

## EREDETI KÖZLEMÉNY

# A deprenyl és származékai a neuroprotekciónban

Szilágyi Géza, Simon László, Gál Anikó, Wappler Edina Amália, Skopál Judit, Magyar Kálmán, Nagy Zoltán

**Bevezetés** – A (-)-deprenyl (selegilin) sejtvédő hatása jóval kisebb koncentrációban érvényesül, mint a MAO-B-gátló hatás. Ezt a sejtvédő hatást patkány-stroke modellben már bizonyították. A deprenyl további hatása a mitochondrium-membrán-stabilizálás és a szabadgyök-termelés csökkentése, ami a sejtvédő hatásban játszhat szerepet. A korábbi vizsgálatok alapján továbbra sem tudható pontosan, hogy a deprenyl vagy valamelyik metabolitja-e az aktív szer. Ezért a deprenyl és egy újabban szintetizált deprenylmetabolit, a deprenyl-N-oxid (DNO) hatását vizsgáltuk.

**Anyag és módszer** – A deprenyl és a deprenyl-N-oxid nagyon kis koncentrációit vizsgáltuk PC-12 sejttenyészetben, patkány agyi ischaemia modelljében és mongol futóegér kétoldali, rövid idejű carotisleszorításos modelljében. A PC-12 sejttenyészetben a sejtpusztulást propidium-jodid festéssel, a szabad gyökök szintjét cérium-klorid festéssel, a mitochondrium-transzmembrán-potenciált JC-1 festéssel határoztuk meg. Patkány és futóegér agyi metszeteken TUNEL/kaspáz-3 festéssel mértük az apoptotikus sejtek arányát. A vizsgálatokhoz Nikon/BIORAD konfokális mikroszkópot használtunk.

**Eredmények** – Mindkét molekula a hypoxia-reoxigenizációs modellben szignifikánsan csökkentette a sejtpusztulást, a szabad gyökök termelését, és stabilizálta a mitochondrium-transzmembrán-potenciált. A patkány stroke-modelljében a deprenyl csökkentette a kialakult károsodás nagyságát és a penumbrarégióban az apoptotikus sejtek számát, míg a deprenyl-N-oxid a futóegérmodellben a CA2 hippocampalis területben szignifikánsan csökkentette az apoptózis mértékét.

**Következtetés** – Mindkét szer képes csökkenteni az átmeneti hypoxia vagy ischaemia károsító hatását. Vizsgálatainkból arra következtetünk, hogy a deprenyl-N-oxid lehet az aktív molekula, amely a sejtvédő hatásért felelős.

deprenyl, apoptózis, stroke, mitochondrium

## Deprenyl and its metabolites in neuroprotection

**Background and aims** – (-)-Deprenyl (selegiline) possesses cyto-protective effect in a much lower concentration, than it is needed to inhibit MAO-B activity. This cyto-protective effect was demonstrated in the rat stroke. The stabilization of mitochondrial membrane and a decrease of reactive oxygen species (ROS) are the other consequences of (-)-deprenyl treatment, which may interfere with the cell death process. However, it is not clear, that (-)-deprenyl or its metabolites are responsible for protection in the hypoxic/ischemic conditions. Because of that reason we tested the possible cyto-protective effect of deprenyl and deprenyl-N-oxid (DNO), recently synthesized as a naturally according (-)-deprenyl metabolite.

**Material and methods** – Deprenyl and DNO in a very low dose was tested in PC-12 cell culture after hypoxia and in rat permanent stroke model and in gerbils after transient occlusion of bilateral common carotid artery. In PC12 culture the cell death was visualized by PI staining. The level of reactive oxygen species was measured by the Cerium method, and the mitochondrial membrane integrity was labeled by JC1 staining. Apoptotic neurons were counted on formaldehyde fixed rat and gerbil brain slices after TUNEL and caspase-3 immune-staining - NIKON/BIORAD confocal microscope was used for the quantitative analysis.

**Results** – Deprenyl and DNO treatment significantly decreased the cell death in PC12 cultures after hypoxia and increased the mitochondria transmembrane potential ( $D\Psi_m$ ) and decreased ROS production. This effect was dose dependent. The cyto-protective effect was demonstrated in the rat stroke model, where the lesion size and the number of apoptotic neurons in the penumbra region were decreased. In the CA2 regions of gerbil hippocampus, we found significantly less apoptotic neurons than in the untreated controls.

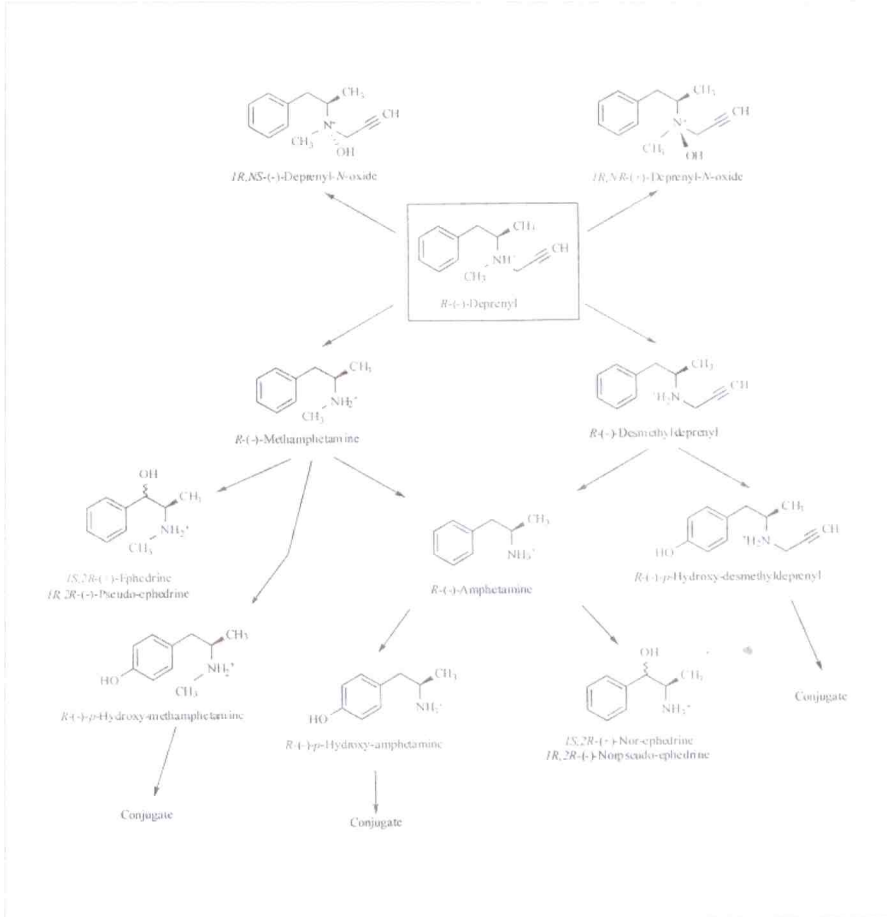
**Conclusion** – Transient hypoxia or ischemia induced cell damage could be diminished by deprenyl and DNO. The DNO, a (-)-deprenyl metabolite is an active cell protective molecule. It has a perspective as a new drug candidate in the strategy of cyto-protection (neuroprotection).

deprenyl, apoptosis, stroke, mitochondria

dr. Szilágyi Géza (levelező szerző/correspondent):  
Állami Egészségügyi Központ, Neurológiai Osztály;  
H-1134 Budapest, Róbert Károly krt. 44.  
E-mail: szilagyi@radi.sote.hu

Gál Anikó, dr. Wappler Edina Amália, dr. Skopál Judit,  
dr. Nagy Zoltán: Semmelweis Egyetem, Ér- és Szívsebészeti Klinika,  
Vascularis Neurológiai Tanszéki Csoport, Budapest;  
dr. Simon László: Richter Gedeon Rt., Budapest  
dr. Magyar Kálmán: Gyógyszerhatástani Intézet, Semmelweis  
Egyetem, Budapest;

A deprenylt (fenil-izopropil-metil-propargylamin) 1962-ben szintetizálták először. 1965-ben írták le először MAO-gátló hatását, majd később pontos mérések bizonyították, hogy szelektíven és irreverzibilisen gátolja a MAO-B enzimet (1, 2). Klinikai alkalmazása során ezt a hatását használják ki a Parkinson-kórban szenvedő betegek kezelésére. A deprenylt a betegség korai szakaszában alkalmazva a levodopa-kezelés kezdete későbbre toódik, csökken a szükséges dózisa és mérséklődik a tünetek fluktuációja (3).



