

Zárójelentés az

„Újabb terápiás lehetőségek a Huntington kór állatmodelljében”

című,

F **43306** számú pályázathoz

Dr. Klivényi Péter

Szegedi Tudományegyetem

Neurológiai Klinika

2007

Előzmények:

A Huntington kór egy autoszómális domináns öröklődésű neurodegeneratív kórkép. A betegség általában 40 éves kor körül kezdődik, viselkedészavarral, memóriazavarral, majd az akaratlan choreiform mozgászavar is megjelenik, általában 15 év alatt, halálhoz vezet. 1993-ban igazolták a betegséget okozó gént. A gén normál funkciója nem ismert. Az adatok arra utalnak, hogy a fehérje nem elveszti normális funkcióját, hanem egy új, toxikus funkciót nyer (funkciónyeréses mutáció). A mutációt tartalmazó exon 1 beültetése egérbe (transzgen) nagyon súlyos kórképet idéz elő, amely sok tekintetben hasonlít a humán Huntington kórra. Az állatok fejlődése látszólag normálisan zajlik 12 hetes korukig, majd észrevehetően remegni kezdenek, abnormális testtartásuk lesz, amikor farkuknál fogva megemeljük őket. Ehhez a későbbiekben progresszív súlyvesztés és mozgásszegénység is társul. Az állatok általában 16-20 hetesen meghalnak. A huntingtin elleni ellenanyaggal végzett immunhisztokémiai vizsgálat diffúzan az idegrendszer minden területén intranukleáris zárványokat mutat. A zárványképződés már 6 hetes korban elkezdődik. Ezek a zárványok, egy kivétellel általánosan jellemzők az trinukleotid repeat betegségekre. Hasonló zárványok észlelhetők a humán posztmortem agyszövetben is. Ez a modell kiváló lehetőséget nyújt különböző vegyületek hatásának vizsgálatára. Eddig számos különböző hatásmechanizmusú anyaggal végeztek vizsgálatokat, amelyek csak átlagban 7-20 nappal javították az állatok túlélését, amely kb. 8-20% élettartam növekedésnek felel meg. Ezért továbbra is szükség van új anyagok, kombinációk tesztelésére. Munkánk célja az volt, hogy a Huntington kór genetikai állatmodelljében potenciálisan hatásos szereket vizsgáljunk. Hatékonysági mutatóknak az állatok túlélését, a magatartás változását, a súlyvesztés csökkenését, a striatális sejtpusztulás és az oxidatív károsodás csökkenését tekintjük.

A transzgenetikus modell mellett egyéb neurodegeneratív modelleket is tanulmányozunk. Ezeket a modelleket különböző neurotoxinok meghatározott séma szerinti intraperitoneális adásával idézünk elő. A mitokondriális komplex I gátló MPTP-t Parkinson kór, a komplex 2 gátló 3 nitropropionsav Huntington kór, míg a komplex IV gátló azid Alzheimer kór modellezésére szolgál. Munkánk során, ezekben a modellekben is vizsgáljuk a feltételezhetően neuroprotektív hatású szereket. A hatékonysági mutatóknak a magatartásváltozást, a sejtpusztulás mértékét, ill. az oxidatív károsodás csökkenését választottuk.

Vizsgálati módszereink:

A túlélés/élettartam mérése

Az állatok ellenőrzése naponta történt. Azt a napot, amelyen az állat elpusztult, tekintettük a halál napjának. Az élettartamot az ismert születési idő és a halál napja alapján számítottuk. Az adatok ábrázolásakor a csoportok átlagos élettartamát tüntettük fel. Ebben a modellben az átlagos élettartam kezelés nélkül 90-110 nap között szokott változni (átlag 100 nap).

A motoros teljesítmény mérése:

Az állatoknál kb. 10-12 hetes korukban egész testükre kiterjedő remegés, majd mozgászavar alakul ki, amely leginkább ataxiához hasonlatos (szélesebb alapú, bizonytalan, ingatag a járásuk). Későbbi stádiumban már alig mozognak, legtöbbször csak a ketrechen mozdulatlanul fekszenek. A motoros rendszer vizsgálatára open-field apparátust, használtunk, amelyben az állatok spontán lokomotoros aktivitását, szorongását, valamint a sztereotip mozgások változását is nyomon tudtuk követni. Az egereket hetente egy alkalommal, mindig azonos napon és időben vizsgáltuk. A módszerrel meg lehetett állapítani a betegség motoros tüneteinek kezdetét is.

