

A cuprizone által indukált kísérletes demyelinizáció – a III-as és IV-es típusú
sclerosis multiplex ígéretes modellje

Ph.D. tézis

Dr. Ács Péter

Pécsi Tudományegyetem

Klinikai Központ

Neurológiai Klinika

Témavezető: prof. Dr. Komoly Sámuel, egyetemi tanár, az MTA doktora

Programvezető: prof. Dr. Komoly Sámuel, egyetemi tanár, az MTA doktora

Doktori iskola vezetője: prof. Dr. Komoly Sámuel, egyetemi tanár, az MTA doktora

Pécs, 2012

Tartalom

1	Bevezetés	3
1.1	Sclerosis multiplex.....	3
1.2	A cuprizone-indukálta kísérletes demyelinizáció	4
2	A tanulmányok összefoglalása	6
2.1	17 β -ösztadiol és progeszteron kezelés hatása a cuprizone-indukálta demyelinizációra	6
2.1.1	Háttér és célkitűzések	6
2.1.2	Eredmények	6
2.1.3	Következtetések	9
2.2	A poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) gátlásának hatása a cuprizone-indukálta demyelinizációra	9
2.2.1	Háttér.....	9
2.2.2	Hipotézis és a tanulmány célja	10
2.2.3	Eredmények	10
2.2.4	Következtetések	12
3	A tézis összefoglalása	13
3.1	17 β -ösztadiol és progeszteron kezelés hatása a cuprizone-indukálta demyelinizációra	13
3.2	A poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) gátlásának hatása a cuprizone-indukálta demyelinizációra	14
4	A tézishoz kapcsolódó közlemények jegyzéke	15
5	Köszönetnyilvánítás	17

1 Bevezetés

1.1 Sclerosis multiplex

A sclerosis multiplex (SM) a központi idegrendszer krónikus, gyulladással, demyelinizációt okozó, neurodegeneratív betegsége. A nyugati félteke leggyakoribb megbetegedése fiatal felnőttekben, előfordulása körülbelül kétszer gyakoribb nőkben. Az SM-et szenzo-motoros, kognitív és neuropszichiátriai tünetek jellemzik. Klinikai lefolyását illetően különböző formákban jelenik meg. A betegek többségénél kezdetben az úgynevezett relapszáló-remittáló forma (RRSM) a jellemző, melyre a neurológiai tünetek kialakulása, majd azok gyógyulása, akár teljes remissziója jellemző. Ez a klinikai lefolyás több évig tarthat, de 25 éven belül a betegek 90%-ánál kifejlődik a másodlagos progresszív forma (SPSM), mely a neurológiai tünetek folyamatos romlásával jár. Az SM betegek kb. 10%-a a primer progresszív formába (PPSM) tartozik, melyre a neurológiai tünetek fokozatos, javulás nélkül bekövetkező romlása a jellemző. A progresszív-relapszáló forma (PRSM) a betegek 4-10%-át érinti, melyre a folyamatosan romló neurológiai tünetek mellett akut relapszusok jellemzőek javulás nélkül. Az elmúlt évtizedek kutatásai rámutattak, hogy a különböző klinikai lefolyásokhoz eltérő patomechanizmus társulhat.

Az SM klasszikus neuropathológiai elváltozása a plakk-szerű demyelinizált lézió. Lucchinetti és munkatársai egy részletes neuropathológiai vizsgálattal rámutattak arra, hogy a demyelinizáció mintázata különböző lehet az SM betegek körében. Ezen leírások alapján a léziókat négy különböző formára lehet osztani, de közös jellemzőjük a myelin károsodása és bizonyos gyulladással (T sejtek, illetve makrofágok) jelenléte. Az I-es és II típusra a makrofág- és ellenanyag-mediált demyelinizáció a jellemző. Az I-es típust a T sejtek és makrofágok által előidézett gyulladás jellemzi, s az aktív demyelinizáció helyszínének tartják. A II-es típus az I-re sok mindenben hasonlít, azonban itt immunglobulin és aktív komplement depozíció is kimutatható. A III-as típus nem vénák körül alakul ki, s gyakran található egy megőrzött myelin gyűrű a gyulladt ér körül a demyelinizáló plakkon belül. A III-as léziók határai kevésbé definiáltak. A III-as típusú lézió egyik jellegzetessége, hogy elsősorban a MAG myelin fehérje károsodik. Ezen