1. ábra. A deprenyl metabolizmusa és a főbb metabolitok

A betegség kezelésére 5-10 mg/nap dózisban alkalmazták, ez nemcsak a nigro-striatalis rendszerben okoz dopaminhatást, hanem a mesolimbicus, tuberohipofysealis és a kemoszenzitív triggerzónában is, mely rendszerek a mellékhatásokért lehetnek felelősök (4).

A deprenyl gyorsan **metabolizálódik** a szervezetben. Az 1. ábrán láthatjuk a fő metabolitokat, amelyek két enzimszerepen keresztül alakulnak ki. A fő útvonal a **citokróm P450 enzim**en keresztüli dezalkiláció. Ebből a reakcióból keletkezik a metamfetamin (MA), amfetamin (A) és dezmetil-deprenyl (DD) (5). A másik metabolikus útvonal a flavintartalmú **mono-amino-oxidáz** enzim, amelyből a pár éve felfedezett és szintetizált deprenyl-N-oxid (DNO) keletkezik. Ez a metabolikus útvonal a korábbi HPLC-módszerek hibája miatt maradt rejtve, mivel acil reagenst használva a deprenyl-N-oxid gyorsan átalakul metamfetaminná és dezmetil-deprenyllé, és így nem lehetett kimutatni.

A deprenylről először 1984-ben írták le, hogy az 1-metil-4 fenil-1,2,3,6-tetrahidro-piridin (MPTP/MPP+) toxikus hatását csökkenti azáltal, hogy a MAO-B-n keresztül az MPTP/MPP+ átalakulást gátolja (6). Későbbi vizsgálatban az MPP+ direkt toxikus hatását is sikerült gátolni deprenyllal; ez már MAO-B-független hatás lehet, bár az irodalom ellentmondásos ezen a téren (7). A deprenyl és egyes metabolitjainak hatását először DSP-4 noradrenalinerg neuronok szelektív

toxinjával végzett kísérletek alapján vizsgálták. Ezek szerint a deprenyl szignifikánsan csökkenti a DSP-4 károsító hatását, viszont ez a hatás SKF525A jelenlétében - amely a P450 enzimszere gátlója - megszűnik. Ez felveti, hogy a deprenyl metabolitjainak potenciózó hatásuk van (8). Felmerült a kérdés, hogy a deprenyl vagy valamelyik metabolitja-e az aktív neuroprotektív hatású molekula? 2002-ben *Tatton* PC-12 sejttenyészetben azt találta, hogy a dezmetil-deprenyl az aktív neuroprotektív metabolit (9). Ennek ellentmond *Magyar* és munkatársainak humán melanomasejteken végzett vizsgálata, amelynek során kizárólag a deprenyl kis koncentrációjánál találtak antiapoptotikus hatást (10).

A kutatások szerint a deprenyl antiapoptotikus hatása bifázisos természetű: nagy koncentrációban ( $10^{-3}$  M) pro-, kis koncentrációban ( $10^{-9}$ - $10^{-13}$  M) antiapoptotikus hatású (9, 10, 11). Az antiapoptotikus hatást

többféle mechanizmussal magyarázzák. PC-12 sejtkultúrában igazolták, hogy a deprenylkezelés a szérummegvonás, illetve NGF-megvonás után  $10^{-9}$  M koncentrációban kivédte a mitochondrium DΨm-csökkenését (12). Ezen túl a deprenyl több mint 50 gén expressziós változását eredményezi (13). Csökkenti a proapoptikus proteinek (BAX, c-JUN, c-FOS, GAPDH, glutation-peroxidáz, stb.) szintjét, míg emeli a túlélést javító fehérjék (Bcl-2, Bcl-XL, SOD1, SOD2, katalázok, HSP70, stb.) szintjét. A jelenleg elfogadott elmélet szerint a deprenyl sejtvédő hatását az MPTP mitochondriális csatorna szabályozásában résztvevő gének és antioxidáns hatású fehérjék expressziós változtatásán keresztül fejt ki.

Vizsgálatainkban a deprenyl és a deprenyl-N-oxid hatását vizsgáltuk PC-12 sejttenyészetben és állatkísérleti stroke-modellben.

## Módszerek

### Állatkísérletek

A kísérletek során 320-460 g testtömegű hím Wistar patkányokat, 40-60 g tömegű hím mongol futóegereket használtunk. Az állatokat az Európai Unió megfelelő rendelkezéseivel összhangban tartottuk és kezeltük.

**A. cerebri media permanens oclusiója patkányban:** A kísérleti állatok 320-460 g testtömegű hím Wistar

patkányok voltak. A pMCAO kivitelezéséhez standardizált technikát használtunk (14)).

**A. carotis interna kétoldali átmeneti lekötése egéren:** A kísérleti állatok 40-60 g testtömegű hím mongol futóegerek voltak. A *Nakanishi* által 1994-ben leírt technika alapján végeztük a műtéteket (15).

### PC-12 sejtenyészet

PC-12 (ATCC, Manassas, VA, USA) sejteket DMEM tápoldatban tenyésztettünk. A sejteket 24 lyukú tenyésztőlemezre helyeztük, a lyukak átmérője 15 mm volt. Minden lyukba patkányfarokból izolált kollagénnel bevont kerek üveglemezt helyeztünk, erre növesztettük rá a sejteket (16). A PC-12 tenyészetet NGF-kezeléssel differenciáltattuk öt napig.

**Hypoxia-reoxigenizáció PC-12 sejtenyészetben:** A 24 lyukú edényben tenyésztett sejtek fölé argon gázt rétegeztünk, így elvonva az oxigént (17). A hypoxiát követően az argon gázt eltávolítottuk a tenyészetéről, majd 24 órára normál termosztátba helyeztük, ez volt a reoxigenizációs időszak.

### TTC-festés

A patkányok agyát eltávolítottuk, felszeleteltük, majd a károsodott szövetek térfogatának méréséhez a 2 mm vastag, friss agyszeleteket 2,3,5-triféniltetrazólium-klorid reakcióval (TTC-módszer) megfestettük (18). Ezt követően a TTC-vel festett agyszeleteket lefényképeztük, a fényképeket digitalizáltuk, majd a lézió területét az egyes agyszeletekben számítógépes morfometria segítségével határoztuk meg.

### Propidium-jodid festés

A 24 órás reoxigenizáció után a sejtekről eltávolítottuk a tápoldatot, majd 1,5 mg/ml-es koncentrációjú propidium-jodid oldattal két percig festettük. A sejtpusztulás mértékét százalékos értékben adtuk meg, az összes leszámolt sejthez képest.

### Immunhisztokémia

**TUNEL/kaspáz-3 festés:** A 10%-os paraformaldehidben való fixálás, valamint paraffinba való beágyazás után 6  $\mu$ m-es metszeteket készítettünk a kísérleti állatok agyából. Minden állatból a hippocampusról 4 db 1 mm távolságú síkban 3-3 metszetet készítettünk. Az infarktus körüli régióban található apoptotikus sejtek azonosításához a törött DNS-végeket fluoreszcens TUNEL kit segítségével jelöltük meg. Ezzel egyidejűleg kaspáz-3 primer antitesttel 1:500-as hígításban és Alexa 568 másodlagos antitesttel 1:200-as hígításban fluoreszcens immunhisztokémiát is végeztünk.

