Plaschke és munkatársai megfigyeléseivel is. A csoport SK-N-MC humán neuroblasztóma sejteket vizsgált és azt találta, hogy 1 mM sztreptozotocin 24 és 48 óra után is jelentős citotoxicitást mutatott. A neuronok pusztulásán kívül egyéb, Alzheimer-kórra specifikus változást is megfigyeltek, többek között az Aβ plakkok kialakulásában jelentős szerepet játszó β-szekretáz fokozott és a folyamat ellen ható α-szekretáz csökkent aktivitását [196]. Egér eredetű, neuronális N2A sejtek esetében 50, 100 és 1000 μM sztreptozotocin 48 óra után már szignifikáns károsodást eredményezett, illetve további, a betegségre jellemző folyamat is bekövetkezett a kezelés hatására. Fokozódott a tau-fehérje és foszforilált formájának koncentrációja, illetve az apoptózisban fontos szerepet játszó kaszpáz-3 aktivitása, nagyobb mértékű volt az Aβ aggregáció, mitokondriális diszfunkció alakult ki, károsodott a DNS, és nőtt az acetilkolin-észteráz aktivitása [203]. Az acetilkolin-észteráz fokozott működését sztreptozotocinnal intracerebroventrikulárisan kezelt patkányoknál is leírták [192], habár a jelenség nem feltétlenül korrelál jól a betegség patomechanizmusával, ahol az általános kolinerg neurontranszmisszió hanyatlása miatt, inkább csökkent szintről számol be az irodalom [23]. A munkacsoport a fentiek mellett C6 asztrociták aktiválódását is tapasztalta a szer hatására [205].

A sejttípus jelentősen befolyásolta a kezelés körülményeit. Primer sejtkultúrán a citotoxicitás kiváltásához magasabb koncentrációra volt szükség. Patkány cerebelláris granula sejteken a vegyület 2,5-4,5 mM [199] és 3-4 mM [200] koncentráció tartományban fejtett ki szignifikáns sejtpusztulást, míg felnőtt izolált hippocampális neuronális őssejteken (NSC) 2,5 mM sztreptozotocin gátolta a proliferációt, differenciálódást [206].

5.2 A sztreptozotocin hatása a glükóz és inzulin rendszerre nem-differenciált SH-SY5Y sejtek esetében

A citotoxicitás mellett eltérő glükóz felhasználást is tapasztaltak a kezelt sejtek esetében. Csökkent a glükózfelvétel N2A és C6 sejteknél és kimutatták a glükóz transzporterek, a GLUT1 és GLUT3 expresszió mérséklődését [203, 205]. Szintén alacsonyabb szintű GLUT1 és 3 expressziót igazoltak primer NSC sejteken [206]. Az inzulin jelátvitelének sztreptozotocin-indukálta károsodásáról is több tanulmány beszámolt. Rajasekar és munkatársai eredményei alapján C6 asztrocitákban már 0,1 mM-os koncentráció csökkentette az IR expresszióját és az Akt/PKB, IRS-1, GSK-3 foszforilációját, ugyanakkor ezeket a folyamatokat 100 nM inzulin előkezelés kivédte [204]. Az IRS-1 expresszió csökkenését SH-SY5Y esetében is megfigyelték 0,8 mM sztreptozotocin hatására [207]. Illetve a GSK-3 foszforiláció is mérséklődött az SK-N-MC sejtekben 1 mM-os kezelést követően [196]. Az inzulin protektív hatását a vegyület indukálta sejtpusztulás ellen primer cerebelláris granula sejteken is kimutatták [199]. Ezek az eredmények összeségében arra utalnak, hogy a kezelés hatására károsodik a glükóz metabolizmus és az inzulin jelátvitel a neuronális és gliális sejtekben, mégis egyértelműen az inzulin rezisztencia kialakulását egyik munkacsoport sem igazolta, vagy cáfolta meg.

A kísérleteink során az inzulin protektív hatását vizsgáltuk sztreptozotocin és szérum csökkentett táp kezeléssel szemben. A szérum csökkentett médiumot választottuk kontroll károsodásnak, mert ez egy olyan körülmény, ami szintén fokozatos sejtpusztulást okoz, mégis valószínűtlen, hogy hatására inzulin rezisztencia alakuljon ki [210, 211]. A szérum csökkentett táp enyhe citotoxicitást eredményezett az SH-SY5Y sejtekben, amit a sztreptozotocin idő-, és koncentrációfüggő módon tovább rontott. Az inzulin jelentős, koncentrációfüggő javulást eredményezett a sejtek életképességében mindkét károsító tényezővel szemben. A két csoportban az inzulin hatékonysága jelentősebb volt a szérum-csökkentett sejteknél, ugyanakkor a maximális hatás feléhez szükséges koncentrációban nem volt különbség a legtöbb vizsgálati pontnál. Az eredményünk arra utal, hogy nem-differenciált sejtek esetében a két modellben az inzulin hatáserőssége nem különbözik, így inzulin rezisztencia feltehetőleg nem alakult ki a sztreptozotocin kezelés hatására. Az, hogy a szérum csökkentett csoportban az inzulin jelentősebb citoprotekciót eredményezett magyarázható azzal, hogy a kezelt csoportban szignifikánsan nagyobb volt a károsodás, feltehetőleg a nemspecifikus celluláris mechanizmusok, például direkt DNS

károsodás és oxidatív stressz következtében [181]. A hipotézisünket megerősíttette, hogy a két csoport között nem találtunk különbséget az inzulin-indukálta GSK-3 foszforiláció mértékében. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a nem-differenciált SH-SY5Y sejtek esetében a sztreptozotocin sejtpusztító hatása hátterében nem játszik szerepet az inzulin jelátvitel romlása.

5.3 A sztreptozotocin hatása a retinsavval differenciált SH-SY5Y sejtekre

Az SH-SY5Y sejttípust nagyon gyakran alkalmazzák a központi idegrendszer *in vitro* modellezésére. Mivel nem-differenciált formában a sejtek éretlen neuron karakterisztikát mutatnak, így sok kutatócsoport differenciálja a sejteket érettebb idegsejt fenotípussá a kísérletek elvégzése előtt. A sejtek differenciálására számos módszer létezik, a megfelelő kiválasztását nagyban befolyásolja, hogy kolinerg, dopaminerg, vagy adrenerg neuronkra van-e szükség [212]. A leggyakrabban alkalmazott vegyület a retinsav, de a kezelés koncentrációjában, idejében, körülményeiben még így is jelentős eltérések vannak az irodalomban [213]. Összességében elmondható, hogy a retinsavval indukált differenciálás hatására a sejtek proliferációs rátája csökken, érett neuronális markereket expresszálnak, morfológiailag polarizáltabbak, elnyújtottabbak lesznek és dominánsan kolinerg fenotípus jellemző rájuk [213]. A kolinerg rendszer túlsúlyát több kutatás igazolta, leírták, hogy a differenciált sejtekben megnőtt a muszkarinos acetilkolin receptorok M_1 és M_2 altípusának a száma [214], illetve az kolin-acetiltranszferáz [213, 214] és acetilkolin-észteráz [213-215] szintje is emelkedett.

