

Alzheimer kór: Az edzés és a mikrobiom szerepe transzgenikus egérmódelben

Doktori tézisek

Ábrahám Dóra

Testnevelési Egyetem
Sporttudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Radák Zsolt egyetemi tanár, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Tretter László egyetemi tanár, DSc

Dr. Virág László egyetemi tanár, DSc

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tihanyi József professor emeritus, DSc

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Rácz Levente tudományos főmunkatárs,
PhD

Dr. Molnár Andor főiskolai docens, PhD

Budapest

2020

1.Bevezetés

Az Alzheimer kór (AD) világszerte a demencia leggyakoribb formája, a tünet együttest először Alois Alzheimer írta le 1907-ben. Az AD felelős a demenciák 50-75%-áért mely leggyakrabban az idősek betegsége, ezen felül az AD már a második leggyakoribb halálozási ok a fejlett országokban, de sajnos egyelőre még nincs rá hatásos gyógymód. A betegségnek számos klinikai és patológiai tünete van. A klinikai tünetek az enyhétől a súlyosig változnak a betegség előrehaladtával. A kór kezdetén a betegek rövidtávú memóriája romlik, csökken a beszédképességük, magányosnak és depressziósnak érzik magukat. Később problémát jelent nekik a térbeli tájékozódás például egy rövid séta után nem találnak haza, romlik a hosszú távú memóriájuk, a saját családjukra sem emlékeznek. Az AD-nek 6 stádiuma van és a kór diagnosztizálása rendszerint az V. stádiumban történik, amikor a betegség már egy előrehaladott állapotban van. Az utolsó stádiumban a betegeknek már állandó felügyeletre van szüksége. A kórnak 2 előfordulási formája van a sporadikus és az öröklődő. A sporadikus forma az idős korban előforduló változat, ami egy spontán génmutációnak köszönhető, míg az öröklődő forma fiatal korban jelentkezik. A sporadikus AD sokkal gyakoribb, ez tehető felelőssé az esetek 99%-áért.

Számos molekula játszik szerepet a betegség kialakulásában. A leggyakrabban érintett molekulák a következők: amiloid prekursor protein (APP), Presenilin 1 és presenilin 2 (PS1, PS2), Neprilizin és neprilizin 2 (NEP, NEP2), Apolipoprotein E (ApoE) és a Tau fehérje.

Rengeteg transzgenikus egérmodell áll rendelkezésre mely bemutatja a betegség kórlefolyását és minimum 1 fent említett molekulát tartalmazza. Ezek a modellek az örökletes formáját mutatják be az AD-nek, mivel ez a betegség alapvetően nincs jelen az egerekben. Annak ellenére, hogy rengeteg különböző modell létezik egyik sem alkalmas arra, hogy egy az egyben bemutassa ezt a kórt. A betegség egyes molekuláris útvonalainak jobb megértésére van velük lehetőség.

Az oxidatív stressznek is nagy szerepe lehet a betegség kialakulásában és lefolyásában. Azt gondolják, hogy az oxidatív stressz által okozott károk már jóval a betegség detektálhatósága előtt megtörténik. Az AD-ben a DNS károsító folyamatoknak lehet nagy szerepe melyet leggyakrabban a 8-oxoguanin DNS glikoziláz 1 (OGG1)

javít. Ennek a glikoziláznak a szintje rendszerint szignifikánsan alacsonyabb az AD-ben szenvedő betegeknél, mint az egészséges kontrolloknál.

A mikroglia aktiválásnak fontos szerepe van a béta-amyloid (A β) eltávolításában. A mikroglia általában aktivált állapotban vannak jelen a plakkok körül. Sajnos a kontroll nélküli mikroglia aktiváció egy komoly gyulladáshoz vezethet, mely felelőssé tehető a neurodegeneratív betegségek kialakulásában például az AD-ben is.

Jelenleg nincs megfelelő gyógymód a betegség kezelésére, de számos preventív módszer elérhető. A rendszeres testmozgás jótékony hatása számos egészségügyi állapotban bebizonyosodott. A fizikai aktivitás indukálhatja a neurogenesiszist a hippocampusban, emellett megemeli az agyban az OGG1 szintjét, így segíthet semlegesíteni a reaktív oxigén gyökök által okozott károkat, és védelmet nyújthat a központi idegrendszer olyan betegségeivel szemben, mint az AD. A maratoni típusú edzést több kutatócsoport vizsgálta, míg az intervallum típusú edzés csak mostanában került a tudományos érdeklődés középpontjába. Az intervallum típusú edzés hasonló hatással lehet az agyi funkciókra, mint a maratoni típusú edzés, és akár preventív módszerként is hatékony lehet.

