

A duloxetine hatása a β -aktin stresszválásra patkány agyban

SZÜCS SZABINA¹, PÁKÁSKI MAGDOLNA¹, DOMOKOS ÁGNES¹, IFJ. KÁLMÁN JÁNOS¹, KÁLMÁN SÁRA¹, GARAB DÉNES¹, PENKE BOTOND², SZABÓ GYULA³, JANKA ZOLTÁN¹ ÉS KÁLMÁN JÁNOS¹

Szegedi Tudományegyetem, ¹ Pszichiátriai Klinika, Alzheimer-kór Kutatócsoport, ² Orvosi Vegytani Intézet, ³ Kórleltani Intézet, Szeged

Alzheimer-kórban (AK) gyakran prodromális tünetként szerepel a depresszió. Mindkét betegség kóroki tényezői között fontos szerepet játszanak a különböző stresszhatások. A krónikus stressz hatására megemelkedett glükokortikoid szint közvetett úton idegsejtpusztuláshoz vezet. **Kísérleteink célkitűzése** az AK patomechanizmusában szerepet játszó faktorok közül az amiloid prekursor protein (APP), a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK-1), illetve az új szinaptikus struktúrák létrejöttéhez alapvető β -aktin expressziójában stressz hatására bekövetkező változások vizsgálata volt állatmodellben. A továbbiakban kérdésként merült fel: vajon egy szerotonin-noradrenalin visszavétel gátló hatásmechanizmusú antidepresszív szer, a duloxetine képes-e modulálni a stressz indukálta központi idegrendszeri transzkripció változásokat. **Módszer:** Hím Wistar patkányokat 21 napon keresztül napi 5 órás immobilizációs stressznek tettünk ki, miközben egy csoportjuk napi 45 mg/tskg duloxetint kapott. A kortexből és hippokampuszból tisztított β -aktin, MAPK-1 és APP mRNS mennyiségét real time PCR technikával határoztuk meg. Fehérjeszinten szemi-quantitatív meghatározást Western blot technika segítségével végeztünk. **Eredmények:** Stressz hatására jelentősen megnövekedett a β -aktin transzkripciója a kontroll csoporthoz képest, ezt a növekedést a duloxetine kezelés represszálta. A MAPK-1 és APP mRNS-szintekben nem találtunk szignifikáns változásokat. A Western blot vizsgálatok eredménye szerint a β -aktin fehérje mennyisége az antidepresszáns kezelés hatására kissé csökkent, a gyógyszer és a stressz-kezelés együttes hatására pedig jelentősen csökkent. **Következtetés:** Eredményeink arra utalnak, hogy a duloxetinnel történő antidepresszív kezelés protektív tényezőként szerepelhet a krónikus stressz okozta negatív idegrendszeri változások, azaz a szinaptikus plaszticitás zavarának, illetve ennek nyomán a kognitív funkciók romlásának kivédésében mind az affektív zavarok, mind az AK vonatkozásában.

Kulcsszavak: Alzheimer-kór, immobilizációs stressz, amiloid prekursor protein, β -aktin, mitogén-aktivált protein kináz, duloxetine

A stressz központi etiológiai szerepet tölt be számos pszichiátriai kórkép, köztük az Alzheimer-kór (AK), valamint az affektív zavarok esetében. Klinikai tanulmányok igazolják a pszichés traumák szerepét a demencia kialakulásában, illetve progressziójában (Charles és mtsai, 2006). Szintén jól ismert a különböző életkorokban bekövetkezett stressz-események hatása a depresszió kifejlődésére. A Selye János által elsőként leírt, és azóta is intenzíven kutatott stressz-válasz számos vonatkozásának megismerése a mai napig várat magára.