Kísérletünkben 50 μM retinsavat 5 napig alkalmaztunk Jahn és munkatársai módszeréhez hasonlóan [208] és a differenciáló protokoll végén a korábbiakhoz hasonlóan sztreptozotocinnal és szérum csökkentett táppal kezeltük a sejteket. A szérum csökkentett táp ezesetben is enyhén csökkentette a sejtek életképességét, amit a sztreptozotocin tovább mérsékelt koncentrációfüggő módon a reszazurin redukciós teszt alapján. Érdekes, hogy a nem-differenciált sejteknél citotoxikusnak bizonyuló 1 mM-os sztreptozotocin alig károsította az érettebb neuron-szerű sejteket. Ahhoz, hogy alacsony fokú, mégis jelentős károsodást hozzunk létre 3-5 mM-os koncentrációra volt szükség. Ez az eredmény jól korrelál a már korábban említett Isaev és munkatársai eredményeivel, akik azt találták, hogy a cerebelláris granula sejtek éretlen állapotban nagyon érzékenyek

voltak a kezeléssel szemben, de pár nap érést követően a szer alig befolyásolta az életképes sejtek számát [200]. Az érettebb, differenciált fenotípust több munkacsoport is összefüggésbe hozta a neurotoxinok iránti mérsékeltebb érzékenységgel. Tieu és munkatársai kimutatták, hogy a retinsavval differenciált SH-SY5Y sejtek ellenállóbbak voltak cisplatin, 5-flurouracil, 6-hidroxidopamin és γ-sugárzás ellen. Eredményeiket a p53 tumorszuppresszor gén csökkent és az antiapoptotikus Bcl-2 gén fokozott expressziójával magyarázták [202]. Az utóbbi folyamatot számos további kutatócsoport is igazolta SH-SY5Y retinsavval történő differenciálását követően [213, 216-218]. Cheung és munkatársai szintén azt tapasztalták, hogy a retinsavval differenciált sejtek kevésbé voltak érzékenyek a 6-hidroxidopamin és a 4-fenil-1-metilpiridinium kezelésre, amit neuronális túlélési útvonalak, pl. a PI3K/Akt/PKB útvonal fokozott működésével hoztak összefüggésbe [201], amit több kutatócsoport szintén kimutatott [213, 217-219].

Egy további lehetséges magyarázat arra, hogy a sztreptozotocin csak nagyobb koncentrációban váltott ki citotoxicitást, hogy ismert, hogy a sejt károsító mechanizmusában jelentős szerepet játszik az oxidatív stressz fokozódása [181]. Több tanulmány kimutatta, hogy a retinsavval differenciált sejtek esetében változik a sejtek redox státusza, a differenciálódásban a pro-oxidáns állapot esszenciális, ugyanakkor az antioxidáns mechanizmusok is felerősödnek. Így logikus lehet, hogy a sztreptozotocin kevésbé befolyásolja a sejtek életképességét ezen az útvonalon [220].

5.4 Az inzulin jelátvitel szerepe a sztreptozotocin hatásában retinsavval differenciált SH-SY5Y sejtekben

Az inzulin protektív hatását retinsavval differenciált SH-SY5Y sejtek esetében is kimutatták különböző károsító ágensekkel szemben. Ramalingam és Kim 3 órán keresztül H_2O_2-vel kezelték a differenciált sejteket és koncentrációfüggő toxicitást állapítottak meg. Kísérletükben 200 μM H_2O_2 oxidatív stresszt okozott, fokozta a ROS és NO termelést, szignifikánsan emelte az intracelluláris kalcium koncentrációt, fokozta az laktát-dehidrogenáz felszabadulást. Ezen celluláris hatásokon kívül csökkentette az IR β-alegység, IRS-1, IRS-2 és IGF-1R β-alegység expresszióját. Vizsgálatukban 1 órás 100 nM inzulin előkezelés gátolta a H_2O_2-indukálta laktát-dehidrogenáz felszabadulást, a ROS és NO termelődést, valamint kivédte az intracelluláris kalcium szint emelkedését.

Továbbá fokozta a protektív Akt/PKB/Bcl-2 útvonalat, ugyanakkor a nagyobb mértékű Akt/PKB foszforiláció PI3K gátlószer jelenlétében nem következett be. Az inzulin kezelés az IRS-1 szintjét is emelte [218]. A munkacsoport egy másik vizsgálatában 4-fenil-1-metilpiridiniummal kezelték a retinsavval differenciált SH-SY5Y sejteket, ami jelentős sejtkárosodást eredményezett, továbbá fokozta a ROS termelődést, felerősítette az iNOS működését és csökkentette az IR, IGF-1R, IRS-1, IRS-2 szinteket, valamint a GSK-3 foszforiláció mértékét. Abban az esetben, ha a sejteket 1 órán keresztül, 100 nM inzulinnal előkezelték a káros celluláris folyamatok nem következtek be [221].

Kísérletünkben, az inzulin sejtvédő hatását vizsgáltuk sztreptozotocinnal, illetve szérum csökkentett táppal kezelt, retinsavval differenciált sejteken. Hasonlóan korábbi eredményeinkhez az inzulin koncentráció- és időfüggő módon javította a sejtek életképességét a károsodással szemben, ugyanakkor a protektív hatása kevésbé érvényesült, mint a nem-differenciált sejtek esetében. A differenciált sejteknél az inzulin kezelés a szérum csökkentett táppal kezelt csoportban 25-40%-os, míg a sztreptozotocin csoportban 10-25%-os javulást eredményezett. A nem-differenciált csoportban az inzulin a kontroll károsodást teljes mértékben kivédte és a sztreptozotocinnal kezelt sejteknél is több, mint 50%-os javulást figyeltünk meg. Következésképpen felmerült, hogy az inzulin szenzitivitásban a differenciálás hatására szignifikáns változás következett be. Annak ellenére, hogy a maximális hatásban korábbi eredményeinkhez hasonlóan eltérést tapasztaltunk a két csoport között, az EC50 értékek nem különböztek. Az eredmények alapján ismét arra következtettünk, hogy a sztreptozotocin nem változtatja meg az inzulin protektív hatásának mértékét a retinsavval differenciált sejtek esetében sem, illetve a különbség az inzulin hatékonyságában fakadhat a kompenzálandó károsodás eltérő mértékéből.

Az inzulin jelátvitel tanulmányozására vizsgáltuk a GSK-3 inzulin-indukálta foszforilációjának mértékét, és azt tapasztaltuk, hogy az inzulin mindkét csoportban koncentrációfüggő módon fokozta a foszforilált enzim szintjét, ugyanakkor a sztreptozotocinnal kezelt csoport esetében az inzulin koncentráció-hatás görbéje jobbra tolódott, ami az inzulin érzékenység csökkenésére utalhat. A feltételezésünk összhangban áll azzal, hogy széles körben igazolták *in vivo* körülmények között a sztreptozotocin inzulin rezisztenciát kiváltó hatását a periférián és a központi idegrendszerben is [116]. Kiindulva abból, hogy korábbi kísérleteinkben, nem-differenciált sejteken ilyen eltérést

nem tapasztaltunk, valószínűsíthető, hogy a differenciálódás hatására a sejtekben az inzulin jelátvitelben változás lép fel és így a sejtek érzékenyebbé válnak a sztreptozotocin specifikus hatására, ugyanakkor a nem-specifikus citotoxikus hatásával szemben ellenállóbak lesznek.

Az inzulin érzékenység romlásának megerősítése érdekében az inkretin analóg exenatid hatását is vizsgáltuk. Az exenatid hatóanyagról *in vivo* számos tanulmány igazolta neuroprotektív hatását [170-172], de a centrális inzulin rezisztencia csökkentéséről is beszámoltak [17, 173]. *In vitro* kísérletekben is kimutatták, hogy a hatóanyag javítja az inzulin jelátvitelt, például hippocampális neuronkultúrában csökkentette az inzulin jelátvitelt gátló IRS-1 szerin foszforilációját [144]. A szer protektív hatását feltehetőleg GLP-1 receptorokon keresztül fejti ki [144]. Az exenatidot számos sejtkultúra modellben alkalmazták és többszörösen igazolták neuroprotektív hatását. A hatóanyag 10^{-7} M-os koncentráció tartományban különféle neuronális sejttípusnál gátolta H_2O_2 [222, 223], Aβ [222, 224], staurosporin [223], vagy glutamát [225] kiváltotta károsodást. Qiu és munkatársai kísérletében a 100-500 nM-os, 1 órás exenatid előkezelés csökkentette a Aβ-indukálta citotoxicitást PC12, patkány phaeochromocytoma sejtekben és a sejtvédő hatást az Akt/PKB, foszforilált Akt/PKB, CREB, foszforilált CREB és emelkedett Bcl-2 szintjével magyarázták [224]. Az adenilát-cikláz szerepét, fokozott protein-kináz A aktivitást és CREB aktivációt más tanulmányokban is kimutatták a protektív mechanizmus hátterében [226].

