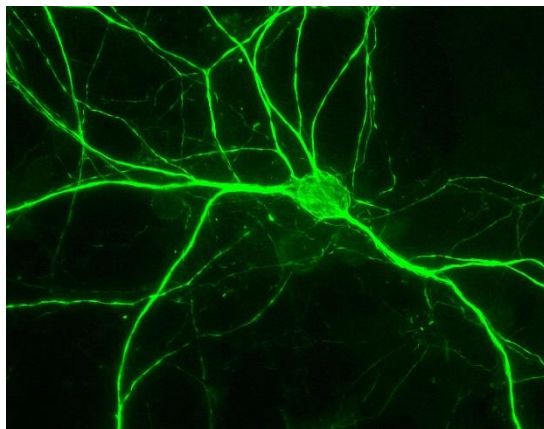


**Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar**  
**Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék**

**A D-aszpartát és a D-szerin hatása a gliagenezisre**



**Készítette: Gáspár Gábor**

Biológia BSc

**Témavezető: Dr. Zachar Gergely**

tudományos munkatárs

Semmelweis Egyetem; Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

**Budapest**

**2016**

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	4
2.1. Aminosav transzmitterek.....	4
2.2. L-szerin.....	6
2.3. D-aminosav transzmitterek.....	7
2.4. D-aszpartát.....	8
2.5. D-szerin.....	10
2.6. Gyrus dentatus.....	12
3. Célkitűzések.....	13
4. Anyag és módszer.....	14
4.1. Egerek, mint modellállatok.....	14
4.2. Viselkedéses kísérletek.....	14
4.2.1. Morris water maze teszt.....	14
4.2.2. Kapaszkodás (grip strength) teszt.....	15
4.3. Az agyak feldolgozása.....	16
4.3.1. Az agyak eltávolítása.....	16
4.3.2. Metszés.....	16
4.3.3. Immunhisztokémia.....	17
4.3.4. Lefedés.....	17
4.4. A metszetek kiértékelése.....	18
4.4.1. Konfokális mikroszkópia.....	18
4.4.2. Statisztika.....	18
5. Eredmények.....	21

5.1. Kapaszkodás (grip strength) teszt .....	21
5.2. Kezelések hatása a gliagenezisre és a tanulásra.....	21
6. Diskusszió.....	30
6.2. Izomerő vizsgálata .....	30
6.1. D-aszpartát hatásának vizsgálata .....	30
6.3. D-szerin hatásának vizsgálata .....	31
6.4. L-szerin, mint kontroll .....	32
6.5. Tömeg és új sejtek számának összefüggése .....	32
7. Összefoglalás .....	34
8. Abstract.....	35
9. Irodalomjegyzék .....	36
10. Köszönetnyilvánítás .....	43

## Rövidítések jegyzéke

AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-izo-xazolo-4-propionsav

BrdU – bromodeoxi-uridin

DAPI – 2,4-diamidino-2-fenilindol

DG – gyrus

DNS – dezoxiribonukleinsav

GABA –  $\gamma$ -aminovajsav

GFAP – Gliális fibrilláris savas protein

GluN – NMDA glutamát receptor alegység

Got111 – glutamát-oxaloacetát-transzamináz-1-like-1

LTD – hosszú távú depresszió

LTP – hosszú távú potenciáció

mGluR – metabotróp glutaminsav receptor

NMDA – N-metil-D-aszpartát

PBS – foszfát-pufferes sóoldat

PGDH – foszfoglicerát-dehidrogenáz

PSP –foszfoszerin-foszfátáz

SR – szerin-racemáz

SHMT – szerin-hidroxi-metil-transzferáz

## 1. Bevezetés

Korábban úgy gondolták, hogy az élő szervezetekben csak L-aminosavak fordulnak elő, D-aminosavak pedig nincsenek, vagy legalábbis nincs fontos szerepük a belső folyamatokban. Később azonban kiderült, hogy a D-aminosavak jelen vannak számos taxonban, így a növényekben, puhatestűekben, madarakban és az emlősökben is. Ma már tudjuk, hogy a D-aminosavak nem csak megtalálhatóak az élő szervezetben, központi szerepük van sok fontos folyamatban, mint a hormonális szabályozás, a gametogenezis, a szinaptikus transzmisszió és a neurogenesis. Az emlős központi idegrendszerben legnagyobb mennyiségben előforduló két D-aminosavat, a D-aszpartátot és a D-szerint egyaránt leírták, mint neurotranszmittert vagy neuromodulátort, és napjainkban is zajlik a pontos működésüknek és szerepüknek intenzív kutatása. A kutatásunk előzményeinek tekinthető kísérletekből tudjuk, hogy a D-aszpartát segíti az olyan kognitív képességeket, mint a tanulás és a memória, míg a D-szerin látszólag fontos szerepet játszik a felnőttkori neurogenesisben. A mi kutatásunk keretében mindkét D-aminosav hatását vizsgáltuk a gliogenesisre immunhisztokémiai festés, majd a gyrus dentatusban konfokális mikroszkóppal végzett sejtszámlálás segítségével, illetve a gliogenesis és a tanulás közti esetleges összefüggést vizsgáltuk a sejtszámlálás és viselkedési tesztek adatait is felhasználva.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Aminosav transzmitterek

Tudjuk, hogy egyes aminosavak a fehérjeépítő és intermedier anyagcserében betöltött szerepük mellett transzmitterként is funkcionálnak a központi idegrendszerben (Watkins, 2000; Bowery & Smart, 2006). A két fő aminosav transzmitterrendszer a serkentő (L-glutaminsav és L-aszparaginsav) és a gátló ( $\gamma$ -aminovajsav (GABA) és glicin) transzmitterrendszer. Előbbi depolarizálja, utóbbi hiperpolarizálja a sejtmembránt. Ma úgy tudjuk, hogy az agyi szinapszisok közel 80%-ának jelátvivő molekulája L-glutamát vagy L-aszpartát (Világi & Tarnawa, 2013). Jelenlegi ismereteink szerint az L-glutamát a legjelentősebb serkentő transzmitter a központi idegrendszerben (Herring et al., 2015). Három ionotróp és nyolc metabotróp receptora ismert. L-glutamát bekötődése esetén

az ionotróp receptorok (transzmitter-vezérelt ioncsatornák) megnyílnak, és rajtuk kationok ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$ ) áramlanak át, míg a metabotróp receptorok (G-fehérje kapcsolt receptorok) esetében a kapcsolt G-fehérje aktiválódik, mely további effektorfehérjéken és másodlagos hírvivőkön keresztül viszi tovább a jelet. Az ionotróp receptorok közé tartoznak az AMPA, az NMDA és a kainát receptorok.

A többi receptorról ellentétben az NMDA receptorok aktivációjához két ko-agonista kell, a glutamát kapcsolódása mellett glicin kötődése is szükséges. Az NMDA receptorok aktiválása elnyújtottabb membrán depolarizációt eredményez (Jansson & Akerman, 2014), melynek fontos szerepe van a plaszticitásban. A szinaptikus plaszticitás a szinapszisban résztvevő neuronok közötti információátvitel hatékonyságának (a kapcsolat erősségének) változása. Ennek egyik formája a hosszú távú potenciáció (long term potentiation - LTP), mely egy hosszabb távon fennálló hatékonyságfokozódás a serkentő szinapszisban és a memória, a tanulás akapjának tekintik, valamint hatással van a neuronális őssejtek és progenitor sejtek aktivációjára, proliferációjára, az új sejtek túlélésére (Nicoll & Roche, 2013; Taylor et al., 2014; Schlett, 2006).

Az L-glutamát mellett a másik fontos serkentő aminosav az L-aszpartát. Az L-aszpartát neurotranszmitter szerepével kapcsolatban vannak viták, ugyanis az axonterminálisokban mindig csak L-glutamáttal együtt fordul elő, tisztán L-aszpartáterg neuronokat nem találtak (Gundersen & mtsai, 1998; Nadler, 2011). Az axonterminálisból való ürülésének módja szintén vitatott. Egyes kutatások szerint az L-glutamáthoz hasonlóan  $\text{Ca}^{2+}$ -függő exocitózissal (Fleck et al., 1993; Tsumoto, 1990; Bradford & Nadler, 2004; Zachar et al., 2012), mások szerint  $\text{Ca}^{2+}$ -független exocitózissal ürül (Wilkinson & Nicholls, 1989; McMahan & Nicholls, 1990), míg egyes eredmények szerint plazmamembrán transzporterek útján szabadul fel (Nicholls & Atwell, 1990). Az eltérő felszabadulási sajátságok alapján mindenesetre feltételezik, hogy az L-glutamát és az L-aszpartát külön szinaptikus vezikulában tárolódhat.

Az L-aszpartát az ionotróp glutamát NMDA receptorhoz kötődve fejt ki hatását, az AMPA, kainát, vagy metabotróp glutamát receptorokhoz nem, vagy minimális mértékben képes csak kötődni (Yamane et al., 2009; Nadler 2011). A szinaptikus NMDA receptorok aktiválását a neuronok túlélésének serkentésével hozzák összefüggésbe (Bradford & Nadler, 2004). Az L-glutamát és az L-aszpartát eltérő tulajdonságai alapján feltételezik, hogy a két aminosav különböző biológiai funkcióval rendelkezik, és az L-aszpartátnak inkább

a neuropeptidekhez hasonló, szabályozó neuromodulátor szerepet tulajdonítanak (Bradford & Nadler, 2004; Nadler, 2011).

## 2.2. *L-szerin*

Az L-szerin az emlősök sok szervében, szövetében nagy mennyiségben termelődő aminosav, mely az 1-szenes egységek fő forrása a DNS-szintézishez, így fontos eleme a sejt proliferációnak, emellett szintézise során jönnek létre a prekursorai sok más fontos molekula szintézisének, mint a cisztein és taurin, lipid messenger molekulák és neuromodulátorok, mint a glicin és a D-szerin. Az L-szerin képződése 3 úton történhet: bioszintézissel az intermedier anyagcseretermék 3-foszfoglicerátból, glicinből illetve protein és foszfolipid degradáció által. Hogy melyik út játszik nagyobb szerepet, az függ az adott szövettípustól. Például a fetális májban főleg glicinből alakul át a szerin-hidroxi-metil-transzferáz (SHMT) enzimnek köszönhetően (Narkewicz et al., 1996). Ezzel szemben a vesében és a felnőttkori májban főleg 3-foszfoglicerátból képződik (Waziri et al., 1983), így ezt a bioszintetikus utat tekintik az L-szerin fő képződési útjának (Snell, 1984). A szintézisben 3 enzim vesz részt, a 3-foszfoglicerát-dehidrogenáz (3-PGDH), a foszfo-hidroxi-piruvát-aminotranszferáz és a foszfoszerin-foszfátáz (PSP)(Snell, 1984). A májon és a vesén kívül ezek az enzimek még sok más szervben és szövetben vannak jelen nagy mennyiségben, ami az L-szerin nagy mennyiségű szintézisére utal. Ilyen szervek a here, a lép és az agy, míg elenyésző aktivitás mutatható ki a szív- és vázizmokban (Snell, 1984).

A központi idegrendszerben az L-szerinből származtatják a glicin és a D-szerin képződését is, melyek egyaránt az NMDA receptorok koagonistái és fontos neuromodulátorok (Johnson et al., 1987; Matsui et al., 1995). Az L-szerin szintézisét tekintve fontos különbséget mutat más aminosavakkal szemben abban, hogy a magzati korban elenyésző mennyiségben jut át az anyából, így a magzat a glicinnel együtt nagyrészt maga termeli meg a szükséges L-szerint (Moore, et al., 1993; Cetin et al., 1992). Ez a szintézis főleg a májban történik, glicinből, melyet a fetális placenta termel nagy mennyiségben (Moore, et al., 1993; Cetin et al., 1992; Cetin et al., 1991). A magzati korban az L-szerin mennyisége minden testnedvben jelentős, a vér-agy gát kialakulása után azonban különbözik a vér és az agy-gerincvelői folyadék koncentrációja (Huether et al., 1991). Mivel

a neutrális aminosavak transzportjával az L-szerin nem jut át jelentős mennyiségben a vér- vagy gáton (Smith et al., 1987), ezért feltételezik, hogy az agynak saját magának kell megtermelnie a szükséges mennyiséget. És valóban, nagy mennyiségű 3-PGDH expresszáldást mutattak ki főleg a ventrikuláris és szubventrikuláris zónákban, ahol fetális korban a legintenzívebb a sejt-proliferáció. Több kísérlet is kimutatta, hogy neuronokat kultúrában tenyésztve L-szerin hozzáadásával fokozni lehet a dendritek és axonok fejlődését (Furuya et al., 2000; Sato et al., 1991). Az L-szerin felnőttkori szintézisét, a D-szerinrel és a glicinnel együtt, az asztrocitákhoz kötik (Furuya et al., 2000; Martinez-Hernandez et al., 1997).

### 2.3. *D-aminosav transzmitterek*

Szerkezetét tekintve a legtöbb (az élő szervezetekben előforduló) aminosav királis, azaz két konfigurációját különböztetjük meg, az L- és a D-konfigurációt. Az L- és D-aminosavak egymás tükörképi párjai, enantiomerjei. Az enantiomerek forgatással nem hozhatók egymással fedésbe, de kémiai és fizikai tulajdonságaikban hasonlóak. Mai ismereteink szerint az élőlények fehérjéi kizárólag L-aminosavakból épülnek fel, ha ugyanis D- és L-aminosavak egyaránt beépülhetnének a fehérjeláncba, az megakadályozná a lánc megfelelő feltekeredését és az aktív fehérje kialakulását (Banik & Nandi, 2013). D-aminosavakat, mint fehérje felépítőket korábban csak inert fehérjékben (pl. szemlencse fehérjéi), baktériumok sejtfalát felépítő peptidekben és a baktériumok által termelt antibiotikumokban találtak (Corrigan, 1969; Fujii, 2002; Fujii, 2005). Mára az analitikai módszerek fejlődésével sikerült D-aminosavakat kimutatni a magasabb rendű élőlényekben is. Szabad formában megtalálták őket növényekben (Brückner & Westhauser, 2003), puhatestűekben (D'Aniello & Giuiditta, 1977), madarakban (Neidle & Dunlop, 1990; Nagata et al., 1994), emlősökben (Dunlop et al., 1986; Neidle & Dunlop, 1990; Hashimoto et al., 1992), köztük az emberben (Fisher et al., 1991), és egyéb taxonokban is (D'Aniello, 2007). A D-aminosavak közül az emlős (és az emberi) idegrendszerben nagy mennyiségben mutatták ki a D-aszpartátot és a D-szerint, ezért fontos szerepet tulajdonítanak nekik az idegrendszeri folyamatokban és a közelmúltban sok kutatás irányult neurotranszmitter vagy neuromodulátor szerepük pontos megismerésére.