területeken belül az apoptosissal tipikus jeleit mutató oligodendroglia sejtek (OL) találhatóak. Az OL pusztulás az aktív plakkok határára jellegzetes, miközben az inaktív középpontban hiányoznak az OL-ek. A IV-es típusú minta a plakk körüli fehérállományban jelentkező sejtpusztulással jellemezhető, hasonlóan a III-as mintához. Ezen léziók is tartalmaznak T sejteket és makrofágokat az I-es típusúhoz hasonlóan. Összefoglalva, a III-as és IV-es típusú az OL apoptosissal jellemzi. A szövettani heterogenitás mellett az időbeni heterogenitás is jellemzi az SM-es léziókat, amint arra a közelmúlt tanulmányai rávilágítottak, s ezzel a léziók kialakulásának egy új hipotézisét állították fel. Új, tüneteket okozó léziók vizsgálata során – olyan betegek agyában, akik a relapsus fellépte után nem sokkal elhaláloztak – OL apoptosist figyeltek meg. További vizsgálatok megerősítették, hogy az OL-ek apoptosisa a legkorábbi esemény, megelőzve a myelin pusztulást, illetve a fagocita és T sejtek invázióját a gyorsan növekvő SM-es plakkokat övező szövetben. Ezen megfigyelések megkérdőjelezzik az általánosan elfogadott nézetet a T sejtek által iniciált demyelinizációról, és hangsúlyozzák, hogy az OL apoptosissal nemcsak a III-as típusú léziókra jellemző, hanem a plakkok kifejlődésének legkorábbi fázisát jelenthetik.

1.2 A cuprizone-indukálta kísérletes demyelinizáció

A cuprizone-indukálta demyelinizációt növekvő figyelem kíséri az elmúlt évtizedben, mivel ellentétben más SM állatmodellekkel, jól reprodukálhatóan idéz elő elsődleges OL pusztulást és következményes demyelinizációt. A réz kelátor cuprizone egereknek történő adagolása térben és időben jól elkülöníthető szövettani elváltozásokat idéz elő az egerek központi idegrendszerében (pl. a corpus callosumban, vagy a pedunculus cerebellaris superiorban). A legkorábbi esemény óriás mitochondriumok képződése, melyet az OL-ek apoptosissal követ. Az apoptosissal a cuprizone-kezelés 3. és 10. napja között a legkifejezettebb, de az a cuprizone-kezelés során végig fellelhető. Az OL-ek apoptosissal kiterjedt demyelinizációt követi. Egy másik, jellegzetes elváltozás a demyelinizált területek macrophagok általi inváziója. A károsodott myelin fagocitózisán túl a microglia sejtek szerepe ellentmondásos a cuprizone-modellben. Ezen sejtek hozzájárulhatnak az OL-ek további pusztulásához pro-inflammatorikus citokinek termelésével. Ugyanakkor

hozzájárulhatnak a remyelinizáció elősegítéséhez az éretlen OL-ek stimulálásával.

Amennyiben hat hét után a cuprizone adagolását felfüggesztik, a demyelinizációt spontán és teljes remyelinizáció követi, melyet az OL prekursor sejtek érése, és általuk a demyelinizált területek repopulációja idéz elő. Ha a cuprizone-kezelést 12 hétig fenntartják, a remyelinizáció nem, vagy csak korlátozott mértékben történik meg.

A cuprizone-indukálta demyelinizációban látott kórszövettani elváltozások emlékeztetnek a Lucchinetti és munkatársai által leírt III-as típusú SM lézióra. A legfontosabb hasonlóságok között a kifejezett OL apoptosist, az aktívan demyelinizálódó területek korai mikroglia invázióját kell említeni. Emelett a léziók nem erek körül helyezkednek el, határaik kevésbé definiáltak, s a MAG mRNS expressziója korán és súlyosan csökken. A fentebb részletezett kórszövettani jellegzetességeket figyelembe véve a cuprizone-modell alkalmas az akut és krónikus demyelinizáció pathológiájának vizsgálatára, az OL apoptosis kórélettanának kutatására, és a szöveti regenerációt, illetve remyelinizációt elősegítő terápiás lehetőségek pre-klinikai tesztelésére SM-ben.

2 A tanulmányok összefoglalása

Kísérleteink célja annak a vizsgálata volt, hogy az OL-ek túlélését segítve (akár a remyelinizációt előmozdítva, akár az apoptosist gátolva) kivédhető e a cuprizone által indukált demyelinizáció.