A mikrobiom preventív szerepe még nem bizonyított, ám ígéretes eredmények vannak erre vonatkozóan. A mikrobiom egy folyamatosan változó környezet, ahol több baktériumfaj van jelen. A mikrobiom összetétele függ az életkortól, a környezettől, az étkezési szokásokról, a fizikai aktivitástól és a betegségektől. Míg a fizikai aktivitás, az egészséges táplálkozás és az állandó környezet kedvezően hat a jótékony baktériumtörzsek szaporodásához addig az öregedés és a betegségek a kártékony baktériumok számára kedveznek. Megfigyelték, hogy az AD korai szakaszában a probiotikumok használata előnyös lehet, hozzájárulhatnak a kognitív funkció fenntartásához, és támogatják az antioxidáns terelést. Ezen kívül elősegítheti a butirát- és a vitamintermelő baktériumok megjelenését a bélflórában, és elősegítheti a hasznos baktériumtörzsek, mint például a *Lactobacillus spp.* elszaporodását. Mivel az AD főleg idős korban fordul elő, az áteresztő bél szindróma jelenlétét nem lehet figyelmen kívül hagyni. Az áteresztő bél szindróma az összefoglaló neve egy olyan tünetegyüttesnek, melyben a bélfal nem rendelkezik megfelelő

nyálkahártya réteggel, és amelyhez epiteliális gyulladás társul. Az áteresztő bél szindróma akkor fordul elő gyakrabban, ha a beteg tartós stressznek van kitéve, ha idős korban van, és krónikus betegségben szenved. Figyelembe véve a fent említett tényezőket, hatalmas esély van arra, hogy az AD-os betegek áteresztő bél szindrómában szenvednek, és a mikrobiom összetételük jelentősen eltér az optimálisnak mondottól.

2. Célkitűzés

A vizsgálatban az intervallum típusú futópados edzés és egy specifikus probiotikum lizátumot tartalmazó táplálék kiegészítő hatását tanulmányoztuk. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a kezelések késleltetik-e a demencia kialakulását az APP / PS1 transzgenikus egerekben.

Számos publikációt találtunk, amelyekben bizonyították a maratoni típusú testmozgás pozitív hatását az AD kórlefordulására, érdekelt minket, hogy ezen pozitív hatások elérhetőek-e nagy intenzitású intervallum edzésekkel is. Azt is bebizonyították, hogy a nagyobb futási sebesség nagyobb agyi anyagcsere-igényt eredményez. Mivel az intervallum edzés hatásait akartuk tesztelni, amely a folyamatos sebességszabályozáson alapul, nem tudtuk olyan modellt használni ahol az önkéntes edzést lehet alkalmazni.

Szerettük volna felfedni azt is, hogy egy speciális probiotikum lizátumot tartalmazó táplálék kiegészítő képes-e jelentősen módosítani a bél mikrobiomjának az összetételét. És ha igen, lehetnek-e ezek a változások olyan jelentőségteljesek, hogy különbségeket okozzanak az agyi funkciókban? Lehetséges, hogy a mikrobiomban bekövetkező változások hozzájárulhatnak a testmozgás által kiváltott pozitív hatásokhoz?

Érdeklődésünk középpontjában az a feltételezés állt, hogy a kétféle kezelés önmagában is hatékony lehet, vagy együttes alkalmazásuk esetén kedvezőbb hatással lehetnek a betegségre. Lehetséges, hogy ezek a preventív módszerek kitolhatják az AD-re jellemző tünetek kialakulását és megjelenését?

3.Módszerek

I. Állatok, kísérleti csoportok

32 darab hím APP/PS1 transzgenikus egeret használtunk kísérletünkben. Az állatok véletlenszerűen lettek beosztva az alábbi 4 kísérleti csoportba (n=8/csoport) kontrol

APP/PS1TG-C, edzést végző APP/PS1TG-Ex, táplálék kiegészítőt kapó APP/PS1TG-Pr és kombinált (edzést és táplálék kiegészítést is kapó) APP/PS1TG-ExPr. Ezen felül egy vad típusú kontrollcsoportot is hozzáadtunk a kísérlethez (n=10).