#### 2.4. D-aszpartát

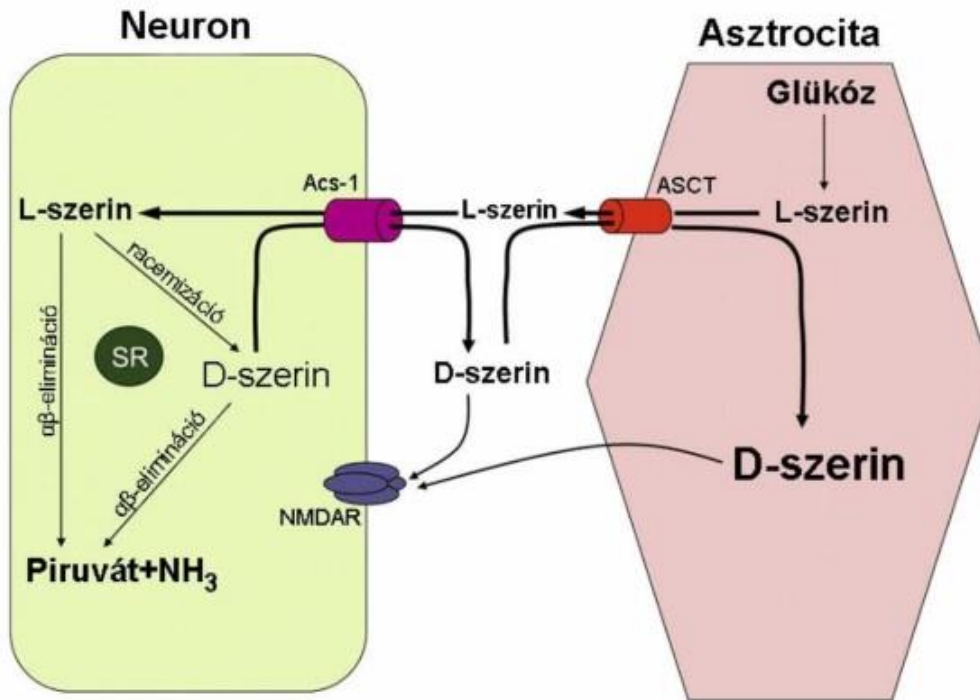
A D-aszpartát az L-aszpartát enantiomereként megtalálható a legtöbb állati taxon endokrin- és idegrendszerében is (D’Aniello, 2007). Az aminosav szabad formája jelen van az endokrin mirigyekben, ezek közül főleg a gerinctelenek (D’Aniello et al., 1996; 2003), és gerincesek, köztük az emlősök (Di Fiore et al., 1998; Assisi et al., 2001; Hashimoto et al., 1993; D’Aniello et al., 1996; 1998; 2000; Imai et al., 1995; Lee et al., 1997; Nagata et al., 1999; Wang et al., 2002; Boni et al., 2006) reprodukcióval összefüggő szerveiben. Többek között megtalálták patkányok (D’Aniello et al., 1996), juhok (Boni et al., 2006), és emberek (D’Aniello et al., 2007) ondójában, spermájában, valamint tüszőváladékában is. Az aminosav jelenlétét leírták még az idegrendszeren kívül a hipofízisben, a tobozmirigyben, a mellékvese velőállományában és a herében, ahol a hormonális szabályozásban játszik szerepet, illetve kimutatták, hogy enyhén növeli a tesztoszteronszintézist (Topo et al., 2009). Terméketlen férfiaknál a tesztoszteronszint növekedését írták le D-aszpartát hatására (Nagata et al., 1999), valamint sportolóknál ideiglenes teljesítményfokozóként működött. Az idegrendszerben fejlődési stádiumtól függően változó koncentrációt mutat. Nagy mennyiségben mutatták ki embrionális és perinatális patkány- és csirkeagyból, illetve retinából, míg a szülést vagy kikelést követően a mennyisége drasztikusan lecsökkent (Neidle & Dunlop, 1990; Dunlop et al., 1986). Hasonló változást mutattak ki emberi agyban is (Hashimoto et al., 1993). A D-aszpartát embriókori nagy mennyiségéből arra következtettek, hogy szerepe lehet az idegrendszer korai fejlődési folyamatainak szabályozásában (Neidle & Dunlop, 1990).

A kifejlett állatokban azonban több kutatás is kimutatta, hogy a D-aszpartátnak szerepe van a neurotranszmisszióban, vagy neurotranszmitterként, vagy neuromodulátorként. Például az aranyhal retinájában a D-aszpartát képes akár 15-szörösére növelni az L-glutamát hatását, a fényre reagálva (Ishida & Gordon, 1981). Ehhez hasonlóan a *Sepia officinalis* retinájában a D-aszpartát koncentrációja korrelál az állat fényre tett reakciójának mértékével (D’Aniello et al., 2005). Patkány agyi- és hippokampusz metszeteinek  $K^+$  ionos depolarizációja D-aszpartát felszabadulásához vezetett egy  $Ca^+$  csatorna-függő mechanizmusnak köszönhetően (Davies & Johnston, 1976; Holopainen & Kontro, 1990; Malthe-Sorensen et al., 1979). Továbbá leírtak egy D-aszpartát specifikus transzportert is, mely a szinaptikus résekből a posztzinaptikus idegsejtekbe szállítja

az aminosavat (Kanai & Hediger, 1992). A vezikuláris transzportjáért felelős molekulát még nem írták le. A D-aszpartátra specifikus receptort sem ismerünk, azonban képes kapcsolódni az NMDA receptorokhoz az L-glutamát agonistájaként, annál tízszer kisebb affinitással (Errico et al., 2011). Ezzel együtt azt is kimutatták, hogy az NMDA receptortól független úton is képes hatni az 5-ös típusú metabotróp glutamát receptorhoz (mGluR5) kötődve (Molinaro et al., 2010). Ezenkívül bizonyítékot találtak arra, hogy a D-aszpartát az AMPA glutamát-receptorok modulálásával (Brown et al., 2006) fokozza a hosszú távú potenciáció (LTP) mértékét egér hippocampusban (Errico et al., 2008a) és gátolja a kortikostriális hosszú távú depressziót (LTD) (Errico et al., 2008b). A D-aszpartát ezen tulajdonságai azt bizonyítják, hogy szerepe van a kognitív folyamatokban. Egy másik fontos felismerés, hogy a kontrollcsoporthoz képest a D-aszpartát koncentrációja szignifikánsan kisebb volt Alzheimer kóros betegek agyában, és azon belül a fő kognitív funkciókkal összefüggő területeken, mint a frontális cortex (Fisher et al., 1991), a parietális és occipitális cortex, a kisagy, valamint az amygdala és a hippocampusz (D'Aniello et al., 1998). Mindezeket összevetve arra következtethetünk, hogy a D-aszpartát fontos szerepet játszik, nem csak a hormonális működés endokrin szabályozásában és a gametogenezisben, de neurotranszmitterként vagy neuromodulátorként az idegrendszerben is, azon belül a kognitív funkciókban és feltételezhetően a tanulásban és a memóriában is. Topo és munkatársai 2010-es kutatásuk során bizonyították, hogy a külsőleg beadott D-aszpartát patkányokban javította a teljesítményt a Morris water maze teszt során, tehát a D-aszpartát nagyobb koncentrációja a hippocampusban bizonyítottan segíti a tanulást és javítja a memóriát (Topo et al., 2010). A transzmisszióban megfigyelt szerepe mellett megfigyelték, hogy a megnövelt D-aszpartát szint növelte a dendritsűrűséget a prefrontális kéreg piramissejtjeiben (Errico et al., 2014) és az aszpartát racemáz enzim gátlása csökkenést okozott a dendritek fejlődésében és az új neuronok túlélésében egerekben (Kim et al., 2010). Az aszpartát racemáz enzimről (vagy Got111) azt tartották, hogy az L-aszpartát átalakításával végzi a D-aszpartát szintézisét. Egy későbbi kutatásban azonban már nem sikerült kimutatni az enzim racemáz aktivitását, valamint a patkányban és emberben található homológ enzimének mennyiségét sem sikerült összefüggésbe hozni a D-aszpartát mennyiségével (Matsuda et al., 2015). Ezek alapján az eredmények alapján tehát nem tudjuk biztosan, hogy a D-aszpartátnak van-e szabályozó hatása a neurogenesisre, illetve, hogy a tanulásban tapasztalt fejlődés közvetetten a neurogenesis fokozásának tudható-e be.

## 2.5. D-szerin

A D-szerint a gerincesek, főleg az emlősök központi idegrendszeréből mutatták ki nagy mennyiségben (Nagata et al., 1994; Hashimoto et al., 1995). Emlősök előagyában viszonylag nagy koncentrációban van jelen, és a magas koncentráció felnőttkorban is tartósan fennmarad. A D-szerin az L-szerin enantiomere, szintézisét a piridoxál-foszfát függő szerin racemáz enzim végzi, mely L-szerinből alakítja át az aminosavat (Wolosker et al. 1999). A korai vizsgálatok azt találták, hogy a D-szerin legnagyobb mennyiségben a II. típusú asztrocitákban van jelen, ahonnan glutamát hatására ürül  $\text{Ca}^{2+}$ -függő exocitózissal (Schell et al., 1995; Gundersen et al., 2015). Ezek a gliasejtek körbeburkolják a szinapszist és tripartite (háromszatú) szinapszist hoznak létre. A II. típusú asztrociták eloszlását egy vizsgálatban hasonlóan találták az NMDA receptorok eloszlásával (Schell et al., 1997b). Mindezekből arra következtettek, hogy a D-szerin a gliákban termelődik és gliatranszmitterként működik, újabban azonban kimutatták, hogy a D-szerin és elsősorban a szerin racemáz enzim nagy mennyiségben megtalálható a neuronokban (Balu et al., 2014; Curcio et al., 2013; Benneyworth et al., 2012). Mivel az L-szerint a neuronok nem, csak az asztrociták képesek előállítani (Yang et al., 2010), ezért ma már azt feltételezzük, hogy a D-szerin metabolizmusa és tárolása egy neuron-asztrocita ingázás során valósul meg (Wolosker, 2011). Ez az ingázás az L-szerin szintézisével kezdődik az asztrocitákban, mely átranzportálódik a neuronokba, ahol a szerin racemáz enzim D-szerinné alakítja azt. A D-szerin ezután kikerül az extracelluláris térbe, ahonnan transzporterek által visszakerül az asztrocitákba, ahol mikrovezikulákban tárolódik az L-glutamáterg stimuláció általi felszabadulásáig **(1. ábra)**(Gundersen et al., 2015). A szinapszis során a D-szerin az asztrocitából felszabadulva az NMDA receptorok GluN1 alegységén található glicin-kötő helyhez kötődik az L-glutamát koagonistájaként (Mothet et al., 2000). A D-szerin bekötődésével neuromodulátorként növeli az NMDA receptor affinitását az L-glutamáthoz (Miller, 2004). Több kutatás azt mutatta ki, hogy a D-szerin koncentrációjának csökkenésével csökken az NMDA receptor függő szinaptikus transzmissziók mértéke is (Mothet et al., 2000; Papouin et al., 2012; Rosenberg et al., 2013). Szerepét a neurogenesisben szintén több kutatás során vizsgálták.



1. ábra: A szerin ingázása a neuron és az asztrocita között (forrás: Wolosker, 2011). Az asztrociták glükózból állítanak elő L-szerint, mely egy semleges aminosav transzporter (ASCT) által kijut az extracelluláris térbe, ahonnan a neuron egy alanin-szerin-cisztein transzporterrel (Acs-1) veszi azt fel. A szerin-racemáz (SR) az L-szerint D-szerinné alakítja. Mivel a folyamat a D-szerint is felhasználja, ezért szükség van a keletkezett D-szerin térbeli szeparációjára. Ezért a D-szerin neuronális és gliális transzporterek által visszajut az asztrocitába, ahol felhalmozódik, hogy később stimuláció hatására felszabadulhasson.

Külsőleg adagolva növelte a neurális őssejtek és progenitor sejtek proliferációját és túlélését in vivo és in vitro körülmények között is (Sultan et al., 2013). Megnövekedett szintje in vitro serkentette újszülött egerek szubventrikuláris zónájából származó őssejtek differenciációját (Huang et al., 2012). Azt is kimutatták, hogy D-szerin bevitele gátolta a fenciklidin hatását egerek gyrus dentatusában (Maeda et al., 2007). A fenciklidin szintén az NDMA receptorok antagonistája, mely negatívan befolyásolja a proliferációt. A D-szerin neurogenesisben bizonyított szerepe mellett kimutatták, hogy mennyiségének csökkenése összefüggésben lehet a prefrontális kéreg piramissejtjeinek dendritarborizációjában, dendrittüske sűrűségében talált csökkenéssel (DeVito et al., 2011). Emelkedett D-szerin szintet figyeltek

meg Alzheimer kóros betegeknél, míg a normálnál alacsonyabb szintet skizofréniás betegeknél, ami arra utal, hogy a D-szerin koncentráció szabályzásának zavara szerepet játszhat ezeknek a betegségeknek a kialakulásában (Cappelletti et al., 2015). Mindezen eredmények alapján fontos szerepet tulajdonítanak a D-szerinnek az alapvető idegrendszeri folyamatokban, köztük a neurogenesisben és egyes kognitív folyamatok szabályzásában.

## 2.6. *Gyrus dentatus*

A felnőttkori neurogenesis minden gerinces taxonban jelen van, különböző mértékben (Barker et al., 2011). A halakban, kételtűekben és hüllőkben számos neurogenezist végző központ található, melyek a teljes élettartam alatt megőrzik proliferációs kapacitásukat. Madarakban, bár a neurogenesis csak egy periventrikuláris területre korlátozódik, az itt keletkezett neuronok az agy teljes területére eljuthatnak (Nottebohm, 2004; Lindsey & Tropepe, 2006; Kaslin et al., 2008). Ezzel szemben az emlős agy legtöbb területe a születés után elveszíti a neurogenetikus kapacitását, azaz az agy nagy részén felnőtt korban már nem termelődnek új neuronok. Ez alól két terület képez kivételt (Lledo et al., 2006). Az egyik a szubventrikuláris zóna, ahol interneuronok képződnek, majd vándorolnak a szaglólagymába, a bulbus olfactoriusba. A másik terület a hippocampusz egy területe, a gyrus dentatus (DG), pontosabban annak a szubgranuláris zónája. Ez a tulajdonság minden vizsgált emlős fajra jellemző, az erszényeseket is beleértve (Harman et al., 2003; Grabiec et al., 2009), ami arra utal, hogy a neurogenesisnek ez a limitált területi eloszlása az emlősök fejlődéstörténetének korai szakaszán alakulhatott ki. Bár a felnőttkori neurogenesis jelenléte a hippocampuszban már bizonyított (Gross, 2000), a felnőttkorban keletkezett neuronok (adult-born granule cell, abGC) fontossága a korábbi egyedfejlődés során létrejött neuronokhoz (mature developmentally born granule cells, matGC) képest még vitatott. Bár korábban úgy gondolták, hogy az ember esetében a hippocampális neurogenesis viszonylag kis mértékű (például a rágcsálókhoz képest), egy vizsgálat a közelmúltban arra mutatott rá, hogy az embereknél is fennáll a rágcsálókéhoz hasonló sejtkepződési ráta, ám az új abGC sejtek nagyrésze a régiók helyére kerül, a neuronok között egyfajta turnover megy végbe (Spalding et al., 2013). Egyes elméletek szerint a matGC sejtek már mind „nyugdíjas” sejtek, és a gyrus dentatus teljes kódolását az abGC sejtek végzik (Alme et al., 2010). Emellett kimutatták, hogy az abGC sejtek nem megfelelő képződése vagy működése egy sor pszichiátriai és neurológiai problémához vezethet (Drew et al., 2013). A

hippocampus és a gyrus dentatus fontos agyi központja a téri tanuláshoz. A gyrus dentatusban végbemenő felnőttkori neurogenesis funkciójának, és pontos működésének megismerése napjainkban az egyik legfontosabb és legintenzívebben kutatott területek közé tartozik a neurológiában.