2.1 17 β -ösztradiol és progeszteron kezelés hatása a cuprizone-indukálta demyelinizációra

2.1.1 Háttér és célkitűzések

A női nemi hormonok (17 β -ösztradiol [E] és progeszteron [P]) pozitív hatása a neurodegeneratív és neurotoxikus folyamatokra széles körben elfogadott. SM betegekben a szérum E és P szint fordítottan arányos a tünetek súlyosságával és progressziójával. A felvetés, hogy a szexuál-szteroidok jótékony hatásúak lehetnek SM-ben retrospektív tanulmányokból származik, melyek rámutattak a tünetek remissziójára a terhesség alatt, a betegség fellángolására szülés után, illetve a betegség kisebb előfordulására többször szült nőkben. Prospektív tanulmányok támogatják ezen megfigyeléseket, és felvetik, hogy a terhesség alatti hormonális változásoknak protektív szerepe van az SM lefolyására nézve, különösen a harmadik trimeszterben, amikor a hormon szintek erőteljesen emelkedettek.

Kísérleteink célja annak a meghatározása volt, hogy a 17 β -ösztradiol és progeszteron kezelés, önmagában vagy kombinációban alkalmazva hatással van e a cuprizone-indukálta demyelinizációra. Kísérleteinkben - önmagukban vagy kombinációban - E és P kezelést alkalmaztunk, hogy megelőzzük a cuprizone-indukálta, nem autoimmun reakció által létrejött demyelinizációt.

2.1.2 Eredmények

A hormon kezelés hatása a cuprizone-indukálta demyelinizációra és az érett OL-ek pusztulására

A cuprizone-kezelt csoportban az *in vivo* T2 súlyozott MRI felvételeken a corpus callosum (CC) szignál intenzitása megemelkedett, masszív demyelinizációt jelezvén. Az E és a P kezelés szignifikánsan csökkentette a CC demyelinizációját a T2 súlyozott MRI felvételeken, illetve csökkentette a

cuprizone kezelésre jellegzetes kamra-tágulatot. Az MRI felvételeken látottakat megerősítendő, luxol fast blue festés történt és a CC "myelin score"-ja meghatározásra került a különböző kísérleti csoportokban. Az E és P kombinált alkalmazása szignifikánsan csökkentette a demyelinizációt. A „myelin score” meghatározása azt mutatta, hogy a cuprizone kezelés a score-t erőteljesen csökkentette 1-re, szemben a kontroll állatokban talált 3-mal. Az E, illetve P önmagában történő alkalmazása csak enyhén csökkentette a cuprizone negatív hatását. A két hormon együttes alkalmazása azonban a myelin score-t 2 fölé emelte. Az adatok konzekvensen közepes erősségű hatást mutattak a hormonok külön-külön történő alkalmazásakor, míg a hormonok együttes adása mindig szignifikánsan jobb myelinizációhoz vezetett. Az eredmények további kvantifikációja véget az érett, myelin szintetizáló OL-re jellemző markerek (MBP, PLP) gén expresszióját rtPCR-rel meghatároztuk. A cuprizone expozíció mindkét marker erőteljes csökkenéséhez vezetett. A kombinált E és P kezelés mindkét marker expresszióját szignifikánsan megemelte a cuprizone csoporthoz képest, de az emelkedés kevésbé volt nyilvánvaló, mint azt a „myelin score”-ok alapján várni lehetett. A gén expresszió csak a kontrollok 45 (MBP), illetve 30 százalékát érték el. A külön alkalmazott szteroid hormonoknak nem volt szignifikáns hatása ezen gének expressziójára. Az érett OL-ek immun-jelölése az APC antigénre az OL-ek szignifikáns csökkenését mutatta a CC-ban a cuprizone csoportban, mely hatást a kettős hormonkezelés szignifikánsan javította. A kombinált hormon kezelés után a CC-ban talált érett OL-ek száma és elrendeződése összehasonlítható volt a kontroll csoportban találtakal. Mivel az asztroglia- és mikroglia-funkció összefüggésben lehet a megtartott myelin statusszal, immunhisztokémiával elemeztük ezen sejtpopulációk jelenlétét/hiányát a CC-ban, illetve a GFAP mRNS expressziót rtPCR-rel megmértük. A cuprizone-kezelt állatokban kifejezett asztrocitózist találtunk. Ez a hatás azonban még erősebben jelentkezett az E+P csoportban. A gén expresszió analízise megerősítette, hogy az asztrocitózis a kombinált hormonkezelt csoportban sokkal jelentősebb (12-szeres GFAP mRNS emelkedés a cuprizone csoportban, 18-szoros emelkedés a cuprizone+E/P csoportban a kontroll csoporthoz képest). A nem kombinációban alkalmazott hormonkezelésnek nem volt szignifikáns hatása a GFAP mRNS-re nézve.