A vizsgálatunkhoz 100 nM exenatid előkezelést alkalmaztunk, mivel ezt a koncentrációt már számos kísérletben hatékony neuroprotektív dózisnak írták le [222, 223, 225, 226]. Vizsgáltuk, hogyan befolyásolja az előkezelés az inzulin-indukálta GSK-3 foszforilációt és különbséget tapasztaltunk a két csoport között. Az előkezelés hatására a szérum csökkentett táppal kezelt sejtek esetében nem változott szignifikánsan az enzim foszforilációjának mértéke inzulin stimuláció hatására, de a sztreptozotocin csoportban a hatóanyag jelentősen fokozta a sejtek inzulinra adott válaszát. Az eredményből arra következtethettünk, hogy a retinsavval differenciált SH-SY5Y sejtek esetében valóban kialakul inzulin rezisztencia a sztreptozotocin csoportban, amit az inkretin analóg mérsékelni tud.

6. Következtetések

A jelen munka során célunk volt, hogy tanulmányozzuk, a sztreptozotocin citotoxikus hatását SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejteken, továbbá, hogy vizsgáljuk, hogy a károsodás hátterében szerepet játszik-e az inzulin rezisztencia kialakulása.

Kísérletünkben igazoltuk, hogy a sztreptozotocin megfelelő koncentrációban, lassú, progrediáló károsító hatást képes kiváltani nem-differenciált és retinsavval differenciált neuronális sejteken, amit az inzulin gátolni, vagy mérsékelni képes. Az inzulin jelátvitel tanulmányozásához eredményeinket olyan kontroll károsodáshoz hasonlítottuk, melyben az inzulin rezisztencia nem játszik szerepet, ezek alapján a következő következtetésekre jutottunk:

- Nem-differenciált sejtek esetében az inzulin jelentősen csökkenti a sztreptozotocin indukálta károsodást. Az inzulin protektív és GSK-3 foszforilációt kiváltó hatásának EC50 értéke nem különbözik a kontroll károsodásnál tapasztaltaktól, így arra következtetünk, hogy nem alakul ki inzulin rezisztencia a kezelés hatására.
- Feltehetőleg a sztreptozotocin citotoxikus hatásának hátterében nem-specifikus mechanizmusok játszanak szerepet nem-differenciált sejtek esetében.
- A sejtek differenciálása retinsavval jelentősen csökkentette az érzékenységüket a toxikus vegyülettel szemben. Arra következtethetünk, hogy a sztreptozotocin indukálta citotoxikus hatásokra kevésbé érzékenyek az érettebb sejtek.
- Az inzulin differenciált sejtek esetében is védő hatást fejtett ki, de ennek mértéke elmaradt a nem-differenciált sejtek esetében tapasztalttól, így feltételezhetjük, hogy a differenciálás hatására változik az inzulin jelátvitel.
- Összevetve a kontroll károsodással nem változott az inzulin protektív hatása, de a maximális GSK-3 foszforiláció csak nagyobb inzulin koncentráció mellett alakult ki, ami inzulin rezisztencia kialakulására utal.
- Az exenatid a sztreptozotocinnal kezelt csoportban fokozta az inzulin-indukálta GSK-3 foszforilációt, ami megerősíti az inzulin rezisztencia jelenlétét.

Eredményeink arra utalnak, hogy a lassan kialakuló, progrediáló károsítása miatt a sztreptozotocin jól modellezheti a neurodegeneratív kórképeket neuronális sejteken. Továbbá a differenciált SH-SY5Y sejtekben a sztreptozotocin kezelés rontja az inzulin érzékenységét, ami lehetőséget teremt az Alzheimer-kór és a centrális inzulin rezisztencia kapcsolatának tanulmányozására. Ugyanakkor a nem-specifikus citotoxikus mechanizmusok szerepe a vegyület károsító hatásában nem hagyható figyelmen kívül még a differenciált SH-SY5Y sejtek esetében sem.

7. Összefoglalás

Az Alzheimer-kór patomechanizmusában jelentős szerepet tulajdonítanak a centrális inzulin rezisztencia kialakulásának, így ez egy intenzíven kutatott terület. A sztreptozotocin egy széles körben használt vegyület, amit perifériás és centrális inzulin rezisztencia modellezésére számos kutatócsoport alkalmaz *in vivo* körülmények között. Sejtkultúrákon is gyakran vizsgálják hatását, de *in vitro* nem igazolt, hogy inzulin rezisztencia kiváltására megfelelő modell-e.

Jelen munkánkban igazoltuk, hogy a sztreptozotocin koncentráció- és időfüggő módon csökkenti a nem-differenciált és retinsavval differenciált humán SH-SY5Y neuroblasztóma sejtek életképességét. A differenciálás hatására a sejtek érzékenysége jelentősen csökken a károsító vegyület iránt. Az inzulin kezelés mindkét esetben koncentrációfüggő módon védi a sejteket a sztreptozotocin-indukálta citotoxicitással szemben, ugyanakkor a differenciált sejteknél a protektív hatás kisebb mértékű. Feltételezhető, hogy a differenciálás hatására a sztreptozotocin nem-specifikus sejtkárosító mechanizmusai kevésbé érvényesülnek, ugyanakkor változás következik be az inzulin jelátvitelében is.

Az inzulin hatását többek között a PI3K/Akt/PKB útvonalon fejti, melyen keresztül foszforilálódik, és ezáltal inaktiválódik a GSK-3 enzim, aminek túlzott aktivitása jellemző Alzheimer-kórban. Munkánk során azt tapasztaltuk, hogy nem-differenciált sejtekben a sztreptozotocin kezelés nem változtatja meg a kináz inzulin-indukálta foszforilációját, míg a differenciálódás hatására az inzulin csak nagyobb koncentrációban éri el a maximális hatást, mely inzulin rezisztencia kialakulására utal. Ezt megerősítette, hogy a neuroprotektív és inzulin szenzitivitást javító inkretin analóg, az exenatid csak a sztreptozotocinnal kezelt sejtekben fokozta az inzulin-indukálta GSK-3 foszforilációt, a kontroll károsodás esetében hatástalannak bizonyult.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a sztreptozotocin alkalmas neurodegeneratív kórképek *in vitro* modellezésére lassan kialakuló citotoxicitása miatt, továbbá a differenciált sejtek esetében az inzulin rezisztencia szerepének tanulmányozására is, de a nem-specifikus sejtkárosító mechanizmusok szerepe sem hagyható figyelmen kívül a vegyület hatásában.

8. Summary

In the pathophysiology of Alzheimer's disease contribution of central insulin resistance is suggested, therefore it is an intensively investigated area. Streptozotocin is a frequently used compound for the induction of either peripheral or central insulin resistance *in vivo*. Its effects are often examined in cell cultures, however; induction of insulin resistance has not been proven yet.

In our present work we found that streptozotocin concentration and time dependently decreased the viability of non-differentiated and retinoic acid differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Differentiation reduced the sensitivity of the cells for its harmful effects. Insulin treatment improved cell viability induced by streptozotocin in both cases in a concentration-dependent manner; however, its protective effect was less pronounced in the differentiated cells. These results might be explained by the decreased susceptibility of differentiated cells against non-specific toxic mechanisms of streptozotocin and the possible alteration of insulin signaling.

Insulin exerts its effect mainly through the PI3K/Akt/PKB pathway resulting the phosphorylation and inactivation of GSK-3, an enzyme that is often overactivated in Alzheimer's disease. In our experiments we found that in non-differentiated cells streptozotocin treatment did not alter the insulin-induced phosphorylation of the kinase, while in the differentiated cells only higher insulin concentrations can induce maximal effect. These results suggest the development of insulin resistance in the later case. Our hypothesis was further confirmed the effect of incretin analogue exenatid, a compound with established neuroprotective and insulin sensitivity improving properties, that increased the insulin-induced GSK-3 phosphorylation in the streptozotocin treated cells but not in the control damage group.