### 3. Célkitűzések

Az általunk vizsgált két D-aminosav bizonyítottan részt vesz egyes idegrendszeri folyamatokban, a D-aszpartát valószínűsíthetőleg a tanulásban, memóriában játszik szerepet, valamint feltehetőleg a neurogenesis szabályzásához is köze van, míg a D-serin fontos szerepet játszik a neurogenesisben, illetve feltételezhetően egyes kognitív folyamatokkal is összefüggésben van. A D-serinről tudjuk, hogy képződése az asztrocitákhoz kötött, illetve korábban gliatranszmitterként írták le.

Kutatásunk két fő előzménye Topo és munkatársai (2010) kutatása, mely a D-aszpartát szerepére irányul patkányok tanulásában és memóriájában, valamint Sultan és munkatársai (2013) vizsgálata, mely a D-serin szerepét derítette fel a felnőttkori neurogenesisben, egér gyrus dentatusában. Ezenkívül a Zachar Gergely és Wéber Katalin vezetésével párhuzamosan indult kutatás részeredményeit is felhasználtuk, mely a D-aszpartát és D-serin hatását vizsgálta a tanulásra és neurogenesisre. Ezek az előzmények azt az eredményt hozták, hogy a D-aszpartát beadásával a patkányok és egerek is szignifikánsan jobb teljesítményt mutattak a Morris water maze teszt során, a D-serin viszont egereknél nem okozott jobb teljesítményt, de a Sultan-féle kísérletben szignifikánsan fokozta a neurogenesis a gyrus dentatusban. Wéber Katalin kísérletének neurogenesisrel kapcsolatos eredményei a szakdolgozat írása idejében még nem voltak felhasználhatóak.

A mi vizsgálatunk célkitűzései arra irányultak, hogy felderítsük ennek a két D-aminosavnak korábban nem vizsgált hatását a gliogenesisre, illetve az esetlegesen megnövekedett gliasejt szám és a Morris water maze tesztben nyújtott teljesítmény közti összefüggés lehetőségét. Emellett a D-aszpartát tesztoszteron szintézisben játszott szerepének (Topo et al., 2009) ismeretében igyekeztünk kizárni annak a lehetőségét, hogy a jobb teljesítmény az anabolikus szteroid hatására megnövekedett izomerőnek köszönhető.

## 4. Anyag és módszer

### 4.1. Egerek, mint modellállatok

A kísérletben 80-140 napos koruk között vettek részt a felhasznált C57Bl/6 típusú egerek. Az állatokat mesterségesen megvilágított állatházban helyeztünk el 12 órás fény/sötétség ciklussal és kontrollált hőmérséklettel, ad-libitum hozzáféréssel a táplálékhoz és ivóvízhez. Az egereket három csoportra osztottuk, kontroll, D-aszpartát és D-szerin kezelt csoportokra. A kontroll csoportba 11, a D-aszpartát és D-szerin csoportokba 10-10 állat került. A kontrollcsoport 11. egyedét később az immunjelölési próbára használtuk fel, így a vizsgálatomban 30 állat szerepelt. Az utóbbiak ivóvizébe a csoportoknak megfelelően 40mM/l D-aszpartát, valamint D-szerin került oldott állapotban, míg a kontroll csoport ivóvizébe 40mM/l L-szerin került. Az L-szerint azért választottuk kontrollnak, hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy az aminosavak fehérjefelépítő tulajdonsága következtében találjunk különbségeket a kontroll és a kísérleti csoportok között. Az egerek 6 héten keresztül kapták az aminosavakat tartalmazó ivóvizet. A vizet naponta cseréltük, mindennap a megfelelő mennyiségű aminosavval. 3 hét után a kísérleti állatok BrDU (5-bromo-2-deoxyuridin) kezelést kaptak injekció formájában (0,2mg/ttg). A BrDU az újonnan keletkezett sejtek DNS-ében a timidin helyére épül be, így az immunhisztokémiai festés során azok kimutathatóak lesznek. Ezután a 6. héten került sor a viselkedéses tesztekre, a Morris water maze tesztre és a grip tesztre.

### 4.2. Viselkedéses kísérletek

#### 4.2.1. Morris water maze teszt

A hippocampus fontos szerepet játszik a térbeli tájékozódásban és a memória kialakulásában. A Morris water maze teszt az egyik legelterjedtebb és széles körűen használt viselkedéses teszt a térbeli tanulás és a memória vizsgálatára (Morris, 1984). A teszt egy felül nyitott műanyag tartályban zajlik (kísérletünkben 110 cm átmérőjű 36 cm magas falakkal), melyet jól felismerhető, vizuális jelzést (visual cue) biztosító tárgyak vesznek

körül.

A tartályt az egereknek megfelelő, 24-26 celsius fokos vízzel töltöttük fel, melyet egyszerű fehér temperával átlátszatlanná tettünk. Figyeltünk arra, hogy a tempera ne tartalmazzon mérgező összetevőket, az egereket semmilyen módon ne befolyásolja. A vízben körülbelül egy centiméter mélyen kör alakú platformot helyeztünk el, három napig az északnyugati, majd 3 napig az északkeleti negyedben. A tartály fölött középen kamerát helyeztünk el. Előzetes gyakorlás után minden egér napi kétszer (délelőtt és délután) két alkalommal került a tartályba. Az egereket a platformtól távol, mindig azonos ponton a tartályba engedték, majd szabadon úszhattak, maximális két percig, vagy amíg megtalálták a platformot. Ekkor 15 másodpercet tölthettek a platformon a pontos helyének memorizálására. Az időt, amit a platform megtalálása igénybe vett, rögzítettük. Az egerek ezután visszakerültek a ketrecbe, és továbbra is kapták az aminosavakkal dúsított ivóvizet. Az platform megtalálásához igénybe vett időt, majd a platform áthelyezése után az újratanuláshoz igénybe vett időt másodpercekben rögzítettük, majd összevetettük a grip teszt során mért teljesítménnyel, később pedig az újonnan keletkezett neuronok (Wéber Katalin vizsgálata) és az újonnan keletkezett gliasejtek számával. A kísérletek teljes időtartama alatt az egerek tömegét hetente lemértük, hogy ezt is összevethessük a többi eredménnyel.

#### 4.2.2. *Kapaszkodás (grip strength) teszt*

A grip strength teszt vagy hanging wire teszt elterjedt módszer az egerek izomerejének, motorikus funkcióinak a mérésére, illetve annak időbeli változásainak követésére (van Putten et al., 2011). A teszt során az egereket egy egy 35 centiméter magasan kifeszített dróra függesztjük fel úgy, hogy a két mellső végtagjukkal kapaszkodjanak meg. Ezután rögzítjük, hogy mennyi ideig képesek kapaszkodni a drótba. A drót alatti területet kipárnázzuk, ezzel megakadályozva, hogy az állatok megsérüljenek. Az eddigi megfigyelések szerint a 35 centiméteres magasság ideális, mert ilyen magasságból az egerek általában nem akarnak önszántukból leugrani, viszont a sérülés esélye is minimális. Abban az esetben, ha az egér önszántából leugrik, vagy sikerül a dróton egyensúlyoznia (mely lényegesen kevesebb energiát igényel, mint a kapaszkodás), akkor visszaállítjuk a kezdő pozícióba. A tesztet minden egyeddel 3-szor megismételtük. Kísérletünkben azért



döntöttünk a grip teszt elvégzése mellett, hogy az izomerőre vonatkozó eredményeket és a Morris water maze teszt eredményit összevetve kizárhassuk azt, hogy a D-aszpartát tesztoszteron szintézisben játszott szerepe révén (Topo et al., 2009) a jobb teljesítmény kizárólag a megnövekedett izomerőnek köszönhető.

### *4.3. Az agyak feldolgozása*

#### *4.3.1. Az agyak eltávolítása*

Az agyak eltávolítására a viselkedéses kísérletek befejezése után került sor. Először is megtörtént az állatok elaltatása, majd perfúziója. A perfúzió során az elaltatott állatokat először hanyattfekve rögzítettük olyan felületen, ahonnan a perfundáló folyadék és a vér könnyen elfolyhatott. Ezt követően felvágtuk a hason a bőrt és feltártuk a mellüregt. A szívet érfogóval megfogtuk és a bal kamrába kanült szúrtunk. Az érfogóval rögzítettük a kanült, felvágtuk a jobb pitvar falát és megnyitottuk a perfundáló folyadék áramlását. Először 50ml fiziológias sóoldattal, majd a szövetek fixálása érdekében 50ml 4%-os paraformaldehiddel mostuk át az állatot. Ezután kiszedtük a műszereket és levágtuk az állat fejét. A foramen magnumon át ollóval átvágtuk a koponyát a fülig, majd a két felét óvatosan eltávolítottuk. Végül csipesz segítségével óvatosan átvágtuk az agyidegeket és kiemeltük az agyat. A kiemelt agyakat egy nap posztfixáció után 25%-os szaharózoldatba helyeztük, melyhez 0,1%-os nátrium-azid oldatot is adtunk, hogy megakadályozzuk a penészgomba esetleges megjelenését, majd így tároltuk őket a metszés megkezdéséig. A szaharózoldat krioprotektív tulajdonságú, ezért lehetővé tette, hogy az agyakat ezután sérülés nélkül lefagyasszuk a fagyasztva metszés során.

#### *4.3.2. Metszés*

Az agyak metszését fagyasztó mikrotómmal végeztük. A metszés során 40 µm-es vastagságú metszeteket készítettünk a hippokampusz teljes hosszában. Az elkészült metszetek közül 200 mikrononként egy metszetet használtunk fel az immunhisztokémiához. Azért döntöttünk emellett a távolság mellett, hogy minél pontosabban kövessük a kutatásunk egyik előzményének tekinthető, Sultan és munkatársai (2013) által végzett kísérletet, ahol

szintén 200 mikrononként használtak fel egy-egy metszetet. A másik ok, hogy a párhuzamosan zajló több vizsgálathoz többféle immunhisztokémiai festést szerettünk volna alkalmazni, és ezek összehasonlíthatóságának érdekében megfelelően elosztani a metszeteket. A metszeteket a festésig foszfát pufferes sóoldatban (PBS), hűtőben tároltuk.

#### *4.3.3. Immunhisztokémia*

Az immunhisztokémiai festés megkezdése előtt a metszeteket háromszor átmostuk PBS-sel, majd fél órára 2N-es sósav oldatban hagytuk. A sósav denaturálja az örökítőanyagot, így a BrdU-jelölt sejtek később láthatóvá válhattak, a szövetek viszont ennyi idő alatt nem károsodtak. Ezután ismét háromszoros PBS mosás következett, majd a metszetek 1%-os normál számár szérumba kerültek, melyhez 0,2%-os Tween-20-at adtunk. A normál számár szérumban fél óráig álltak a metszetek, ennek célja a nem specifikus immunkötőhelyek blokkolása volt. A fél óra leteltével rákerültek a metszetekre a primer ellenanyagok. Primer ellenanyagként bárányban termelt anti-BrdU (DyLight550, 1:200, Novus Biologicals) és nyúlban termelt anti-GFAP (Novus rabbit, 1:1000, Novus Biologicals) antitesteket használtunk, melyeket 1%-os normál számár szérummal és 0,2%-os Tween-20-szal kevertünk össze. Ezután egy éjszakás inkubációra került sor, majd ismét háromszoros PBS mosás következett. Ekkor kerültek fel a fluoreszcens festékek konjugált szekunder antitestek, a BrdU primerhez DY-550-nel konjugált, számárban termelt anti-bárány szekundert, a GFAP primerhez pedig Alexa-488-cal konjugált, számárban termelt anti-nyúl szekundert adtunk, 1:250-es PBS-hígításban. Az ezután következő lépéseket már lehetőleg lefedve, a fénytől védetten végeztük, hogy a fény ne károsítsa, fakítsa a jelölt sejtek festődését. Ismét háromszor mostuk a metszeteket PBS-ben, majd egy harmadik festést is alkalmaztunk DAPI-val (0,01% 2,4-diamidino-2-fenilindol PBS-ben oldva). A DAPI a DNS kettős hélixéhez kötődő fluoreszkálni képes molekula, mellyel képesek voltunk minden sejt sejtmagját megjelölni, a könnyebb azonosítás érdekében. A festés befejeztével egy utolsó hármás PBS mosás következett, majd megkezdtuk a metszetek tárgylemezre húzását.

#### *4.3.4. Lefedés*

Az immunhisztokémia során megfestett metszeteket egy nagyobb átmérőjű, PBS-sel feltöltött Petri-csészében anatómiai sorrendbe állítottam, majd egy másik, desztillált vízzel

feltöltött Petri-csészéből tárgylemezre húztam. Azért használtam desztillált vizet, hogy a pbs-ben levő sók a kiszáradáskor ne kristályosodjanak rá a tárgylemezre. A tárgylemezeket egy órán keresztül hagytam száradni, majd pár másodpercre xilol-pótlóba áztattam és Surgipath Micromount fedőanyaggal lefedtem. A mikroszkópos kiértékelés megkezdése előtt a lefedett metszeteket egy-két napig fénytől védve, hűtőben tároltuk és hagytuk megszáradni a fedőanyagot.

