

dc_202_11

**Újabb adatok a neurodegeneratív betegségek
pathomechanizmusához: terápiás perspektívák**

MTA doktori értekezés

Dr. Klivényi Péter

**Neurológiai Klinika
Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar**

2011

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Bevezetés	4
Neurodegeneratív betegségek.....	4
Huntington kór.....	5
Parkinson kór.....	8
Amyotrophiás lateralsclerosis.....	9
Leber-féle hereditár opticus neuropathia (LHON).....	11
Sclerosis multiplex (SM)	12
Dystonia.....	13
Módszerek és statisztikai elemzés:.....	14
Célkitűzések:	14
Eredmények és megbeszélés	15
Mitokondriális toxinok hatása az agy aminosav szintjeire, ill. az antioxidáns rendszereire.....	15
Antioxidáns rendszerek vizsgálata Leber-féle opticus neuropathiás ill. sclerosis multiplexes betegekben	19
Aminosav szintek sclerosis multiplexben	23
Állatmodelljeink longitudinális magatartásvizsgálata.....	24
Huntington kór transzgenikus modellje	24
PGC1- α deficiens egerek.....	27
Huntington kór 3-NP modellje	28
Azid hatása az α -tokoferol szintre	28
Az α-synuclein hatása a mitokondriális toxinmodellekben.....	30
Különböző genetikai modifikációk hatása a mitokondriális toxinok okozta sejtpusztulásra	33
Glutation peroxidáz (GSHPx) deficiencia	33
Mangán szuperoxid-diszmutáz (MnSOD) deficiencia	36
Dihydrolipoamide dehydrogenase deficiencia	37
Foszfolipáz A ₂ deficiencia.....	38
Kaspáz 1 deficiencia	41
Transzgenikus ALS modell toxin érzékenysége	43

Transzgenikus HD modell toxinérzékenysége	45
Anyagszere folyamatok tanulmányozása Huntington kór modelljében	46
MR spektroszkópiás adatok	46
Biokémiai adatok	49
Kinurenin rendszer	50
Mitokondriális támadáspontú szerek vizsgálata	58
A kreatin szupplementáció hatása Parkinson kór modelljében	61
Kreatin szupplementáció hatása ALS modelljében	62
Különböző támadáspontú szerek additív hatásának vizsgálata	64
A kreatin neuroprotektív hatásmechanizmusa: mitokondriális kreatin kináz deficiencia	67
Karnitin hatása Huntington modellben	68
Hisztón deacetiláz gátló szerek vizsgálata	72
Fenilbutirát hatása Huntington kór modelljére	73
Fenilbutirát hatása Parkinson kór modelljére	74
Valproát hatása Huntington kór modelljére	75
Antioxidáns hatású molekulák tesztelése	75
BN82451 hibrid molekula hatása Huntington kór modelljében	75
N-acetil-L-cisztein hatása ALS modellben	77
A szabadgyök csapdák (spin trap) hatása MPTP, 3NP és malonát toxicitásra	79
Exogen pirimidin (triacetil-uridin) hatása az MPTP és malonát toxicitásra	82
A nNOS gátlás szerepe a mitokondriális toxinok okozta sejtpusztulásra	83
Embriionális őssejt transzplantációval elérhető eredmények Parkinson kór modelljében .	86
Új megállapítások	89
Köszönetnyilvánítás	90
A disszertációt megalapozó tudományos munkák jegyzéke	91
Rövidítések	97
Irodalom	99

Bevezetés

Neurodegeneratív betegségek

A neurodegeneratív betegségek a központi idegrendszer olyan (feltehetően nagyrészt genetikailag determinált) kórképei, amelyekben az idegsejtek károsodása, ill. pusztulása az elsődleges. Ezek közé számos kórkép tartozik, legismertebbek az Alzheimer kór (AD), a Parkinson kór (PD), a Huntington kór (HD) és az amyotrophiás lateralsclerosis (ALS). A genetikai diagnosztika fejlődésével azonban újabb és újabb kórképek kerülnek ebbe a csoportba, mint pl. a spinocerebellaris ataxiák, Friedreich ataxia, vagy hereditær spasticus paraparesisek. Az életkor előrehaladtával egyre gyakoribbá váló neurodegeneratív betegségek már most is jelentős népegészségügyi problémát jelentenek, azonban az öregedő társadalmakban az elkövetkezendő évtizedekben jelentőségük meg fog sokszorozódni. Előrejelzések alapján a betegek száma meg fog többszöröződni és csak az Alzheimer kórban szenvedő páciensek száma el fogja érni a 100 millió főt, akiknek a kezelési költsége már most meghaladja a 183 milliárd dollárt évente (Alzheimer's Association, 2011).

Bizonyos esetekben a betegség oka egyértelműen azonosított (pl. Huntington kór), míg más esetekben csak rizikófaktorok ismertek (Alzheimer kór, Parkinson kór). Ennek ellenére mindegyik esetben van egy alcsoport, ahol egyértelmű genetikai mutáció igazolódott, és ez okozza a tüneteket. Azonban a Huntington kórt leszámítva a kórképek nagyobb része sporadikusnak tekinthető és mivel ezek fenotípusa sok esetben hasonló a genetikai formákéval, így közös pathomechanizmus feltételezhető. Az intenzív kutatások ellenére a pontos folyamatok mai napig nem ismertek, azonban számos útvonal szerepe igazoltnak tekinthető. Ezek közé tartozik a mitokondriális károsodás, az energiatermelés zavara, az excitotoxicitás, a szabadgyök-képződés fokozódása, a kinurenin útvonal aktiválódása, a mikroglia aktiváció, a hiszton acetiláció/deacetiláció megváltozása, stb.