**PBR immuncitokémia:** A PBR-receptor-denzitás meghatározására immunfestést használtunk a PC-

12-sejteketben. Anti-PBR elsődleges antitesttel (nyúlban termelt anti-PBR antitest) egy óráig festettünk 1:500-as hígításban, majd PBS-lemosás után az FITC jelölésű másodlagos fluoreszcens antitesttel (kecske anti-nyúl-IgG FITC) kezeltük a sejteket 1:200-as hígításban.

### Szabadgyök-festés és a mitochondrium-transzmembrán-potenciál meghatározása PC-12-sejteketben

A két festési módszert módosítottuk és egy közös módszert hoztunk létre (19, 20). A korábban kidolgozott módszerekkel jól mérhetjük a ROS (szabad gyök) mennyiségét, de egyik sem ad megfelelő képet a ROS sejten belüli eloszlásáról. Az utóbbi években, a konfokális lézer szkennning mikroszkópia elterjedésével új ROS-kimutatási módszerre nyílt lehetőség. A cérium-klorid- ( $\text{CeCl}_3$ -) molekula a külső elektronhiány miatt a külső elektron miatt rendkívül könnyen reakcióba lép a szabad gyökökkel. Ebből a reakcióból cérium-perhidroxid-molekula keletkezik, amely fényvisszaverő tulajdonságú, oldhatatlan csapadék (21, 22, 23). Ez a fényvisszaverő tulajdonság használható ki a CLSM reflexiós üzemmódjában. Ezt a módszert egészítettük ki egy másik mitochondriális modalitással, az MMP mérésével.

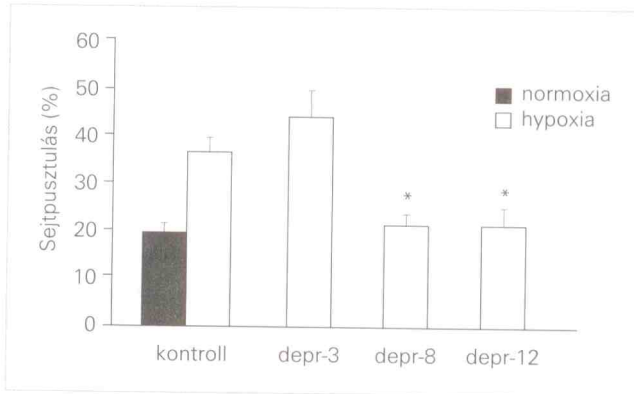
### Konfokális lézerszkennning mikroszkópia

Vizsgálataink nagy részében fluoreszcens festési módszert használtunk. Ennek a detektálására konfokális lézer szkennning mikroszkópot használtunk, amely egy Nikon OPTIPHOT mikroszkópra telepített (Donsanto Corp., Nattick, Massachusetts) BIO-RAD MRC 1024 konfokális rendszer (Bio-Rad Corp., Hertfordshire, England).

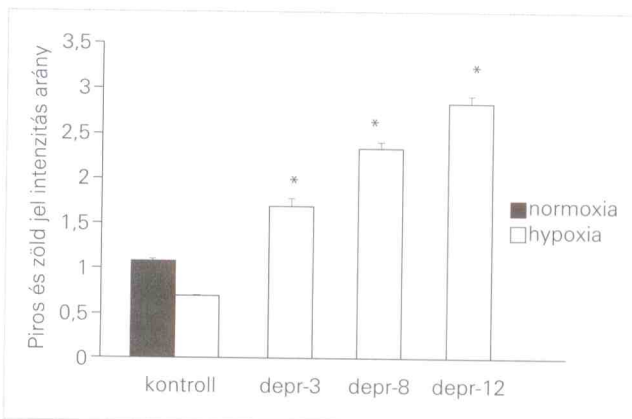
**Képkalkotás a PC-12 sejtenyészetben:** A vizsgálatok során PC-12 sejtenyészetben JC-1- és  $\text{CeCl}_3$ - (kettős) festést és PBR-immunfestést mértünk konfokális mikroszkóppal. Általános szabályként alkalmaztuk, hogy az összes méréshez használtunk saját kontrollcsoportot, a mért értékeket ehhez viszonyítottuk. Ezzel elkerülhető a szabad gyök és a mitochondrium-membránpotenciál mérésénél a más-más napon használt tenyészetekben feltételezhető eltérésekből származó hiba (annak ellenére, hogy a tenyésztés, a kezelés és a festési eljárások standard módon folytak). A különböző mérési beállításokat rögzítettük, és mérés közben nem változtattunk rajta.

A kvantitatív elemzéshez nagy felbontású (820x) képeket készítettünk. Minden mérési csoportban véletlenszerűen 100-100 sejtet fotóztunk le, majd egy beépített szoftver (LaserSharp Processing, Bio-Rad Corp., Hertfordshire, England) segítségével a sejtekben mért átlagintenzitást határoztuk meg.

**Képkalkotás szövettani metszetben:** A szövettani metszeteken - mind a patkány-, mind az egérkísérletekben - TUNEL/kaspáz-3 immunfestést használ-



2. ábra. Deprenylkezelés egyórás hypoxia után. A sejtpusztulást PI-festéssel határoztuk meg 24 órás reoxigenizáció után (átlag $\pm$ SEM,  $p < 0,05^*$ )



3. ábra. Deprenylkezelés egyórás hypoxia után. A mitochondriális transzmembrán-potenciált JC-1 festéssel (piros és zöld jel aránya) határoztuk meg 24 órás reoxigenizáció után (átlag $\pm$ SEM,  $p < 0,05^*$ )

tunk 6  $\mu$ m vastag fixált metszeteken. Az egyidejű képképzésnél a TUNEL-festés zöld jelet adott a FITC fluoreszcens festés miatt, míg a kaspáz-3 esetén piros jelet kaptunk az Alexa 568-as másodlagos antitest miatt.

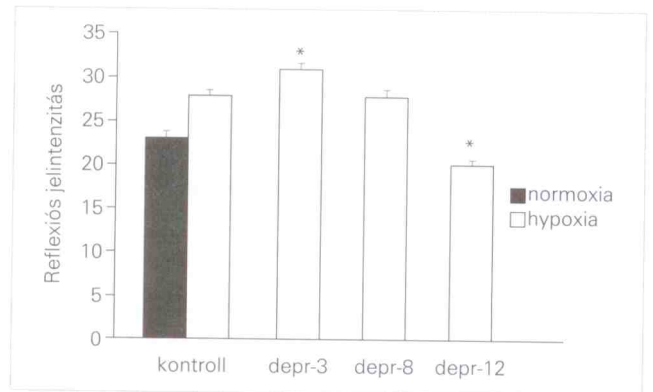
## Eredmények deprenyllel

### Sejtbológiai mérések

**A deprenyl hatása a sejtpusztulásra.** A normoxiás kontrollcsoportban a sejtpusztulás  $19,5 \pm 2,18\%$ , ami a hypoxiát követően  $36,6 \pm 3,25\%$ -ra növekedett (2. ábra). A deprenylkezelés  $44,2 \pm 5,78\%$ ,  $21,5 \pm 2,33\%$  és  $21,4 \pm 3,97\%$ -ra csökkentette a károsodás mértékét ( $10^{-3}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-12}$  M-os koncentrációban). A változás a  $10^{-8}$  és a  $10^{-12}$  M-os csoportban volt szignifikáns.

**A deprenyl hatása a mitochondriális membránpotenciálra (MMP).** A normoxiás kontrollcsoportban az MMP  $1,07 \pm 0,02\%$ , ami a hypoxiát követően  $0,68 \pm 0,01\%$ -ra csökkent (3. ábra).

A deprenylkezelés  $1,68 \pm 0,09\%$ ,  $2,33 \pm 0,07\%$  és



4. ábra. Deprenylkezelés egyórás hypoxia után. A ROS-termelést  $\text{CeCl}_3$ -festéssel határoztuk meg 24 órás reoxigenizáció után (átlag $\pm$ SEM,  $p < 0,05^*$ )

$2,83 \pm 0,1\%$ -ra változtatta a piros-zöld jel arányát ( $10^{-3}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-12}$  M-os koncentrációban). A változás mindhárom kezelt csoportban szignifikáns volt.