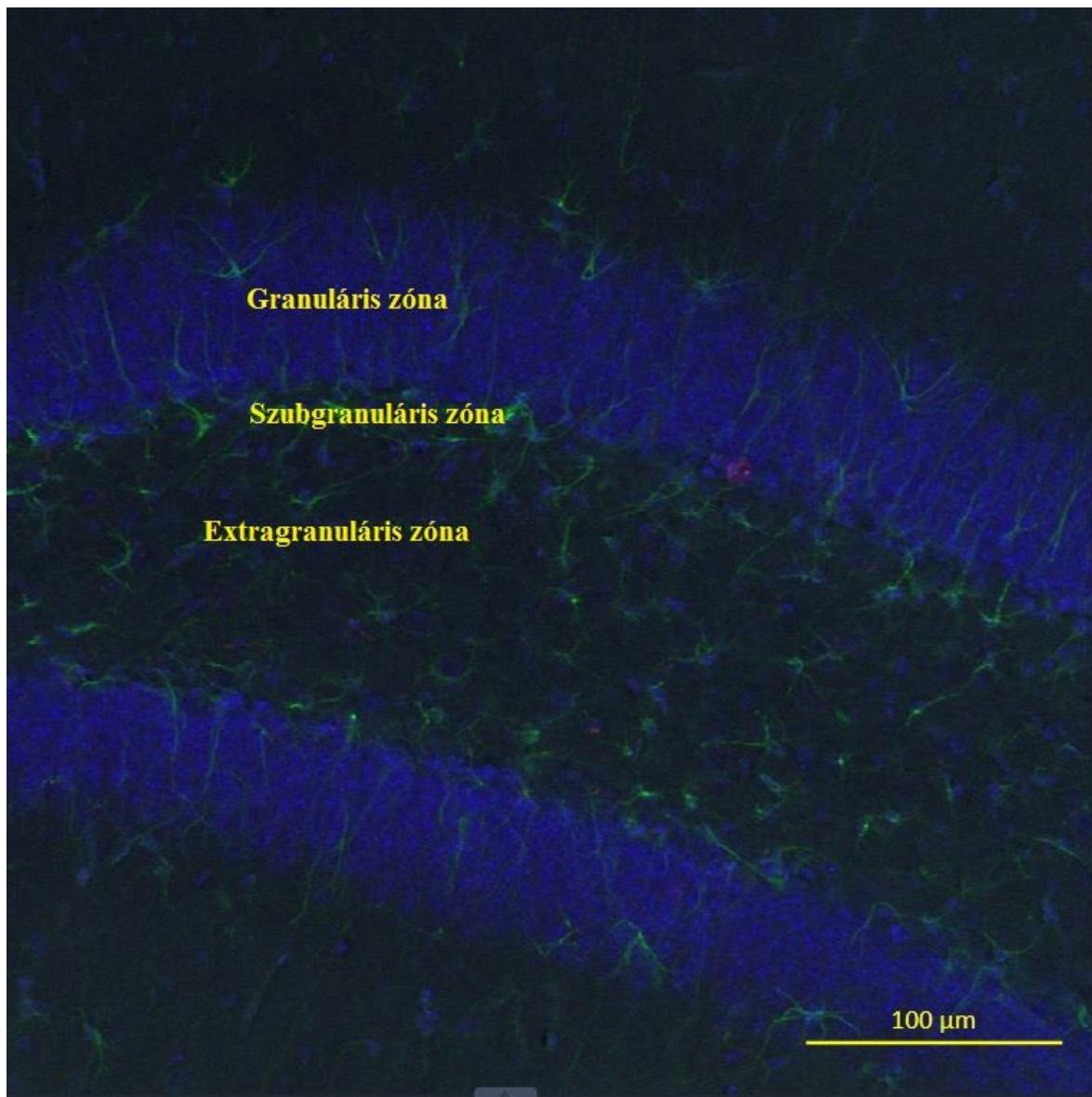
#### *4.4. A metszetek kiértékelése*

##### *4.4.1. Konfokális mikroszkópia*

A megfestett metszetek kiértékelését Zeiss Imager.Z2 LSM 780 típusú konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal végeztem, 20x-os nagyításban. Agyanként 5 metszeten (két rostrális, egy intermediális és két caudális elhelyezkedésű) vizsgáltam a gyrus dentatus területét, elkülönítve a granuláris, szubgranuláris és extragranuláris zónákat. **(2. ábra)** A területek és a megfelelő zónák azonosításában az Allen-féle on-line agyi metszetgyűjtemény(Allen Mouse Brain Atlas, 2007, <http://mouse.brain-map.org>) referencia atlasza volt segítségemre. A metszetek megfelelő területéről a Zen 2.1 programmal (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Release version 11.0) a metszet teljes vastagságát átfogó optikai metszeteket (z-sorozat, z-stack) készítettem, majd ezeket a Zen által használt .dzi formátumban mentettem el, mely a teljes optikai metszetet adatvesztés nélkül tárolja. A sejtek számlálását szintén a Zen programban végeztem. Kihhasználva a Zenben adott lehetőséget, hogy az elkészített optikai metszeten a különböző festékek külön-külön és együtt is megjeleníthetők, először a DAPI és BrdU által együttesen jelölt sejtmaggal rendelkező sejteket számoltam össze és rögzítettem, majd a GFAP jelölést is megjelenítve megszámláltam és rögzítettem a BrdU pozitív és DAPI pozitív sejtmaggal és GFAP pozitív nyúlványokkal rendelkező, háromszorosan jelölt sejteket **(3. ábra)**. Minden sejtről feljegyeztem, hogy a gyrus dentatuson belül melyik zónában találtam.

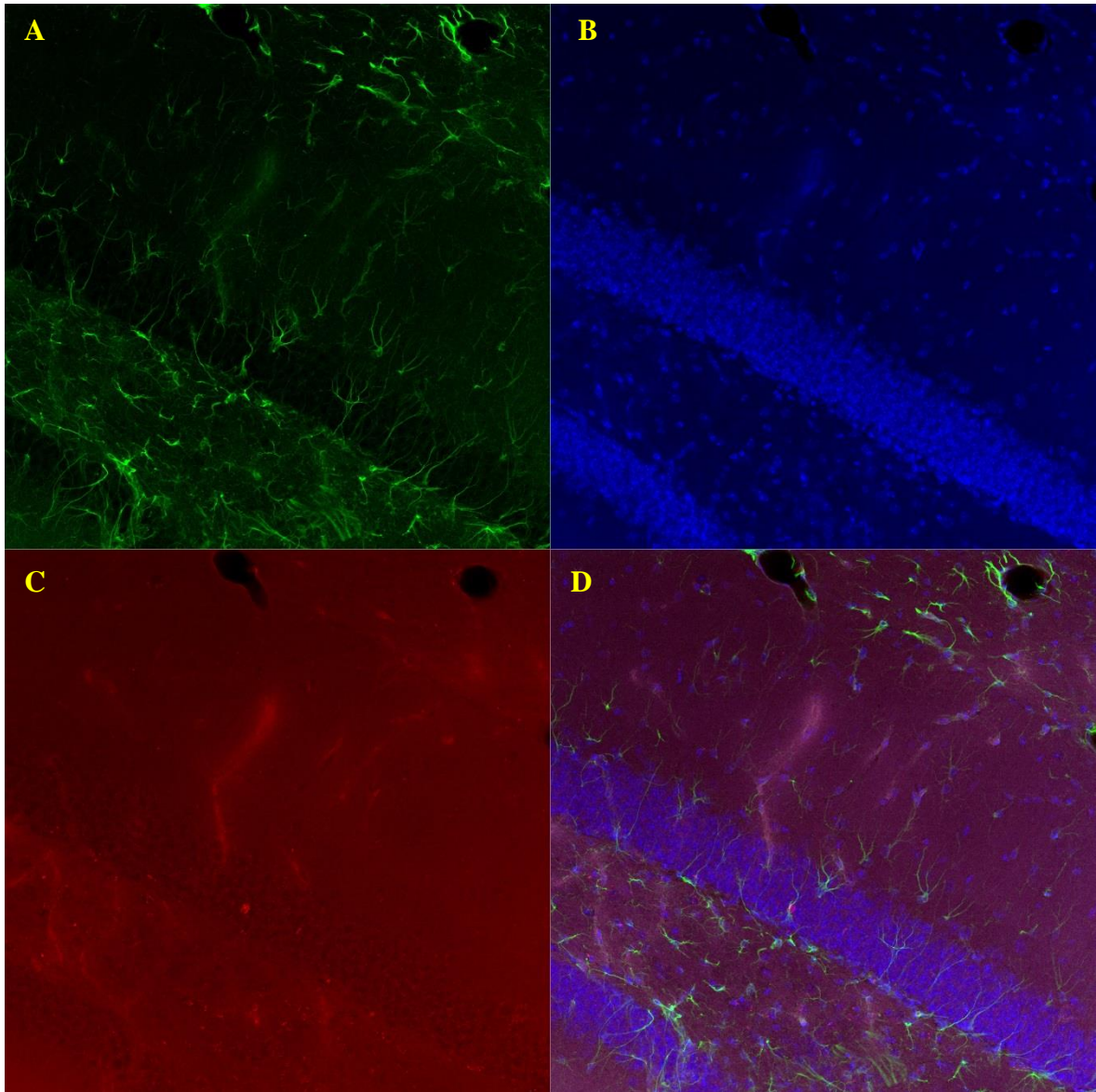
##### *4.4.2. Statisztika*

Az adatok kiértékeléséhez és a statisztika készítéséhez az IBM SPSS Statistics program 22-es verzióját használtuk. A grip-teszt eredményeinek kiértékelése során a kezelési csoportok összehasonlítására az izomerő szempontjából nemparaméteres Kruskal-



**2. ábra: A gyrus dentatus konfokális mikroszkóppal készült képe és a vizsgálatban megfigyelt zónái**

Wallis tesztet használtunk. Egyváltozós ANOVA tesztel végeztük a kezelési csoportok összehasonlítását az új sejtek számának szempontjából, valamint többváltozós ANOVÁval a csoportok összehasonlítását az új sejtek számának szempontjából, az egyes zónákat megkülönböztetve. Wéber Katalin előzetes adatai alapján többváltozós ANOVÁval vizsgáltuk a csoportok összehasonlítását tanuláshoz szükséges és az újratanuláshoz szükséges összes idő szempontjából. Post hoc analízisként Tukey-féle post hoc tesztet



**3. ábra: Az alkalmazott fluorescens immunhisztokémiai jelölések: A) GFAP (Alexa 488), B) Általános sejtmagfestés (DAPI), C) BrdU (DyLight 548), D) kompozit kép mindhárom jelöléssel.**

alkalmaztunk. Az új sejtek és a testtömeg, valamint az új sejtek száma és a tanulási teljesítmény között korrelációvizsgálatot végeztünk. Minden esetben  $p=0,05$  szignifikancia szinttel dolgoztunk.

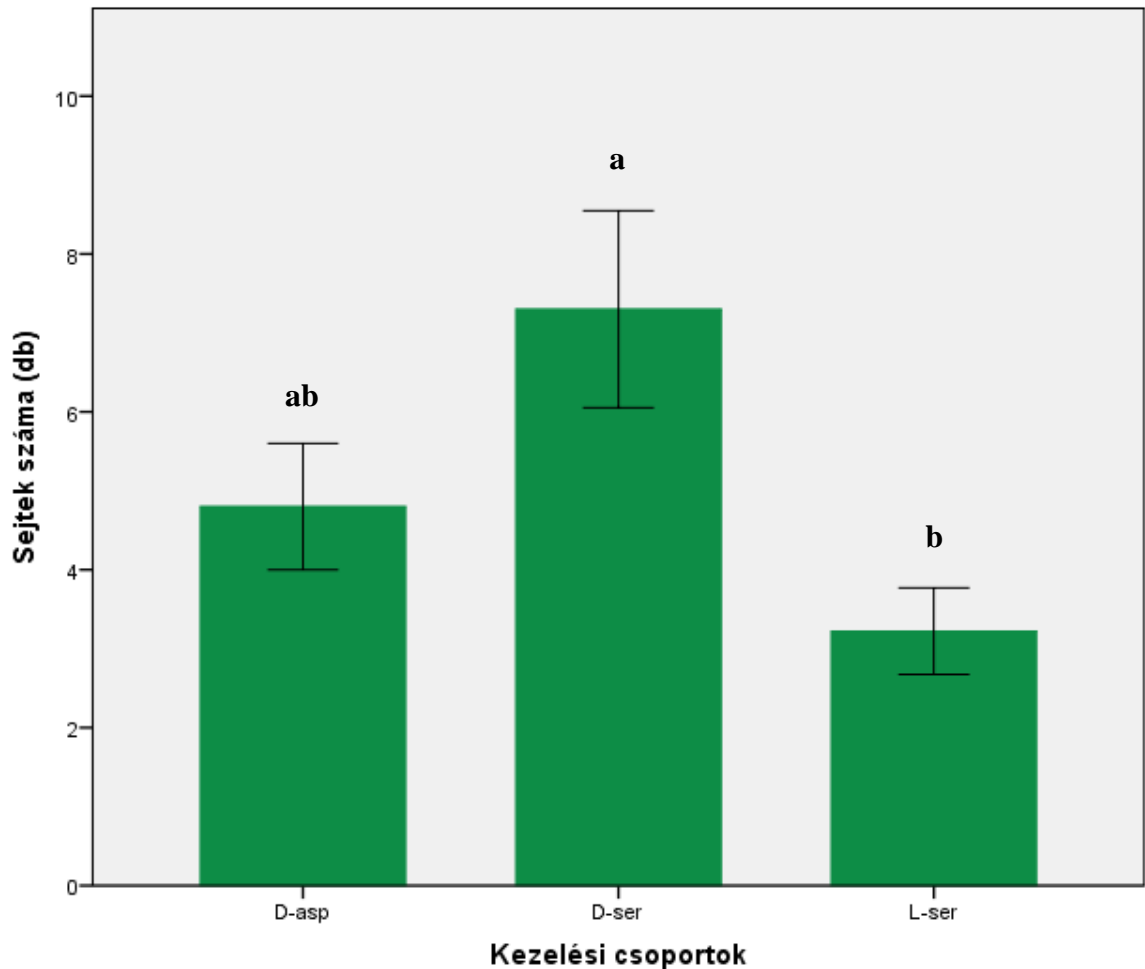
## 5. Eredmények

### 5.1. Kapaszkodás (grip strength) teszt

A grip strength teszt adatai alapján a Kruskal-Wallis teszt nem mutatott szignifikáns különbséget a kezelési csoportok között sem az első teszt alkalmával mért függeszkedési idő, sem átlagos függeszkedési idő alapján. A testtömeg nem korrelált a függeszkedési idővel.