A sejtpusztulás és az aggregátumok számának mérése

Amennyiben az élettartam vizsgálatok hatásos szert találtunk, akkor az állatok egy másik csoportját 16 hetes korukig az adott szerrel kezeljük. Az adott időpontban transzkardiálisan perfundáljuk, és anti-huntingtin antitesttel, immunhisztokémiai módszerrel hasonlítottuk össze az aggregátumok számát a kezelt és a kezeletlen csoportban. A sejtpusztulás megítélésére hematoxin festést használtunk.

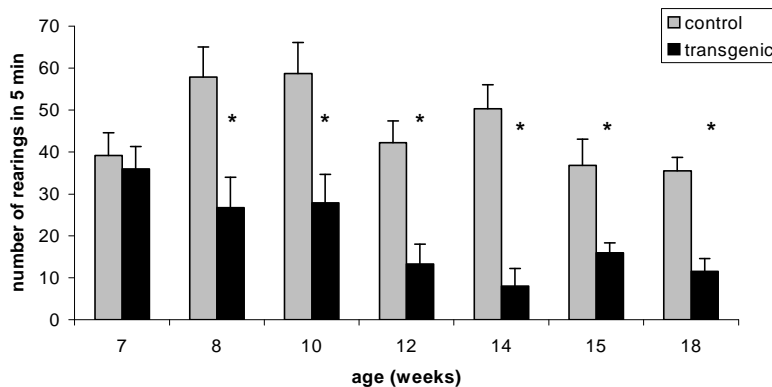
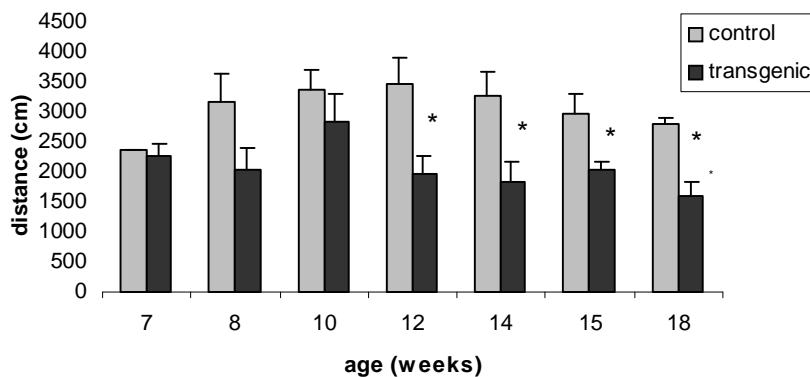
Eredmények:

Mivel a transzgenetikus kolónia megalapítását a Jackson Laboratories szaporítási gondjai miatt csak késve és kevés állattal tudtuk elkezdni, a pályázati periódus első két évében nem volt lehetőségünk terápiás vizsgálatra. Ezért a pathomechanizmus vizsgálatát kezdtük el.

Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy az állatok motoros aktivitása, hogyan változik az élettartamuk során. Ezért a kontroll és a transzgenetikus állatokat 7 hetes koruktól

kezdődően 18 hetes korukig teszteltük open field rendszerben. Azt találtuk, hogy a transzgenetikus állatok motoros aktivitása 12 hetes koruktól kezdődően progresszíven romlott, míg az exploratív magatartásuk már 8 hetes korban szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest. Ez arra utal, hogy a jól ismert motoros tüneteket jóval megelőzi egy magatartás-változás (1. ábra).