**A deprenyl hatása a ROS-termelésre.** A normoxiás kontrollcsoportban a reflexiós jel átlagintenzitása  $23,8 \pm 0,78\%$ -ról a hypoxiát követően  $28,9 \pm 0,65\%$ -ra emelkedett (4. ábra). Deprenylkezelés  $32,1 \pm 0,65\%$ ,  $28,8 \pm 0,78\%$  és  $20,8 \pm 0,58\%$ -ra változtatta a reflexiós szintet ( $10^{-3}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-12}$  M-os koncentrációban). A  $10^{-3}$  és a  $10^{-12}$  M-os koncentrációban volt szignifikáns a változás.

### Állatkísérleti eredmények

Patkányban az a. cerebri media permanens okklúziós modelljében vizsgáltuk a deprenyl neuroprotektív hatását. TTC-festéssel határoztuk meg a károsodás mértékét. A kontrollcsoportban a lézió nagysága  $65,8 \pm 28,6$  mm<sup>3</sup> volt, míg a kezelt csoportban ez  $36,5 \pm 24,4$  mm<sup>3</sup>-re szignifikánsan csökkent (5. ábra).

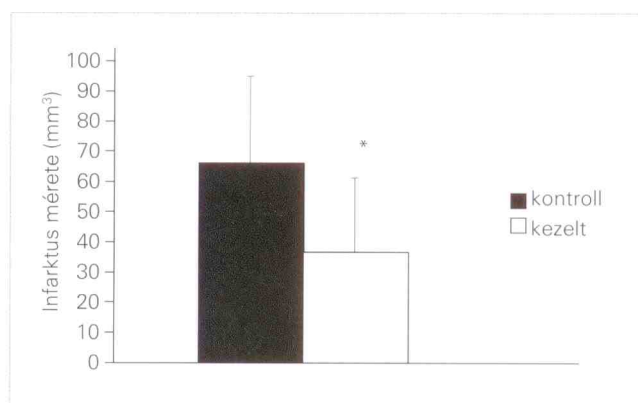
A penumbrarégióban az apoptózis mértékét immunfeszítéssel vizsgáltuk. A TUNEL/kaspáz-3-pozitív sejtek átlagszáma a kezelt csoportban látóterenként  $8 \pm 6$ -ról  $3,3 \pm 3$ -ra szignifikánsan csökkent (6. ábra). A TUNEL-jelzett neuronok száma  $9 \pm 7$ -ről  $6 \pm 6$ -ra csökkent a deprenylkezelés hatására (7. ábra). Ez a változás nem volt szignifikáns.

### Eredmények deprenyl-N-oxiddal

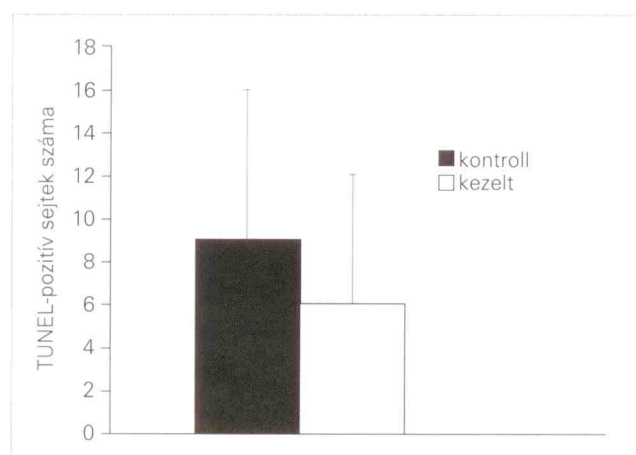
#### Sejtbológiai mérések

**A deprenyl-N-oxid hatása a sejtpusztulásra.** A normoxiás kontrollcsoportban a sejtpusztulás  $2,37 \pm 0,4\%$ , ami a hypoxiát követően  $11,3 \pm 1,0\%$ -ra növekedett (8. ábra). A DNO-kezelés  $8,9 \pm 0,78\%$ ,  $6,5 \pm 0,83\%$  és  $5,5 \pm 0,43\%$ -ra csökkentette a károsodást ( $10^{-5}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-12}$  M-os koncentrációban). A változás mindhárom csoportban szignifikáns volt.

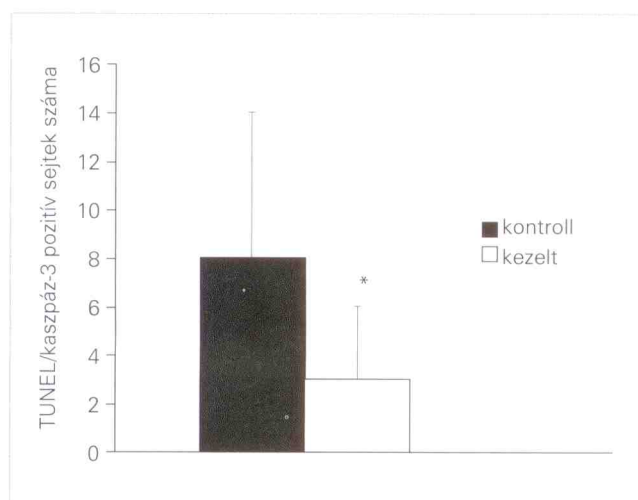
Az SFK525A-kezelés után a sejtpusztulás  $9,84 \pm 0,47\%$ -ról  $18,6 \pm 1,1\%$ -ra emelkedett. A metabolizmusgátlás mellett a deprenyl-N-oxid  $14,8 \pm 0,82\%$ ,  $12,6 \pm 0,71$  és  $11,4 \pm 0,51\%$ -ra csök-



5. ábra. Infarktus mérete patkányagyban az a. cerebri media permanens okklúziója után két nappal. 1 mm-s agyi szeleteken TTC-festéssel volumetriát készítettünk. A deprenylt 0,2 mg/kg/nap dózisban két napig adtuk a kezelt csoportban (átlag $\pm$ SEM,  $p < 0,05^*$ )



7. ábra. A TUNEL-pozitív neuronok száma a kezelt és a kontrollcsoportban. A TUNEL-módszerrel festett neuronok száma 30 mintára nézve és átlagolva  $9 \pm 7$  a kontrollállatokban,  $6 \pm 6$  a kezelt állatokban ( $p = 0,1460$ ) (átlag $\pm$ SEM,  $p < 0,05^*$ )



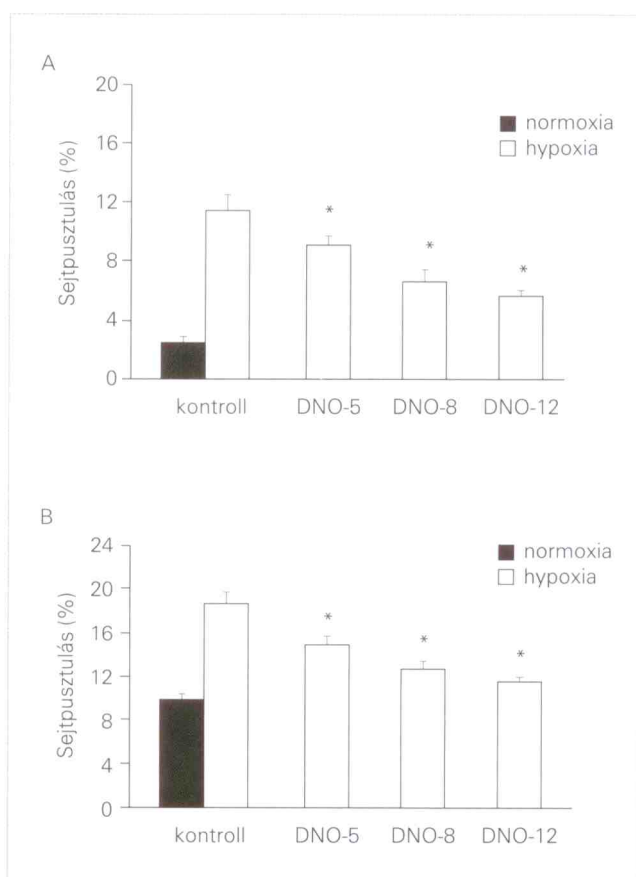
6. ábra. TUNEL-kaspáz-3 kettős jelölésű sejtek száma a kontroll- és a kezelt csoportban. A TUNEL-kaspáz-3 kettős jelölésű sejtek száma 30 mintára nézve és átlagolva:  $8 \pm 6$  a kontrollállatokban,  $3 \pm 3$  a kezelt állatokban ( $p = 0,0003$ ) (átlag $\pm$ SEM,  $p < 0,05^*$ )

kontentte a károsodást. A változás mindhárom koncentrációban szignifikáns.