Tudományos munkám során e közös folyamatok szerepét tanulmányoztam mind állat modellekben, mind bizonyos esetekben, humán mintákban. Gyakorló orvosi munkámnak megfelelően új terápiás hatású molekulák tesztelését legalább ennyire fontosnak tartottam.

Az alábbiakban az általam tanulmányozott legfontosabb betegségeket és modelljeiket ismertetem röviden.

Huntington kór

A Huntington kór egy autoszómális domináns öröklődésű progresszív neurodegeneratív kórkép, amelyet személyiségváltozás, choreiform kényszermozgás, valamint dementálódás jellemez és feltartóztathatatlanul, általában 10-15 év alatt, halálhoz vezet. A betegséget patológiailag többek között a basalis ganglionok GABAerg közepes tüskés neuronok pusztulása jellemzi. A Huntington kór oka a 4. kromoszómán található IT 15 gén normál esetben is meglevő CAG ismétlődésének az expanziója. A megbetegedésért felelős genetikai defektust a Huntington's Disease Collaboration Research Group publikálta 1993-ban (The Huntington's Disease Collaborative Research Group). Az *IT15* gén termékének, a *huntingtin* fehérjének sejtfunkcióban betöltött szerepe jelenleg nem teljesen tisztázott. A sejten belül számos folyamatban szerepet játszik, mint pl. sejtfejlődés, intracelluláris jelátvitel, transzportfolyamatok, stb. Normális körülmények között ez a gén maximum 35 CAG ismétlődést tartalmaz. Ha ez expanzió 40, vagy annál több, a betegség mindenképpen kialakul. A Huntington-kór megjelenése, illetve a tünetek súlyossága a repeat hossz nagyságától függ: minél nagyobb a CAG ismétlődések száma, annál hamarabb jelentkezik a kórkép, és lefolyása is annál súlyosabb (összefoglaló: Zuccato et al., 2010). Ennek ellenére számos egyéb protein interakciója befolyásolja a kórkép kialakulását, ill. a tünettant (ún. genetikai módosító faktorok: kainát specifikus glutamát receptor GluR6, NMDA receptor 2B alegység (GRIN2B), apolipoprotein E ε2ε3 genotípus, ubiquitin COOH-terminal hydrolase L1 (UCHL1), TP53 és hCAD, apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1), mitogen-activated protein kináz 6 (MAP2K6) vagy PPAR-γ coactivator 1α (PGC-1α) (összefoglaló: Zuccato et al., 2010).

Annak ellenére, hogy ez a betegség ritka, jelentősége abban rejlik, hogy monogénes, autoszómális domináns, 100% penetranciájú betegség, amely relatíve egyértelmű helyzetet biztosít a kóros folyamatok tanulmányozására.

Huntington kór modellezése

Egy neurotoxin, a 3-nitropropionsav (3-NP) a putamen kétoldali károsodását okozza. Ez a toxin irreverzibilis inhibitor a szukcinát dehidrogenáz enzimnek, mind a Szent-Györgyi-Krebs ciklusban, mind a mitokondriális légzési láncban (komplex II). A 3-NP egy természetben is előforduló gomba toxin, amely emberben és állatban egyaránt mérgező. Az akcidentálisan előfordult Arthrinium gombamérgezés eseteit vizsgálva állapították meg, hogy a betegek tünetei, valamint a posztmortem szövettani vizsgálatok egyaránt meglepő hasonlóságot mutatnak Huntington-kórban bekövetkező változásokkal. Ez a gomba tartalmazta a 3-NP-t. A szelektív károsodást feltehetően a csökkent ATP termelés okozta fokozott szabadgyök-képződés és excitotoxikus mechanizmus okozza (1. ábra). A krónikus 3-NP adagolás tehát a Huntington-kór bizonyos klinikai tüneteit (mozgászavar) és a szövettani elváltozásokat is utánozza (Beal et al., 1993). A 3-NP mellett a malonsav is mitokondriális toxin, amely intrastriatálisan alkalmazva ugyancsak szelektív neuron pusztulást eredményez. A malonsav reverzibilis gátlója a komplex II-nek és intrastriatális adagolása hasonló patológiai elváltozásokat okoz, mint a 3-NP vagy a humán kórkép.

Egyes transzgenikus modellek

A Huntington-kór vizsgálatára különböző transzgenikus modellek léteznek, amelyek vagy a teljes hosszúságú mutáns huntingtint, vagy annak csupán egy bizonyos fragmentjét expresszálják.

A **mutáns huntingtin N-terminális fragmentjét expresszáló egerek** nem a teljes humán gént, csak annak bizonyos részét tartalmazzák: az 1. exont, az 1. és 2. exont, vagy a mutáns huntingtin mintegy felének megfelelő szakaszt (összefoglaló: Gárdián, 2006).

R6 csoport

Az ebbe a csoportba tartozó egerek a humán *IT15* gén 1. exonját hordozzák, különböző CAG repeat-hosszal. Az ismétlődések száma 116 és 156 között változik (Mangiarini et al., 1996). Többféle törzs létezik, melyek közül mi vizsgálatainkhoz az *R6/2-t* használtuk.