Központi idegrendszeri hatásait tekintve eddig bizonyítást nyert, hogy a stressz hatására megemelkedett CRH és glükokortikoid szint valószínűleg közvetlenül is, illetve a brain-derived neurotrophic factor (BDNF) szint csökkenésén keresztül a neuronok atrófiáját, pusztulását okozza. Ez a pusztulás legkifejezettebben a hippokampusz területén jelentkezik (Chen és mtsai, 2008; Licinio és mtsai, 2002; Magri és mtsai, 2006). A BDNF szerepét támasztják alá a stresszhatást követő morfológiai változások, így a dendrittüskék számának csökkenése, amelyek a szinaptikus plaszticitás,

s ezáltal a tanulási folyamatok romlásának hátterében állnak (Bodnoff és mtsai, 1995). A tanulási folyamatok idegéletteni alapjának a long-term potentiation (LTP) tartják. Az LTP konszolidálódását mutatják a dendrittüske morfológiájában létrejövő változások, kialakul a posztszinaptikus denzitás. Mindez igen gyorsan, akár 30 perc alatt stabilizálódik. Hátterében az aktin citoskeleton gyors átrendeződését feltételezik. Ezen folyamat egyik kezdő szignálja a tanulás során fölszabaduló BDNF, amely integrin molekulák közvetítésével indítja meg az aktin polimerizációját (Lynch és mtsai, 2007). A tanult anyag konszolidálódását biztosító szinaptikus plaszticitás hátterében álló mechanizmusok számos pszichiátriai kórkép, így a szkizofrénia, az affektív zavarok és a demenciák esetében zavart szenvednek.

Az AK és a depresszió együttes jelentkezése nem ritka. Az időskori depresszió gyakran prodromális tünete, máskor pedig kísérőbetegsége az AK-nak. Poszt mortem vizsgálatok igazolták, hogy az AK-hoz társult major depresszió fokozza az AK-ra jellemző neuropatológiai elváltozások (amiloid plakkok és neurofibrilláris kötegek) jelenlétét a betegek hippokampuszában, ennek megfelelően gyorsítja a kognitív funkciók romlását (Rapp és mtsai, 2006).

Az AK amiloid hipotézise szerint az amiloid plakkok kialakulásáért az amiloid prekursor protein (APP) kóros hasítási termékeként keletkező β -amiloid tehető felelőssé. Az extracellulárisan aggregálódó β -amiloid a szinapszis funkcionális károsodását, illetve egy gyulladáso, apoptotikus folyamat elindítását okozza, melynek végső következménye a neuronok pusztulása (Haass és Selkoe, 2007).

Az AK hasonlóképp patognomikus citomorfológiai elváltozásai az intracellulárisan kialakuló neurofibrilláris kötegek. Ezek kialakulásában egy mikrotubulus-asszociált protein, a tau hiperfoszforilálódása játssza a központi szerepet, aminek eredményeképp a mikrotubulusok dezorganizálódnak, a celluláris transzportfolyamatok sérülnek. Mindez végső soron szintén a neuronok pusztulását eredményezi (Duyckaerts és mtsai, 2009). A tau foszforilálását a mitogén-aktivált protein kináz-1 (MAPK-1) enzim végzi.

Mind az APP, mind a MAPK-1 a sejtekben normális körülmények között is jelenlévő, fiziológiás funkciót betöltő fehérjék. Az AK-ban betöltött szerepük kóros metabolizmusuk, illetve regulációjuk eredménye (Palmert és mtsai, 1990).

Az AK-hoz társuló depresszió súlyosbítja és gyorsítja a betegség lefolyását, hatással van a molekuláris elváltozások intenzitására. A krónikus stressz

hatására megemelkedett kortizol szint hosszútávon a hippokampusz atrofíáját és memória deficitet okoz idős korban, valamint major depresszióban az AK kifejlődése nélkül is (Seeman és mtsai, 1997). Az antidepresszív kezelés hatására megemelkedik a hippokampális BDNF mennyisége, ami ellene hat a glükokortikoid szint emelkedés okozta negatív változásoknak. Hatására javul a szinaptikus plaszticitás, beindul a neuron regeneráció, helyreállnak a tanulási folyamatok (Russo-Neustadt és mtsai, 2001; Garcia, 2002). Újabb kutatások szerint az antidepresszívumok hatásukat a cAMP másodlagos messenger rendszeren keresztül fejtik ki, megnövelve a cAMP response element binding protein (CREB) expresszióját, amelynek egyik valószínűsíthető target génje a BDNF-gén (Duman, 1998).

Mivel a BDNF egyik hatását az aktin citoskeleton átrendeződésén keresztül hozza létre, kísérleteink során célunk a krónikus stressznek, valamint az antidepresszív kezelésnek a β -aktin expresszióra kifejtett hatásának vizsgálata volt. Emellett vizsgáltuk ugyanezen faktorok APP és MAPK-1 expressziót befolyásoló hatásait is. Antidepresszív szerként egy szerotonin-noradrenalin visszavétel gátló hatásmechanizmusú szert, a duloxetint használtuk. A gének transzkripciójának vizsgálatára real time PCR-t, a fehérjék mennyiségi változásainak meghatározása céljából Western blot-ot végeztünk.