A makrofágok jelenlétét Iba1 immunhisztokémiával vizsgáltuk. A cuprizone csoportban a demyelinizált CC laterális részét a makrofágok infiltrálták. Az E+P csoportban nemcsak a laterális, hanem a teljes CC erőteljes makrofág reakciót mutatott.

Az OL-éréssel asszociált gének expressziója a cuprizone- és hormonkezelt egerekben

A kombinált hormonkezelés protektív hatása a CC myelinizációjára az OL progenitor sejtek besorozásának, és ezáltal új myelin képzésének lehet a következménye. Azért, hogy ezt a hipotézist tovább vizsgáljuk, megmértük a PDGF α R mRNS expresszióját a CC-ban, mivel ez a gén az éretlen OL-ek megbízható markere. A cuprizone-kezelt egerekben, a CC-ban a PDGF α R mRNS emelkedett értékeket mutatott a kontroll csoporthoz képest, ez az emelkedés azonban a szignifikancia határát nem érte el (kontroll: 100 ± 3 vs. cuprizone: 122 ± 11). Ezzel ellentétben az E+P csoportban a PDGF α R mRNS szignifikánsan emelkedett volt a kontroll csoporthoz képest (kontroll: 100 ± 3 vs. cuprizone+E+P: 145 ± 20 $p < 0.05$), jelezvén az éretlen OL-ek proliferációját a hormonkezelés mellett. Ezt a feltevést megerősítette az elvégzett Ki67 (a proliferáló sejtek markere) immunhisztokémia. Csak néhány Ki67-pozitív sejtet találtunk a subventricularis zónában és a laterális CC-ban a kontroll és a cuprizone csoportban. Az E/P kezelést követően számos Ki67-pozitív sejt volt látható ezekben a régiókban és a CC teljes részén. Az insulin-like growth factor-1 (IGF-1) mitogén hatása az éretlen OL sejtekre jól ismert. Az agyi IGF-1 fő forrásául az asztrociták szolgálnak. Mivel erőteljes asztrocita reakciót észleltünk a hormonkezelt egerekben, megvizsgáltuk az IGF-1 expresszióját a CC-ban. Az IGF-1 mRNS expressziója kb. 20-szoros emelkedést mutatott a cuprizone kezelt egerekben a CC-ban a kontroll csoporttal összehasonlítva, míg a kombinált hormonkezelés 40-szeres IGF-1 mRNS növekedést idézett elő. Hasonlóan a GFAP mRNS expressziójának változásaihoz, a cuprizone kezelés mellett alkalmazott nem kombinált hormon adagolás nem idézett elő szignifikáns változást az IGF-1 mRNS expressziójában.

2.1.3 Következtetések

Az első tanulmányunkban a gonadalis szteroid hormonok hatását vizsgáltuk a cuprizone-indukálta demyelinizációra hím egerek agyában, a CC-ban. Tiszta evidenciákkal demonstráltuk, hogy az ovárium eredetű szteroid hormonok kombinált alkalmazása alkalmas az érett OL-ek károsodásának gátlására és/vagy a remyelinizáció stimulálására, amíg a nem kombinációban adott hormonok hatása nem ilyen kifejezett. Mindkét hormon befolyásolta az asztroglia és makrofág sejtek interakcióját az érett és éretlen, nyugvó állapotú OL sejtekkel, azok aktivációját előidézve, illetve az érett OL sejtek károsodását megelőzve. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a szexuál szteroidok által kifejtett protektív hatásáért nagyobb mértékben az éretlen OL sejtek aktivációja és differenciációjuk elősegítése a felelős.