Az *R6/2* vonal 141-157 CAG ismétlődést tartalmaz, mely emberben a juvenilis HD megfelelője. Ezen állatokban bizonyos viselkedési eltérés és motoros deficit 5-6 hetes

kortól detektálható, de nyilvánvaló tünetek csak az egerek 8 hetes korától alakulnak ki. Progresszív mozgászavar, súlyvesztés, tremor, convulsiók, diabetes a jellegzetes tünetek. Az állatok hamar, 10-14 hetes korban pusztulnak el. Szövettanilag a sejtekben jelentős számban mutathatók ki intranukleáris zárványtestek, de neuron pusztulás csak a megbetegedés késői fázisában, és akkor is csak mérsékelt formában alakul ki. Az R6/2 egerek halála leggyakrabban generalizált metabolikus betegség (súlyos fogyás, diabetes mellitus), vagy konvulzió miatt következik be (Mangiarini et al, 1996).

N171-82Q törzs

Ez a törzs a huntingtin fehérje N-terminális fragmentjét (171 aminosavat) expresszálja. A CAG-ismétlődések száma 82. Az állatba bejuttatott transzgén expresszióját egy egér prion protein promotor vektor irányítja. A transzgén által expresszált kóros polipeptid szintje alacsonyabb, mint az endogénen termelődő normál huntingtin szint.

Ez az egértörzs jellegzetes viselkedési és patológiai tünetekkel rendelkezik. Normális posztnatális fejlődési periódus után kb. 2 hónapos koruktól jelentkeznek az eltérések. Elsőként a súlynövekedés elmaradása (8-10 hét), majd későbbiekben progresszív testsúlycsökkenés jön létre (16-24 hét). Ezt követik a viselkedésbeli elváltozások és motoros tünetek: tremor, motoros inkoordináció, hypokinesis, rendellenes (púpos) testtartás és járás, illetve „*clasp*ing”: ha az állatot farkánál fogva felemeljük, a normális menekülő mozdulatok helyett a hátsó végtagjait összekulcsolja, mely testtartásból nem tud elernyedni (12-16 hét). A betegség végstádiumában (az állatok életének utolsó heteiben) jellegzetes a kis testméret, az ingerekre való válaszadás csökkenése, szegényes tisztálkodás és gyakori clasp

ing. Az egerek körülbelül 20-24 hetes korukban, hirtelen pusztulnak el. A halál oka nem teljesen tisztázott. Patológiai eltérésként számos intranukleáris zárvány és neurit aggregáció található az agy különböző területein (többek között a caudatum, a cortex, a hippocampus, a gyrus dentatus, és az amygdala érintett), míg a sejtpusztulás minimális, és nincs súlyos asztrocita-proliferáció sem. A folyamatban érintett területektől távol az állatok agyszövege semmilyen kóros eltérést nem mutat. Ugyanígy a perifériás szövetek esetén sem található patológiás elváltozás, még a szívizomszövet esetén sem, mely az agyszövethez hasonló szinten expresszálja az idegen, mutáns fehérjét (Schilling et al., 1999).

Parkinson kór

A Parkinson kór a Huntington kórnál jóval gyakrabban előforduló neurodegeneratív betegség, amelyet mozgáslelassulás (hypokinesis), nyugalmi tremor és izomrigiditás jellemez. Patológiailag többek között a substantia nigra dopaminerg sejtjeinek pusztulása észlelhető, valamint az ubiquitin és α -synuclein pozitív Lewy testek meghatározott rend szerinti kialakulása jellemzi (Braak stádiumok) (Braak et al., 2003), bár az utóbbi években közöltek Lewy test negatív (főleg genetikailag determinált) eseteket is. A Huntington kórral szemben az esetek döntő többsége sporadikus előfordulása, azonban több gén (α -synuclein, parkin, PINK1, DJ1, LRRK2) mutációját is azonosították a ritkán előforduló familiáris esetekben (1. táblázat).

Név	gén	öröklődés menet	kromoszóma	hivatkozás
PARK1	SNCA	AD	4q21	Polymeropoulos et al., 1997
PARK2	Parkin	AR	6q25.2-q27	Kitada et al., 1998
PARK3	SPR?	AD	2p13	Gasser et al., 1998
PARK4	SNCA	AD	4q21	Singleton et al., 2003
PARK5	UCHL1	AD	4p14	Leroy et al., 1998
PARK6	PINK1	AR	1p36	Valente et al., 2004
PARK7	DJ-1	AR	1p36-23	Healy et al., 2004
PARK8	LRRK2	AD	12q12	Zimprich et al., 2004
PARK9	ATP13A2	AR	1p36	Ramirez et al., 2006
PARK10	?	?	1p32	Hicks et al., 2002
PARK11	?	?	2q36-37	Pankratz et al., 2002