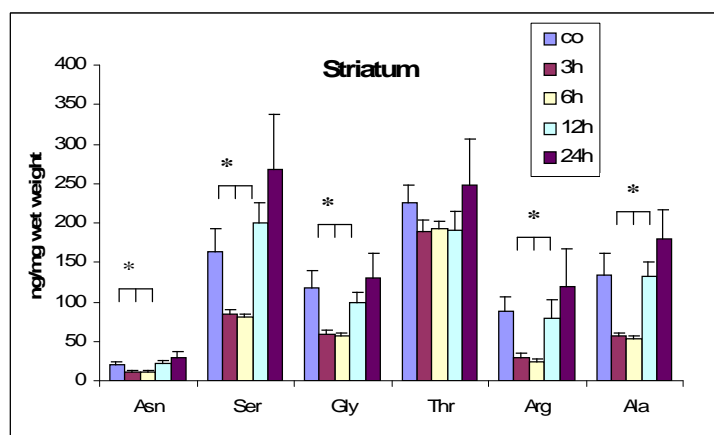
Eredményeiket a Behavioural Brain Research-ben közzétették, valamint a 2005 évi Berlini Nemzetközi Parkinson Kongresszuson számoltunk be róluk.



1. ábra

Az excitotoxicitás vizsgálatára vizsgáltuk a neuroaktív aminosavak szintjét Huntington kór toxin modelljében. Az neurotranszmitter ill neuromodulátor jellegű aminosavak (Asp, Asn, Ser, Gly, Thr, Arg, Ala, Tau és GABA) szintje szignifikánsan alacsonyabb Huntington kór ill. Parkinson kór toxinmodelljében. Ez az aminosav szint csökkenés a toxin adagolása után 12 ill. 24 óra elteltével spontán szinte teljesen rendeződött (2. ábra).

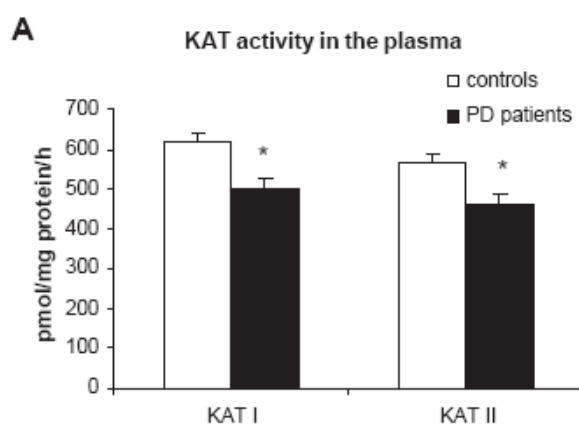
Eredményeiket a Neurochemical Research-ben közzétették, valamint a 2006 évi washingtoni Parkinson Világkongresszuson számoltunk be róluk.



2. ábra

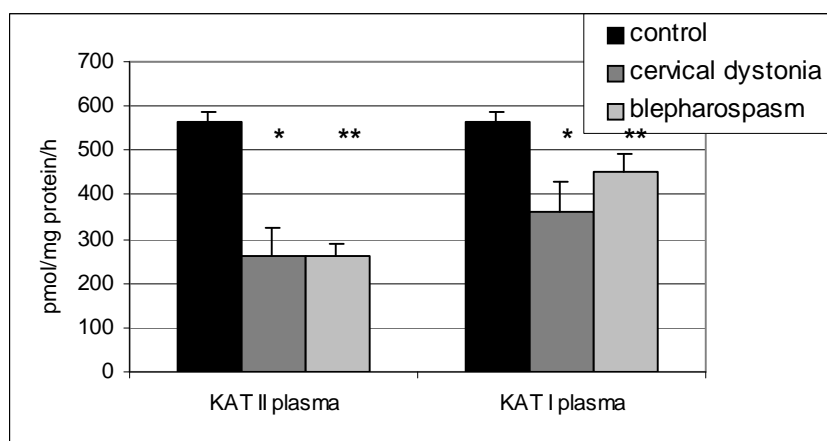
A kinurénsav metabolizmusának vizsgálatára Parkinson kóros betegek vérében tanulmányoztuk a kinurénsav aminotranszferáz (KAT) enzimet és a kinurénsav szintjét. A betegek plazmájában a KAT izoenzimek aktivitása, valamint a kinurénsav szintje is alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban (3. ábra).

Eredményeiket a Journal of Neurological Sciences-ben közzétük.



3. ábra

A kinurénsav metabolizmus vizsgálatára a szintén mozgászavarok csoportjába tartozó fokális dystóniákban tanulmányoztuk a vér KAT aktivitását és kinurénsav szintjét. A plazma KAT izoenzimek aktivitása csökkent a betegekben, míg a kinurénsav szintje nem változott (4. ábra). Az eredményeinket a Medicinal Chemistry-ben közzétük.