2.2 A poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) gátlásának hatása a cuprizone-indukálta demyelinizációra

2.2.1 Háttér

A legkorábbi, III és IV típusú SM léziók jellegzetes elváltozása az OL sejtek apoptotikus pusztulása, mely degeneratív folyamatok szerepére enged következtetni. Az SM egyik alternatív hipotézisét követve, az OL sejtek apoptosisa minden SM lézió első és legkorábbi stádiumát jelenti. A PARP nukleáris enzim a DNS károsodás felismerésében szerepet játszó jelátviteli molekula. Különböző nukleáris cél fehérjéken – beleértve magát a PARP fehérjét is - hosszú ADP-ribose polimereket képez. A kiterjedt DNS károsodás a PARP túlaktiválásához vezet, mely potenciálisan a sejt károsodásához, illetve pusztulásához vezethet. Ezen túl, a PARP aktivációja szükséges az apoptosis-inducing factor (AIF) mitochondriumokból a magba történő áthelyeződéséért. Ez megerősíti a feltevést, mely szerint a sejtmag és a mitochondriumok közötti párbeszéd nagymértékben függ a poly(ADP)riboziláltság mértékétől, s ez utóbbi meghatározza a sérült sejtek további sorsát. Számos központi idegrendszeri betegség pathogenezisének hátterében bizonyosodott be a PARP által indukált sejtpusztulás és gyulladás. Több agyi megbetegedés állatmodelljében ismert a PARP gátlásának pozitív

hatása. Egyebek mellett a PARP-gátlás csökkenti a gyulladás mértékét EAE-ben, az SM autoimmun modelljében.

2.2.2 Hipotézis és a tanulmány célja

Az OL sejtek apoptosisa a cuprizone-indukálta demyelinizáció és az SM bizonyos patológiai alcsoportjainak közös jellegzetessége. A cuprizone modellben az OL-ek apoptosist – részben legalábbis – a mitochondriális légzési lánc és a komplex IV károsodása idézi elő. Ez a folyamat az érintett sejtekben a DNS károsodásához vezet. Feltételeztük, hogy a mitochondriumok sérülése és a következményes DNS károsodás a PARP túlaktiválásával jár, s ezzel hozzájárul az OL pusztuláshoz a cuprizone modellben.

Ebben a tanulmányban a következő kérdésekre kerestük a választ. A PARP túlaktiválása szerepet játszik-e az OL apoptosiban a cuprizone-indukálta demyelinizációban? A PARP gátlása kedvező hatással van-e a demyelinizációra a cuprizone modellben? Ezen túlmenően, vizsgáltuk azt is, hogy a PARP aktiváció jelen van-e humán SM léziókban, hozzájárulván ezzel az OL sejtek pusztulásához.

2.2.3 Eredmények

A cuprizone felerősíti a PARP aktivációját a corpus callosumban. Ahhoz, hogy a PARP-gátlás szerepét vizsgáljuk a kísérleti demyelinizációban, először a cuprizone PARP aktivációra kifejtett hatását vizsgáltuk. A cuprizone auto-poly(ADP-ribozilációt) indukált, vagyis aktiválta a PARP-ot a CC-ban, az egerek agyában. Immunhisztokémia alkalmazásával, confocalis mikroszkóppal vizsgálva, poly(ADP-ribose) expressziót találtunk apoptotikus OL sejtekben. Emellett, 4HQ – egy hatásos PARP enzim-gátló – kezelés meggátolta mind a cuprizone által indukált, mind a bazális auto-poly(ADP-ribozilációt) 100 mg/kg dózisban. Kísérleteink alatt a 4 HQ- végig ilyen adagban használtuk. Ez az adag korábbi tanulmányokban is hatásosnak bizonyult, toxikus mellékhatással pedig nem rendelkezett.

A PARP gátlása kivédi a cuprizone-indukált demyelinizációt. Első lépésben az agyakat nem-invazív, *in vivo* MRI-vel vizsgáltuk. Nem-kezelt állatokban a CC hypointenz jelet adott T2 súlyozott képeken. Cuprizone

etetés hatására a CC T2 súlyozott képeken hyperintenz jelet adott, ezzel demyelinizáció fennállását jelezve, mely 4 hét cuprizone-kezelés után volt a legkifejezettebb. 4 HQ kezelés megelőzte a CC cuprizone-indukálta hyperintenzsé válását. Tehát a PARP gátlása kivédte a demyelinizációt. Önmagában alkalmazva a 4HQ semmilyen eltérést nem okozott a jelintenzitásban. A patológiai elemzés LFB-krezil ibolya festéssel súlyos demyelinizációt mutatott a CC-ban cuprizone-kezelt állatokban. 4HQ kezelés a demyelinizáció mértékét jelentősen csökkentette ($p < 0.001$). Önmagában a 4HQ nem befolyásolta a demyelinizációt. Kvantitatív MBP immunoblott csökkent MBP expressziót mutatott 5 hét cuprizone-kezelés után ($p < 0.01$). Ezt az eltérést a 4HQ kezelés visszafordította ($p < 0.05$). Az MBP szintet az önmagában alkalmazott 4HQ nem befolyásolta. MBP immunhisztokémiával hasonló eredményeket találtunk.