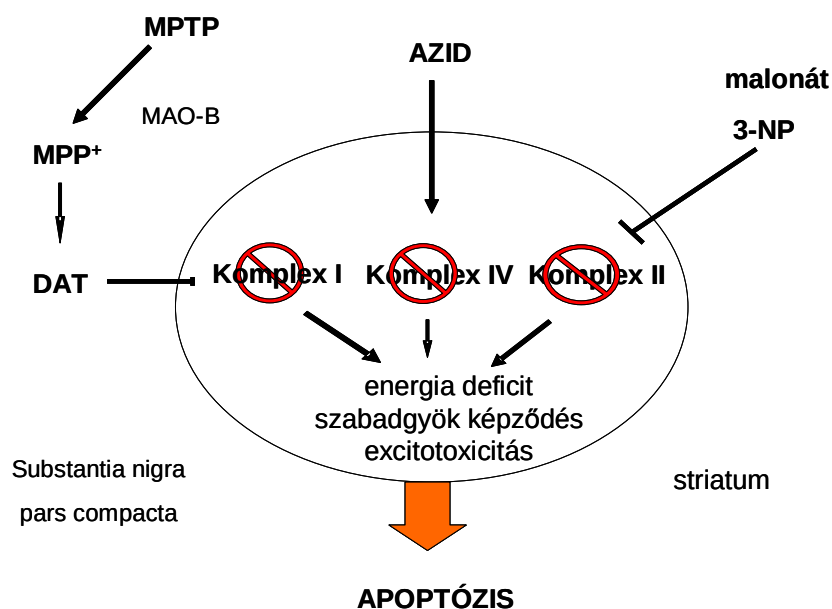
1. táblázat. Monogénis öröklődésű Parkinson kórformák.

Parkinson kór modellezése

A korábban kábítószer melléktermékeként előállított 1-metil-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropiridin (MPTP) a substantia nigra pars compacta területén hoz létre szelektív sejtszám csökkenést. A szerrel történt véletlen mérgezés az idiopathiás Parkinson kórhoz nagyon hasonló tüneteket okozott fiatal kábítószer élvezőknél az 1980-as években („frozen addicts”). A toxikus hatásokért egyik fő metabolitja, az 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP^+) felelős. Az átalakulást a monoamin oxidáz-B (MAO-B)

katalizálja. Az MPP^+ a szinaptikus dopamin transzporter segítségével kerül felvételre a dopaminerg sejtekbe. Itt a mitokondriális komplex I aktivitását és az oxidatív foszforilációt gátolja a rotenone kötőhelyhez kapcsolódva (1. ábra). A légzési lánc gátlása megnövekedett szabadgyök képződést, valamint ATP depléciót okoz, ami a sejt pusztulásához vezet. Adagolása mind emberben, mind kísérletes állatokban Parkinson-kórhoz hasonló tüneteket okoz (Dawson et al., 1995).

Másik általánosan használt modell a 6-hidroxi-dopamin (6-OHDA) okozta szelektív neurodegeneráció. A 6-OHDA intraventrikulárisan vagy intrastriatálisan adagolva egyoldali szelektív dopaminerg és noradrenerg sejtpusztulást okoz. Dopaminerg szelektivitása noradrenerg reuptake inhibitorral együttadva (pl. desipramin) érhető el.



1. ábra. A mitokondriális toxinok hatásmechanizmusa.

Amyotrophias lateralsclerosis

Ez a betegség az elsődleges (corticospinalis) és a másodlagos (gerincvelő mellső szarvi) motoneuronok pusztulásával jár. Általában középkorú emberekben jelentkezik és progresszív gyengeséggel, izomsorvadással, beszéd és nyelészavarral, majd a mozgásképesség elvesztésével jár. Az esetek egy részében kognitív funkciók csökkenését is lehet észlelni. Az érzőrendszer, ill. a vegetatív idegrendszer általában megkímélt. A légzőizmok bénulása általában 2-5 év alatt feltartóztathatatlanul halálhoz

vezet. Az esetek többsége ebben az esetben is sporadikus (90%), azonban egyre több gén mutációját hozzák kapcsolatban a kórképpel (2. táblázat).

A betegség kialakulásának számos teóriája van, de mindegyikben közös, hogy a sejtpusztulás apoptotikus, hasonló az egyedfejlődés során észlelt programozott sejthalálhoz. Az elméletek közötti különbség a kiváltó okokban és/vagy a legfontosabb mechanizmusokban van. Ezek közé a mechanizmusok közé tartozik a mitokondriális diszfunkció, az energia deficit, fokozott szabadgyök képződés, az excitotoxicitás, neuroinflammáció, proteoszoma diszfunkció, ill. az axonális transzport zavara.

Név	gén	öröklődés menet	lokusz	hivatkozás
ALS1	SOD1	AD/AR	21q22.21	Rosen et al, 1993
ALS2	ALS2	AR	2q33	Yang et al., 2001
ALS3	?	AD	18q21	Hand et al, 2002
ALS4	SETX	AD	9q34	Chan et al., 2004
ALS5	SPG11	AR	15q15-21	Hentati et al., 1998
ALS6	FUS	AD	16q12	Kwiatkowsy et al., 2009
ALS7	?	AD	20p13	Sapp et al., 2003
ALS8	VAPB	AD	20q13.3	Nishimura et al., 2004
ALS9	ANG	AD	14q11.2	Greenway et al., 2004
ALS10	TARDBP	AD	1p36.2	Tan et al., 2007
ALS11	FIG4	AD	6q21	Chow et al., 2009
ALS/12	OPTN	AD/AR	10p15-p14	Maruyama et al., 2010
ALS/FTD	ATXN2	AD	9q21-22	Elden et al., 2010
ALS/D-P	TAU	AD	17q21.11	Poorkaj et al., 2001

2. táblázat. Az ALS genetikai formái. FTD: fronto-temporális demencia, D-P: demencia-parkinsonizmus.