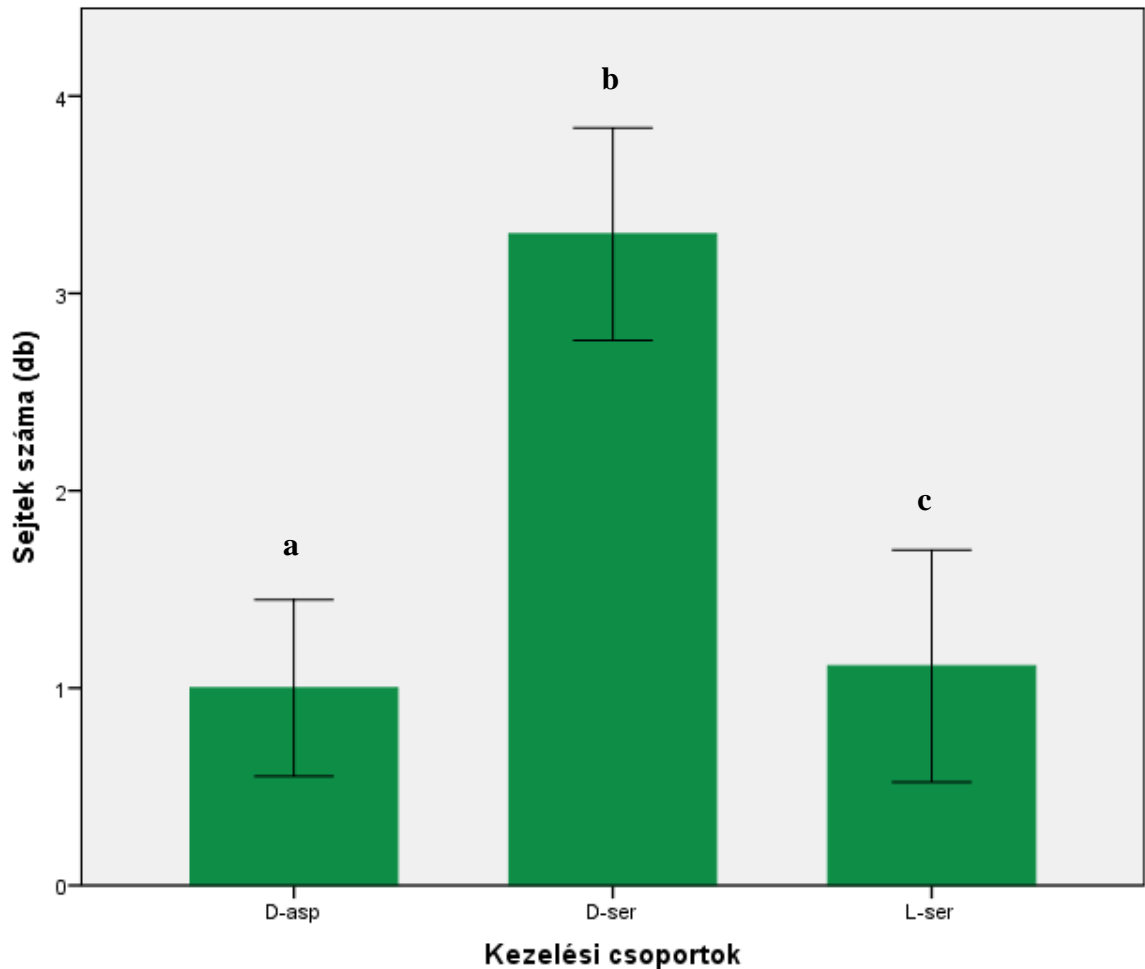
### 5.2. Kezelések hatása a gliogenezisre és a tanulásra

Az újonnan keletkezett GFAP jelölt sejtek számát tekintve a kezelés szignifikáns hatással volt ( $F=4,796$ ,  $df=2$ ,  $p=0,017$ ). A D-szerines és az L-szerines kezelési csoportok között szignifikáns különbség volt kimutatható ( $p=0,014$ ), a D-szerines csoportban szignifikánsan nagyobb volt az új sejtek száma. A D-aszpartátos és az L-szerines csoport között, valamint a D-aszpartátos és D-szerines csoport között nem volt szignifikáns különbség, de a D-aszpartátos és az L-szerines csoport között hasonló trend látszott. A **4. ábrán** ábrázolt eredmények azt mutatják, hogy a kezelés a D-szerines csoportra volt szignifikáns hatással, az L-szerines csoportra nem, míg a D-aszpartátos csoport a kettő között van, de itt sem volt szignifikáns hatás. Az újonnan keletkezett GFAP jelölt sejtek számát tekintve zónánként, a kezelés szintén szignifikáns hatással volt ( $F=3,981$ ,  $df_{H,E}=4;52$ ,  $p=0,007$ ). Mivel a granuláris zónában elenyésző számú új sejtet találtunk, ezért a tesztben csak a szubgranuláris (SG) és az extragranuláris zónát (ExG) vettük figyelembe. Az ExG zónában a kezelés szignifikáns hatással volt az új GFAP-jelölt sejtek számára ( $F=6,246$ ,  $df=2$ ,  $p=0,006$ ), míg az SG zónában a hatás nem volt szignifikáns. Az ExG zónában D-szerines csoportban szignifikánsan nagyobb volt az új GFAP-jelölt sejtek száma mind a D-aszpartátos csoporthoz ( $p=0,011$ ), mind az L-szerines csoporthoz ( $p=0,019$ ) képest (**5. ábra**). A D-aszpartátos és L-szerines csoportok nem mutattak hasonló hatást. Az SG zónában hasonló trend látszott, de nem volt szignifikáns hatás ( $F=2,3$ ,  $df_{H,E}=2;26$ ,  $p=0,12$ ) (**6. ábra**).



**4. ábra:** Az újonnan keletkezett GFAP jelölt sejtek száma a kezelések függvényében (átlag ± SEM). Az oszlopok felett található különböző betűk a szignifikáns különbséget jelölik (Tukey-féle post hoc teszt,  $p < 0,05$ ).

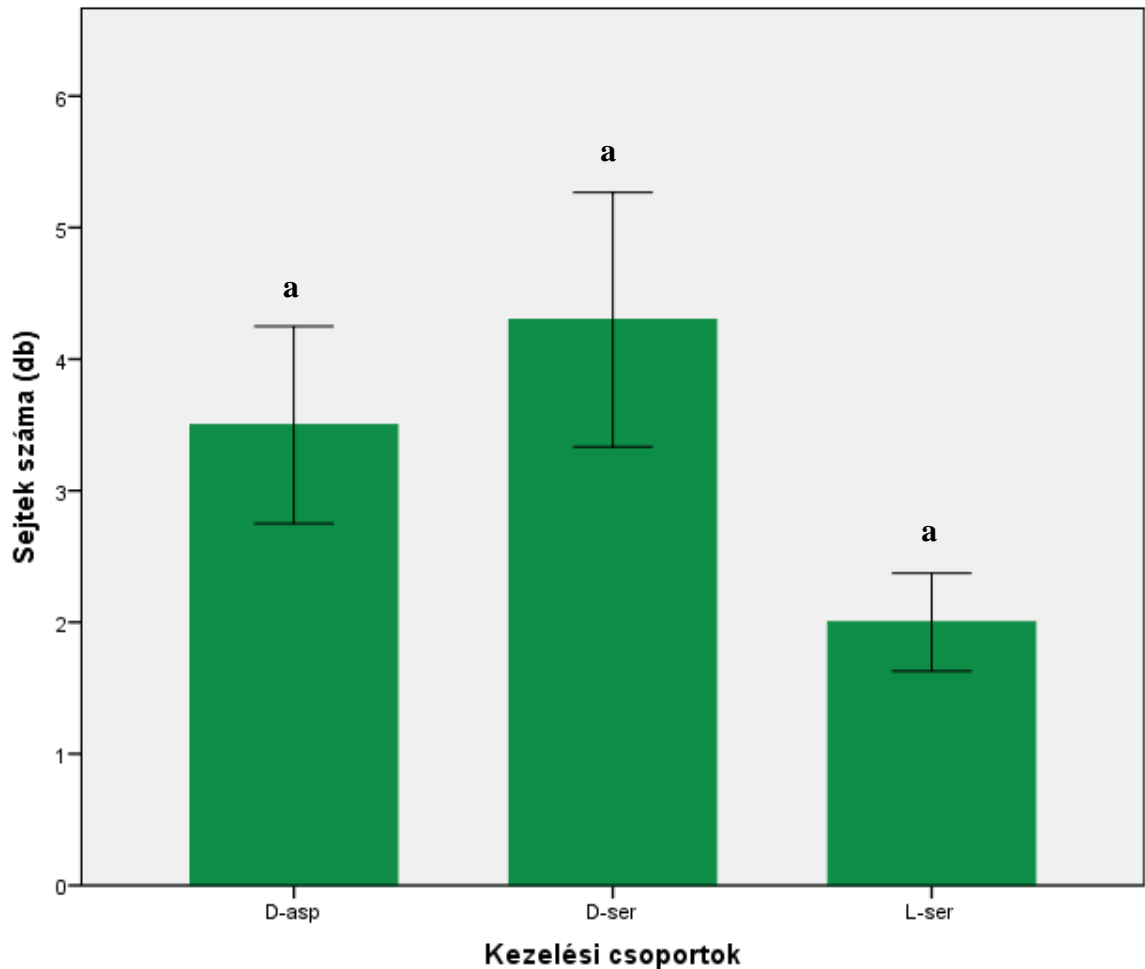
Wéber Katalin előzetes adatait vizsgálva azt találtuk, hogy a kezelések szignifikánsan hatottak a tanulásra és újratanulásra ( $F=3,019$ ,  $df_{H,E}=4;50$ ,  $p=0,026$ ), ezen belül az összes tanuláshoz szükséges ( $F=4,253$ ,  $df=2;25$ ,  $p=0,026$ ) időre. A vizsgálatból a tanulási teljesítményben mutatott kiugró értékek miatt két egyedet outlier-ként kizártunk. Az összes tanuláshoz szükséges idő tekintetében a D-aszpartátos csoport szignifikánsan különbözött a



**5. ábra:** Az extragranuláris zónában újonnan keletkezett GFAP jelölt sejtek száma a kezelések függvényében (átlag  $\pm$  SEM). Az oszlopok felett található különböző betűk a szignifikáns különbséget jelölik (Tukey-féle post hoc teszt,  $p < 0,05$ ).

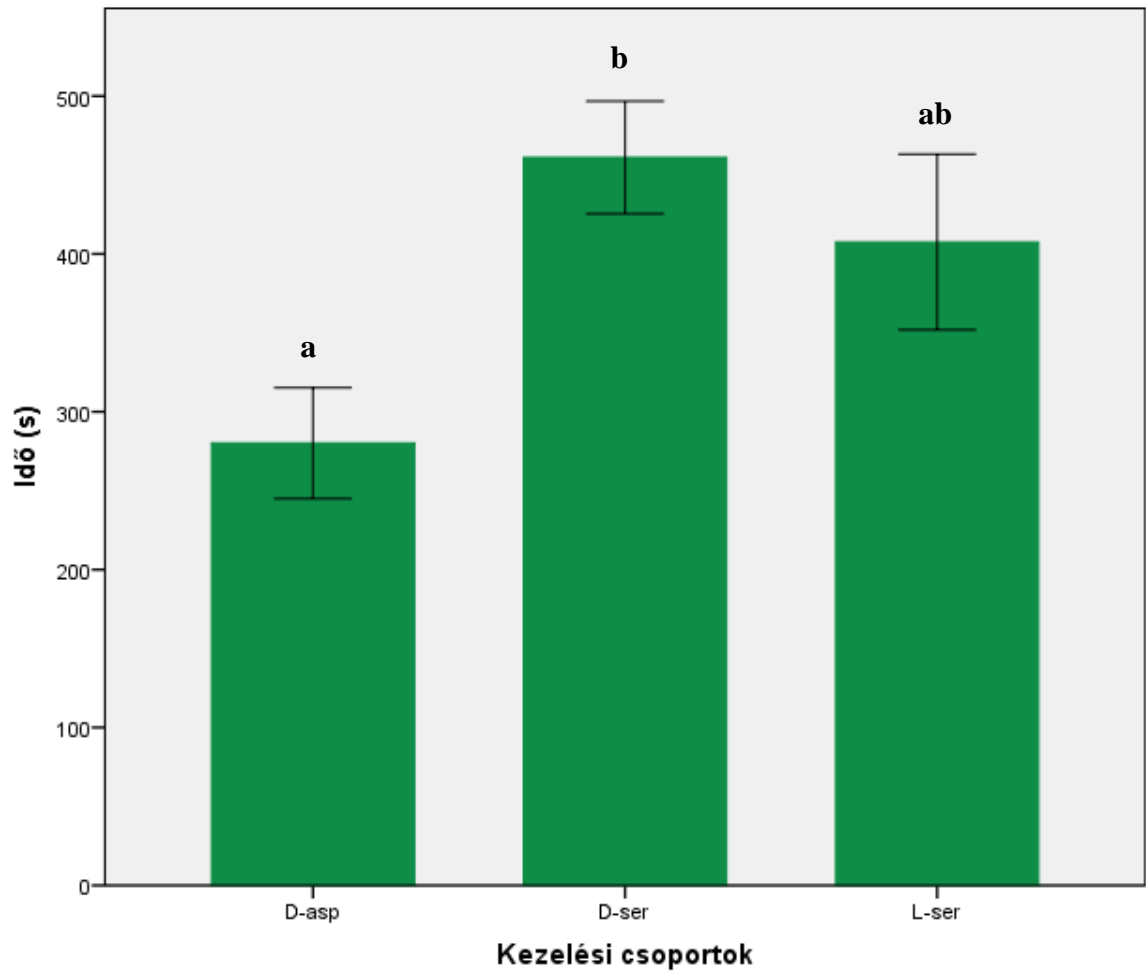
D-szerines csoporttól ( $p=0,024$ ), valamint különbséget mutatott az L-szerines csoporttól, de a hatás itt nem volt szignifikáns (**7. ábra**). Az újratanuláshoz szükséges összes idő szempontjából a kezelési csoportok hasonló trendet mutattak, de nem volt szignifikáns különbség ( $F=3,1$ ,  $df=2;25$   $p=0,063$ ) (**8. ábra**). A korrelációvizsgálat eredményei szerint a tanuláshoz szükséges összes idő nem korrelált az új GFAP jelölt sejtek számával egyik zónában sem. Az újratanuláshoz szükséges összes idő szignifikánsan korrelált az összes új GFAP jelölt sejt számával ( $p=0,024$ ) (**9. ábra**), valamint a szubgranuláris zónában talált új GFAP jelölt sejtek számával ( $p=0,035$ ) (**10. ábra**). Ezenkívül a 7. héten (utolsó alkalommal)