A cuprizone caspase-független, AIF-mediált sejthalált okoz, mely hatást a PARP gátlása csökkenti

A demyelinizáció mellett emelkedett AIF expressziót észleltünk a CC-ban 3 hét cuprizone-etetés után. Ezt a hatást a 4HQ kezelés meggátolta. Amellett, hogy az expresszióját megemelte, a cuprizone az AIF nukleáris transzlokációját is előidézte. Cuprizone-kezelt egerekben számos, alakjukban és elrendeződésükben OL-re hasonlító sejtet találtunk, mely erős nukleáris immun-reakciót mutatott AIF-fal a CC középvonalában és cinguláris részében. Hasonló sejteket a PARP gátlása esetén nem figyeltünk meg. Fentiekkel ellentétben, a cuprizone nem indukált caspase-dependens sejt halált, ahogyan azt a pro-caspase 3 hasítási termékének hiánya mutatta immunoblott kísérlettel és fluoreszcens caspase-3 esszé alkalmazásával. Összességében a cuprizone-etetés caspase-független, AIF-mediált sejthalálhoz vezet.

A PARP aktivációja SM léziókban

A PARP-aktiváció meghatározásához SM léziókban, az enzim termékének akkumulációját demonstráltuk anti-poly(ADP-ribose) immunfluoreszcencia, illetve immunhisztokémia alkalmazásával. Erős poly(ADP-ribose) reaktivitást észleltünk az egyes sejtek magjában és citoplazmájában. Ez akut SM betegek

agyában volt a legkifejezettebb, olyan aktív léziókban, melyek a III pathológiai altípus karakterisztikus jegyeit mutatták, s magas számban tartalmaztak apoptotikus OL sejteket. Az expresszió olyan sejtekben volt látható, melyek anatómiai jellegzetességükből adódóan leginkább OL sejteknek feleltek meg. Magjuk kondenzált, néha töredezett volt, citoplazmájuk vakuolizációt vagy duzzadást mutatott, sejtnyúlványaik pedig fragmentálódtak. A kvantitatív analízis megerősítette, hogy a poly(ADP-ribose) reaktív glia sejtek ott fordultak elő legnagyobb számban, ahol a kezdeti és aktív demyelinizáció jelentkezett a III-as típusú lézióknak megfelelően. Hasonló poly(ADP-ribose) reaktív OL sejtek kisebb számban előfordultak a lassan expandáló léziók széli részein progresszív SM-es mintákban, illetve még ritkábban II-es típusú léziókban is. Kettős festéssel és konfokális mikroszkópos vizsgálattal megerősítettük, hogy az erős poly(ADP-ribose) reakciót adó sejtek nagy többsége pozitív reakciót ad az OL marker carbon-anhydrase II-vel is.

Az AIF nukleáris transzlokációja III-as típusú SM léziókban

Mivel az AIF a PARP által indukált sejthalál közvetítésében elengedhetetlen, megvizsgáltuk expresszióját SM léziókban. Az AIF reaktivitás a normál agyban, s a „normálisnak tűnő fehér állomány”-ban SM betegek agyában a neuron és glia sejtek mitochondriumjaira korlátozódott. SM léziókban a mitochondriális AIF reaktivitás felerősödött, s nemcsak neuronokban és glia sejtekben, de makrofágokban is mutatkozott. A III-as típusú SM minták kezdeti és aktív régióiban (illetve sokkal kisebb mértékben más aktív SM léziókban is) glia sejtek feltöredezett, apoptotikus magjaiban az erős AIF reakció kolokalizálódott a megemelkedett poly(ADP-ribose) immunopozitivitással. Ezen adatok azt mutatják, hogy a PARP aktiváció AIF-mediált OL apoptosishoz vezethet a III-as típusú SM léziókban.