MÓDSZER

Vizsgálati csoportok

Kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat használtunk. A kontrollcsoport (K, n=20) semmilyen kezelésben nem részesült. A stressznek kitett csoport (S, n=16) esetében immobilizációs módszert alkalmaztunk: 21 napon keresztül napi 5 órán át 25-30 cm hosszú, 10 cm átmérőjű műanyag csövekben tartottuk az állatokat élelem és víz nélkül. Az állatok minden nap, a stresszkezelés előtt gyomorszondán keresztül fiziológiás sóoldatot kaptak (a duloxetin oldat térfogatával megegyező mennyiségben). Az antidepresszív kezelésben részesülő állatok (D, n=4) gyomorszondán keresztül napi 45 mg/tskg duloxetint kaptak 10 mg/ml hígításban (fiziológiás sóoldatban oldva). A negyedik csoportba (SD, n=6) tartozó állatokat a 21 napos immobilizációs stressz mellett kezeltük szintén 45 mg/tskg duloxetinnel.

A kísérlethez a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága adott etikai engedélyt.

Mintavétel

A három hetes kísérleti idő leteltével az állatokat intraperitoneálisan adott 10%-os klorálhidráttal altattuk, majd hideg fiziológiás sóoldattal transzkardiálisan perfundáltuk. Ezt követően mindkét agyféltekéből különválasztottuk a hippokampuszt, illetve mindkét oldali kortexből mintát vettünk, amelyeket a felhasználásig -80°C -on tároltunk.

Totál RNS izolálás

Mind a hippokampuszból, mind a kortexből totál RNS-t izoláltunk (Nucleo Spin[®] RNA II kit, *Machery-Nagel*). 30 mg agyszövetet 350 μl RA1 pufferrel homogenizáltunk, majd a sejteket 3,5 μl merkaptotetanollal lizáltuk. A lizátumot két szűrőn átcentrifugálva (1. 11.000 g, 1'; 2. 350 μl 70 %-os etanollal 11.000 g, 2') kötöttük meg a nukleinsavakat, majd a szilika membránt 350 μl membrán desalting buffer felhasználásával kimosztuk. Az így kapott oldathoz 10 μl rDNáz, 90 μl rDNáz reakció puffert és 95 μl rDNáz reakció mixet pipetázva, majd szobahőmérsékleten 15 percig inkubálva emésztettük meg a mintában található DNS-t. Ezt követően a membránt centrifugálással, 200 μl RA2 (30 sec, 11.000 g), majd 600 μl RA3 (30 sec, 11.000 g), majd ismét 250 μl RA3 puffer (2', 11.000 g) hozzáadásával lemostuk és kiszárítottuk. A totál RNS-t végül 60 μl ribonukleáz mentes vízzel oldottuk le a membránról (1', 11.000 g). Ehhez 0,5 μl ribonukleáz gátlót adtunk, majd a mintákat felhasználásig -80°C -on tároltunk.

Real time PCR

Az mRNS-ek cDNS-re történő átírásához High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitet (*Applied Biosystem*) használtunk. Az oldatok RNS koncentrációját Nanodrop készülék segítségével mértük. Az oldatokat úgy hígítottuk, hogy 15 μl tartalmazzon 2 ng RNS-t. Ezekhez 15 μl átíró mixet adva (RT puffer, dNTP Mix, RT random primerek, Multi Scribe[™] reverz transzkriptáz és nukleáz mentes víz) történt meg az mRNS-ek cDNS-re való átírása (10' 25°C , 120' 37°C , 5'' 85°C , végül 4°C).

Az így nyert minták 9 μl -éhez 10 μl Fast Start SYBR Green Master Mixet (*Roche*) és 1 μl primert (10 pmol/ml) adva a cDNS-ek mennyiségi meghatározása Rotogene[®] (*Corbett*) készülékkel történt. Az eredmények kiértékelésénél $\Delta\Delta\text{Ct}$ módszert alkalmaztunk, mely az áttörési ciklusszámok ($\text{Ct} = \text{threshold cycle}$) közvetlen összevetését teszi lehetővé.