Az állatokat 100 napos korukban hoztuk az állatházunkba ahol 1 hét adaptálódási periódus következett. Minden állat egyedül volt a ketrecben, mivel az egér kolóniákban szeret élni így szükségessé vált, hogy környezetüket különböző elemekkel gazdagítsuk. Az állatok korlátlanul hozzáfértek az ivóvízhez, a rágcsálótápból pedig naponta 5 grammot kaptak. Az állatokat 12-12 órás sötétség-világosság ciklusban tartottuk ahol a világos periódus egybe esett a nappalal. Minden vizsgálatot a világos szakaszban végeztünk. Intervallum típusú futószalagos edzést és egy probiotikum lizátumot tartalmazó táplálék kiegészítőt használtunk, hogy megvizsgáljuk az AD-re kifejtett hatásukat. APP/PS1 transzgenikus egereket használtunk melyekben a β - amyloid plakkképződés és a kognitív hanyatlás már 6 hónapos korban elindul. Tau fehérje aggregátumok nem képződnek ebben a modellben. Az állatok egyedül voltak 1 ketrecben, mert mérnünk kellett a probiotikum fogyasztás napi adagját. Éppen ezért a környezet gazdagítás különböző elemeit kellett használnunk, mint például nagyobb ketrec játszóalagúttal. Ezen felül olyan itató melyen egy labda állja el a víz útját így képezve újabb stimulációt. Futókerekeket nem helyeztünk el a ketrecben, mert az összeegyeztethetetlen lett volna a kísérletünkkel.

II. A kísérlet felépítése, edzés protokoll

Mindegyik kezelés 20 hétig tartott. Intervallum edzést az edző és a kombinált csoport tagjai kaptak. Előzetesen 2 héten keresztül minden csoportot hozzászoktattunk a futószalaghoz (Columbus Inst. Columbus Ohio) és a futási sebességhez. Heti 4db 60 perces edzést kaptak az egerek. Mindegyik edzés 10 szakaszból állt, szakaszonként 4 perc magas és 2 perc alacsony intenzitású futással. Az alacsony intenzitású szakasz sebessége az egész kísérlet alatt állandó volt 10m/perc, míg a magas intenzitású részt 16m/perces sebességről 3 hetente 1 m/perccel emelve elértünk a 20m/perces sebességhez. A kontroll és a táplálék kiegészítést kapó csoportokat is hozzászoktattuk a futószalaghoz, ők minden edzésnapon 5 percig voltak az álló szalagon.

A táplálék kiegészítőt (Framelim[®]) a rágcsáló táppal együtt kapták heti 5x 120mg/nap adagolással. A Framelim[®] csukamáj olajban oldott *Bifidobacterium longum* és

Lactobacillus acidophilus lizátumot valamint B1, B3, B6, B9, B12 vitaminokat tartalmaz. Ezen táplálék kiegészítő pozitív hatásairól már beszámoltak áteresztő bél szindrómánál, egyéb bélrendszeri és neuropszichiátriai betegségekkel kapcsolatban pedig javulást értek el vele. Feljegyeztük a napi táplálék és táplálék kiegészítő fogyasztást melyből megállapítottuk, hogy a táplálék kiegészítő nem befolyásolta az állatok táp és vízfogyasztását sem.

A 20 hetes kezelést követően 2 hét kognitív tesztelés következett. Morris vízi útvesztő tesztet, Y útvesztő tesztet, nyílt porond és új tárgy felismerési tesztet végeztünk el. A kognitív tesztek végeztével az állatokat ketamin (Richter, koncentráció: 100mg/ml) /xylazine (Produlab Pharma, koncentráció: 20mg/ml) koktélos intraperitoneális injekcióval elaltattuk melynek adagolása testsúlygrammonként 0.1 ml/ 10g. Végül heparinos fiziológiás sóoldattal perfundáltuk az állatokat.

Az egerek agyát eltávolítottuk és azonnal megmértük. Ezek után a corpus callosum mentén kettévágtuk. Az egyik agyféltekét 4%-os paraformaldehidben utófixáltuk, hogy immunhisztológiai festéseket hajthassunk végre rajtuk. Míg a másik agyféltekét 3 részre metsztük (frontális, parietális és occipitális irányban) és a hippocampust elkülönítettük. Minden részt begyűjtöttünk, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és -80°C-on tároltuk a biokémiai vizsgálatok elvégzéséig.

Mikrobiom analízis céljából bélsár mintákat is gyűjtöttünk.

III. Kognitív tesztek

Morris vízi útvesztő teszt

A tesztet 4 egymást követő napon végeztük, minden tesztnapon 4 próbát végeztünk. Egy 60 cm magas és 100 cm átmérőjű kör alakú medencét megtöltöttünk vízzel, majd egy hat cm széles kör alakú platformot helyeztünk a medence északnyugati negyedének központjába egy cm-rel a víz felszíne alatt. A vízhőmérsékletet minden alkalommal 22 ° C és 23 ° C között tartottuk. A tesztet sötétben hajtottuk végre, így nem volt szükség a víz fehérre színezésére.