2.2.4 Következtetések

Adataink azt mutatják, hogy az OL apoptosis hasonló mitochondriális úton zajlik a cuprizone-indukálta kísérletes demyelinizációban illetve a III-as típusú SM léziókban. A PARP gátlása hatásosan csökkentette az OL pusztulás mértékét és védelmet jelentett a cuprizone által előidézett demyelinizációval szemben egy caspase-független, az AIF nukleáris transzlokációját magába

foglaló jelátviteli úton. Mivel a PARP-gátlás hasonlóan kedvező volt EAE-ben, az SM autoimmun modelljében, az terápiás lehetőségként szolgálhat megcélozván az SM két fő pathofiziológiai folyamatát, a gyulladást és a demyelinizációt. Azonfelül, hatásos lehet az SM összes altípusában, akár az OL sejtek pusztulásának s ezzel az új léziók kialakulásának megelőzésével, akár a gyulladás csökkentésével.

3 A tézis összefoglalása

Ebben a tanulmányban – egy olyan állatmodell használatával, mely kifejezett hasonlóságot mutat a III-as típusú SM léziókkal – arra tettünk kísérletet, hogy új potenciális terápiás lehetőségeket találjunk olyan SM formákra, melyeket leginkább az OL sejtek apoptosisa jellemez. Mindezt a remyelinizáció aktiválásával, illetve az OL sejtek apoptosisa gátlásával kívántuk elérni. Emellett vizsgálni akartuk az SM-ben látott OL apoptosisa pontos pathomechanizmusát.

3.1 17 β -ösztradiol és progeszteron kezelés hatása a cuprizone-indukálta demyelinizációra

- Az *in vivo* MRI vizsgálat, a rutin szövettan és az immunhisztokémia azt mutatta, hogy a cuprizone kezelés alatt adott kombinált hormonkezelés mellett a corpus callosum myelinizáltsága megtartott marad szemben a kizárólag cuprizone kezelésben részesülő egerekkel.
- A kombinált hormonkezelés erőteljes asztrocita reakciót és makrofág infiltrációt idézett elő a cuprizone-kezelés alatt. Habár az asztrocita- és makrofág-reakció a cuprizone-modell jól ismert velejárója, a hormonkezelés ezt a hatást jelentősen felerősítette.
- A 17 β -ösztradiol és progeszteron kezelés a remyelinizációval összefüggésben álló gének expresszióját indukálta, a corpus callosumban a cuprizone-kezelés alatt. Emellett a hormon-kezelt állatokban az osztódó sejtek száma jelentősen megemelkedett a subventricularis zónában.
- Adataink arra mutatnak, hogy a kettős hormonkezelés előmozdítja az OL sejtek érési folyamatát és ezzel együtt a remyelinizációt a cuprizone által indukált kísérletes demyelinizációs modellben.

- Eredményeink alapján a kombinált 17β -ösztadiol és progeszteron kezelésnek kedvező terápiás hatása lehet az SM nem-immun mediált formáiban.

3.2 A poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) gátlásának hatása a cuprizone-indukálta demyelinizációra

- A cuprizone-kezelés PARP-aktivációt idéz elő, mely hatás kivédhető a PARP-gátló szer, 4HQ együttes alkalmazásával.
- A PARP túlaktiválásával a cuprizone AIF-mediált, caspase-független OL apoptosist vált ki.
- A nukleáris PARP enzim gátlása 4HQ alkalmazásával erőteljesen lecsökkenti a cuprizone által okozott demyelinizációt, ahogyan azt in vivo MRI, szövettani, immunhisztokémiai és immunoblott kísérleteinkkel demonstráltuk.
- A PARP gátlása protektív hatással bír az OL sejtek apoptosisa ellen, s így csökkenti a demyelinizáció mértékét a cuprizone-modellben.
- A PARP enzim túlaktiválása és a következményes AIF-mediált, caspase-független OL apoptosisa a III-as típusú SM léziókban jelen van.
- Adataink azt mutatják, hogy a PARP gátlása terápiás lehetőségekkel rendelkezhet az SM-ben látott OL pusztulással szemben.