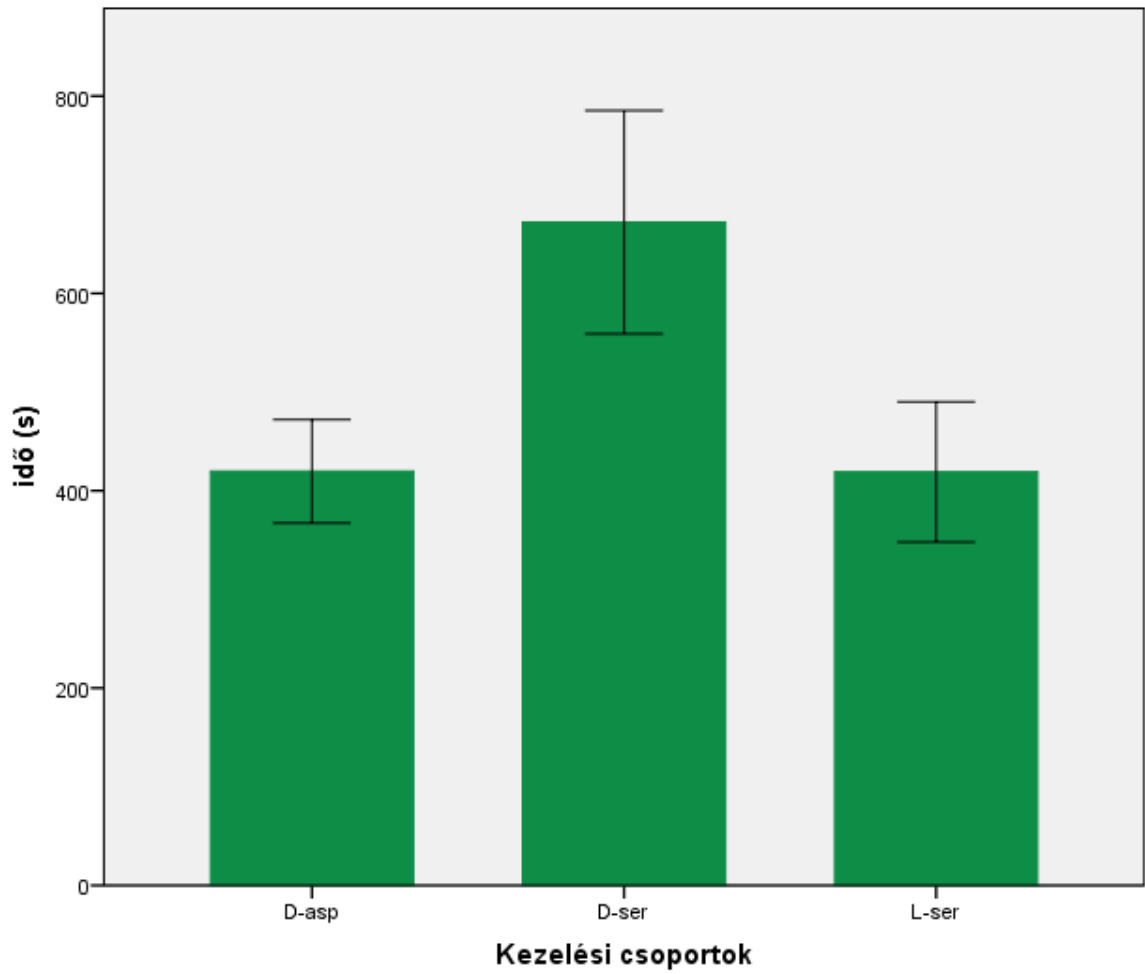


**6. ábra:** A subgranuláris zónában újonnan keletkezett GFAP jelölt sejtek száma a kezelések függvényében. Az extragranuláris zónához hasonló trend látszik, de a csoportok közti különbség nem szignifikáns ( $p > 0,1$ ).

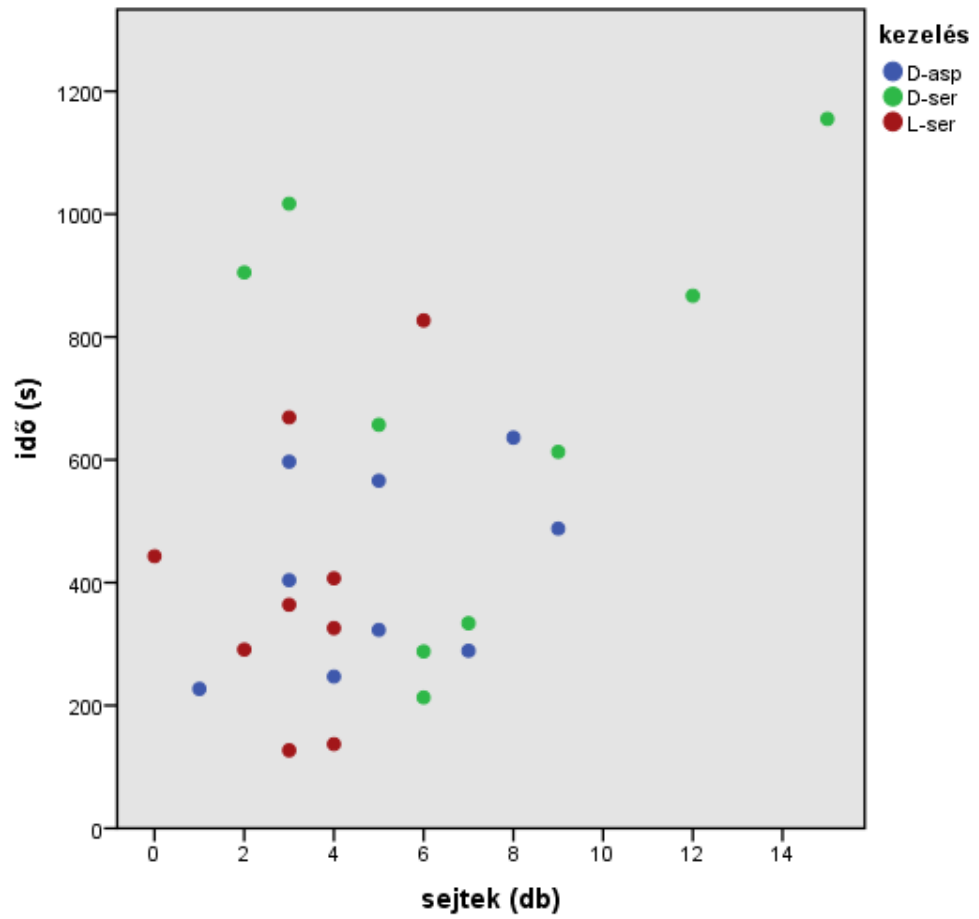
mért testtömeg és az összes új BrdU jelölt sejt száma között is szignifikáns korrelációt találtunk ( $p = 0,01$ ) (**11. ábra**). Az extragranuláris BrdU jelölt sejtek, illetve GFAP jelölt sejtek száma nem korrelált a testtömeggel ( $p > 0,21$ ).



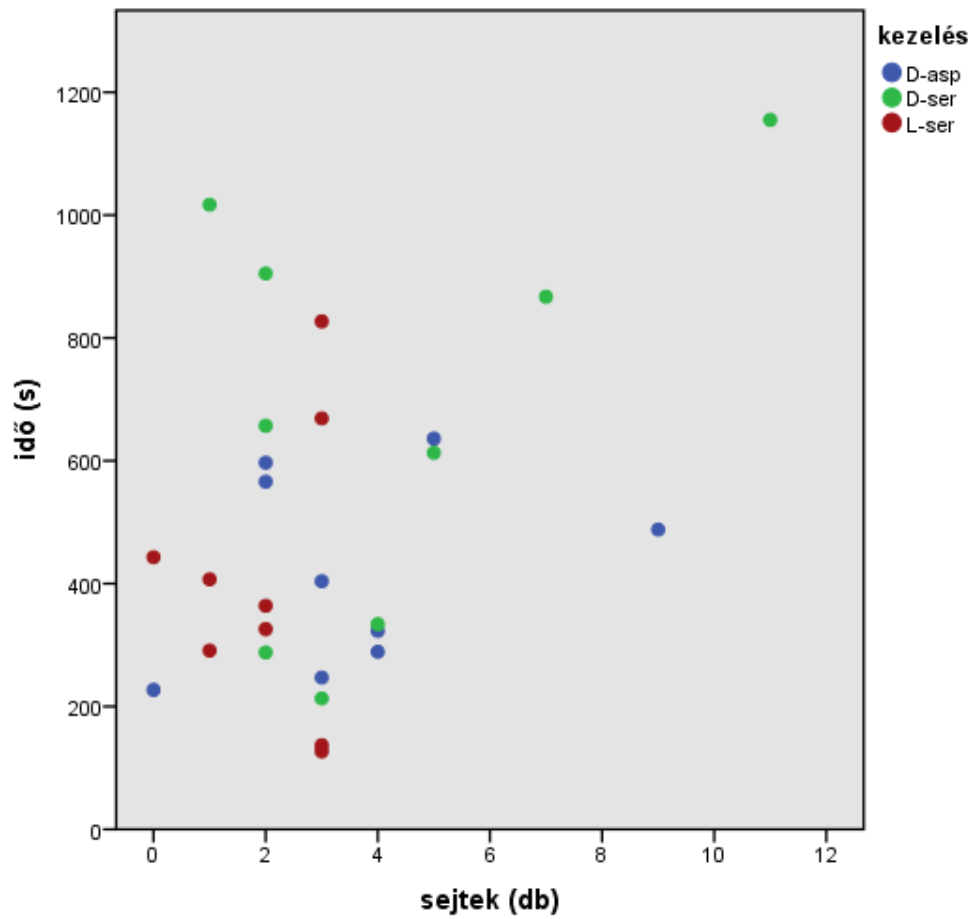
**7. ábra: A kezelések hatása az összes tanuláshoz szükséges időre. Az oszlopok felett található különböző betűk a szignifikáns különbséget jelölik (Tukey-féle post hoc teszt,  $p < 0,05$ ).**



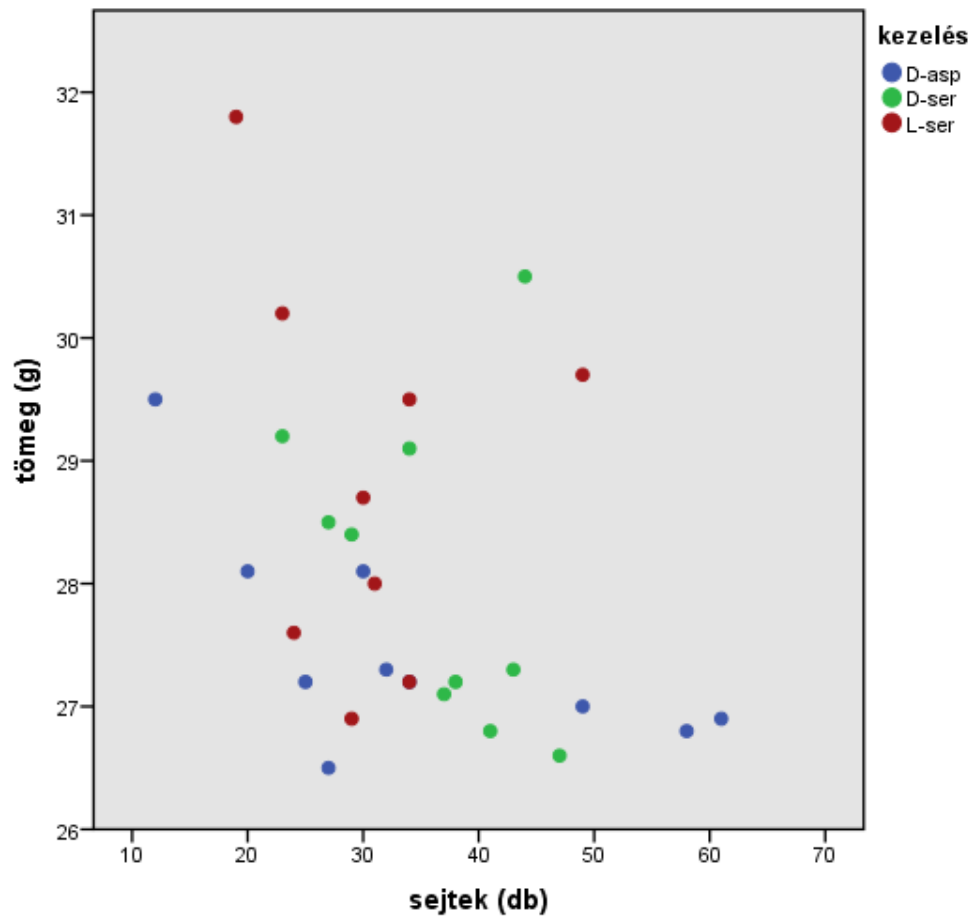
**8. ábra: A kezelések hatása az összes újratanuláshoz szükséges időre. Szignifikáns hatás hiányában post hoc tesztet nem végeztünk.**



9. ábra: Korreláció az összes újratanuláshoz szükséges idő és az újonnan keletkezett GFAP jelölt sejtek száma között ( $r^2=0,43$ ,  $p=0,024$ ).



10. ábra: Korreláció az összes újratanuláshoz szükséges idő és a szubgranuláris zónában újonnan keletkezett GFAP jelölt sejtek száma között ( $r^2=0,4$ ,  $p=0,035$ ).



11. ábra: Korreláció a 7. héten (utolsó alkalommal) mért testtömeg és az összes újonnan keletkezett BrdU jelölt sejt száma között ( $r^2=-0,48$ ,  $p=0,01$ ).

## 6. Diszkusszió

A D-aszpartát és a D-szerin aminosavakat egyaránt leírták, mint fontos neurotranszmitter vagy neuromodulátor molekulát az emlős központi idegrendszerben. Mindkét aminosavat összefüggésbe hozták a tanulással és memóriával (Topo et al., 2010), valamint a felnőttkori neurogenézissel (Errico et al., 2014; Kim et al., 2010; Sultan et al., 2013; Huang et al., 2012), mely szerepükre Wéber Katalin párhuzamosan zajló kutatása is összpontosított. Jelen kutatásunk fókuszában a D-aszpartát és D-szerin gliagenezisre, azon belül az asztrociták képződésére gyakorolt hatása állt, valamint ennek összefüggései a tanulással és memóriával.

### 6.2. Izomerő vizsgálata

A D-aszpartát az idegrendszerben általunk vizsgált szerepe mellett tudjuk, hogy részt vesz a tesztoszteron szintézis szabályzásában is (Topo et al., 2009), illetve megnövekedett bevitel megnövekedett tesztoszteronszinttel járhat (Nagata et al., 1999). Ezért felmerült a lehetőség, hogy a D-aszpartátos csoport Morris water maze tesztben nyújtott jobb teljesítménye közvetetten a tesztoszteron szintézis serkentésének eredménye, mely megnövekedett izomerőt és gyorsabb vagy kitartóbb úszást jelenthet. Ennek kizárása érdekében vezettük be a grip tesztet, mely az egerek izomerejének hatékony mérési módszere. Az kapott eredmények nem mutattak különbséget a kezelési csoportok között, a D-aszpartát nem okozott szignifikáns változást az izomerő tekintetében.

### 6.1. D-aszpartát hatásának vizsgálata

A D-aszpartát egy korábbi kísérletben egyértelműen javította patkányok tanulását és memóriáját Morris water maze teszt során (Topo et al., 2010), de hogy ezt a hatását a neurogenézis fokozásán keresztül fejti-e ki, vitatott maradt, ellentmondásos eredményekkel (Kim et al., 2010; Matsuda et al., 2015). Wéber Katalin előzetes adatai alapján a D-aszpartát egerek esetében is szignifikánsan javította a tanulást és memóriát a Morris water maze teszt során: A D-aszpartát kezelés hatására rövidebb idő alatt tanulták

meg a platform helyét. Kutatásunk eredményei alapján a D-aszpartátnak nincs szignifikáns hatása az új asztrociták képződésére, és bár az L-szerinhez képest látható volt valamilyen serkentő hatás, ez nem érte el a szignifikáns szintet.