**A deprenyl-N-oxid hatása a mitochondriális membránpotenciálra (MMP).** A normoxiás kontrollcsoportban az MMP  $1,24 \pm 0,25\%$ , ami a hypoxiát követően  $0,59 \pm 0,08\%$ -ra csökkent.

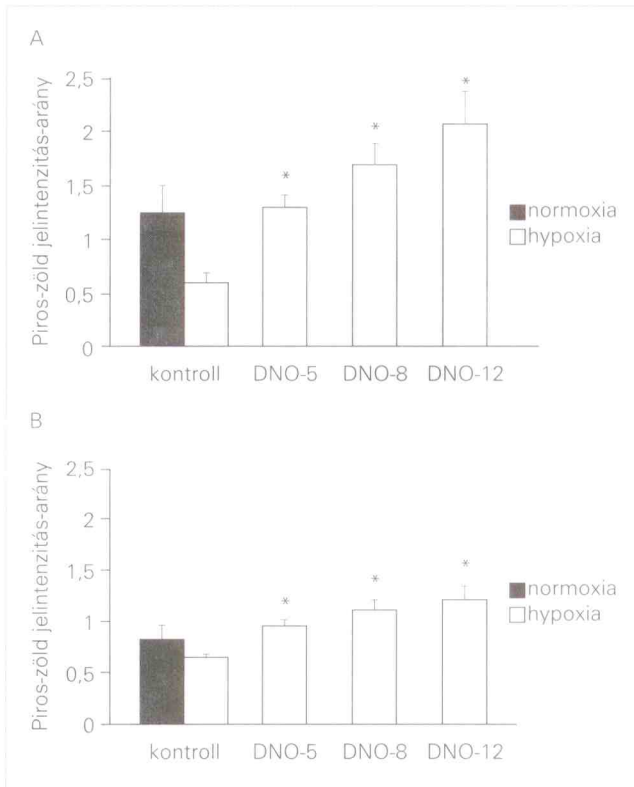
DNO-kezelés  $1,28 \pm 0,12\%$ ,  $1,68 \pm 0,21\%$  és  $2,07 \pm 0,31\%$ -ra változtatta a piros-zöld jel arányát ( $10^{-5}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-12}$  M-os koncentrációban) (9. ábra). A változás mindhárom koncentrációban szignifikáns. Az SFK525A-kezelés után az MMP  $0,82 \pm 0,14\%$ -ról  $0,64 \pm 0,03\%$ -ra csökkent. A metabolizmusgátlás mellett a deprenyl-N-oxid  $0,94 \pm 0,07\%$ ,  $1,1 \pm 0,1$  és  $1,2 \pm 0,13\%$ -ra emelte a piros-zöld jel arányát. A változás mindhárom koncentrációban szignifikáns.

**A deprenyl-N-oxid hatása a ROS-termelésre.** A normoxiás kontrollcsoportban a reflexiós jel átlagintenzitása  $2,36 \pm 1,1\%$ -ról a hypoxiát követően

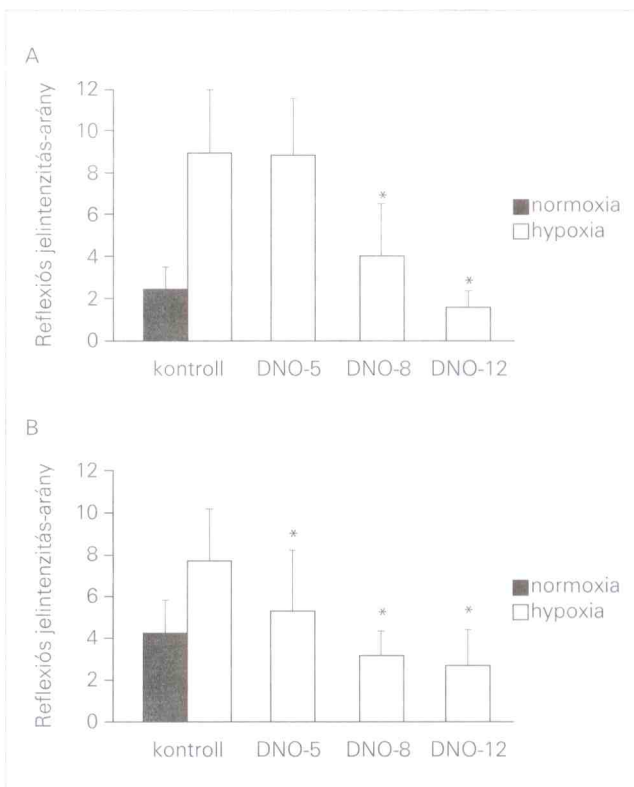


8. ábra. Deprenyl-N-oxid-kezelés egyórás hypoxia után. A sejtpusztulást PI festéssel határoztuk meg 24 órás reoxigenizáció után. Az A panelen a DNO-kezelés önmagában, a B panelen DNO-kezelés SKF525A gátlószer adása után (átlag $\pm$ SEM,  $p < 0,05^*$ )

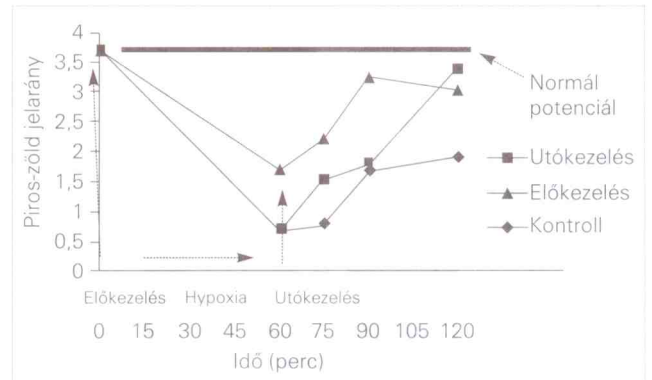
$8,9 \pm 3,0\%$ -ra emelkedett (10. ábra). DNO-kezelés  $8,8 \pm 2,7\%$ ,  $4,0 \pm 2,4\%$  és  $1,47 \pm 0,8\%$ -ra változtatta a reflexiós szintet ( $10^{-5}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-12}$  M-os koncentrációban), a változás  $10^{-8}$  és  $10^{-12}$  M-os koncentrációban szignifikáns. Az SFK525A-kezelés után a ROS szintje  $4,2 \pm 1,6\%$ -ról  $7,6 \pm 2,6\%$ -ra emelkedett. A metabolizmusgátlás mellett a deprenyl-N-oxid



9. ábra. Deprenyl-N-oxid-kezelés egyórás hypoxia után. A mitochondriális transzmembrán-potenciált JC-1-festéssel (piros és zöld jel aránya) határoztuk meg 24 órás reoxigenizáció után. Az A panelen a DNO kezelés önmagában, a B panelen DNO-kezelés SKF252A gátlószer adása után (átlag $\pm$ SEM,  $p < 0,05^*$ )



10. ábra. Deprenyl-N-oxid-kezelés egyórás hypoxia után. A ROS-termelést CeCl<sub>3</sub> festéssel határoztuk meg 24 órás reoxigenizáció után. Az A panelen a DNO-kezelés önmagában, a B panelen DNO-kezelés SKF252A gátlószer adása után (átlag $\pm$ SEM,  $p < 0,05^*$ )



11. ábra. A deprenyl-N-oxid- (10-12M) kezelésnek a mitochondriális membránpotenciálra kifejtett hatásának időfüggése PC-12 sejtenyészetben

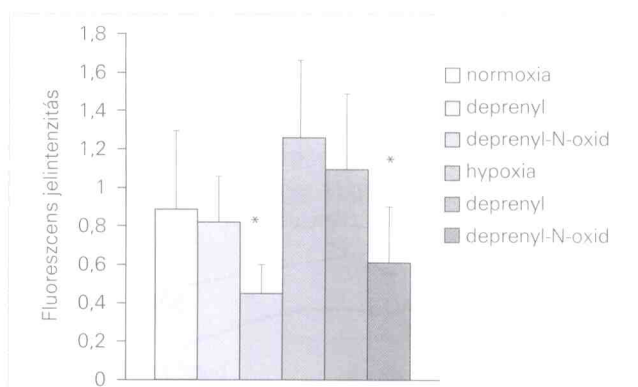
5,2 $\pm$ 3,0%, 3,1 $\pm$ 1,2 és 2,6 $\pm$ 1,8%-ra csökkent reflexiós szint. A változás mindhárom koncentrációban szignifikáns.