A Ct azt a ciklusszámot jelenti, ahol a minden egyes PCR ciklusban detektált fluoreszcens jel exponenciálisan növekedni kezd áttörve a detektálhatóság határát. A vizsgált mRNS expressziós szintek normalizálása glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) mRNS meghatározással történt. Az általánosan elfogadott irányelveket követve csak az 1 fölötti (illetve -1 alatti) $\Delta\Delta\text{Ct}$ értékeket tekintettük releváns változásnak, ezekben az esetekben statisztikai kiértékelésként kétmintás t-próbát végeztünk. Az adatokat átlag \pm SEM formában jelentettük meg. A szignifikancia szint: $p < 0.05$ volt.

Western blot

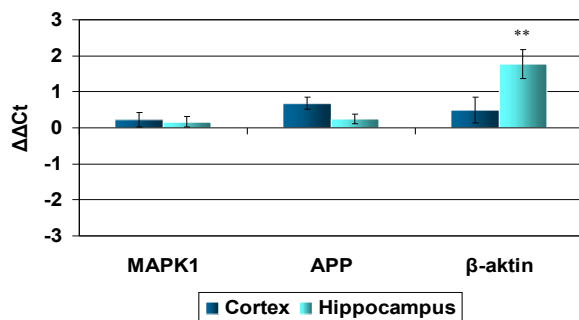
Az állatok agymintáit teflon-üveg homogenizátorban 0.15 M NaCl-ot, 2 mM PMSF (fenilmetil-szulfonil-fluorid)-t, 2 mM EDTA (etiléndiamin-tetraecetsav)-t, 1% SDS (nátrium-dodecilsulfát)-t, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptint és 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatint tartalmazó 50 mM Tris (tri(hidroximetil)-aminometán) pufferben (pH 7.5) homogenizáltuk (1500 rpm, 1 perc). A homogenizátumot 30 percig 4°C -on centrifugáltuk (10000 g). A felülúszó fehérje tartalmát BCA (bicinkoninsav) kit segítségével mértük (Smith és mtsai, 1985).

Denaturálást követően a mintákat (20 μg fehérje-tartalom) 9%-os poliakrilamid gélen futtattuk, majd a szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. 1.5 órán át 5%-os tejport tartalmazó 0.1 M Tris puffer-0,9% NaCl (TBS-0,2% Tween) keverékében előinkubáltuk a membránt, majd 5x5 percig szobahőmérsékleten TBS-0,2% Tween-ben mostuk. Ezután a primer antitesttel (monoklonális egér anti- β -aktin 1:8000, *Sigma*; monoklonális egér anti-APP 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, *Chemicon*) egy éjszakán keresztül inkubáltuk. Másnap 5x5 perces TBS-0,2% Tween-ben történő mosás után inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten a szekunder antitesttel (torma-peroxidáz konjugált (HRPO)-birka anti-egér IgG 1:1000, *Jackson*), amit újbóli 5x5 perces mosás követett. A specifikus csíkokat Supersignal West Pico Chemiluminescens reagenssel (*Pierce*) és röntgenfilmre hívással tettük láthatóvá. A csíkokat denzitometriával kvantifikáltuk.

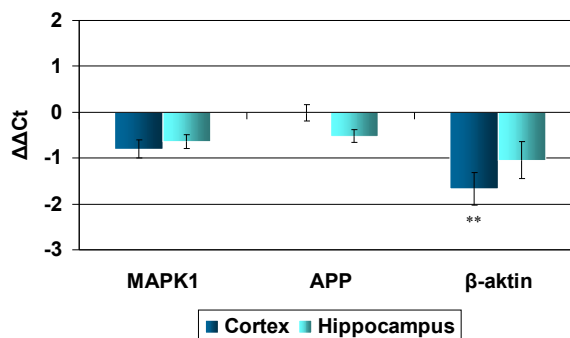
EREDMÉNYEK

A krónikus stressz hatására (S) a MAPK-1 és APP RNS-szintek nem mutattak változást sem a kortikális, sem a hippokampális mintákban. A β -aktin esetében azonban a hippokampális neuronokban majdnem négyszeres expresszió növekedést figyeltünk meg ($p < 0.01$) (1. ábra).