According to our findings we concluded that streptozotocin is a suitable *in vitro* tool to model neurodegenerative disorders as it induces a low grade, slowly developing cytotoxicity. Also it is appropriate to study the role of insulin resistance in differentiated cells, however; the presence of non-specific harmful cellular mechanisms must be taken into consideration too in SH-SY5Y cells.

9. Irodalomjegyzék

1. Crous-Bou M, Minguillon C, Gramunt N, Molinuevo JL. (2017) Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. Alzheimers Res Ther, 9(1): 71.
2. Leung GM, Yeung RYT, Chi I, Chu LW. The Economics of Alzheimer Disease. Dementia and Geriatric Cognitive Disorders. 2003: 34-43.
3. Yilmaz U. (2015) Alzheimer's disease. Der Radiologe, 55(5): 386-8.
4. Cummings JL. (2004) Alzheimer's disease. N Engl J Med, 351(1):56-67.
5. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83(13): 4913-7.
6. Kudo T, Davis K, Blesa R, Wilkinson D. Practical Pharmacology for Alzheimer’s Disease, Springer, Switzerland, 2016: 1-22.
7. Hardy JA, Higgins GA. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science, 256(5054): 184-5.
8. Hardy J, Selkoe DJ. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science, 297(5580): 353-6.
9. Cardoso SM, Santos S, Swerdlow RH, Oliveira CR. (2001) Functional mitochondria are required for amyloid beta-mediated neurotoxicity. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 15(8):1439-41.
10. Swerdlow RH, Khan SM. (2004) A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. Med Hypotheses, 63(1): 8-20.
11. Chen Z, Zhong C. (2014) Oxidative stress in Alzheimer's disease. Neurosci Bull, 30(2): 271-81.
12. Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee HG, Zhu X. (2014) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta, (8):1240-7.

13. Gerakis Y, Hetz C. (2018) Emerging roles of ER stress in the etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. Febs j, 285(6): 995-1011.
14. Sushma, Mondal AC. (2019) Role of GPCR signaling and calcium dysregulation in Alzheimer's disease. Mol Cell Neurosci, 101: 103414.
15. Calsolaro V, Edison P. (2016) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association, 12(6): 719-32.
16. Morales I, Guzman-Martinez L, Cerda-Troncoso C, Farias GA, Maccioni RB. (2014) Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. Front Cell Neurosci, 8: 112.
17. Talbot K. (2014)Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and its potential treatment with GLP-1 analogs. Neurodegenerative disease management, 4(1): 31-40.
18. Kidd M. (1963) Paired Helical Filaments in Electron Microscopy of Alzheimer's Disease. Nature, 197(4863): 192-3.
19. Ihara Y, Abraham C, Selkoe DJ. (1983) Antibodies to paired helical filaments in Alzheimer's disease do not recognize normal brain proteins. Nature, 304(5928): 727-30.
20. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 72(5): 1858-62.
21. Lindwall G, Cole RD. (1984) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. J Biol Chem, 259(8): 5301-5.
22. Bartus RT, Dean RL, 3rd, Beer B, Lippa AS. (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science, 217(4558): 408-14.
23. Davies P, Maloney AJ. (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. Lancet, 2(8000): 1403.
24. Nordberg A. (2001) Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. Biol Psychiatry, 49(3): 200-10.
25. Nordberg A. WB. Alzheimer’s and Parkinson’s Disease. Advances in Behavioral Biology: Springer, Boston, MA; 1986: 1-36.

26. Glenner GG, Wong CW. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochemical and biophysical research communications, 120(3): 885-90.
27. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82(12): 4245-9.
28. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature, 325(6106): 733-6.
29. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL. (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. Nature, 359(6393): 322-5.
30. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. Nature 349(6311): 704-6.
31. Epis R, Marcello E, Gardoni F, Di Luca M. (2012) Alpha, beta-and gamma-secretases in Alzheimer's disease. Front Biosci (Schol Ed), 4: 1126-50.
32. Kametani F, Hasegawa M. (2018) Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. Front Neurosci, 12:25.
33. Cruts M, Hendriks L, Van Broeckhoven C. (1996) The presenilin genes: a new gene family involved in Alzheimer disease pathology. Human molecular genetics, 5:1449-55.
34. De Strooper B. (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. Neuron, 38(1): 9-12.
35. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N. (1996) Secreted amyloid β–protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. Nature Medicine, 2(8): 864-70.
36. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science, 261(5123): 921-3.

37. Holtzman DM, Fagan AM, Mackey B, Tenkova T, Sartorius L, Paul SM. (2000) Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model. Ann Neurol, 47(6): 739-47.
38. Kline A. (20012) Apolipoprotein E, amyloid-ß clearance and therapeutic opportunities in Alzheimer's disease. Alzheimer's research & therapy, 4(4):32.
39. Bryan KJ, Lee HG, Perry G, Smith MA, Casadesus G. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: Behavioral Testing and Considerations. In: Buccafusco JJ, editor. Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009: Chapter 1.
40. Price JL, McKeel DW, Jr., Buckles VD, Roe CM, Xiong C, Grundman M. (2009) Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. Neurobiol Aging, 30(7):1026-36.
41. Edison P, Archer HA, Hinz R, Hammers A, Pavese N, Tai YF. (2007) Amyloid, hypometabolism, and cognition in Alzheimer disease: an [11C]PIB and [18F]FDG PET study. Neurology, 68(7): 501-8.
42. Chetelat G, La Joie R, Villain N, Perrotin A, de La Sayette V, Eustache F. (2013) Amyloid imaging in cognitively normal individuals, at-risk populations and preclinical Alzheimer's disease. Neuroimage Clin, 2: 356-65.
43. Johnson KA, Schultz A, Betensky RA, Becker JA, Sepulcre J, Rentz D. (2016) Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease. Ann Neurol, 79(1): 110-9.
44. Brier MR, Gordon B, Friedrichsen K, McCarthy J, Stern A, Christensen J. (2016) Tau and Abeta imaging, CSF measures, and cognition in Alzheimer's disease. Sci Transl Med, 8(338): 338-66.
45. Bejanin A, Schonhaut DR, La Joie R, Kramer JH, Baker SL, Sosa N. (2017) Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease. Brain, 140(12): 3286-300.
46. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. Nature, 416(6880): 535-9.

47. Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C. (2002) Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. Nat Neurosci, 5(5): 452-7.
48. Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kayed R, Glabe CG, Yang A. (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature, 440(7082): 352-7.
49. Gallardo G, Holtzman DM. (2019) Amyloid-beta and Tau at the Crossroads of Alzheimer's Disease. Adv Exp Med Biol, 1184: 187-203.
50. Nelson PT, Braak H, Markesbery WR. (2009) Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. J Neuropathol Exp Neurol, 68(1): 1-14.
51. Roe CM, Fagan AM, Grant EA, Hassenstab J, Moulder KL, Maue Dreyfus D. (2013) Amyloid imaging and CSF biomarkers in predicting cognitive impairment up to 7.5 years later. Neurology, 80(19): 1784-91.
52. Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O. (2013) Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. Lancet Neurol, 12(4): 357-67.
53. Donohue MC, Sperling RA, Petersen R, Sun CK, Weiner M, Aisen PS. (2017) Association Between Elevated Brain Amyloid and Subsequent Cognitive Decline Among Cognitively Normal Persons. Jama, 317(22):2305-16.
54. Braak H, Del Tredici K. (2011) The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. Acta neuropathologica, 121(2): 171-81.
55. Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Jr., Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 16(14): 4491-500.
56. West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. (1994) Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. Lancet, 344(8925): 769-72.
57. Santos RX, Correia SC, Wang X, Perry G, Smith MA, Moreira PI. (2010) Alzheimer's disease: diverse aspects of mitochondrial malfunctioning. Int J Clin Exp Pathol, 3(6): 570-81.

58. Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee H-g, Zhu X. (2014) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. Biochimica et biophysica acta, 1842(8): 1240-7.
59. Chen X, Yan SD. (2006) Mitochondrial Abeta: a potential cause of metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. IUBMB Life, 58(12): 686-94.
60. Lunnon K, Ibrahim Z, Proitsi P, Lourdusamy A, Newhouse S, Sattlecker M. (2012) Mitochondrial dysfunction and immune activation are detectable in early Alzheimer's disease blood. J Alzheimers Dis, 30(3): 685-710.
61. Shoffner JM. (1997) Oxidative phosphorylation defects and Alzheimer's disease. Neurogenetics, 1(1): 13-9.
62. Seelert H, Dani DN, Dante S, Hauss T, Krause F, Schafer E. (2009) From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes. Biochim Biophys Acta, 1787(6): 657-71.
63. Esteves A, Arduíno D, Silva D, Martins-Branco D, Oliveira C, Cardoso S. Mitochondrial metabolism in age-related neurodegenerative disorders: Alzheimer's and Parkinson's revisited. In: Mitochondria: Structure, Functions and Dysfunctions, Nova Science Publishers, New York, 2009: 187-244.
64. Pereira C, Santos MS, Oliveira C. (1999) Involvement of oxidative stress on the impairment of energy metabolism induced by A beta peptides on PC12 cells: protection by antioxidants. Neurobiol Dis, 6(3): 209-19.
65. Takuma K, Yao J, Huang J, Xu H, Chen X, Luddy J. (2005) ABAD enhances Abeta-induced cell stress via mitochondrial dysfunction. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 19(6): 597-8.
66. Onyango IG, Khan SM, Bennett JP, Jr. (2017) Mitochondria in the pathophysiology of Alzheimer's and Parkinson's diseases. Front Biosci (Landmark Ed), 22: 854-72.
67. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS. (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 21(9): 3017-23.
68. Chan DC. (2012) Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. Annu Rev Genet, 46: 265-87.

69. Harding HP, Zhang Y, Ron D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. Nature, 397(6716): 271-4.
70. Sidrauski C, Chapman R, Walter P. (1998) The unfolded protein response: an intracellular signalling pathway with many surprising features. Trends Cell Biol, 8(6): 245-9.
71. Bonifacino JS, Weissman AM. (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. Annu Rev Cell Dev Biol, 14: 19-57.
72. Shi Y, Vattem KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L. (1998) Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. Mol Cell Biol, 18(12): 7499-509.
73. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. J Biol Chem, 273(50): 33741-9.
74. Shen J, Snapp EL, Lippincott-Schwartz J, Prywes R. (2005) Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. Mol Cell Biol, 25(3): 921-32.
75. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP. (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. Science, 287(5453): 664-6.
76. Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH. (2006) Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. Mol Cell Biol, 26(8): 3071-84.
77. Scheper W, Hoozemans JJ. (2015) The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective. Acta neuropathologica, 130(3): 315-31.
78. Hetz C. (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol, 13(2): 89-102.
79. Viana RJ, Nunes AF, Rodrigues CM. (2012) Endoplasmic reticulum enrollment in Alzheimer's disease. Molecular neurobiology, 46(2): 522-34.
80. Costa RO, Lacor PN, Ferreira IL, Resende R, Auberson YP, Klein WL. (2012) Endoplasmic reticulum stress occurs downstream of GluN2B subunit of N-methyl-

d-aspartate receptor in mature hippocampal cultures treated with amyloid-beta oligomers. Aging Cell, 11(5): 823-33.

81. Abisambra JF, Jinwal UK, Blair LJ, O'Leary JC, 3rd, Li Q, Brady S. (2013) Tau accumulation activates the unfolded protein response by impairing endoplasmic reticulum-associated degradation. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 33(22): 9498-507.
82. Ferreiro E, Baldeiras I, Ferreira IL, Costa RO, Rego AC, Pereira CF. (2012) Mitochondrial- and endoplasmic reticulum-associated oxidative stress in Alzheimer's disease: from pathogenesis to biomarkers. Int J Cell Biol, 2012:735206.
83. Koss DJ, Platt B. (2017) Alzheimer's disease pathology and the unfolded protein response: prospective pathways and therapeutic targets. Behav Pharmacol, 28(2 and 3-Spec Issue): 161-78.
84. Hanisch UK, Kettenmann H. (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci, 10(11): 1387-94.
85. Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D. (2014) Neuroinflammation: the role and consequences. Neurosci Res, 79: 1-12.
86. Cunningham C. (2013) Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. Glia, 61(1): 71-90.
87. Varnum MM, Ikezu T. (2012) The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 60(4): 251-66.
88. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS. (2004) Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. J Neuroinflammation, 1(1): 14.
89. Liu B, Hong JS. (2003) Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. J Pharmacol Exp Ther, 304(1): 1-7.
90. Barger SW, Harmon AD. (1997) Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. Nature, 388(6645): 878-81.
91. Ho GJ, Drego R, Hakimian E, Masliah E. (2005) Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 4(2): 247-56.

92. Fillit H, Ding WH, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B. (1991) Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. Neurosci Lett, 129(2): 318-20.
93. Strauss S, Bauer J, Ganter U, Jonas U, Berger M, Volk B. (1992) Detection of interleukin-6 and alpha 2-macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of Alzheimer's disease patients. Lab Invest, 66(2): 223-30.
94. Llano DA, Li J, Waring JF, Ellis T, Devanarayan V, Witte DG. (2012) Cerebrospinal fluid cytokine dynamics differ between Alzheimer disease patients and elderly controls. Alzheimer disease and associated disorders, 26(4): 322-8.
95. Sastre M, Klockgether T, Heneka MT. (2006) Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. Int J Dev Neurosci, 24(2-3): 167-76.
96. Phillips EC, Croft CL, Kurbatskaya K, O'Neill MJ, Hutton ML, Hanger DP. (2014) Astrocytes and neuroinflammation in Alzheimer's disease. Biochemical Society transactions, 42(5): 1321-5.
97. Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang HY. (2003) Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. Brain Res, 971(2): 197-209.
98. Guo JT, Yu J, Grass D, de Beer FC, Kindy MS. (2002) Inflammation-dependent cerebral deposition of serum amyloid a protein in a mouse model of amyloidosis. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 22(14): 5900-9.
99. Chen CH, Zhou W, Liu S, Deng Y, Cai F, Tone M. (2012) Increased NF-kappaB signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. Int J Neuropsychopharmacol, 15(1): 77-90.
100. Karch CM, Goate AM. (2015) Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. Biol Psychiatry, 77(1): 43-51.
101. Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E. (2013) TREM2 variants in Alzheimer's disease. N Engl J Med, 368(2): 117-27.
102. Jiang T, Yu JT, Zhu XC, Tan MS, Gu LZ, Zhang YD. (2014) Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 knockdown exacerbates aging-related

neuroinflammation and cognitive deficiency in senescence-accelerated mouse prone 8 mice. Neurobiol Aging, 35(6): 1243-51.

103. Eikelenboom P, Hoozemans JJ, Veerhuis R, van Exel E, Rozemuller AJ, van Gool WA. (2012) Whether, when and how chronic inflammation increases the risk of developing late-onset Alzheimer's disease. Alzheimer's research & therapy, 4(3):15.
104. Dunn N, Mullee M, Perry VH, Holmes C. (2005) Association between dementia and infectious disease: evidence from a case-control study. Alzheimer disease and associated disorders, 19(2): 91-4.
105. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S. (2009) Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. Neurology, 73(10): 768-74.
106. Misiak B, Leszek J, Kiejna A. (2012) Metabolic syndrome, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease--the emerging role of systemic low-grade inflammation and adiposity. Brain research bulletin, 89(3-4): 144-9.
107. Lee YH, Tharp WG, Maple RL, Nair S, Permana PA, Pratley RE. (2008) Amyloid precursor protein expression is upregulated in adipocytes in obesity. Obesity (Silver Spring), 16(7): 1493-500.
108. Spielman LJ, Little JP, Klegeris A. (2014) Inflammation and insulin/IGF-1 resistance as the possible link between obesity and neurodegeneration. J Neuroimmunol, 273(1-2): 8-21.
109. De Felice FG, Lourenco MV, Ferreira ST. (2014) How does brain insulin resistance develop in Alzheimer's disease? Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association, 10(1): 26-32.
110. Margolis RU, Altszuler N. (1967) Insulin in the cerebrospinal fluid. Nature, 215(5108): 1375-6.
111. Havrankova J, Roth J, Brownstein M. (1978) Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. Nature, 272(5656): 827-9.
112. Banks WA. (2004) The source of cerebral insulin. Eur J Pharmacol, 490(1-3): 5-12.