### *6.3. D-szerin hatásának vizsgálata*

A D-szerin szerepét a neurogenesisben több kísérlet is igazolta (Sultan et al., 2013; Huang et al., 2012), emellett feltételezik, hogy szerepe lehet egyes kognitív folyamatok szabályzásában is (Cappelletti et al., 2015). Wéber Katalin előzetes adatai alapján azonban a D-szerinnek nem volt szignifikáns hatása a Morris water maze teszt során nyújtott tanulási teljesítményre, vagy ha mégis, az inkább negatív. A D-szerines csoport a kontroll csoportnál is rosszabbul teljesített, bár ez a különbség nem volt szignifikáns. Az új asztrociták számának tekintetében azt találtuk, hogy a D-szerines kezelési csoportban szignifikánsan több volt az új sejt a kontrollhoz képest, valamint a D-aszpartátos csoporthoz képest is, de itt nem volt szignifikáns a különbség. Ez egybeesik a D-szerin mások által leírt proliferatív hatásával. Külön az extragranuláris zónát nézve azonban a D-szerines csoportban mindkét másik kezelési csoporthoz képest szignifikánsan több volt az új asztrocita, míg a szubgranuláris zónában csak hasonló trend látszott, nem volt szignifikáns hatás. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a D-szerin főleg a szubgranuláris zónából elvándorló, a hálózatba beépülő gliák túlélésére lehet pozitív hatással, míg magában az összes képződő glia számában kevésbé különböznek a csoportok.

A D-szerinnek e hatása mellett azt találtuk, hogy az összes új asztrocita száma, és különösen az szubgranuláris zónában található új asztrociták száma és az újratanuláshoz szükséges összes idő korrelálnak, tehát a több újonnan keletkezett és túlélő asztrocitával rendelkező egerek rosszabb teljesítményt mutattak tanulás és memória terén. Ez az eredmény ellentétes a várakozásainkkal, hiszen arra számítottunk, hogy a D-szerin a neurogenesisel együtt serkenti a gliagenézist is, a több neuron és gliasejt pedig jobb teljesítményhez vezet.

Az eredményeink egyik lehetséges magyarázata, hogy a glia proliferáció nem feltétlenül pozitív változást jelent, korábban kimutatták például, hogy a központi



idegrendszer közvetlen sérülése esetén ún. gliaheg képződik, mely főként újonnan képződött asztrocitákból áll (Silver & Miller, 2004). Ezenkívül van példa nem közvetlen lokális sérülés esetén történő megnövekedett gliagenezisre is. Bruijnzeel és munkatársai 2011-es kutatása során patkányokat tettek ki dohányfüst hatásának, és a neurogenesis csökkenését, valamint a gliagenezis fokozódását figyelték meg a gyrus dentatusban, ami a kognitív képességek és a memória romlásával járhat együtt. Egy másik lehetséges magyarázat, hogy a D-szerin ugyan serkenti a gliagenezist, de az új gliasejteknek a tanuláshoz szükséges funkcionális beépülését már nem segíti, így a D-szerines kezelési csoport esetében csak nem funkcionális proliferációt tapasztaltunk így a Morris water maze teszt során nyújtott teljesítmény nem javult.

#### *6.4. L-szerin, mint kontroll*

A kutatásunk során kontrollként alkalmazott L-szerint, mint a D-szerin és a glicin képződéséhez szükséges prekuzort, szintén összefüggésbe hozták a neurogenesisel és a központi idegrendszer egészséges működésével in vitro és patológias modelleken (Furuya et al., 2000; Sato et al., 1991). A D-szerin nem jut át a vér-agy gáton, és nem esszenciális aminosav, így a szervezet maga is elő tudja állítani, fogyasztása elvileg nem befolyásolja az agyi proliferatív folyamatokat. Eredményeink alapján az L-szerines kezelés sem a tanulásra, sem az új gliasejtek keletkezésére nem volt szignifikáns hatással, így megfelelő kontrollnak bizonyult.

#### *6.5. Tömeg és új sejtek számának összefüggése*

A korrelációvizsgálat során összefüggést találtunk az összes új gliasejt száma és a 7. heti testtömeg között is. Ez egy negatív korreláció, tehát minél kisebb tömegű volt egy egyed a 7. héten az utolsó mérés alkalmával, annál több GFAP-jelölt sejtet találtunk a gyrus dentatusában. Mivel a csoportok testtömege nem különbözött egymástól ám az egyedek közötti variancia meglehetősen nagy volt az ad-libitum táplálkozás ellenére is, az egyedek különböző tápláltsági állapota hatással lehetett az agyi sejtosztódásra. Ismert, hogy magas

zsírtartalmú táplálkozás és az obezitás befolyásolja a hippocampális sejtproliferációt (Yon, Mauger, & Pickavance, 2013; Fotuhi, Do, & Jack, 2012).

A D-szerin fogyasztása tehát megnöveli a gliogenezist, de nem gyakorol pozitív hatást a kognitív képességekre, A D-aszpartát ezzel ellentétben patkányokban tapasztaltakhoz hasonlóan javítja a tanulási teljesítményt, ám ezt nem a gliasejtek intenzívebb genezisének keresztül éri el.

## 7. Összefoglalás

Az emlős idegrendszerben leggyakrabban előforduló D-aminosavak a D-aszpartát és a D-szerin. Ezt a két aminosavat egyaránt leírták, mint fontos neurotranszmittert vagy neuromodulátort. Ismereteink szerint a D-szerin képződése az asztrocitákhoz kötött, illetve korábban gliatranszmitterként írták le. Leírták továbbá, hogy az NMDA receptor koagonistájaként az NMDA receptor mediált plaszticitási folyamatok szabályzásában játszik szerepet (Sultan et al., 2013). A D-aszpartát jellegzetes időbeli változást mutat: nagy mennyiségben fordul elő patkány és házityúk embrió agyában és retinájában, majd a születés vagy kikelés után drasztikusan lecsökken a mennyisége. Ez alapján feltételezik, hogy szerepe lehet a korai fejlődési folyamatokban. Emellett kimutatták, hogy felnőtt állatokban javítja a tanulási teljesítményt (Topo et al., 2010). Vizsgálatunk célja, hogy felderítsük ennek a két D-aminosavnak korábban nem vizsgált hatását a gliagenezisre, illetve az esetlegesen megnövekedett gliasejt szám és a Morris water maze tesztben nyújtott teljesítmény közti összefüggés lehetőségét. Egereket három csoportra osztottunk, kontroll, D-aszpartát és D-szerin kezelt csoportra. Az egerek ivóvizükbe keverve fogyasztották az aminosavakat hat héten keresztül és ip. BrDU injekciót kaptak, hogy az újonnan keletkezett sejteket megjelöljük. Minden csoport Morris water maze tesztben vett részt a tanulás vizsgálatának céljából, majd immunhisztokémiai festést alkalmaztunk és sejtszámlálást végeztünk a gyrus dentatus területén az újonnan kialakult asztrociták vizsgálatára. Az aminosavak közül a D-aszpartát szignifikánsan javította a tanulást és memóriát, de nem volt hatással az új asztrociták képződésére. A D-szerin kezelt csoport a kontroll csoportnál is rosszabbul teljesített a tanulási teszt során, bár ez a különbség nem volt szignifikáns. A D-szerines kezelési csoportban szignifikánsan több volt az új astrocyta a kontrollhoz képest. A extragranuláris zónában a D-szerines csoportban mindkét másik kezelési csoporthoz képest szignifikánsan több volt az új asztrocita. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a D-szerin főleg a szubgranuláris zónából elvándorló, a hálózatba beépülő gliák túlélésére lehet pozitív hatással. Emellett azt találtuk, hogy az új asztrociták száma és az újratanuláshoz szükséges összes idő korrelálnak, tehát a több újonnan keletkezett és túlélő asztrocitával rendelkező egerek rosszabb teljesítményt mutattak tanulás és memória terén, ami arra a korábban már leírt jelenségre utalhat, hogy a gliagenezis nem jár együtt egy adott egyterület hatékonyabb működésével.

## 8. Abstract

The most frequently occurring D-amino acids in the mammalian nervous system are D-aspartate and D-serine. These two amino acids have both been described as important neurotransmitters or neuromodulators. To our knowledge, the formation of D-serine is bound to astrocytes and it has previously been described as a gliotransmitter. It has also been reported that as an NMDA receptor co-agonist, D-serine plays a role in NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. D-aspartate shows a characteristic temporal alteration: it has a high concentration in the brain and retina of rat and chicken embryo, which dramatically decreases after birth or hatching. Thus, it supports the notion that D-aspartate has a role in the early development process. In addition, it has been shown to enhance learning performance in adult animals. The objective of our study was to investigate the never previously studied effect of these two D-amino acids on gliogenesis and the potential relationship between the increased number of glial cells and improved performance in the Morris water maze test. Mice were divided into three groups, a control, a D-aspartate and a D-serine group. Animals received the amino acids in their drinking water for six weeks and new cells were labelled by ip. injecting BrDU. Each group participated in the Morris water maze test, with the purpose investigating the changes in spatial learning and memory (Morris, 1984). Later, by means of immunohistochemical methods and cell counting in the hippocampal dentate gyrus, we investigated the number of newly formed astrocytes. Of the two amino acids, D-aspartate significantly improved learning and memory, but it did not affect the formation of new astrocytes. The D-serine-treated group performed poorly in the learning test. In the D-serine treatment group the number of new cells was significantly higher compared to the control. In the extragranular zone the number of new astrocytes was significantly higher than that of both other treatment groups. These results imply, that D-serine might have a positive impact primarily on the survival of astrocytes migrating from the subgranular zone and their integration into the glial network. In addition, we found that the number of new astrocytes and the total time required to learning correlated, suggesting, that the mice possessing more newly formed astrocytes shown inferior performance in learning and memory. This might refer to a phenomenon previously described, according to which an increase in gliogenesis does not accompanies the better functionality of a given brain region.

## 9. Irodalomjegyzék

Alme CB, Buzzetti RA, Marrone DF, Leutgeb JK, Chawla MK, Schaner MJ, Bohanick JD, Khoboko T, Leutgeb S, Moser EI, et al. 2010. Hippocampal granule cells opt for early retirement. *Hippocampus* 20: 1109–1123.

Balu, D. T., Takagi, S., Puhl, M. D., Benneyworth, M. A., Coyle, J. T. (2014) D-Serine and Serine Racemase are Localized to Neurons in the Adult Mouse and Human Forebrain. *Cell Mol Neurobiol.* 34(3):419-35.

Banik, S. D., Nandi, N. (2013) Chirality and Protein Biosynthesis. *Top Curr Chem.* 333:255-305.

Barker JM, Boonstra R, Wojtowicz JM. 2011. From pattern to purpose: How comparative studies contribute to understanding the function of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 34: 963–977

Benneyworth, M. A., Li, Y., Basu, A. C., Bolshakov, V. Y., Coyle, J. T. (2012) Cell selective conditional null mutations of serine racemase demonstrate a predominate localization in cortical glutamatergic neurons. *Cell Mol neurobiol.* 32:613-624.

Bowery, N. G., Smart, T. G. (2006) GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *British Journal of Pharmacology.* 147:S109-S119.

Bradford, S. E., Nadler, J. V. (2004) Aspartate release from rat hippocampal synaptosomes. *Neuroscience.* 128:751-765.

Brückner, H., Westhauser, T. (2003) Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acids.* 24:43-55.

Cappelletti, P., Piubelli, L., Murtas, G., Caldinelli, L., Valentino, M., Molla, G., Pollegioni, L., Sacchi, S. (2015) Structure-function relationships in human D- amino acid oxidase variants corresponding to known SNPs. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1854(9):1150-9.

Cetin, I., Fennessey, P. V., Sparks, J. W., Meschia, G. and Battaglia, F. C. (1992) Fetal serine fluxes across fetal liver, hindlimb, and placenta in late gestation. *Am. J. Physiol.* 263, E786–E793 71

Cetin, I., Fennessey, P. V., Quick, A. N. J., Marconi, A. M., Meschia, G., Battaglia, F. C. and Sparks, J. W. (1991) Glycine turnover and oxidation and hepatic serine synthesis from glycine in fetal lambs. *Am. J. Physiol.* 260, E371–E378

Corrigan, J. J. (1969) D-amino acids in animals. *Science.* 164:142-149.

Curcio, L., Podda, M. V., Leone, L., Piacentini, R., Mastrodonato, A., Cappelletti, P., Sacchi, S., Pollegioni, L., Grassi, C., D'Ascenzo, M. (2013) Reduced D-serine levels in the nucleus accumbens of cocaine-treated rats hinder the induction of NMDA receptor-dependent synaptic plasticity. *Brain*. 136:1216-1230.

D'Aniello, A. es Giuditta, A. (1977) Identification of D-aspartic acid in the brain of *Octopus vulgaris*. *Journal of Neurochemistry*. 29:1053-1057.

D'Aniello, A., Giuditta, A. (1978) Presence of D-aspartate in squid axoplasm and in other regions of cephalopod nervous system. *Journal of Neurochemistry*. 31:1107-1108.

D'Aniello, S., Somorjai, I., Garcia-Fernandez, J., Topo, E., D'Aniello, A. (2011) D-Aspartic acid is a novel endogenous neurotransmitter. *The FASEB Journal*. 25:1014-1027.

D'Aniello, A. (2007) D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain Research Reviews*. 53:215-234.

Di Fiore MM, Assisi L, Botte V, D'Aniello A (1998) D-Aspartic acid is implicated in the control of testosterone production by the vertebrate gonad. Studies on the female green frog *Rana esculenta*. *J Endocrinol* 156:199–207

DeVito, L. M., Balu, D. T., Kanter, B. R., Lykken, C., Basu, A. C., Coyle, J. T., Eichenbaum, H. (2011) Serine racemase deletion disrupts memory for order and alters cortical dendritic morphology. *Genes, Brain and Behavior*. 10:210-222.

Dunlop, D. S., Neidle, A., McHale, D., Dunlop, D. M., Lajtha, A. (1986) The presence of free D-aspartic acid in rodents and man. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 141:27-32.

Errico, F., Nistico, R., Palma, G., Federici, M., Affuso, A., Brillì, E., Topo, E., Centonze, D., Bernardi, G., Bozzi, Y., D'Aniello, A., Di Laura, R., Mercuri, N. B., Usiello, A. (2008a) Increased levels of d-aspartate in the hippocampus enhance LTP but do not facilitate cognitive flexibility. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 37:236-246.

Errico, F., Rossi, S., Napolitano, F., Catuogno, V., Topo, E., Fisone, G., D'Aniello, A., Centonze, D., Usiello, A. (2008b) D-aspartate prevents corticostriatal long-term depression and attenuates schizophrenia-like symptoms induced by amphetamine and MK-801. *The Journal of Neuroscience*. 28:10404-10414.

Errico, F., Nistico, R., Napolitano, F., Mazzola, C., Astone, D., Pisapia, T., Giustizieri, M., D'Aniello, A., Mercuri, N. B., Usiello, A. (2011) Increased D-aspartate brain content rescues hippocampal age-related synaptic plasticity deterioration of mice. *Neurobiology of Aging*. 32, 2229-2243.