Négy kiindulási pontot használtunk (észak, dél, nyugat vagy kelet), és az egereknek 60 másodpercük volt, hogy megtalálják a víz alatti platformot. A kiindulási pontok sorrendjét minden nap változott. A 60 másodperces próba után az állatoknak 30 másodpercük volt, hogy pihenjenek a platformon. Ezt a protokollt alkalmaztuk minden

kísérletben résztvevő állaton. Az állatok sorrendjét véletlenszerűen osztottuk el. A platform ugyanazon a helyen volt minden próba során. Feljegyeztük a rejtett platform megtalálásához szükséges időtartamot.

Nyílt porond teszt

Ezzel az általános teszttel megmérhetjük az állatok mozgásszervi aktivitását és felfedező képességét valamint a szorongásra való hajlamot is. Kör alakú porondot használunk, ahol a külső és belső területeket bejelöltük az ezeken való áthaladással a spontán aktivitást mérhetjük. Az kiindulási pont a kör közepe, ide helyezzük az egeret, majd szabadon hagyjuk felfedezni a területet 5 percen keresztül. Feljegyezzük a belső és a külső területen való áthaladások számát, az ágaskodással és mosakodással töltött időt, valamint a látencia időtartamát.

Új tárgy felismerési teszt

Ezt a tesztet ugyanazon a porondon hajtjuk végre, mint a nyílt porond tesztet. A nyílt porond teszt elvégzését követő napon alkalmazható, így már nem kell az új környezethez hozzászoktatnunk az állatokat. Itt az egerek tárgy felismerési képességét mérhetjük. Egész pontosan azt, hogy képesek-e újból felismerni a már ismert tárgyakat, akkor is, ha egy új tárgy mellett mutatják be őket. A tesztet 2 egymást követő napon kell elvégezni. Az első napon 2 azonos méretű, színű és anyagú tárgyat helyezünk az arénába. Az egerek adott ideig megfigyelhetik a 2 tárgyat, a tárgyak megfigyelésével töltött időt feljegyezzük. A második tesztnapon az egyik tárgyat kicserélik egy újra, amely méretében és anyagában is különbözik. A régi és az új tárggyal eltöltött időt feljegyezzük majd a kapott adatokat elemezzük.

Spontán alternáció

Ezzel a teszttel az egerek azon természetes viselkedését lehet vizsgálni, amely az új területek felfedezésére vonatkozik. Egészséges állatokban megfigyelhető, hogy az Y alakú labirintus új karjait fedezik fel, a korábban meglátogatottak helyett. A labirintuskarok 120 fokos szöget zárnak be egymással, a kiindulási pont a labirintus közepe. Az állatokat külön-külön a labirintus kiindulási pontjába helyezzük, majd engedjük, hogy szabadon felfedezzék, bejárják a területet. A teszt 5 percen keresztül zajlik, melyben egy 3 perces ellenőrző pont is található. Mérjük a látencia időt és a

helyes alternálásokat is. Helyes alternálásnak az számít, ha az egér aktuális karba történő belépése eltér a két előzőtől, és a 2 előző is különbözik egymástól. Az alternálás magas aránya arra utal, hogy az egér kognitív képessége nem károsodott. Belépésnek az számít, amikor az egér mind a 4 végtagja az adott kar belsejében van.

IV. Immunhisztológia

Az agyféltekéket 4% PFA-ban 1 napig konzerváltuk majd utána szobahőmérsékleten 0,1% foszfát-pufferrel (PB) mostuk. Ezután az agyféltekéket 4 órára 15% -os szacharóz-oldatba helyeztük, majd éjszakára 4 ° C-on 30% -os szacharóz-oldatba tettük. A szövetet ezután folyékony nitrogén felett egy úgy nevezett hidegvédő anyagba ágyasztuk (Tissue Tek, Sakura Finetek Europe Ref. 4583).

Az agyakat ezután Leica Sliding Microtome-mal (SM2000R modell) 40 µm-es koronális metszetekre szeltek, és nátrium-azidos foszfát pufferben tároltuk.

β-amiloid és OGG1 festés

A kísérleti csoportok minden hatodik szabadon lebegő agymetszetét amiloid plakkok ellen immunfestettük (6E10, Anti-β-amiloid, 1-16 antitest, BioLegend # 803015).

A DNS-javító enzimet (Anti-OGG1 Abcam # ab22766) is immunfestéssel detektáltuk.