ALS genetikai modellje

Az első mutáció, amit közöltek familiáris ALS-ben az a SOD1 mutációja volt. Jelenleg az enzimnek több mint 110 különféle mutációját közölték és hozzák összefüggése a familiáris esetekkel. Ezek közül néhány benignus klinikai lefolyással jár (H46R), míg mások kifejezetten agresszív kórformát eredményeznek (A4V). Mivel a SOD1 potens antioxidáns enzim, mutációja érinti az enzim aktivitását, és ez feltehetően hozzájárul a kórkép kialakulásához. Azonban az autoszomális domináns öröklődés és az antioxidánsok limitált hatásossága felveti annak lehetőségét, hogy a mutációk új,

toxikus funkciót is eredményeznek (funkciónyeréses mutáció). Arra vonatkozólag, hogy az enzim mutációja hogyan okozza a motoneuronok pusztulását, nincs egyértelmű konszenzus. Sőt úgy tűnik, hogy az SOD1 mutációja nem csak a motoneuronok pusztulását eredményezi, hanem a körülötte levő astrocyták és mikroglia is érintett. Ezt látszik igazolni az a tény is, hogy amennyiben a SOD1 mutáció a glia sejtekben is expresszálódik, az a klinikai tünetek akcelerációját eredményezi (Boillee et al., 2006).

Ennek felismerése után transzgenikus állatot állítottak elő, amely tartalmazta az Cu/Zn SOD G93A mutációját (Gurney et al., 1994). Ezeknél az egereknél progresszív izomgyengeség és ezzel párhuzamosan a motoneuronok számának csökkenése észlelhető, majd az állatok mozgásképtelenné válva 120-130 napos korukban elpusztulnak.

Leber-féle hereditär opticus neuropathia (LHON)

A Leber-féle optikus neuropathia a retinális ganglion sejtek és axonjainak mitokondriálisan öröklődő degenerációja. A betegség akutan/szubakutan kétoldali, fájdalomtalan látáscsökkenéshez vezet, elsősorban fiatal férfiakban. A férfiakban négyszer gyakrabban alakul ki ez a betegség, mint nőkben. A legjellemzőbb klinikai tünet a centrális látás elvesztése, a retinális ganglion sejtek és axonjainak károsodása következtében. Minor neurológiai tünetek (posturalis tremor, neuropathia, myopathia vagy mozgászavar) előfordulhatnak, de ezek klinikailag ritkán jelentősek. Néhány esetben (főleg nőknél) sclerosis multiplexhez hasonló eltéréseket is leírtak (Olsen et al., 1995, La Russa et al., 2011).

A kórkép oka a mitokondriális DNS-ben kódolt légzési lánc NADH koenzim Q oxidoreduktáz (komplex I) mutációja. A genetikailag igazolt esetek 95%-ában az A1177G8 (0-50%-os reziduális aktivitás), A3460G (60-80%-os reziduális aktivitás) ill. T14484C (0-65%-os reziduális aktivitás) pozícióban levő valamelyik SNP okozza a klinikai tüneteket. Azonban a penetrancia nem 100%-os, mivel pl. 11778 mutációt hordozó férfiak 40-50%-ának, míg a nők 5-15%-ának van aktuálisan látászavara. Ez arra utalhat, hogy a primer mutáció mellett egyéb faktorok is szerepet játszhatnak, mint pl. különböző szuszeptibilitási lokuszok, nukleáris hatás, heteroplasmia, környezeti hatások (dohányzás, alkohol), sőt még az autoimmunitás is. Mivel a primer mutációk mind a komplex I aktivitás csökkenés eredményeznek, a mitokondriális légzési lánc

defektusa, ill. a következményes energiadeficit, fokozott szabadgyök képződés és excitotoxicitás hozzájárulhat a betegség kialakulásához. Azonban a komplex I deficiencia és a pathomechanizmus összefüggése nem teljesen tisztázott, hiszen ezek a mutációk minden szövetben megtalálhatók (pl. thrombocyta, lymphocyta vagy izomszövet), amelyekhez klinikai tünet nem társul.

Sclerosis multiplex (SM)

Sclerosis multiplex a központi idegrendszer demyelinisatiojával járó autoimmun betegség. Az első tünetek általában fiatal felnőttkorban jelentkeznek, és előfordulása nőkben gyakoribb. A tünetek változatosak, leggyakrabban látáscsökkenés, koordinációs- és érzészavar, ill. a pyramis rendszer működészavara észlelhető. A betegséget autoimmun kórképnek tarjuk, azonban kialakulásnak egyértelmű oka nem ismert. Genetikai faktorok mellett, különböző vírusinfekciók (HSV 6, EBV), ill. a D vitaminhiány kóroki szerepe is felmerült. Mivel egypetűjű ikrek esetén is a konkordancia csak 20-35%-os, így a genetikai tényezőknek csak mérsékelt szerepük lehet (Nessler et al., 2009).