- Errico, F., Nistico, R., Di Giorgio, A., Squillace, M., Vitucci, D., Galbusera, A., Piccinin, S., Mango, D., Fazio, L., Middei, S., Trizio, S., Mercuri, N. B., Teule, M. A., Centonze, D., Gozzi, A., Blasi, G., Bertolino, A., Usiello A. (2014) Free d-aspartate regulates neuronal dendritic morphology, synaptic plasticity, gray matter volume and brain activity in mammals. *Transl Psychiatry*. 4:e417.
- Fisher, G. H., D'Aniello, A., Vetere, A., Padula, L., Cusano, G. P., Man, E. H. (1991) Free D-aspartate and D-alanine in normal and Alzheimer brain. *Brain Research Bulletin*. 26(6):983-5.
- Fleck, M. W., Henze, D. A., Barrionuevo, G., Palmer, A. M. (1993) Aspartate and Glutamate Mediate Excitatory Synaptic Transmission in Area CA1 of the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 13(9): 3944-3955.
- Fotuhi, M., Do, D., & Jack, C. (2012). Modifiable factors that alter the size of the hippocampus with ageing. *Nature Publishing Group*, 8(4), 189–202. <http://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.27>
- Furuya, S., Tabata, T., Mitoma, J., Yamada, K., Yamasaki, M., Makino, A., Yamamoto, T., Watanabe, M., Kano, M. and Hirabayashi, Y. (2000) L-Serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 11528–11533
- Fujii, N. (2002) D-amino acids in living higher organisms. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. 32:103-127.
- Fujii, N. (2005) D-amino acid in elderly tissues. *Biol. Pharm. Bull.* 28(9):1585-1589.
- Gross CG. 2000. Neurogenesis in the adult brain: Death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1: 67 –73.
- Gundersen, V., Chaudhry, F. A., Bjaalle, J. G., Fonnum, F., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J. (1998) Synaptic vesicular localization and exocytosis of L-aspartate in excitatory nerve terminals: a quantitative immunogold analysis in rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 18:6059-6070.
- Gundersen, V., Storm-Mathisen, J., Bergersen, L. H. (2015) Neuroglial Transmission. *Physiol Rev*. 95(3):695-726.
- Harman A, Meyer P, Ahmat A. 2003. Neurogenesis in the hippocampus of an adult marsupial. *Brain Behav Evol* 62: 1 –12.
- Hashimoto, A., Nishikawa, T., Hayashi, T., Fujii, N., Harada, K., Oka, T., Takahashi, K. (1992) The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS*. 296(1): 33-6.

- Hashimoto, A., Kumashiro, S., Nishikawa, T., Oka, T., Takahashi, K., Mito, T., Takashima, S., Doi, N., Mizutani, Y., Yamazaki, T., Kaneko, T., Ootomo, E. (1993) Embryonic Development and Postnatal Changes in Free D-Aspartate and D-Serine in the Human Prefrontal Cortex. *Journal of Neurochemistry*. 61:348-351.
- Hashimoto, A., Oka, T., Nishikawa, T. (1995) Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery. *European Journal of Neuroscience*. 7(8):1657-1663.
- Herring, B. E., Silm, K., Edwards, R. H., Nicoll, R. A. (2015) Is Aspartate an Excitatory Neurotransmitter?. *The Journal of Neuroscience*. 35(28):10168-10171.
- Huang, W., Kong, H., Tang, M., Lu, M., Ding, J., Hu, G. (2012) D-Serine Regulates Proliferation and Neuronal Differentiation of Neural Stem Cells from Postnatal Mouse Forebrain. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 18(1):4-13.
- Huether, G. and Lajtha, A. (1991) Changes in free amino acid concentrations in serum, brain, and CSF throughout embryogenesis. *Neurochem. Res.* 16, 145–150
- Jansson, L. C., Akerman, K. E. (2014) The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration, differentiation and survival of neural progenitor cells. *J Neural Transm.* 121(8):819-36.
- Johnson, J. W. and Ascher, P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature (London)* 325, 529–531
- Kaslin J, Ganz J, Brand M. 2008. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 101 –122
- Kim, P. M., Duan, X., Huang, A. S., Liu, C. Y., Ming, G. L., Song, H., Snyder, S. H. (2010) Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:3175-3179.
- Kim, P. M., Aizawa, H., Kim, P. S., Huang, A. S., Wickramasinghe, S. R., Kashani, A. H., Barrow, R. K., Haganir, R. L., Ghosh, A., Snyder, S. H. (2005) Serine racemase: Activation by glutamate neurotransmission via glutamate receptor interacting protein and mediation of neuronal migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(6):2105-10.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7: 179 –193.
- Lindsey BW, Tropepe V. 2006. A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Prog Neurobiol* 80:281 –307.
- Maeda, K., Sugino, H., Hirose, T., Kitagawa, H., Nagai, T., Mizoguchi, H., Takuma, K., Yamada, K. (2007) Clozapine Prevents a Decrease in Neurogenesis in Mice Repeatedly Treated With Phencyclidine. *Journal of Pharma Sciences*. 103:299-308.



- Martinez-Hernandez, A., Bell, K. P. and Norenberg, M. D. (1977) Glutamine synthetase : glial localization in brain. *Science* 195, 1356–1358
- Matsuda, S., Katane, M., Maeda, K., Kaneko, Y., Saitoh, Y., Miyamoto, T., Sekine, M., Homma, H. (2015) Biosynthesis of d-aspartate in mammals: the rat and human homologs of mouse aspartate racemase are not responsible for the biosynthesis of d-aspartate. *Amino Acids*. 47(5):975-85.
- Matsui, T., Sekiguchi, M., Hashimoto, A., Tomita, U., Nishikawa, T. and Wada, K. (1995) Functional comparison of D-serine and glycine in rodents : the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *J. Neurochem.* 65, 454– 458
- McMahon, H. T. , Nicholls, D. G. (1990) Glutamine and Aspartate Loading of Synaptosomes: A Reevaluation of Effects on Calcium-Dependent Excitatory Amino Acid Release. *Journal of Neurochemistry*. 54:373-380.
- Miller, R. F. (2004) D-Serine as a Glial Modulator of Nerve Cells. *Glia*. 47:275-283.
- Molinaro, G., Pietracupa, S., Menna, L. D., Pescatori, L., Usiello, A., Battaglia, G., Nicoletti, F., Bruno, V. (2010) D-Aspartate activates mGlu receptors coupled to polyphosphoinositide hydrolysis in neonate rat brain slices. *Neuroscience Letters*. 478:128-130.
- Moores, Jr, R. R., Rietberg, C. C., Battaglia, F. C., Fennessey, P. V. and Meschia, G. (1993) Metabolism and transport of maternal serine by the ovine placenta : glycine production and absence of serine transport into the fetus. *Pediatr. Res.* 33, 590–594
- Mothet, J., Parent, A. T., Wolosker, H., Brady, R. O. Jr., Linden, D. J., Ferris, C. D., Rogawski, M. A., Snyder, S. H. (2000) D-Serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(9):4926-31.
- Nadler, J. V. (2011) Aspartate Release and Signalling in the Hippocampus. *Neurochem Res.* 36:668-676.
- Nagata, Y., Horiike, K., Maeda, T. (1994) Distribution of free D-serine in vertebrate brains. *Brain Research*. 634:291-295.
- Narkewicz, M. R., Thureen, P. J., Sauls, S. D., Tjoa, S., Nikolayevsky, N. and Fennessey, P. V. (1996) Serine and glycine metabolism in hepatocytes from mid gestation fetal lambs. *Pediatr. Res.* 39, 1085–1090
- Neidle, A., Dunlop, D. S. (1990) Developmental changes of free D-aspartic acid in the chicken embryo and in the neonatal rat. *Life Sciences*. 46:1517-1522.
- Nicholls, D., Attwell, D. (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci.* 11(11):462-8.

- Nicoll, R. A., Roche, K. W. (2013) Long-term potentiation: peeling the onion. *Neuropharmacology*. 74:18-22.
- Nottebohm F. 2004. The road we travelled: Discovery, choreography, and significance of brain replaceable neurons. *Ann N Y Acad Sci* 1016:628 –658.
- Papouin, T., Ladepeche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J., Oliet, S. H. R. (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell*. 150:633-46.
- Rosenberg, D., Artoul, S., Segal, A. C., Kolodney, G., Radzishevsky, I., Dikopoltsev, E., Foltyn, V. N., Inoue, R., Mori, H., Billard, J., Wolosker, H. (2013) Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity. *The Journal of Neuroscience*. 33(8):3533-3544.
- Sato, K., Yoshida, S., Fujiwara, K., Tada, K. and Tohyama, M. (1991) Glycine cleavage system in astrocytes. *Brain Res*. 567, 64–70
- Schell, M. J., Molliver, M. E., Snyder, S. H. (1995) D-Serine, an endogenous synaptic modulator: Localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:3948-3952.
- Schell, M. J., Brady, R. O. Jr., Molliver, M. E., Snyder, S. H. (1997b) d-Serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience*. 17:1604-1615.
- Schlett, K. (2006) Glutamate as a Modulator of Embryonic and Adult Neurogenesis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 6:949-960.
- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Bostrom E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, et al. 2013. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153:1219 –1227.
- Sultan, S., Gebara, E. G., Moullec, K., Toni, N. (2013) D-serine increases adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*. 7:155.
- Snell, K. (1984) Enzymes of serine metabolism in normal, developing and neoplastic rat tissues. *Adv. Enzyme Regul*. 22, 325– 400
- Smith, Q. R., Momma, S., Aoyagi, M. and Rapoport, S. I. (1987) Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J. Neurochem*. 49, 1651–1658
- Taylor, C. J., He, R., Bartlett, P. F. (2014) The role of the N-methyl-D-aspartate receptor in the proliferation of adult hippocampal neural stem and precursor cells. *Science China Life Sciences*. 57(4):403-411.

Topo, E., Soricelli, A., Di Maio, A., D'Aniello, E., Di Fiore, M. M., D'Aniello, A. (2010) Evidence for the involvement of D-aspartic acid in learning and memory of rat. *Amino Acids*. 38:1561-1569.

Tsumoto, T. (1990) Excitatory amino acid transmitters and their receptors in neural circuits of the cerebral neocortex. *Neuroscience Research*. 9:79-102.

Világi, I. es Tarnawa, I. (2013) *Neurokémia. Dem-Dialóg Campus Kiadó, Budapest - Pécs*

Wang H, Wolosker H, Morris JF, Snyder SH, Selkoe DJ (2002) Naturally occurrence free D-aspartate is a nuclear component of cells in the mammalian hypothalamus–neurohypophyseal system. *Neuroscience* 109:1–4

Watkins, J. C. (2000) L-Glutamate as a Central Neurotransmitter: Looking Back. *Biochemical Society Transactions*. 28(4):297-310.

Waziri, R., Wilson, R. and Sherman, A. D. (1983) Plasma serine to cysteine ratio as a biological marker for psychosis. *Br. J. Psychiatry* 143, 69–73

Wilkinson, R. J., Nicholls, D. G. (1989) Compartmentation of glutamate and aspartate within cerebral cortical synaptosomes: evidence for a non-cytoplasmic origin for the calcium-releasable pool of glutamate. *Neurochem. Int.* 15(2): 191-197.

Wolosker, H., Sheth, K. N., Takahashi, M., Mothet, J., Brady, R. O. JR., Ferris, C. D., Snyder, S. H. (1999) Purification of serine racemase: Biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:721-725.

Wolosker, H. (2011) Serine racemase and the serine shuttle between neurons and astrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1814:1558-1566.

Yamane, H., Asechi, M., Tsuneyoshi, Y., Kurauchi, I., Denbow, D. M., Furuse, M. (2009) Intracerebroventricular injection of L-aspartic acid and L- asparagine induces sedative effects under an acute stressful condition in neonatal chicks. *Animal Science Journal*. 80:286-290.

Yang, C. R., Svensson, K. A. (2010) Allosteric modulation of NMDA receptor via elevation of brain glycine and D-serine: The therapeutic potentials for schizophrenia. *Pharmacology & Therapeutics*. 120:317-332.

Yon, M. A., Mauger, S. L., & Pickavance, L. C. (2013). Review Article Relationships between dietary macronutrients and adult neurogenesis in the regulation of energy metabolism *British Journal of Nutrition*, 1573–1589.

Zachar, G., Wagner, Z., Tabi, T., Balint, E., Szoko, E., Csillag, A. (2012) Differential Changes of Extracellular Aspartate and Glutamate in the Striatum of Domestic Chicken Evoked by High Potassium or Distress: An In Vivo Microdialysis Study. *Neurochemical Research*. 37:1730-1737.

## **10. Köszönetnyilvánítás**

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Zachar Gergelynek, hogy bevezetett az agykutatás és a laborban végzett munka világába, és egyébként is szűkös idejéből rengeteget áldozott arra, hogy az én munkámat segítse. Olyan tapasztalatokat szereztem, melyek végigkísérnek majd biológus pályafutásom során, és ezért hálás vagyok.

Nagyon köszönöm Nyámándy Pirosnak, hogy mindent megtanított a laborban használt eszközökről, segített a munkámban, és bármilyen kérdésem volt, nyugodtan fordulhattam hozzá.

Szeretném megköszönni Udvardy Szabinának és Wéber Katalinnak, hogy nem csak besegítettek a munkámba, de gondoskodtak a jó társaságról és a vidám légkörről a laborban.

Köszönöm Csonka Diánának a szakdolgozat írásában nyújtott segítséget és a jótanácsokat.

És végül köszönöm szüleimnek és családomnak, hogy tanulmányaim során mindig támogattak, nem csak anyagilag, de bátorító szavakkal is, köszönöm barátnőmnek, Andinak, hogy türelmes volt és velem volt a gondterheltebb időszakban is, és köszönöm barátaimnak, akik mindig ott voltak nekem, amikor szükségem volt az ösztönzésre és a támogatásra.

**HuVetA - SZIA**  
**ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\***

**Név:** Gáspár Gábor

**Elérhetőség (e-mail cím):** gaspgabor@gmail.com

**A feltöltendő mű címe:** A D-aszpartát és a D-szerin hatása a gliagenezisre

**A mű megjelenési adatai:** Budapest, 2016

**Az átadott fájlok száma:** 1

---

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA és a SZIA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédtett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA és a SZIA egynél több (csak a HuVetA és a SZIA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrészt mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel):**

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban/SZIA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- a Szent István Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a SZIE Állatorvos-tudományi Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

\* Jelen nyilatkozat az 5/2011. számú, *A Szent István Egyetemen folytatott tudományos publikációs tevékenységgel kapcsolatos adatbázis kialakításáról és alkalmazásáról* című rektori utasításhoz kapcsolódik, illetve annak alapján készült.

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA/SZIA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban/SZIA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2016. év 04. hó 28. nap

---

aláírás  
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

---

*A **HuVetA** Magyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgálta, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

*A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- az Állatorvos-tudományi Kar és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- a nyílt hozzáférés támogatása.*

*A **SZIA** Szent István Archívum a Szent István Egyetemen keletkezett tudományos dolgozatok tára.*