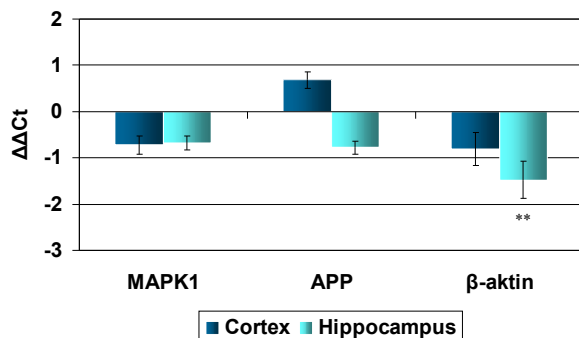
1. ábra. MAPK-1, APP és β -aktin mRNA expressziója krónikus stressz-kezelés hatására patkány kortexben és hippokampuszban. Változás a kontrollcsoporthoz viszonyítva. (K-S) ** $p < 0.01$



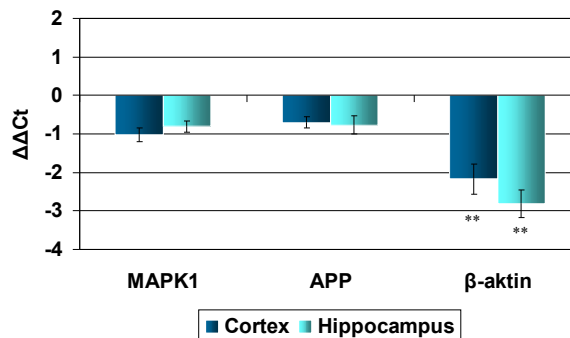
3. ábra. MAPK-1, APP és β -aktin mRNA expressziója krónikus stressz és duloxetin kezelés hatására patkány kortexben és hippokampuszban. Változás a kontrollcsoporthoz viszonyítva. (K-SD) ** $p < 0.01$



2. ábra. MAPK-1, APP és β -aktin mRNA expressziója krónikus duloxetin kezelés hatására patkány kortexben és hippokampuszban. Változás a kontrollcsoporthoz viszonyítva. (K-D) ** $p < 0.01$



4. ábra. MAPK-1, APP és β -aktin mRNA expressziója krónikus stressz és duloxetin kezelés hatására patkány kortexben és hippokampuszban. Változás a stresszelt állatokhoz viszonyítva. (S-SD) ** $p < 0.01$



A kizárólag duloxetinnel kezelt állatokban (D) a kezelés hatására szignifikánsan csökkent a β -aktin hippokampális expressziója ($p < 0.01$). Hasonló változási tendencia volt jellemző ugyan a MAPK-1 és APP kifejeződésére is, ez azonban nem érte el a szignifikanciaszintet (2. ábra).

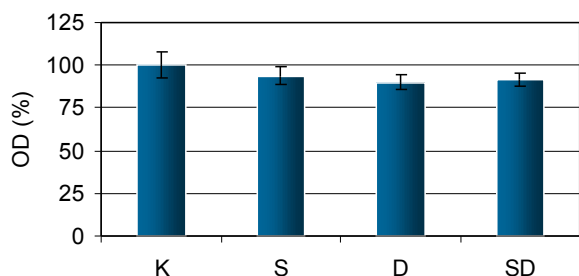
Az immobilizációs stressz melletti duloxetin kezelés hatására a stressz következtében létrejövő β -aktin expresszió növekedés elmaradt, sőt, kismértékű csökkenést tapasztaltunk (3. ábra). A duloxetin kezelés hatása még kifejezettebbnek bizonyult, ha a stressz kezelés mellett gyógyszerrel kapott állatok eredményeit a kizárólag stressznek kitett csoportéhoz hasonlítottuk (4. ábra): igen szembevető az antidepresszívum β -aktin szintet represszáló hatása ($p < 0.01$).

A Western blot mérések során (az mRNA szintekben kapott eredmények figyelembevételével) csak a hippokampuszban vizsgáltuk az APP és β -aktin fehérjék mennyiségét. Az APP szintekben itt sem tapasztaltunk változást (5. ábra). A β -aktin mennyiségében stressz hatására nem következett be változás, a duloxetin kezelés azonban kismértékben ($p < 0.05$), a krónikus stresszel együtt alkalmazva pedig kifejezetten csökkentette a β -aktin fehérje mennyiségét (6. ábra) ($p < 0.01$).