Prevalenciája földrajzi eloszlás szerint jelentősen különbözik, északi államokban sokkal gyakoribb, míg a déli országokban előfordulása jóval ritkább. Maga a kórkép több formában jelentkezik: leggyakrabban javuló-rosszabbodó formával találkozunk, amelyből az idő előrehaladtával szekunder progresszív forma alakul ki. E mellett ismert primer progresszív altípus is, amely inkább tekinthető degeneratív betegségnek, mintsem autoimmun kórképnek. Klinikailag izolált formáról (CIS) akkor beszélünk, ha a páciensnek először jelentkeznek klinikai tünetei, de az MRI felvétel, ill. a liquorvizsgálat alapján betegsége definitívnek tekinthető. Az alapvető patológiai eltérés az oligodendroglia sejtek károsodása, következményes demyelinistioval, amelyet többé-kevésbé sikeres remyelinisatio követ. Ezzel párhuzamosan maga az axon is károsodhat, sőt el is pusztulhat. A demyelinisatio tehető felelősség az akutan megjelenő klinikai állapotrosszabbodásért, a remyelinisatio a javulásáért, míg az axonkárosodás a maradandó deficit tünetekért.

Dystonia

Dystoniának nevezzük az izmok akaratlan tartós, repetitív összehúzódását, amely kóros ízületi helyzetet eredményezhet. Attól függően, hogy milyen izomcsoportot érint, megkülönböztetünk fokális (csak egy izom), szegmentális (több szomszédos izomcsoport), hemidystoniát (féloldali izomcsoportok), ill. generalizált dystoniát (több testtájon, több izomcsoport). Ez a kényszermozgás rendszerint spontán jelentkezik, de előfordulnak úgynevezett feladat-specifikus dystoniák is, amikor a kényszertartás csak bizonyos mozgássor végzésekor jelentkezik (írásgörcs, zongoristák dystóniája, stb.). A kórkép pathomechanizmusa nem teljesen tisztázott, de az esetek nagy részében központi idegrendszeri eredet valószínűsíthető. A kevés humán posztmortem patológiai feldolgozás során nem észleltek sejtpusztulást, így a basalis ganglionok tüzelési mintázatának megváltozását teszik felelőssé a tünettan kialakulásáért. Ezt támogatják saját megfigyeléseink is, amikor dopaminerg transzporter aktivitást csökkenést tudtunk kimutatni fokális dystoniában szenvedő betegeinknél (nem közölt adatok).

Név	gén	öröklődés	kromoszóma	hivatkozás
DYT1	torsin1 A	AD	9q34	Ozelius et al., 1997
DYT5	GTP ciklohidroláz	AD	14a22.1-q22.2	Ichinose et al., 1994
	Tirozin hidroxiláz	AR	11p	Lüdecke et al., 1995
DYT6	THAP1	AD	8p21-q22	Almasy et al., 1997
DYT7	?	AD	18p	Leube et al., 1996
DYT11	ϵ -sarcoglikán	AD	7q21 11q23.1	Zimprich et al., 2001
DYT12	<i>ATP1A3</i>	AD	19q12-q13.2	Kramer et al., 1999
DYT13	?	AD	1p36.32-p36.13	Bentivoglio et al., 1997
DYT15	?	D	18p11	Grimes et al., 2002

3. táblázat. A leggyakrabban előforduló dystoniák genetikai csoportosítása.

Többféle ok vezethet a basalis ganglionok szabályozási zavarához, így pl. spinális reciplok gátlás zavara, kortikális átstrukturálódás, túlzott használat, szenzomotoros integráció zavara, stb. Az utóbbi évtizedekben egyre több gén kóroki szerepe igazolódott főleg a generalizált dystoniák esetében (Ozelius et al., 2011; 3. táblázat). Annak ellenére, hogy a tünettan egy adott betegnél fokális jellegű, nem zárja ki annak lehetőségét, hogy ennek háttérében genetikai (generalizált) ok áll. Ez főleg a felnőttkori formákra igaz, vagyis itt sem lehet a fenotípus alapján meghatározni a genotípust.

Módszerek és statisztikai elemzés:

A munkánk során alkalmazott módszereket, ill. statisztikai elemzéseket területi okokból nem ismertetem, ezek a dolgozatokban részletesen megtalálhatók.

Célkitűzések:

Munkám során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

I. A neurodegeneráció mechanizmusának tanulmányozása:

- Az agy aminosav szintjeinek és az antioxidáns rendszereinek vizsgálata különböző neurológiai betegségekben és egyes modelljeiben
- Állatmodelljeink magatartásvizsgálata
- Az α -synuclein deficiencia hatása
- Különböző genetikai modifikációk hatása a sejtpusztulásra
- Az anyagcsere folyamatok tanulmányozása Huntington kór modelljében
- A kinurénsav útvonal vizsgálata neurológiai betegségekben

II. Új terápiás lehetőségek keresése

- Kinurénsav analógok
- Mitokondriális támadáspontú szerek
- Hiszton deacetiláz gátlók
- Antioxidáns hatású molekulák
- Exogen pirimidin származék
- Neuronális NOS gátló
- Embriónális őssejt transzplantáció

Eredmények és megbeszélés

Mitokondriális toxinok hatása az agy aminosav szintjeire, ill. az antioxidáns rendszereire

A neurodegeneráció során több különböző folyamat egymásra hatását figyelhetjük meg. A szervezetben előforduló aminosavak közül több, egy bizonyos koncentrációt meghaladva toxikussá válhat (glutamát, aszpartát, glicin) és ez excitotoxicitáshoz vezethet. Ezek az aminosavak különböző transzporterek segítségével jutnak át a membránokon, amely folyamat ATP-t igényel. Mitokondriális toxinok gátolják a légzési láncot, ezáltal energia deficitet okoznak és megváltoztathatják az aminosavak intracelluláris vagy extracelluláris koncentrációját, és ez hozzájárulhat a neurotoxicitáshoz. Közleményünket megelőzően csak néhány aminosav esetében voltak adatok az irodalomban (reverzibilisen csökkent glutamát és aszpartát szint a striátumban) (Chan et al., 1994), ezért mindkét toxin esetében az aminosavak régió-specifikus és időbeni meghatározását végeztük el (2. és 3. ábra).