6E10 és Iba1 kettős festés

Az agymetszeteket 6E10 és Iba1-es kettős fluoreszcens festésnek is alávetettük. Minden hatodik szabadon lebegő metszetet először az Iba1-re (AIF / Iba1 Novus biologe # NB100-1028) FITC-tyramide amplifikációs fluoreszcens immuncitokémia alkalmazásával festettük. Majd a metszeteket szobahőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltuk 6E10-el (1: 7000; BioLegend # 803015).

Mikroszkópia és képfeldolgozás

A metszetek vizsgálatához fluoreszcens epi megvilágítással és sötéttér-kondenzátorral felszerelt Olympus BX60 fénymikroszkópot használtunk. A képeket 2048 × 2048 pixel felbontással készítettük SPOT Xplorer digitális CCD kamerával (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) 10-20 × objektív felhasználásával. A képeket az Adobe Photoshop CS5.1 „szint” és „élesség” parancsaival állítottuk be. A

képek teljes felbontását a végleges verzióig tartottuk fenn, amelyeket 300 dpi felbontásra állítottunk be. A képeket az ImageJ Software 1.48v verziójával elemeztük.

A könyvtár előkészítése és a prokarióta fajok azonosítása

A székletmintákból származó DNS-t a QIAmp Fast DNA széklet mini készlettel (Quiagen) izoláltuk. A fragmentum könyvtárakat tisztított DNS-ből állítottuk elő NEBNext gyors DNS fragmentációs és könyvtár előkészítő készlettel az Ion Torrenthez (New England Biolabs) a gyártó utasításainak megfelelően. A könyvtár mintákat előkészítettük a szekvenáláshoz a Life Technologies Ion OneTouch protokollok és reagensek segítségével. Végül a szekvenálást az Ion PGM Hi-Q nézetű OT2 készlettel (Life Technologies) hajtottuk végre.

V. Statisztika

A kísérlet kezdetén a transzgenikus állatokat véletlenszerűen soroltuk be a következő csoportokba: Kontrol-APP/PS1^{TG}-C, edzést végző-APP/PS1^{TG}-Ex, táplálék kiegészítőt kapó APP/PS1^{TG}-Pr és kombinált (edzést végző és táplálék kiegészítőt kapó) csoportok – APP/PS1^{TG}-Ex-Pr. A kísérlethez egy vad típusú kontroll csoportot WT is hozzáadtunk. Mindegyik transzgenikus csoport 8 állatból, míg a WT csoport 10 állatból állt.

A statisztikai elemzéshez a mikrobiom minták kivételével a GraphPad Prism 5 szoftvert használtuk. A fiziológiai és biokémiai adatok kiértékelésére először Shapiro-Wilk féle normalitási tesztet végeztünk az összes függő változóról. Az eredmény alapján egyirányú varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk, amelyet Tukey post hoc tesztje, vagy Kruskal-Wallis ANOVA teszt követett Dunn post hoc tesztjével. A szignifikanciaszintet $p < 0,05$ -re állítottuk.

Mikrobiális analitikai módszerek

A baktériumok genom-jelölését úgy végeztük, hogy a FASTQ adatfájlokat feltöltöttük az automatizált web-alapú metagenomikai elemző szerverre, az MG-RAST 3.6 verziójára. Az MG-RAST a FASTQ adatfájlokat bemenetként érzékeli, azonosítja az olyan nyitott leolvasási kereteket, amelyek valószínűleg géneket jelölnek, és egy sor alrendszerrel használ (a RAST-ben az „ST”), hogy összehasonlítsa ezeket egy géneket és RNS szekvenciákat tartalmazó adatbázissal, előállítva egy kiváló minőségű adatfájlt. A

RefSeq adatbázis alapján feliratozott adatfájlokat letöltöttük további elemzés céljából. Az adatkészletek MG-RAST azonosítói a következők: Wt (egészséges kontroll): mgm4672670.3; APP / PS1TG: mgm4673335.3; APP / PS1TG -Ex: mgm4682164.3; APP / PS1TG -ExPr: mgm4682165.3; APP / PS1TG -Pr: mgm4682167.3.

A mikrobiom bioinformatikai elemzése

Az adatokat alábbi kritériumok alapján szűrtük: minimális kijelölési hossz: 30 bázispár; az identitás minimális százaléka: 60%; maximális E-érték: 10^{-5} . Ezután az egyes minták leolvasásait véletlenszerű sorrendben permutáltuk, és 10 nem átfedő részhalmazra osztottuk, amelyek az eredeti adatok 10% -át tartalmazzák. Ezt a folyamatot Python szkripttel hajtottuk végre. A létrehozott populációkat a kiválasztott mikrobiális csoportok relatív előfordulásának és szórásának kiszámításához használtuk. Az eredményeket oszlopdiagramon ábráztuk. A csoportok közötti különbségek szignifikanciáját kétmintás Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk $p < 0,001$ szignifikancia küszöb mellett. Ezeket az elemzéseket a MATLAB-ban végeztük.