4 A tézishez kapcsolódó közlemények jegyzéke

Cikkek

P. Acs*, M. Kipp*, C. Beyer, S. Komoly; Estrogen and progesterone treatment prevents cuprizone induced demyelination in C57Bl/6 male mice *Glia*. 2009 Jun; 57(8):807-14 IF: 4.932

*megosztott első szerző

Sara Veto*, Peter Acs* , Jan Bauer, Hans Lassmann, Zoltan Berente, Gyorgy Setalo, Jr, Gabor Borgulya, Balazs Sumegi, Samuel Komoly, Ferenc Gallyas, Jr and Zsolt Illes: Inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase: a potential therapy against oligodendrocyte death *Brain*, 2010, Volume 133, Number 3, Pp. 822-834 IF: 9.23

*megosztott első szerző

Peter Acs, Samuel Komoly: Selective ultrastructural vulnerability in the cuprizone induced experimental demyelination; publikációra elfogadva, *Ideggyógyászati Szemle*

Könyvfejezet

P. Acs, B. Kalman: Pathogenesis of multiple sclerosis: what can we learn from the cuprizone model. In: A. Perl (Ed) *Autoimmunity*. Humana 2012

Absztraktok

Veto S, Acs P, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Sumegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z, 2010. Inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase: a potential therapy against oligodendrocyte death in multiple sclerosis. *Clinical Immunology* 135: S30-S30

Veto S, Acs P, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Sumegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z, 2010. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is activated in multiple sclerosis pattern III lesions and its inhibition prevents experimental demyelination and oligodendrocyte death. *Journal of Neuroimmunology* 222:16-16

Veto S, Acs P, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Sumegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z, 2009. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is activated in multiple

sclerosis pattern III lesions and its inhibition prevents experimental demyelination and oligodendrocyte death. *Journal of the Neurological Sciences* 285: S105-S106 Suppl.

Veto S, Acs P, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Sumegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z, 2009. Poly(ADP-ribose) polymerase is activated in multiple sclerosis pattern III lesions and its inhibition prevents experimental demyelination and oligodendrocyte death. *Multiple Sclerosis* 15: S88-S88

Veto S, Acs P, Tapodi A, Lendvai Z, Komoly S, Illes Z, Gallyas F, 2008. Poly(ADP)ribose polymerase inhibitor modifies the activities of various kinase cascades in the cuprizone-induced demyelination model. *Multiple Sclerosis* 14: S81-S81

Veto S, Acs P, Dolowschiak T, Doppler H, Kanizsai A, Berente Z, ifj Gallyas F, 2007. Cuprizone hatása a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) rendszerekre a corpus callosumban. *Folia Hepatologica* 11: S40-S40

Veto S, Acs P, Dolowschiak T, Lendvai Z, Gallyas F, Komoly S, Berente Z, 2007. In vivo MRI follow-up of cuprizone-induced CNS changes. *Multiple Sclerosis* 13: S255-S255

Veto S, Acs P, Berente Z, Szabo A, ifj. Gallyas F, Komoly S, 2006. 4 hydroxiquinazoline hatása a cuprizone indukálta központi idegrendszeri elváltozásokra. *Biokémia* 30:80-81 S.

5 Köszönetnyilvánítás

Hálásan és tiszta szívből mondok köszönetet prof. Komoly Sámuelnek, Tanár úrnak, aki amellett, hogy témavezetőmként mindvégig támogatott, mindenekelőtt tanárom volt.

Hálával tartozom Illés Zsolt professzor úrnak, aki kiváló és professzionális munkájával nagyban hozzájárult a tézisben ismertetett munkák elkészüléséhez és publikálásához, s végig támogatást nyújtott.

Nagy köszönettel tartozom ifj. Gallyas Ferenc professzornak és Vető Sárának, akikkel mindvégig gyümölcsöző szakmai kapcsolatban álltunk.

Külön köszönetnyilvánítással tartozom Hans Lassmann-nak és laborjának (Centre for Brain Research, Medical University of Vienna) a humán mintákkal történt kísérletekben nyújtott pótolhatatlan segítségért.

Nagyra értékelem és köszönöm aacheni együttműködő partnereimnek, prof. Cordian Beyer-nek és Markus Kippnek a közös munkát.

Köszönet illeti Mázló Máriát, Seress László professzor urat, Ábrahám Hajnalkát és a Központi Elektronmikroszkópos Labort nagy segítségükért.

Hálás vagyok idősebb Gallyas Ferenc professzornak tanácsaiért és technikai segítségéért, illetve az Idegsebészeti Klinika kutató laborjának s Nyirádi Józsefnek, amiért munkám kezdeti lépéseit segítették.

Szívélyes köszönetemet nyilvánítom ki Fülöp Krisztinának, Bognár Ernőnek és Feldmann Ádámnak a nekem nyújtott segítségért.

Hálás vagyok a családomnak. Feltétlen szeretetükért.