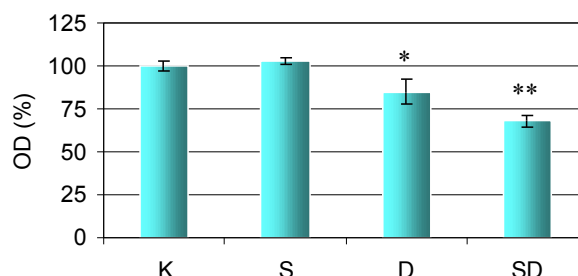
MEGBESZÉLÉS

Eredményeink igazolják, hogy a stressz hatással van a β -aktin hippokampális transzkripciójára. Feltételezhető tehát, hogy az aktinexpresszió változásai

5. ábra. APP Western blot kontroll állapotban (K), krónikus stressz (S), duloxetine (D), illetve krónikus stressz és duloxetine (SD) kezelést követően patkány hippocampusban.



6. ábra. β -aktin Western blot kontroll állapotban (K), krónikus stressz (S), duloxetine (D), illetve krónikus stressz és duloxetine (SD) kezelést követően patkány hippocampusban. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$



hozzájárulhatnak a szinaptikus plaszticitás zavarához, mely az egyik központi folyamata a mind a depresszióban, mind az AK-ban tapasztalható kognitív deficit kialakulásának. Kísérleteink arra nem adnak választ, hogy a stressz aktinexpressziót befolyásoló hatását milyen tényezők közvetítik. Az irodalomban fellelhető adatok alapján lehetséges faktorként merül fel a megemelkedett cerebrális CRH szint, mely az idegsejteken található CRH-receptorokon keresztül befolyásolja a neuronok funkcionális morfológiáját (Chen és mtsai, 2008). További lehetőséget képvisel a BDNF, melynek expressziója stressz hatására, illetve affektív zavarok esetén jelentősen deprimált (Licinio és mtsai, 2002).

Kísérleteink szerint a β -aktin kifejeződését az antidepresszív kezelés is modulálni képes, hiszen a duloxetine kezelés meggátolta a stressz hatására létrejövő β -aktin expresszió növekedését. Ebben a vonatkozásban is felvetődik a BDNF szerepe, hiszen már több szerző is beszámolt az antidepresszív kezelés BDNF expressziót növelő hatásáról (Russo-Neustadt és mtsai, 2001; Garcia, 2002). A duloxetine hatása a β -aktin kifejeződésére azonban a BDNF-től független is lehet, más úton is befolyásolhatja a neuronok regenerálódását, és a szinaptikus struktúrák rendeződését.

A duloxetine biztonságosan alkalmazható antidepresszív szer, generalizált szorongásos zavar terápiájában is bevált, emellett használják depressziót kísérő fájdalomszindrómák, diabéteszes polineuropátia, illetve stressz inkontinencia kezelésére is. A kórképek közötti összefüggés molekuláris háttere egyelőre kevésbé ismert, a depresszióra és a fájdalomra gyakorolt együttes hatás mögött vélhetőleg szintén az idegi plaszticitásra és neuron regenerációra kifejtett kedvező hatás állhat (Delgado, 2004).

A duloxetine gátolja a szerotonin és a noradrenalin preszinaptikus újrafelvételét (Trivedi és mtsai, 2008). A stressz hatására létrejövő hippocampális szerotoninszint-emelkedés szükséges a megfelelő idegi adaptáció, érzelmi és viselkedésválasz létrejöttéhez. Patkánykísérletekben a szerotonin-depletált állatok stressznek kitéve különböző viselkedési tesztekben fokozott szorongást, tanult tehetetlenséget, és tanulási zavarokat mutattak. A szerotonin hiány valószínűleg a hippocampális glükokortikoid-receptorok és BDNF-expresszió csökkentésén keresztül okozza a stressz-adaptáció zavarát (Zhou és mtsai, 2008).

Eredményeink lényeges módszertani vonatkozása, hogy megkérdőjelezi azt a bevett gyakorlatot, amely szerint a β -aktint elterjedten használják belső standardnak a real time PCR technika során, feltételezve, hogy mint háztartási gén, expressziója a külső behatásoktól nagymértékben független. Ezt a tézist az utóbbi időben egyre több eredmény cáfolja (Bonfeld és mtsai, 2008; Gutala és Reddy, 2004), így a mi kísérleteink is rávilágítanak arra, hogy a β -aktin kifejeződése igen érzékenyen reagál bizonyos hatásokra.