4. Eredmények

I. A kognitív tesztek eredményei

A kognitív tesztekben vad típusú (WT) egereket (N = 10) is használtunk annak érdekében, hogy a transzgenikus egerek teljesítményét ehhez a csoporthoz tudjuk viszonyítani. Emellett az eredményeket csak a transzgenikus csoportokra vetítve is elemeztük.

A térbeli memóriát MWM teszttel vizsgáltuk, ahol a vad típusú egerek nem szárnyalták túl a transzgenikus csoportok teljesítményét. Érdekes módon az APP/PS1^{TG}-Ex-Pr csoport teljesített az összes vizsgálati csoport közül a legjobban, jelezve hogy agyi funkcióik nekik károsodtak a legkevésbé.

Ha csak a transzgenikus csoportok teljesítményét vizsgáljuk, szignifikáns különbségeket fogunk találni a csoportok között. Az APP/PS1^{TG}-Ex-Pr csoport a második, harmadik és negyedik napon felülmúlta a többi transzgenikus csoportot.

A második napon az APP/PS1^{TG}-Ex-Pr csoport felülmúlta az APP/PS1^{TG}-C csoportot.

A harmadik napon az APP/PS1^{TG}-Ex-Pr csoport felülmúlta az APP/PS1^{TG}-Ex csoportot.

A negyedik napon az APP/PS1^{TG}-Ex-Pr csoport felülmúlta az APP/PS1^{TG}-Ex és APP/PS1^{TG}-Pr csoportot.

A nyílt porond teszt során nem találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált csoportok explorációs aktivitása között. Az összes csoport állata belépett a belső és a külső területekre is, ami azt jelenti, hogy egyik állat sem szorongott, mind készen állt a terület felfedezésére. Nem volt szignifikáns különbség a belső és a külső területeken való áthaladások között.

Új tárgy felismerési teszt. A nyílt porond tesztet a NOR-teszt előtt kell elvégezni, mivel az állatoknak az arénában lévő tárgyakat kell felfedezniük, nem pedig az új környezetet. Az egerek felismerik a régi tárgyat, így több időt töltenek az új felfedezésével. Az APP/PS1^{TG}-Ex egerek szignifikánsan kevesebb időt töltöttek az új objektummal az APP/PS1^{TG}-C csoporthoz képest.

A spontán alternáció jó módszer a kognitív deficit mérésére transzgenikus eger modellekben. A WT egerekkel összehasonlított adatok jól mutatják, hogy az AD-nek súlyos hatása van a kognitív funkciókra. Az APP/PS1^{TG}-C állatok szignifikánsan rosszabbul teljesítettek, mint a WT állatok, ha a helyes alternálások % -át mérjük.

II. Az agyszövet vizsgálati eredményei

A 6E10 antitesttel festett amiloid plakkok azt mutatják, hogy az amiloid plakk lerakódás a hippokampális régióban volt a legkifejezettebb, ahogy az várható volt ebben az egér törzsben. A legtöbb plakkot az APP/PS1^{TG}-C csoportban figyelték meg. Az APP/PS1^{TG}-C csoporthoz ($31,7 \pm 9,0$) és az APP/PS1^{TG}-ExPr csoporthoz ($29,1 \pm 6,7$) képest az APP/PS1^{TG}-Ex csoportban ($13,9 \pm 6,7$) szignifikánsan alacsonyabb volt a plakkok száma. Érdekes módon észrevehetjük, hogy minden kezelést kapó csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt a plakkok által lefedett terület, mint az APP/PS1^{TG}-C csoportban.

Megmértük a mikroglia számát is a hippokampusz területén. Egyrészt nem találtunk különbséget a csoportok közötti teljes mikroglia számban. Másrészt a mikroglia által lefedett terület szignifikánsan magasabb volt az APP/PS1^{TG}-ExPr csoportban ($8,11 \pm 1,3$), mint az APP/PS1^{TG}-C csoportban ($5,36 \pm 2,4$).