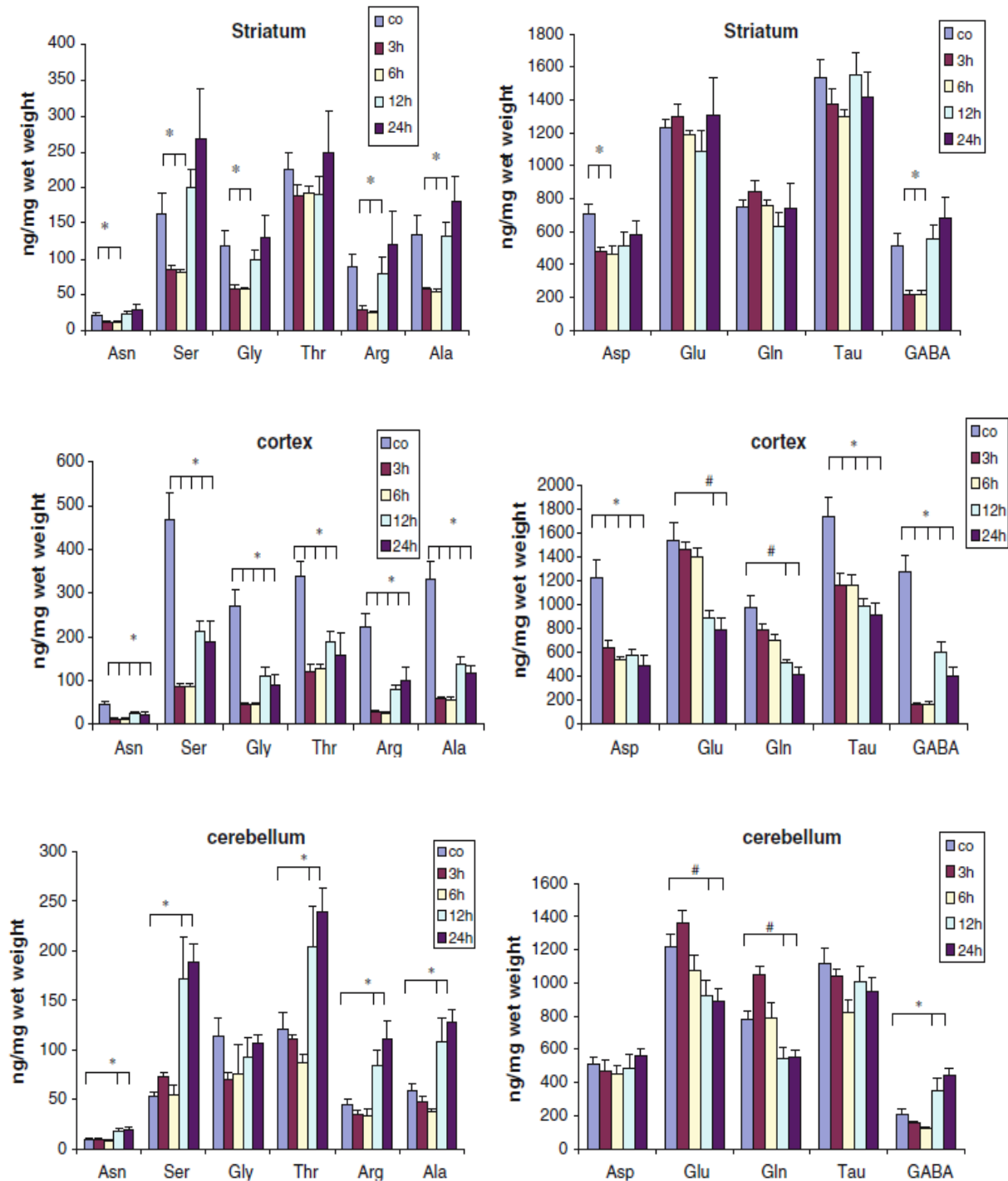
Azt találtuk, hogy a striátumban az MPTP injekciót követően 3 ill. 6 óra elteltével az Asp, az Asn, a Ser, a Gly, az Arg, az Ala és a GABA koncentrációk csökkentek, és a szintek majdnem teljesen normalizálódtak 24 óra elteltével. A Glu, Gln, Thr és Tau koncentrációk nem változtak szignifikánsan.

A kéregben MPTP adását követően az Asp, Asn, Ser, Gly, Thr, Arg, Ala, Tau és a GABA koncentráció lecsökkent és alacsony is maradt 24 óra elteltével is. Érdekes módon a Gln és a Glu szint csak 12 óra elteltével csökkent.