4. ábra

Az agyspecifikus tubulin polymerization promoting protein TPPP/p25 protein expressziója nem mutatható ki a transzgenetikus egerekben (Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézet, Neuropathológiai Laboratóriumával együttműködve (dr. Kovács G. Gábor). Az eredmények feldolgozása és interpretálása folyamatban van.

A glükolízis vizsgálata során transzgenetikus állatokban a GAPDH aktivitása jelentősen lecsökkent, ellenben az ATP szint jelentősen megemelkedett. Ennek a látszólagos ellentmondásnak további vizsgálata folyamatban van (SZBK Enzimológiai Intézetében Prof. Dr. Ovádi Judittal együttműködve).

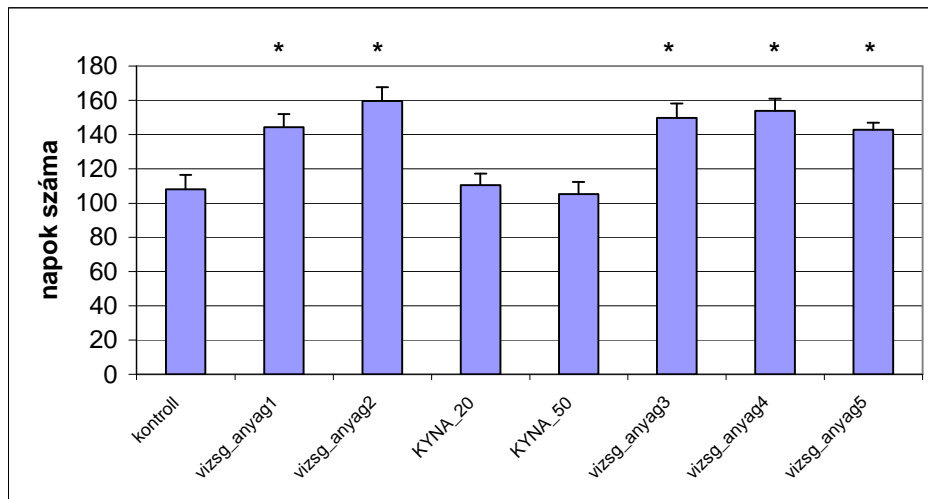
A pályázati periódus második két évében elegendő állatot tudunk szaporítani terápiás vizsgálatok elindításához. Azokban az esetekben, ahol a vizsgálati szereknek neuroprotektív hatását találtuk szabadalmaztatási eljárást elindítottuk. Ezért szerek nevét és kémiai összetételét jelenleg nem adhatjuk meg, így csak sorszámozva hivatkozunk rájuk.

Egy antioxidáns hatású vizsgálati szer (vizsgálati anyag 1) valamint egy organikus sav transzporter gátló szer (vizsgálati anyag 2) szignifikánsan növelte az állatok túlélését, valamint késleltette a betegség kialakulását. A neuroprotektív hatás szövettani alátámasztása folyamatban van.

Egy proteáz inhibitor (vizsgálati anyag 3), egy antipszichotikum (vizsgálati anyag 4) valamint antioxidáns hatású organikus sav (vizsgálati anyag 5) is szignifikánsan növelte az állatok túlélését, valamint késleltette a betegség kialakulását. Ezen szerek esetén a szövettani vizsgálatra jelenleg még nincs elegendő állatunk.

A kinurenine adagolásnak nem találtunk neuroprotektív hatását (5. ábra).

Az eredmények közzlése a szabadalmi eljárás befejeződése után lehetséges.



5. ábra

További anyagokkal is folytatunk vizsgálatokat, így egy antihisztamin hatású és egy hiszton deacetiláz hatású molekulával is folytatunk vizsgálatokat. Ugyancsak tervezzük a szintetikus kinurénsav analógokkal való terápiás vizsgálatokat is.

Összefoglalás: A vizsgálati tervhez képest a terápiás vizsgálatokat csak késve tudtuk elkezdni a szaporítási problémák miatt. A program második felében azonban sikerült több hatásos szert találni, valamint a pathomechanizmus vonatkozásában is értünk el új eredményeket.