**A deprenyl-N-oxid-hatás időfüggése a mitochondriális membránpotenciálra (MMP).** A vizsgált molekulát 10<sup>-12</sup> M koncentrációban alkalmaztuk a hypoxia előtt és közvetlen utána (11. ábra). Ebben a mérésben a JC-1-festés előtt nem fixáltuk a sejteket, hanem közvetlenül az élő sejteket festettük meg. A kontrollcsoportban a piros és zöld jel aránya a kiinduláskor 3,7 $\pm$ 1,5 volt. Az előkezelt csoportban az arány 1,7 $\pm$ 0,2, 2,2 $\pm$ 0,4, 3,2 $\pm$ 1,0 és 3,0 $\pm$ 0,6 volt 60, 75, 90 és 120 perccel a hypoxia kezdetétől számítva. Az utókezelt csoportban az arány 0,7 $\pm$ 0,1, 1,5 $\pm$ 0,2, 1,8 $\pm$ 1,3, illetve 3,4 $\pm$ 0,9 volt. A kezeltlen csoportban 0,7 $\pm$ 0,1, 0,8 $\pm$ 0,1, 1,7 $\pm$ 0,5, illetve 1,9 $\pm$ 0,3 volt a piros és zöld jel aránya (60., 75., 90. és 120. perc).

**A deprenyl és a deprenyl-N-oxid hatása a perifériás benzodiazepinreceptor-expresszióra.** A kezeltlen normoxiás csoportban a fluoreszcens jel 0,88 $\pm$ 0,41-ről 0,81 $\pm$ 0,23-ra, illetve 0,45 $\pm$ 0,14-re csökkent a deprenyl- és a DNO-csoportban (12. ábra). A DNO-kezelés szignifikánsan csökkentette a PBR-expressziót. A hypoxiás csoportokban 1,26 $\pm$ 0,39-ről 1,1 $\pm$ 0,39-re, illetve 0,61 $\pm$ 0,28-ra csökkentette a fluoreszcens jel szintjét a deprenyl és a deprenyl-N-oxid. A deprenyl-N-oxid hatása szignifikánsnak bizonyult.

## Állatkísérleti eredmények

A műtét utáni negyedik napon az állatok agyát kivettük, immunfestéssel vizsgáltuk az ép és apoptotikus sejtek arányát a hippocampus területén. A CA1 hippocampalis régióban a TUNEL/kaspáz pozitív sejtek aránya 44,8 $\pm$ 15,0% volt a kontrollcsoportban, szemben a kezelt csoporttal, ahol 39,7 $\pm$ 13,1% volt az apoptotikus sejtek aránya (13. ábra). A CA2 régióban az apoptotikus sejtek aránya 50,5 $\pm$ 15,6%-ról szignifikánsan csökkent 41,9 $\pm$ 9,8%-ra.

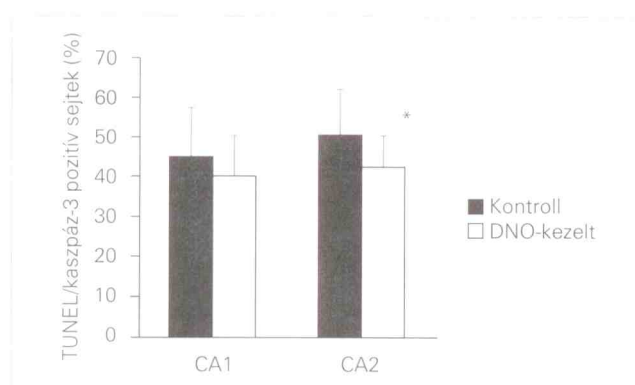


12. ábra. PBR expressziós változás deprenyl- és deprenyl-N-oxid-kezelésre PC-12 sejtenyészetben (átlag $\pm$ SEM,  $p < 0.05^*$ )

**Eredmények deprenyellel.** A kutatások szerint a deprenyl antiapoptotikus hatása bifázisos természetű: nagy koncentrációban ( $10^{-3}$  M) pro-, kis koncentrációban ( $10^{-9}$ - $10^{-13}$  M) pedig antiapoptotikus hatású (9, 10, 11). Deprenyellel végzett vizsgálataink során PC-12 sejtenyészetben vizsgáltuk a sejtpusztulásra, a mitochondriális membránpotenciálra és a szabadgyök-termelésre kifejtett hatást. A PC-12 tenyésztésre ezért is esett a választásunk, mert a sejtekben nincs MAO-B-expresszió, így biztosan a MAO-B-független hatást tudjuk vizsgálni (24). Propidium-jodiddal végzett festéssel határoztuk meg a sejtpusztulást, ez megerősítette a korábbi eredményeket: a deprenyl  $10^{-3}$  M-os koncentrációban növelte a halott sejtek arányát, míg a  $10^{-8}$  és a  $10^{-12}$  M-os koncentrációban szignifikánsan csökkentette azt. A mitochondriális transzmembrán-potenciál mérésénél azt találtuk, hogy a deprenyl mindhárom vizsgált koncentrációban szignifikánsan emelte a hypoxiás kontrollhoz képest a piros és zöld jel arányát. Ezzel szemben a szabadgyökszint-mérésnél a deprenyl nagy koncentrációban ( $10^{-3}$  M) növelte a ROS-termelést, és csak a legkisebb koncentrációban ( $10^{-12}$  M) csökkentette szignifikánsan (25).

Patkány-stroke modellben a deprenyl antiapoptotikus hatását néztük. A deprenylt 0,2 mg/kg/nap dózisban adagolva azt találtuk, hogy a lézió térfogatát szignifikánsan, körülbelül a felére csökkentette. A penumbrarégió nagy felbontású felvételein az apoptotikus sejteket azonosítottuk és látóterenként megszámláltuk. A deprenylkezelés a TUNEL/kaspáz-3 pozitív sejtek számát szignifikánsan csökkentette, de a csak TUNEL-pozitív neuronok száma is csökkent (26, 27).