113. Wozniak M, Rydzewski B, Baker SP, Raizada MK. (1993) The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. Neurochem Int, 22(1): 1-10.
114. Todd S, Yoshida MC, Fang XE, McDonald L, Jacobs J, Heinrich G. (1985) Genes for insulin I and II, parathyroid hormone, and calcitonin are on rat chromosome 1. Biochemical and biophysical research communications, 131(3): 1175-80.
115. Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS. (1994) Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. J Biol Chem, 269(11): 8445-54.
116. Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. (2007) Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. Journal of neural transmission Supplementum, (72): 217-33.
117. van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP. (2006) Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. Prog Neurobiol, 79(4): 205-21.
118. Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D. (2004) Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(9): 3100-5.
119. Johnston AM, Pirola L, Van Obberghen E. (2003) Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. FEBS letters, 546(1): 32-6.
120. Vannucci SJ, Koehler-Stec EM, Li K, Reynolds TH, Clark R, Simpson IA. (1998) GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. Brain Res, 797(1): 1-11.
121. Stoica L, Zhu PJ, Huang W, Zhou H, Kozma SC, Costa-Mattioli M. (2011) Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(9): 3791-6.
122. Gabbouj S, Ryhänen S, Marttinen M, Wittrahm R, Takalo M, Kemppainen S. (2019) Altered Insulin Signaling in Alzheimer's Disease Brain - Special Emphasis on PI3K-Akt Pathway. Frontiers in neuroscience, 13: 629.

123. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. Curr Opin Neurobiol, 11(3): 297-305.
124. Embi N, Rylatt DB, Cohen P. (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. Eur J Biochem, 107(2): 519-27.
125. Woodgett JR. (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. EMBO J, 9(8): 2431-8.
126. Salcedo-Tello P, Ortiz-Matamoros A, Arias C. (2011) GSK3 Function in the Brain during Development, Neuronal Plasticity, and Neurodegeneration. Int J Alzheimers Dis, 2011:189728.
127. O'Brien WT, Harper AD, Jove F, Woodgett JR, Maretto S, Piccolo S. (2004) Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 24(30): 6791-8.
128. Kimura T, Yamashita S, Nakao S, Park J-M, Murayama M, Mizoroki T. (2008) GSK-3beta is required for memory reconsolidation in adult brain. PloS one, 3(10): e3540-e.
129. Kaidanovich-Beilin O, Lipina TV, Takao K, van Eede M, Hattori S, Laliberte C. (2009) Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3alpha mutant mice. Mol Brain, 2: 35.
130. Zhou FQ, Snider WD. (2005) Cell biology. GSK-3beta and microtubule assembly in axons. Science, 308(5719): 211-4.
131. Moosavi M, Naghdi N, Maghsoudi N, Zahedi Asl S. (2006) The effect of intrahippocampal insulin microinjection on spatial learning and memory. Horm Behav, 50(5): 748-52.
132. McEwen BS, Reagan LP. (2004) Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. Eur J Pharmacol, 490(1-3): 13-24.
133. Hoyer S. (1998) Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. Journal of neural transmission, 105(4-5): 415-22.

134. Frolich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S. (1998) Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. Journal of neural transmission, 105(4-5): 423-38.
135. Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R. (2005) Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? J Alzheimers Dis, 7(1): 63-80.
136. Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB. (1998) Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. J Biol Chem, 273(49): 32730-8.
137. Groves CJ, Wiltshire S, Smedley D, Owen KR, Frayling TM, Walker M. (2003) Association and haplotype analysis of the insulin-degrading enzyme (IDE) gene, a strong positional and biological candidate for type 2 diabetes susceptibility. Diabetes, 52(5): 1300-5.
138. Farris W, Mansourian S, Leissring MA, Eckman EA, Bertram L, Eckman CB. (2004) Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. The American journal of pathology, 164(4): 1425-34.
139. Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X. (2003) Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. Neuron, 40(6): 1087-93.
140. Qiu WQ, Folstein MF. (2006) Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. Neurobiol Aging, 27(2): 190-8.
141. Shiiki T, Ohtsuki S, Kurihara A, Naganuma H, Nishimura K, Tachikawa M. (2004) Brain insulin impairs amyloid-beta(1-40) clearance from the brain. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 24(43): 9632-7.
142. Sims-Robinson C, Kim B, Rosko A, Feldman EL. (2010) How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? Nat Rev Neurol, 6(10): 551-9.
143. Gregor MF, Hotamisligil GS. (2011) Inflammatory mechanisms in obesity. Annu Rev Immunol, 29: 415-45.
144. Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, Brito-Moreira J, Houzel JC, Decker H. (2012) An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin

signaling caused by Alzheimer's disease- associated Abeta oligomers. The Journal of clinical investigation, 122(4): 1339-53.

145. Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH. (2008) Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 28(27): 6926-37.
146. Hanger DP, Anderton BH, Noble W. (2009) Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. Trends Mol Med, 15(3): 112-9.
147. Leroy A, Landrieu I, Huvent I, Legrand D, Codeville B, Wieruszeski J-M. (2010) Spectroscopic studies of GSK3{beta} phosphorylation of the neuronal tau protein and its interaction with the N-terminal domain of apolipoprotein E. The Journal of biological chemistry, 285(43): 33435-44.
148. Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J. (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. EMBO J, 20(1-2): 27-39.
149. Jackson GR, Wiedau-Pazos M, Sang TK, Wagle N, Brown CA, Massachi S. (2002) Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in Drosophila. Neuron, 34(4): 509-19.
150. Perez M, Hernandez F, Lim F, Diaz-Nido J, Avila J. (2002) Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. J Alzheimers Dis, 5(4): 301-8.
151. Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F. (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(19): 6990-5.
152. Yamaguchi H, Ishiguro K, Uchida T, Takashima A, Lemere CA, Imahori K. (1996) Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. Acta neuropathologica, 92(3): 232-41.
153. Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B. (1999) Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for

Alzheimer disease neurofibrillary changes. J Neuropathol Exp Neurol, 58(9): 1010-9.

154. Mateo I, Infante J, Llorca J, Rodriguez E, Berciano J, Combarros O. (2006) Association between glycogen synthase kinase-3beta genetic polymorphism and late-onset Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord, 21(4): 228-32.
155. Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS. (2003) GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. Nature, 423(6938): 435-9.
156. Tumminia A, Vinciguerra F, Parisi M, Frittitta L. (2018) Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: Role of Insulin Signalling and Therapeutic Implications. International journal of molecular sciences, 19(11): 3306.
157. Freiherr J, Hallschmid M, Frey WH, 2nd, Brunner YF, Chapman CD, Holscher C. (2013) Intranasal insulin as a treatment for Alzheimer's disease: a review of basic research and clinical evidence. CNS Drugs, 27(7): 505-14.
158. Plum L, Schubert M, Bruning JC. (2005) The role of insulin receptor signaling in the brain. Trends Endocrinol Metab, 16(2): 59-65.
159. Imfeld P, Bodmer M, Jick SS, Meier CR. (2012) Metformin, other antidiabetic drugs, and risk of Alzheimer's disease: a population-based case-control study. J Am Geriatr Soc, 60(5): 916-21.
160. Chiang MC, Cheng YC, Chen SJ, Yen CH, Huang RN. (2016) Metformin activation of AMPK-dependent pathways is neuroprotective in human neural stem cells against Amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction. Exp Cell Res, 347(2): 322-31.
161. Gupta A, Bisht B, Dey CS. (2011) Peripheral insulin-sensitizer drug metformin ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes. Neuropharmacology, 60(6): 910-20.
162. Chen Y, Zhou K, Wang R, Liu Y, Kwak YD, Ma T. (2009) Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(10): 3907-12.
163. Ng TP, Feng L, Yap KB, Lee TS, Tan CH, Winblad B. (2014) Long-term metformin usage and cognitive function among older adults with diabetes. J Alzheimers Dis, 41(1): 61-8.