Az OGG1 szint csökken az AD-ben. A testmozgás növeli az agy OGG1 szintjét. Megmértük, hogy a testmozgás módosíthatja-e az OGG1 szintet. Kiderült, hogy az OGG1 szint az APP/PS1^{TG}-Ex csoportban (7951 ± 4085), szignifikánsan magasabb volt, mint más kezelt csoportokban. APP/PS1^{TG}-Pr (2947 ± 2222) és APP/PS1^{TG}-ExPr (3358 ± 1127). Az általuk lefedett terület nagysága nem különbözik

III. A mikrobiom vizsgálat eredményei

A WT és az APP/PS1^{TG}-C egerek mikrobiom összetételének különbségei szembeötlőek, ha a nemzetségek szintjén vizsgáljuk őket. *Bacteroides spp.* szignifikánsan alacsonyabb volt, míg a *Prevotella spp.* szignifikánsan magasabb volt a WT csoportban, mint az APP/PS1^{TG}-C csoportban. A *Bacteroides spp.* egy ismert szukcinát termelő nemzetség, amely negatívan befolyásolhatja a mucin termelést, és az alacsony számú *Prevotella spp.* szintén mucin termeléssel kapcsolatos problémákra utal az APP/PS1^{TG}-C csoportban.

Butirátt termelő nemzetség, például a *Clostridium spp.* *Eubacterium spp.* és *Roseburia spp.* a WT-csoportban nagyobb sűrűségben fordulnak elő, ami arra utal, hogy a bélben található mucin réteg jól funkcionál.

A butirát termelő nemzetségek szignifikánsan magasabb számban fordultak elő a WT csoportban, mint az APP/PS1^{TG}-C csoportban. Az adatokból az feltételezhető, hogy az AD negatív hatással van a mikrobiom összetételére és áteresztő bél szindróma lehet jelen a betegeknél. (N = 8). * p <0,001. Az eredményeket átlag ± szórásaként fejeztük ki, kétmintás Kolmogorov-Smirnov-tesztet használtunk.

Ha összehasonlítjuk a nemzetségbeli különbségeket a transzgenikus csoportok között, akkor látható, hogy a testmozgás pozitív hatást gyakorolt a butirát termelő nemzetségekre, míg a probiotikum lizátumot kapó csoportban ezeknek a baktériumoknak volt a legalacsonyabb szintje.

A probiotikum lizátum Omega 3 zsírsavakat tartalmazott, amelynek meg kellett emelnie a *Lactobacillus spp*-szintet, és csökkentenie kellett a *Clostridium spp*-t. Adataink bizonyítékokkal szolgálnak erre a feltételezésre.

A fajok szintjén más érdekes különbségeket is megfigyelhetünk.

Összehasonlítva a WT és az APP/PS1^{TG}-C csoportokat, észrevehetjük, hogy a Bacteroides fajai a *Bacteroides thetaiotaomicron* és a *Bacteroides fragilis* a WT csoportban szignifikánsan alacsonyabb mennyiségben vannak jelen, ami ismét arra utal, hogy a bélfal hámrétege jobb állapotban van. A butirát termelő *Butyrivibrio proteoclastus* megemelkedett szintje ugyan ezt a feltételezést támasztja alá.

A *Bacteroides thetaiotaomicron* szintje szignifikánsan magasabb volt az APP/PS1^{TG}-Pr-ban, mint az APP/PS1^{TG}-ExPr csoportban, ez az eredmény jól korrelál az MWM teszt eredményeivel. Ennek a baktériumoknak a megnövekedett szintje arra utalhat, hogy áteresztő bél szindrómában szenvednek az állatok, mivel ezen baktérium a glükóz és laktóz erjedés végtermékeként acetátot és szukcinátot állít elő. Mindkét végtermék felelős a csökkent mucin termelésért. A probiotikum lizátum megemelte a *Bacteroides fragilis* szintjét, érdekes módon a testmozgás módosíthatja ezt a hatást. Az edzésben résztvevő APP/PS1^{TG}-Ex és az APP/PS1^{TG}-ExPr csoportokban lényegesen alacsonyabb ezen baktériumok száma, mint az APP/PS1^{TG}-Pr csoportban. A *Lactobacillus reuteri* egy jól ismert B12-vitamin-termelő baktérium, amely vitamin nélkülözhetetlen az agy optimális működéséhez, szintje magas az APP/PS1^{TG}-Pr és APP/PS1^{TG}-ExPr csoportokban. A *Lactobacillus johnsoni*-ről kimutatták, hogy túlzott mértékben H₂O₂-t termel, szintje szignifikánsan alacsonyabb az APP/PS1^{TG}-Ex csoportban, mint az APP/PS1^{TG}-C csoportban, bizonyítva, hogy a testmozgásnak pozitív szerepe van az

oxidatív stresszel szemben. A butirát termelő baktériumok eltérő arányban fordultak elő a csoportok között. Ezek a baktériumok a *Butyrivibrio proteoclastus*, a *Marvinbryantia formatexigens*, a *Roseburia intestinalis* és a *Roseburia inulinivorans*. Mind megnövekedett mennyiségben fordult elő az APP/PS1^{TG}-Ex és APP/PS1^{TG}-ExPr edzésben részesülő csoportokban, összehasonlítva a kizárólag probiotikum lizátumot kapó az APP/PS1^{TG}-Pr csoporttal.