**Eredmények deprenyl-N-oxiddal.** Jelenleg még továbbra is nagy kérdés, hogy a deprenyl vagy valamelyik metabolitja-e az aktív neuroprotektív hatású. Vizsgálatainkban az FMO-rendszeren keresztül metabolizálódó molekulát, a deprenyl-N-oxid hatását vizsgáltuk. A deprenyl-N-oxidot pár éve szintetizálták először, így erről a molekuláról kevés információ van (28, 29). A deprenylhez hasonlóan a deprenyl-N-oxidot PC-12 tenyésztésben vizsgáltuk

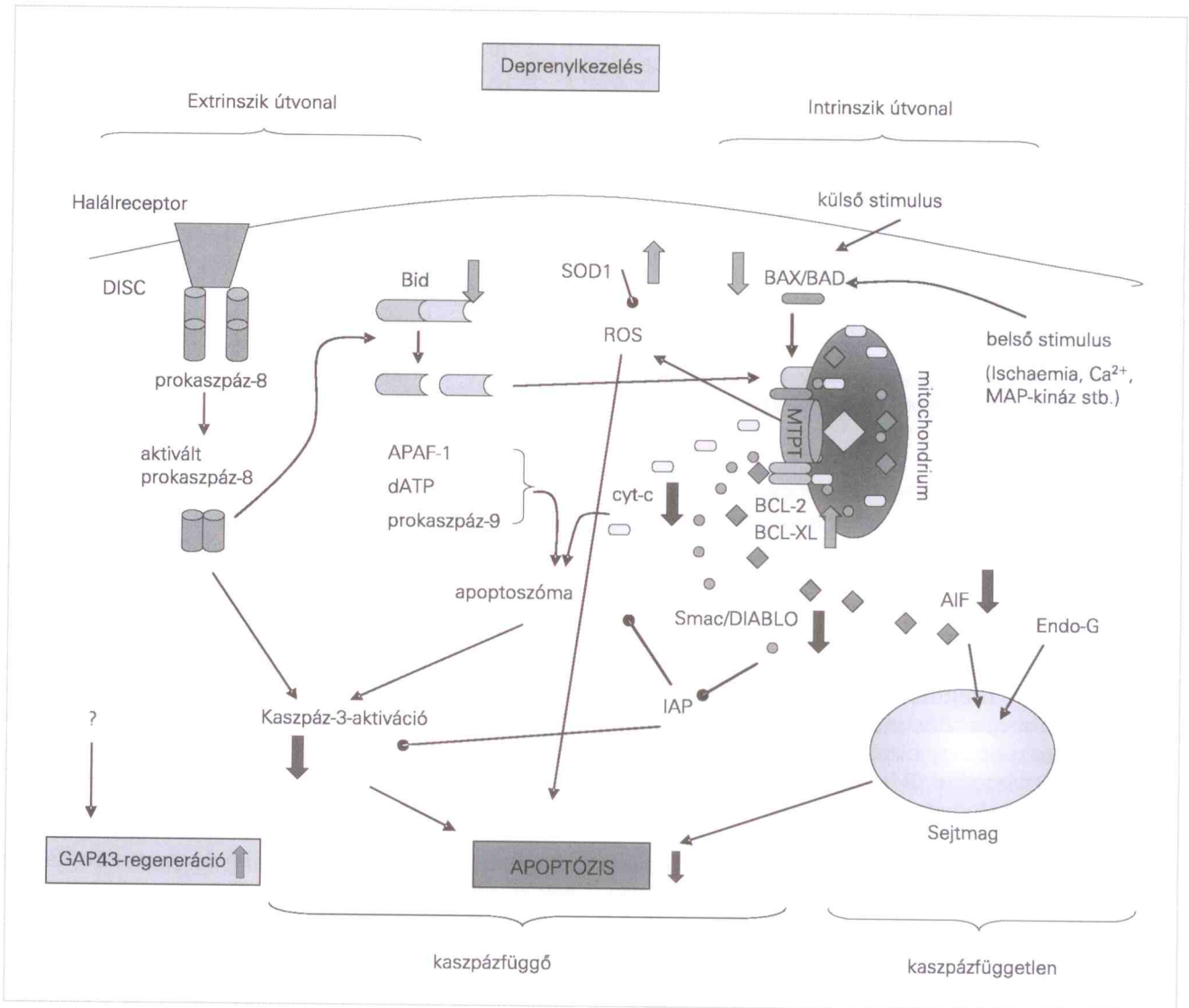


13. ábra. A TUNEL/kaspáz-3 pozitív sejtek aránya a mongol futóegér CA1 és CA2 hippocampus-régiójában (átlag $\pm$ SEM,  $p < 0,05^*$ )

egyórás hypoxia és 24 órás reoxigenizációs kondícióban. A deprenyl-N-oxidot a sejtbiológiai mérések-nél  $10^{-5}$ ,  $10^{-8}$  és  $10^{-12}$  M-os koncentrációban alkalmaztuk. Első mérési sorozatban a sejtpusztulást, az MMP-t és a ROS-szintet mértük. Azt találtuk, hogy szignifikánsan csökkentette a sejtpusztulást; a változások koncentrációfüggést mutattak ( $10^{-12}$  M koncentráció volt a leghatékonyabb). A mitochondrium D $\Psi$ m-csökkenését koncentrációfüggő módon kivédte, sőt,  $10^{-8}$  és  $10^{-12}$  M-os koncentrációban a normál potenciál felé emelte azt. A szabadgyökszintet hypoxia után csak  $10^{-8}$  és  $10^{-12}$  M-os koncentrációban csökkentette. Tehát eredményeink szerint a deprenyl-N-oxid hasonló protektív hatást fejt ki, mint a deprenyl.

A kérdés továbbra is az, hogy ez aktív metabolit vagy sem. Ezért SKF525A-t, egy P450 enzimrendszergátló szert alkalmaztunk, mert a deprenyl és a deprenyl-N-oxid fő metabolizmusa ezen az enzimrendszeren keresztül valósul meg. Az előző mérési sorozatot megismételtük  $10^{-5}$  M koncentrációjú SKF525A jelenlétében. Mindhárom mérési modalitásban hasonló koncentrációfüggő kinetikát találtunk, a sejtvédő hatás is kis eltérésekkel azonos volt. Ez azt jelenti, hogy a deprenyl-N-oxid lehet a deprenyl régóta keresett aktív metabolitja.

A deprenyellel végzett vizsgálatok számos kérdésre választ adtak. Jól elfogadható magyarázat a D $\Psi$ m stabilizálására az, hogy a deprenyl megváltoztatja az MPTP-t reguláló fehérjék (Bcl-2, Bcl-XL, BAX, BAD) expresszióját, ezzel szabályozza a transzmembrán-potenciált. Mikor 2003-ban De Marchi és munkatársai a menadion okozta MPTP-megnyílást vizsgálták, arra az eredményre jutottak, hogy a deprenyl pár percen belül képes a transzmembrán-potenciál csökkenését kivédeni, illetve a mitochondrium duzzadását csökkenteni (30). Ez pedig ellentmond a génexpressziós elméletnek, hiszen a *de novo* fehérjeszintézissel nem magyarázható a pár perc alatt bekövetkezett hatás. De Marchi elmélete alapján a DNO-hatás időfüggését vizsgáltuk mi is, azzal a különbséggel, hogy a membránpotenciál-csökkenést egyórás hypoxiával



14. ábra. A deprenyl antiapoptotikus hatásának általunk felvetett hatásmechanizmusa

indukáltak. Azt találtuk, hogy a deprenyl-N-oxidot  $10^{-12}$  M-os koncentrációban előkezelésként alkalmazva közel fél óra múlva stabilizálta az MMP-t; közvetlenül a hypoxia után adva a deprenyl-N-oxidot egy óra múlva okozott membránpotenciál-változást. Ezzel az eredménnyel azt a hipotézist támasztottuk alá, ami a deprenyl közvetlen mitochondrialis hatását veti fel. Vinpocetinnel végzett kutatásaink eredménye alapján kezdtük el vizsgálni a PBR-receptor-expressziót deprenyl- és DNO-kezelés mellett. Az eredmények azt mutatták, hogy mind normál körülmények közt, mind hypoxia után a deprenyl és a deprenyl-N-oxid is csökkenti a PBR-expressziót. A deprenyl-N-oxid hatása szignifikáns volt. Eredményeink alapján a deprenyl és metabolitjainak direkt MPTP-regulációs hatását vetettük fel (14. ábra).

Korábbi vizsgálataink szerint a kétnapos deprenyl-kezelés a patkányagy hypoxiás károsodásait szignifikánsan csökkentette. A deprenyl-N-oxidot a mongol futóegér átmeneti, kétoldali carotisleszorításos mo-

delljében vizsgáltuk. Azért esett a választásunk erre a modellre, mert ez késleltetett, tiszta apoptózismodell. Nem kell a penumbraterületet meghatározni és az apoptózist a nekrozistól elkülöníteni. Két nappal a carotislekötés után a hippocampusban apoptózis alakul ki, főleg a CA1 és CA2 régióban. Ezért vizsgálatunkban ebben a két régióban mértük az apoptózis mértékét. Eredményeink azt mutatták, hogy a deprenyl-N-oxid 0,4 mg/kg/nap dózisban adagolva a hippocampus CA1 és CA2 régiójában csökkentette az apoptotikus sejtek arányát, a CA2 régióban a változás szignifikánsnak bizonyult.