Kísérleteink során az APP expressziója nem mutatott változást sem a krónikus stressz, sem pedig az antidepresszív kezelés hatására, melynek alapján feltételezhető, hogy a stressz nem közvetlenül az APP expresszió modulálásán keresztül játszik szerepet az AK kialakulásában. Illetve az AK szempontjából lényeges vonása a duloxetinnek, hogy nem emeli az APP szintet, tehát ebből a szempontból biztonságos szernek tűnik. Az irodalomban a stressz APP-re kifejtett hatására vonatkozó adatok meglehetősen ellentmondóak. Hasonló stressz-modell alkalmazása esetén más szerzők sem találtak eltérést a hippocampális APP expresszióban, azonban az amigdala neuronjaiban az APP szintek növekedését észlelték (Rosa és mtsai,

2005). Ettől eltérő stressz-modellben – különböző, előre megjósolhatatlan, véletlenszerű stresszhatások következtében – kismértékű növekedést tapasztaltak a hippokampális APP mRNS szintekben, azonban az APP fehérjeszintek nem változtak (Catania és mtsai, 2009). A szerzők ebben az esetben is elsősorban a stressznek a β - illetve γ -szekretáz aktivitásra kifejtett hatását, ezáltal az APP kóros hasítási termékeinek, így a C-terminális fragmentnek, valamint a β -amiloidnak a felszaporodását hangsúlyozzák, mint a stresszhatás fő okozati tényezőjét.

Mivel a mitogén-aktivált protein kinázok igen szerteágazó szerepkörrel rendelkeznek, a különböző kórfolyamatokban betöltött szerepük vizsgálata meg lehetőségen nehéz. Az expressziójukra vonatkozóan az irodalomban csak kevés adat áll rendelkezésre. Jelen kísérletünk is csak arra ad támpontot, hogy a fehérje AK-ban betöltött szerepéért vélhetőleg nem a transzkripciójában stressz hatására bekövetkező változások tehetők felelőssé.

Eredményeink összefoglalva tehát arra utalnak, hogy a duloxetinnel történő antidepresszív kezelés protektív tényezőként szerepelhet a krónikus stressz okozta negatív idegrendszeri változások: a szinaptikus plaszticitás zavarának, ennek nyomán a kognitív funkciók romlásának kivédésében mind az affektív zavarok, mind az AK vonatkozásában.

Nyilatkozat. A szerzők sem a kísérletek elvégzése, sem a jelen közlemény megírása során külső anyagi támogatást nem vettek igénybe.

Levelezési cím: Szűcs Szabina, Szegedi Tudományegyetem, DNT, 6725 Szeged, Szikra u. 2. tel.: 06-20-979-0351 e-mail: anabisz@gmail.com