5. Következtetések

Az utóbbi időkben nagy az érdeklődés a bélflóra-agy kapcsolatára valamint az Alzheimer kór lehetséges prevenciós eszközeire vonatkozóan. Éppen ezért vizsgáltuk az intervallum típusú edzés és egy lizált probiotikumokat tartalmazó táplálék kiegészítő hatását Alzheimer kóros transzgenikus egereken.

Az edzés jó prevenciós eszköznek tűnik, mert azon felül, hogy megőrizte a térbeli memóriát a transzgenikus állatokban megfigyelhettük az amiloid plakkok csökkenő számát a hippokampuszban. Ezen felül az agy vizsgált területein emelkedett OGG1 szinttel találkozhattunk. Ha az edzésben részesített állatok mikrobiomját vizsgáljuk, megfigyelhetjük a butirát termelő baktériumok emelkedett szintjét, miközben a Prevotellák száma csökkenő tendenciát mutatott. Azonban további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy megállapítsuk, mely változásoknak van a legnagyobb hatása az agyi funkciókra. Ezen felül azt is érdemes lenne megvizsgálni, hogy az áteresztő bél szindróma okozhat-e Alzheimer kórt.

Kísérletünkben hővel előlt baktériumokat probiotikum lizátumot használtunk, melynek természetesen nincs ugyanolyan hatása, mintha élő baktériumokat használtunk volna. Ennek ellenére észrevettünk pozitív változásokat a mikrobiomban. B12 termelő baktérium emelkedett mennyiségét találtuk az APP/PS1^{TG}-Pr csoportban. A lactobacillusok száma emelkedett, míg a Clostridiumok száma csökkent ebben a csoportban mely az Omega 3 zsírsavak hatása is lehet. Meglepetésünkre a probiotikum csökkentette a butirát termelő baktériumok számát és sajnos a kognitív funkciókban sem láttunk akkora javulást, mint vártuk.

Összességében kijelenthetjük, hogy mindkét típusú kezelésnek voltak előnyei az észlelésre és a mikrobiomra nézve is. Az edzés pozitív hatásai javuló észlelésben, csökkenő amiloid plakk számban emelkedő OGG1 értékben és a butirát termelő

baktériumok magas számában mutatkozott meg. A probiotikum lizátumnak nem volt annyi pozitív hatása, mint az edzésnek, de a Lactobacillusok emelkedett aránya jó táptalaja lehet egyéb kedvező hatású baktérium számára. A jövőbeni kutatás célja az lenne, hogy feltérképezzük a pontos mechanizmust a bél-agy kommunikációban, és hogy megtaláljuk az összes, baktériumok által kiválasztott terméket, melyek hatással lehetnek az AD-re akár pozitívan akár negatívan, így képesek lennénk kifejleszteni egy hatásos, de nem invazív terápiát a betegségben szenvedők számára.

6. Saját publikációk jegyzéke

Disszertációhoz kapcsolódó cikkek:

Abraham D, Feher J, Scuderi GL, Szabo D, Dobolyi A, Cservenak M, Juhasz J, Ligeti B, Pongor S, Gomez-Cabrera MC, Vina J, Higuchi M, Suzuki K, Boldogh I, Radak Z. (2019) Exercise and probiotics attenuate the development of Alzheimer's disease in transgenic mice: Role of microbiome. *Exp Gerontol*, 115: 122-131.

IF: 3.376

Marton O, Koltai E, Takeda M, Mimura T, Pajk M, Abraham D, Koch LG, Britton SL, Higuchi M, Boldogh I, Radak Z. (2016) The rate of training response to aerobic exercise affects brain function of rats. *Neurochem Int*, 99: 16-23.

IF: 3.262

Disszertációhoz nem kapcsolódó cikk:

Perényi H, Szegeczki V, Horváth G, Hinnah B, Tamás A, Radák Z, Ábrahám D, Zákány R, Reglodi D, Juhasz T. (2020) Physical Activity Protects the Pathological Alterations of Alzheimer's Disease Kidneys via the Activation of PACAP and BMP Signaling Pathways. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14:

IF: 3.921 (2019)

Szegeczki V, Horvath G, Perenyi H, Tamas A, Radak Z, Abraham D, Zakany R, Reglodi D, Juhasz T. (2020) Alzheimer's Disease Mouse as a Model of Testis Degeneration. *Int J Mol Sci*, 21:

IF: 4.566 (2019)