164. Moore EM, Mander AG, Ames D, Kotowicz MA, Carne RP, Brodaty H. (2013) Increased risk of cognitive impairment in patients with diabetes is associated with metformin. Diabetes Care, 36(10): 2981-7.
165. Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Hanke A, Dewachter I, Kuiperi C. (2005) Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV717I transgenic mice. Brain, 128(Pt 6): 1442-53.
166. Yu Y, Li X, Blanchard J, Li Y, Iqbal K, Liu F. (2015) Insulin sensitizers improve learning and attenuate tau hyperphosphorylation and neuroinflammation in 3xTg-AD mice. Journal of neural transmission, 122(4): 593-606.
167. Fernandez-Martos CM, Atkinson RAK, Chuah MI, King AE, Vickers JC. (2017) Combination treatment with leptin and pioglitazone in a mouse model of Alzheimer's disease. Alzheimers Dement, 3(1): 92-106.
168. Sato T, Hanyu H, Hirao K, Kanetaka H, Sakurai H, Iwamoto T. (2011) Efficacy of PPAR-gamma agonist pioglitazone in mild Alzheimer disease. Neurobiol Aging, 32(9): 1626-33.
169. Geldmacher DS, Fritsch T, McClendon MJ, Landreth G. (2011) A randomized pilot clinical trial of the safety of pioglitazone in treatment of patients with Alzheimer disease. Arch Neurol, 68(1): 45-50.
170. Holscher C. (2010) The role of GLP-1 in neuronal activity and neurodegeneration. Vitam Horm, 84: 331-54.
171. McClean PL, Holscher C. (2014) Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. Neuropharmacology, 76 Pt A: 57-67.
172. Hansen HH, Barkholt P, Fabricius K, Jelsing J, Terwel D, Pyke C. (2016) The GLP-1 receptor agonist liraglutide reduces pathology-specific tau phosphorylation and improves motor function in a transgenic hTauP301L mouse model of tauopathy. Brain Res, 1634: 158-70.
173. Talbot K, Wang HY. (2014) The nature, significance, and glucagon-like peptide-1 analog treatment of brain insulin resistance in Alzheimer's disease. Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association, 10(1): 12-25.

174. Kosaraju J, Gali CC, Khatwal RB, Dubala A, Chinni S, Holsinger RM. (2013) Saxagliptin: a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor ameliorates streptozotocin induced Alzheimer's disease. Neuropharmacology, 72: 291-300.
175. Rizzo MR, Barbieri M, Boccardi V, Angellotti E, Marfella R, Paolisso G. (2014) Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors have protective effect on cognitive impairment in aged diabetic patients with mild cognitive impairment. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 69(9): 1122-31.
176. Lenzen S. (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia, 51(2): 216-26.
177. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. (1994) STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. Diabetes, 43(11): 1326-33.
178. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. (1981) Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP–ribose) synthetase in pancreatic islets. Nature, 294(5838): 284-6.
179. Bennett RA, Pegg AE. (1981) Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. Cancer Res, 41(7): 2786-90.
180. Kroncke KD, Fehsel K, Sommer A, Rodriguez ML, Kolb-Bachofen V. (1995) Nitric oxide generation during cellular metabolization of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotozin contributes to islet cell DNA damage. Biol Chem Hoppe Seyler, 376(3): 179-85.
181. Szkudelski T. (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiological research, 50(6): 537-46.
182. Sandler S, Swenne I. (1983) Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. Diabetologia, 25(5): 444-7.
183. Heller B, Burkle A, Radons J, Fengler E, Jalowy A, Muller M. (1994) Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. Biol Chem Hoppe Seyler, 375(9): 597-602.
184. Prakash L, Bhosale P, Cloyd J, Kim M, Parker N, Yao J. (2017) Role of Fluorouracil, Doxorubicin, and Streptozocin Therapy in the Preoperative Treatment of Localized Pancreatic Neuroendocrine Tumors. J Gastrointest Surg, 21(1): 155-63.

185. Kolb H. (1987) Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. Diabetes Metab Rev, 3(3): 751-78.
186. Wu KK, Huan Y. (2008) Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. Curr Protoc Pharmacol, 70: 5.47.1-5.47.20
187. Yorek MA. (2016) Alternatives to the Streptozotocin-Diabetic Rodent. Int Rev Neurobiol, 127: 89-112.
188. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM. (2000) A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. Metabolism: clinical and experimental, 49(11): 1390-4.
189. Nitsch R, Hoyer S. (1991) Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. Neurosci Lett, 128(2): 199-202.
190. Pathan AR, Viswanad B, Sonkusare SK, Ramarao P. (2006) Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. Life sciences, 79(23): 2209-16.
191. Hellweg R, Nitsch R, Hock C, Jaksch M, Hoyer S. (1992) Nerve growth factor and choline acetyltransferase activity levels in the rat brain following experimental impairment of cerebral glucose and energy metabolism. Journal of neuroscience research, 31(3): 479-86.
192. Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, Ahmad M, Ansari MA. (2006) Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. Behav Brain Res, 171(1): 9-16.
193. Prickaerts J, Fahrig T, Blokland A. (1999) Cognitive performance and biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis. Behav Brain Res, 102(1-2): 73-88.
194. Grunblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. (2007) Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. Journal of neurochemistry, 101(3): 757-70.
195. Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, Hoyer S, Riederer P. (2006) Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex

and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. Journal of neurochemistry, 96(4): 1005-15.

196. Plaschke K, Kopitz J. (2015) In vitro streptozotocin model for modeling Alzheimer-like changes: effect on amyloid precursor protein secretases and glycogen synthase kinase-3. Journal of neural transmission, 122(4): 551-7.
197. Rajasekar N, Nath C, Hanif K, Shukla R. (2016) Inhibitory Effect of Memantine on Streptozotocin-Induced Insulin Receptor Dysfunction, Neuroinflammation, Amyloidogenesis, and Neurotrophic Factor Decline in Astrocytes. Molecular neurobiology, 53(10): 6730-44.
198. Guo XD, Sun GL, Zhou TT, Xu X, Zhu ZY, Rukachaisirikul V. (2016) Small molecule LX2343 ameliorates cognitive deficits in AD model mice by targeting both amyloid beta production and clearance. Acta pharmacologica Sinica, 37(10): 1281-97.
199. Genrikhs EE, Stelmashook EV, Golyshev SA, Aleksandrova OP, Isaev NK. (2017) Streptozotocin causes neurotoxic effect in cultured cerebellar granule neurons. Brain research bulletin, 130: 90-4.
200. Isaev NK, Genrikhs EE, Voronkov DN, Kapkaeva MR, Stelmashook EV. (2018) Streptozotocin toxicity in vitro depends on maturity of neurons. Toxicology and applied pharmacology, 348: 99-104.
201. Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF. (2009) Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. Neurotoxicology, 30(1): 127-35.
202. Tieu K, Zuo DM, Yu PH. (1999) Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: involvement of bcl-2 and p53 proteins. Journal of neuroscience research, 58(3): 426-35.
203. Biswas J, Goswami P, Gupta S, Joshi N, Nath C, Singh S. (2016) Streptozotocin Induced Neurotoxicity Involves Alzheimer's Related Pathological Markers: a Study on N2A Cells. Molecular neurobiology, 53(5): 2794-806.
204. Rajasekar N, Dwivedi S, Nath C, Hanif K, Shukla R. (2014) Protection of streptozotocin induced insulin receptor dysfunction, neuroinflammation and amyloidogenesis in astrocytes by insulin. Neuropharmacology, 86: 337-52.