IRODALOM

- Bodnoff SR, Humphreys AG, Lehman JC, Diamond DM, Rose GM, Meaney MJ: Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J Neurosci* 1995; 15:61-69.
- Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G: Reference genes for normalization: A study of rat brain tissue. *Synapse* 2008; 62:302-309.
- Catania C, Sotiropoulos I, Silva R, Onofri C, Breen KC, Sousa N, Almeida OF: The amyloidogenic potential and behavioral correlates of stress. *Mol Psychiatry* 2009; 14:95-105.
- Charles E, Bouby-Serieys V, Thomas P, Clémant JP: Relation entre événements de vie, traumatismes et démence; étude ouverte portant sur 565 patients déments. *L'Encéphale* 2006; 32:746-752.
- Chen Y, Dube CM, Rice CJ, Baram TZ: Rapid loss of dendritic spines after stress involves derangement of spine dynamics by corticotropin-releasing hormone. *J Neurosci* 2008; 28:2903-2911.
- Delgado PL: Common pathways of depression and pain. *J Clin Psychiatry* 2004;65 (Suppl 12):16-19.
- Duman RS: Novel therapeutic approaches beyond the serotonin receptor. *Biol Psychiatry* 1998; 44:324-335.
- Duyckaerts C, Panchal M, Delatour B, Potier MC: Morphologic and molecular neuropathology of Alzheimer's disease. *Ann Pharm Fr* 2009; 67:127-135.
- Garcia R: Stress, metaplasticity, and antidepressants. *Curr Mol Med* 2002; 2:629-638.
- Gutala RV, Reddy PH: The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains. *J Neurosci Meth* 2004; 132:101-107.
- Haass C, Selkoe DJ: Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:101-112.
- Licinio J, Wong ML: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in stress and affective disorders. *Mol Psychiatry* 2002; 7:519.
- Lynch G, Rex CS, Gall CM: LTP consolidation: Substrates, explanatory power and functional significance. *Neuropharmacology* 2007; 52:12-23.
- Magri F, Cravello L, Barili L, Sarra S, Cinchetti W, Salmoiraghi F, Micale G, Ferrari E: Stress and dementia: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Aging Clin Exp Res* 2006; 18:167-170.
- Palmert MR, Usiak M, Mayeux R, Raskind M, Tourtellotte WW, Younkin SG: Soluble derivatives of the beta amyloid protein precursor in cerebrospinal fluid: alterations in normal aging and in Alzheimer's disease. *Neurology* 1990; 40:1028-1034.
- Rapp MA, Schnaider-Beeri M, Grossman HT, Sano M, Perl DP, Purohit DP, Gorman JM, Hartoutunian V: Increased hippocampal plaques and tangles in patients with Alzheimer disease with a lifetime history of major depression. *Arch Gen Psychiatry* 2006; 63:161-167.
- Rosa ML, Guimaraes FS, de Oliveira RM, Padovan CM, Pearson RC, Del Bel EA: Restraint stress induces beta-amyloid precursor protein mRNA expression in the rat basolateral amygdala. *Brain Res Bull* 2005; 65:69-75.
- Russo-Neustadt A, Ha T, Ramirez R, Kessler JP: Physical activity-antidepressant treatment combination: impact on brain-derived neurotrophic factor and behavior in animal model. *Behav Brain Res* 2001; 120:87-95.
- Seeman TE, McEwen BS, Singer BH, Albert MS, Rowe JW: Increase in Urinary Cortisol Excretion and Memory Declines. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2458-2465.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150:76-85.
- Trivedi MH, Desai D, Ossanna MJ, Pritchett YL, Brannan SK, Detke MJ: Clinical evidence for serotonin and norepinephrine reuptake inhibition of duloxetine. *Int Clin Psychopharmacol* 2008; 23:161-169.
- Zhou J, Li L, Tang S, Cao X, Li Z, Li W, Li C, Zhang X: Effects of serotonin depletion on the hippocampal GR/MR and BDNF expression during the stress adaptation. *Behav Brain Res* 2008; 195:129-138.

The effects of Duloxetine on β -actin stress response in rat brain

Depression is a frequent prodromal symptom of Alzheimer's disease (AD). Stress factors play an important role in the etiopathology of both diseases, since increased corticosteroid levels caused by chronic stress indirectly induce neuronal damage. The aim of our experiments was to evaluate the changes induced by stress in the transcription of amyloid precursor protein (APP), mitogen activated protein kinase-1 (MAPK-1) and β -actin, of which the latest plays a leading role in synaptic plasticity. Additionally we intended to examine how duloxetine - a serotonin-norepinephrin reuptake inhibitor type antidepressant - would modify the stress-induced changes. Wistar rats were exposed to immobilization stress for five hours daily through 21 days, while part of the animals received 45 mg/bwkg of duloxetine. At the end of the third week total RNA was purified from the cortex and hippocampus. The amount of β -actin, APP and MAPK-1 mRNA was determined by real time PCR method. On protein level, semiquantitative measurement was performed by Western blot. The expression of β -actin mRNA in the animals exposed to stress was four times as intense as in the control group. The increase in the β -actin mRNA levels was repressed by the duloxetine treatment. In the case of APP and MAPK-1 no changes were detected. According to the Western blot results, the antidepressant treatment slightly, the drug along with the stress treatment strongly decreased the amount of the β -actin protein. Our findings indicate that antidepressant treatment with duloxetine could play a protective role against the chronic stress-induced changes in the nervous system, such as disorders of synaptic plasticity, and the consequent cognitive dysfunctions in case of both affective disorders and AD.

Keywords: Alzheimer's disease, immobilization stress, amyloid precursor protein, β -actin, mitogen activated protein kinase, duloxetine