### Következtetés

Vizsgálatainkkal PC-12 sejtenyészetben igazoltuk a deprenyl és a deprenyl-N-oxid dózisfüggő neuroprotektív hatását, valamint leírtuk patkány és egér agyi stroke modelljében a molekulák antiapoptotikus hatását. A deprenyl fő metabolikus útvonalának gátlásá-



val bizonyítottuk, hogy valószínűleg a deprenyl-N-oxid az aktív metabolit.

Az évtizedek óta használt gyógyszerrel kapcsolatban teljesen új hatásmechanizmussal foglalkoztunk. Eredményeink alapján kimondhatjuk, hogy mindkét molekula jelentősen csökkenti a károsodás mérté-

két az oxigénhiányos állapotokban, ezt a mitochondriumon keresztül fejt ki. Eredményeinkkel ezt az új hatásmechanizmust még nem bizonyítottuk teljesen, ezért további vizsgálatokat tervezünk a bizonyítás céljára és az esetleges klinikai alkalmazhatóság vizsgálatára.

## IRODALOM

- Knoll J, Ecseri Z, Kelemen K, Nievel J, Knoll B. Phenylisopropylmethylpropinylamine (E-250), a new spectrum psychic energizer. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1965;155(1):154-64.
- Knoll J, Magyar K. Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1972;5:393-408.
- Parkinson Study Group. Mortality in DATATOP: a multicenter trial in early Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998;43(3):318-25.
- Shoulson I, Oakes D, Fahn S, Lang A, Langston JW, LeWitt P, Olanow CW, Penney JB, Tanner C, Kieburtz K, Rudolph A; Parkinson Study Group. Impact of sustained deprenyl (selegiline) in levodopa-treated Parkinson's disease: a randomized placebo-controlled extension of the deprenyl and tocopherol antioxidative therapy of parkinsonism trial. *Ann Neurol* 2002;51(5):604-12.
- Katagi M, Tatsuno M, Tsutsumi H, Miki A, Kamata T, Nishioka H, Nakajima K, Nishikawa M, Tsuchihashi H. Urinary excretion of selegiline N-oxide, a new indicator for selegiline administration in man. *Xenobiotica* 2002;32(9):823-31.
- Cohen G, Pasik P, Cohen B, Leist A, Mytilineou C, Yahr MD. Pargyline and deprenyl prevent the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in monkeys. *Eur J Pharmacol* 1984;106(1):209-10.
- Waldmeier PC, Boulton AA, Cools AR, Kato AC, Tatton WG. Neurorescuing effects of the GAPDH ligand CGP 3466B. *Neural Transm Suppl* 2000;60:197-214.
- Magyar K, Szende B, Lengyel J, Tekes K. The pharmacology of B-type selective monoamine oxidase inhibitors; milestones in (-)-deprenyl research. *J Neural Transm* 1996;48(Suppl):29-43.
- Tatton WG, Chalmers-Redman RM, Ju WJ, Mammen M, Carlile GW, Pong AW, Tatton NA. Propargylamines induce anti-apoptotic new protein synthesis in serum- and nerve growth factor (NGF)-withdrawn, NGF-differentiated PC-12 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:753-64.
- Magyar K, Szende B, Lengyel J, Tarczali J, Sztarmáry I. The neuroprotective and neuronal rescue effects of (-)-deprenyl. *J Neural Transm* 1998;52(S):109-23.
- Tatton WG, Chalmers-Redman RM, Elstner M, Leesch W, Jagodzinski FB, Stupak DP, Sugrue MM, Tatton NA. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegeneration and apoptosis signaling. *J Neural Transm* 2000;60(S):77-100.
- Wadia JS, Chalmers-Redman RM, Ju WJ, Carlile GW, Phillips JL, Fraser AD, Tatton WG. Mitochondrial membrane potential and nuclear changes in apoptosis caused by serum and nerve growth factor withdrawal: time course and modification by (-)-deprenyl. *J Neurosci* 1998;18(3):932-47.
- Tatton WG, Wadia JS, Ju WY, Chalmers-Redman RM, Tatton NA. (-)-Deprenyl reduces neuronal apoptosis and facilitates neuronal outgrowth by altering protein synthesis without inhibiting monoamine oxidase. *J Neural Transm* 1996;48(S):45-59.
- Coyle P. Middle cerebral artery occlusion in the young rat. *Stroke* 1982;13:855-9.
- Nakanishi H, Katsuta K, Koide T, Ueda Y, Shirakawa K and Yoshida K. Protective effect of FR115427 against ischemic hippocampal damage in gerbils. *Jpn J Pharmacol* 1994;64:189-93.
- Csonka E, Szemenyi K, Miskulin M, Robert AM. Morphological examinations of aortic endothelial and smooth muscle cells grown in vitro on collagen membranes. *Artery* 1980;8:243-58.
- Kusumoto M, Dux E, Paschen W, Hossmann KA. Susceptibility of hippocampal and cortical neurons to argon-mediated in vitro ischemia. *Journal of Neurochemistry* 1996;67:1613-21.
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986;17:1304-8.
- Szilágyi G, Nagy Z: Új módszerek a hypoxia kutatásban Ideggyógyászati szemle 2006;59(11-12):411-5.
- Szilágyi G, Simon L, Koska P, Telek G, Nagy Z: Visualization of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species via double staining *Neurosci Lett* 2006;399(3):206-9.
- Robinson JM, Batten BE. Localization of cerium-based reaction products by scanning laser reflectance confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 1990;38:315-8.
- Halbhuber KJ, Scheven C, Jirikowski G, Feuerstein H, Ott U. Reflectance enzyme histochemistry (REH): visualization of cerium-based and DAB primary reaction products of phosphatases and oxidases in cryostat sections by confocal laser scanning microscopy. *Histochem Cell Biol* 1996;105:239-49.
- Telek G, Scoazec JY, Chariot J, Ducroc R, Feldmann G, Roz C. Cerium-based histochemical demonstration of oxidative stress in taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. *J Histochem Cytochem* 1999;47:1201-12.
- Youdim MB, Heldman E, Pollard HB, Fleming P, McHugh E. Contrasting monoamine oxidase activity and tyramine induced catecholamine release in PC-12 and chromaffin cells. *Neuroscience* 1986;19:1311-8.
- Simon L, Szilágyi G, Bori Z, Telek G, Magyar K, Nagy Z. Low dose (-)-deprenyl is cytoprotective: It maintains mitochondrial membrane potential and eliminates oxygen radicals. *Life Sci* 2005;78(3):225-31.
- Simon L, Szilágyi G, Bori Z, Orbay P, Nagy Z. A (-)-deprenyl hatása kísérletes agyi ischaemiában. *Agyérbetegségek* 2001;7(4):6-11.
- Simon L, Szilágyi G, Bori Z, Orbay P, Nagy Z. (-)-d-Deprenyl attenuates apoptosis in experimental brain ischemia. *Eur J of Pharma* 2001;430(2-3):235-41.
- Yoshida T, Yamada Y, Yamamoto T, Kuroiwa Y. Metabolism of deprenyl, a selective monoamine oxidase (MAO) B inhibitor in rat: relationship of metabolism to MAO-B inhibitory potency. *Xenobiotica* 1986;16:129-36.
- Lévai F, Fejér E, Szelezcky G, Szabó A, et al. In vitro formation of selegiline-N-oxide as a metabolite of selegiline in human, hamster, mouse, rat, guinea-pig, rabbit and dog. *Eur J of Drug Metab and Pharmacokin* 2004;29(3):169-78.
- De Marchi U, Pietrangeli P, Marcocci L, Mondovi B, Toninello A. L-Deprenyl as an inhibitor of menadione-induced permeability transition in liver mitochondria. *Biochem Pharma* 2003;66:1749-54.