205. Biswas J, Gupta S, Verma DK, Singh S. (2017) Streptozotocin alters glucose transport, connexin expression and endoplasmic reticulum functions in neurons and astrocytes. Neuroscience, 356: 151-66.
206. Sun P, Ortega G, Tan Y, Hua Q, Riederer PF, Deckert J. (2018) Streptozotocin Impairs Proliferation and Differentiation of Adult Hippocampal Neural Stem Cells in Vitro-Correlation With Alterations in the Expression of Proteins Associated With the Insulin System. Frontiers in aging neuroscience, 10: 145.
207. Wang P, Jiang S, Cui Y, Yue Z, Su C, Sun J. (2011) The n-terminal 5-MER peptide analogue P165 of amyloid precursor protein exerts protective effects on SH-SY5Y cells and rat hippocampus neuronal synapses. Neuroscience, 173: 169-78.
208. Jahn K, Wieltsch C, Blumer N, Mehlich M, Pathak H, Khan AQ. (2017) A cell culture model for investigation of synapse influenceability: epigenetics, expression and function of gene targets important for synapse formation and preservation in SH-SY5Y neuroblastoma cells differentiated by retinoic acid. Journal of neural transmission, 124(11): 1341-67.
209. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72: 248-54.
210. Deshmukh M, Johnson EM, Jr. (1997) Programmed cell death in neurons: focus on the pathway of nerve growth factor deprivation-induced death of sympathetic neurons. Molecular pharmacology, 51(6): 897-906.
211. Li D, Zhu B, Ding L, Lu W, Xu G, Wu J. (2014) Role of the mitochondrial pathway in serum deprivation-induced apoptosis of rat endplate cells. Biochemical and biophysical research communications, 452(3): 354-60.
212. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. (2016) Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. J Vis Exp, (108): 53193.
213. Kovalevich J, Langford D. (2013) Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. Methods Mol Biol, 1078: 9-21.
214. Adem A, Mattsson ME, Nordberg A, Pahlman S. (1987) Muscarinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line: regulation by phorbol ester and retinoic acid-induced differentiation. Brain Res, 430(2): 235-42.

215. Teppola H, Sarkanen JR, Jalonen TO, Linne ML. (2016) Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. Neurochem Res, 41(4): 731-47.
216. Lasorella A, Iavarone A, Israel MA. (1995) Differentiation of neuroblastoma enhances Bcl-2 expression and induces alterations of apoptosis and drug resistance. Cancer Res., 55(20): 4711-6.
217. Lopez-Carballo G, Moreno L, Masia S, Perez P, Barettino D. (2002) Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. J Biol Chem, 277(28): 25297-304.
218. Ramalingam M, Kim SJ. (2015) Insulin exerts neuroprotective effects via Akt/Bcl-2 signaling pathways in differentiated SH-SY5Y cells. J Recept Signal Transduct Res, 35(1): 1-7.
219. Eves EM, Xiong W, Bellacosa A, Kennedy SG, Tsichlis PN, Rosner MR. (1998) Akt, a target of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line. Mol Cell Biol, 18(4): 2143-52.
220. Kunzler A, Zeidan-Chulia F, Gasparotto J, Girardi CS, Klafke K, Petiz LL. (2017) Changes in Cell Cycle and Up-Regulation of Neuronal Markers During SH-SY5Y Neurodifferentiation by Retinoic Acid are Mediated by Reactive Species Production and Oxidative Stress. Molecular neurobiology, 54(9): 6903-16.
221. Ramalingam M, Kim SJ. (2016) The Neuroprotective Role of Insulin Against MPP(+) -Induced Parkinson's Disease in Differentiated SH-SY5Y Cells. Journal of cellular biochemistry, 117(4): 917-26.
222. Li Y, Duffy KB, Ottinger MA, Ray B, Bailey JA, Holloway HW. (2010) GLP-1 receptor stimulation reduces amyloid-beta peptide accumulation and cytotoxicity in cellular and animal models of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis, 19(4): 1205-19.
223. Li Y, Chigurupati S, Holloway HW, Mughal M, Tweedie D, Bruestle DA. (2012) Exendin-4 ameliorates motor neuron degeneration in cellular and animal models of amyotrophic lateral sclerosis. PLoS One, 7(2): e32008.

224. Qiu C, Wang YP, Pan XD, Liu XY, Chen Z, Liu LB. (2016) Exendin-4 protects Abeta(1-42) oligomer-induced PC12 cell apoptosis. Am J Transl Res, 8(8): 3540-8.
225. Li Y, Bader M, Tamargo I, Rubovitch V, Tweedie D, Pick CG (2015) Liraglutide is neurotrophic and neuroprotective in neuronal cultures and mitigates mild traumatic brain injury in mice. Journal of neurochemistry, 135(6): 1203-17.
226. Li Y, Perry T, Kindy MS, Harvey BK, Tweedie D, Holloway HW. (2009) GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(4): 1285-90.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

Bagaméry F, Varga K, Kecsmár K, Vincze I, Szökő E, Tábi T.

The impact of differentiation on cytotoxicity and insulin sensitivity in streptozotocin treated SH-SY5Y cells

NEUROCHEMICAL RESEARCH. 2021 Jun; 46(6): 1350-1358

DOI: 10.1007/s11064-021-03269-2

Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

IF: **3.038** (2019)

Bagaméry F, Varga K, Kecsmár K, Vincze I, Szökő E, Tabi T.

Lack of insulin resistance in response to streptozotocin treatment in neuronal SH-SY5Y cell line

JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION. 2020 Jan; 127(1): 71-80

DOI: 10.1007/s00702-019-02118-5

Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

IF: **3.505** (2019)

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

Lakatos P. P, Vincze I, Nyariki N, **Bagaméry F**, Tábi T, Szökő E.

The effect of L-theanine and S-ketamine on D-serine cellular uptake

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-PROTEINS AND PROTEOMICS. 2020 Oct; 1868(10): 140473 (Pages)

Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

IF: **2.371** (2019)

Vincze I, Lakatos P. P, **Bagaméry F**, Tábi T, Szökő E.

Characterization of a cell line model for D-serine uptake

JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS. 2020 Aug; 187: 113360 (Pages)

Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

IF: **3.209** (2019)

Bába László-István, Kolcsár M, Kun Imre Z, Ulakcsai Zs, **Bagaméry F**, Szökő E, Tábi T, Gáll Zs.

Effects of Cariprazine, Aripiprazole, and Olanzapine on Mouse Fibroblast Culture: Changes in Adiponectin Contents in Supernatants, Triglyceride Accumulation, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Expression

MEDICINA-LITHUANIA. 2019 May; 55(5)

Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

IF: **1.205**

Ulakcsai Zs, **Bagamery F**, Szoko E, Tabi T.

The role of autophagy induction in the mechanism of cytoprotective effect of resveratrol

EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES. 2018 Oct; 123: 135-142

Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

IF: **3.532**

Ulakcsai Zs, **Bagaméry F**, Vincze I, Szökő E, Tábi T.

Protective effect of resveratrol against caspase 3 activation in primary mouse fibroblasts.

CROATIAN MEDICAL JOURNAL. 2015 Apr; 56(2): 78-84

Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

IF: **1.483**

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Tábi Tamás** egyetemi docens úrnak a Gyógyszerhatástani Intézet Igazgatójának, aki az évek során nagyon sok segítséget nyújtott a kísérletek tervezésében, az eredmények értelmezésében és a publikációk, doktori értekezés megírásában. A kutatói munkám folyamatos támogatása mellett az oktatói pálya megszeretésében és a kezdeti lépések megtételében is fontos szerepet töltött be.

Továbbá köszönettel tartozom **Dr. Szökő Éva** professzor asszonynak, aki tanácsaival szintén meghatározóan támogatta kutatói és oktatói munkámat.

Szeretném megköszönni **Dr. Bagdy György** professzor úrnak, hogy az intézetben végzett kutatómunkámat lehetővé tette.

Köszönettel tartozom **Kecsmár Kitti**, **Szanics Valéria**, **Dr. Varga Kamilla** kolléganőimnek és **Dr. Vincze István** férjemnek és kollégámnak a kísérleti munka során nyújtott gyakorlati segítségért, együttműködésért.

Szeretnék köszönetet mondani a Gyógyszerhatástani Intézet további munkatársainak a segítségükért és támogatásukért, mely által a munkámat színvonalas szakmai környezetben és jó hangulatban végezhettem.

Köszönettel tartozom továbbá a kedves családomnak, barátaimnak, akik az évek alatt végig mellettem álltak, bíztattak és segítettétek a munkámat.