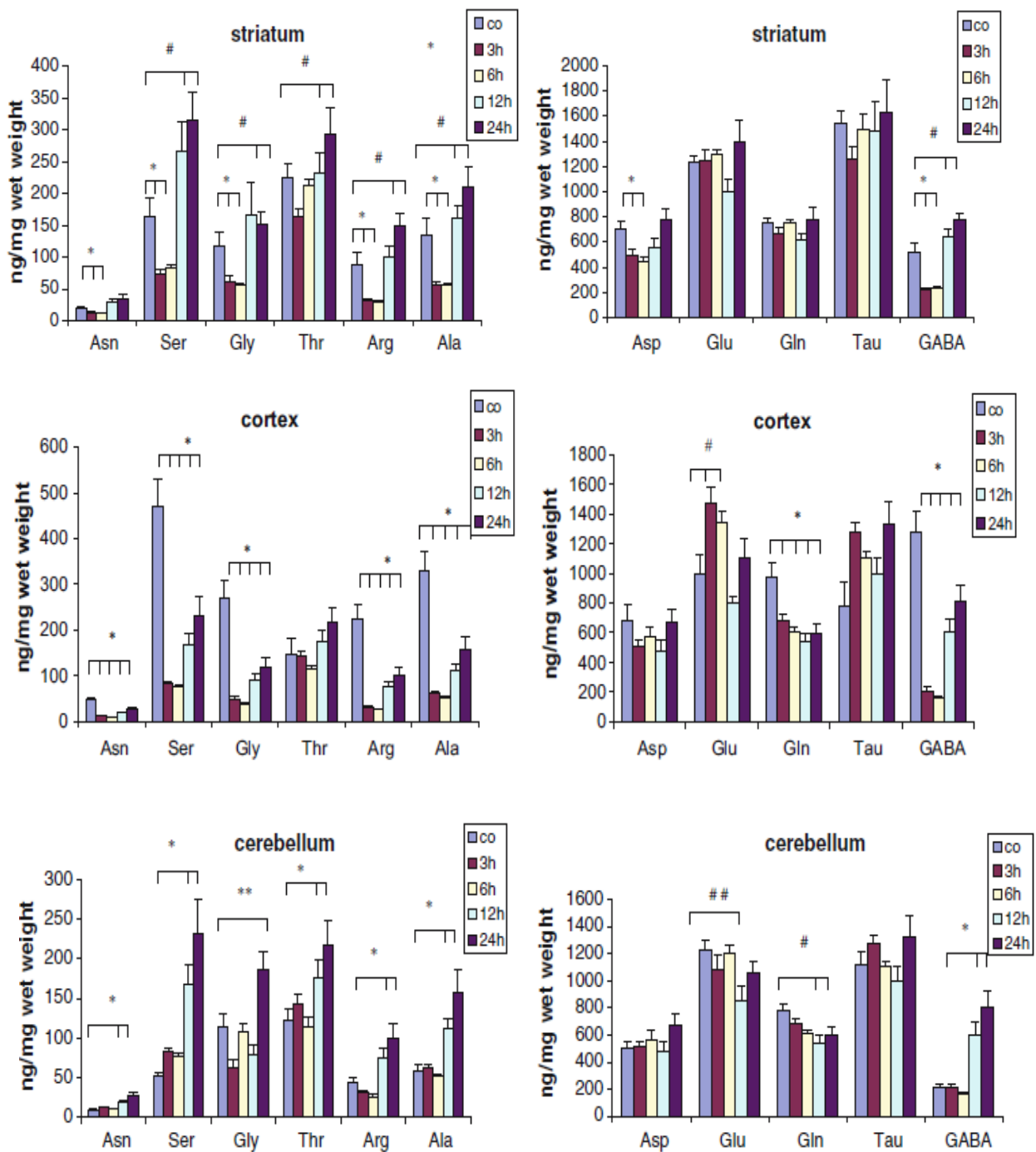
A cerebellumban az Asp, Gly és a Tau szintek nem változtak, míg a Glu és a Gln koncentráció csak 12 ill. 24 óra elteltével csökkent. A fenti eredményekkel ellentétben az Asn, Ser, Thr, Arg, Ala és a GABA szintek 12 ill. 24 óra elteltével megemelkedtek (23. ábra).

3-NP kezelést követően az Asp, Asn, Ser, Gly, Arg, Ala és a GABA koncentrációk a striátumban 3 ill. 6 óra elteltével lecsökkentek, de normalizálódtak 12 óra múlva. Sőt a Ser, a Gly, a Thr, az Arg, az Ala és a GABA szintek szignifikánsan magasabbak lettek a kiindulási értékekhez viszonyítva.

A kéregben a 3-NP az Asn, a Ser, a Gln, a Gly, az Arg, az Ala és a GABA szintet csökkentette és ez alacsony is maradt. Egyedül a Glu koncentrációja emelkedett 3 óra elteltével.



2. ábra. Az MPTP hatása a aminosav szintekre. Átlag $\pm$ SEM, n=7, * p <0,05.



3. ábra. A 3-NP hatása az aminosav szintekre. Átlag $\pm$ SEM, n=7, * p <0,05.

A cerebellumban a Gln és a Glu szintek csökkentek 12 óra múlva, míg a Gly, Asn, Ser, Thr, Arg, Ala és a GABA koncentrációja emelkedett. A Tau szintje nem változott.

A mitokondriális toxinok hatása összetett. Az általunk használt dózisban apoptózist

indukálnak. Annak ellenére, hogy az első 24 órában nem lehet sejtpusztulást kimutatni, számos patológiás folyamat már aktiválódik: ATP hiány alakul ki, fokozódik a szabadgyök képződés ill. apoptotikus enzimek aktiválódnak. Az aminosavak transzportjában, ill. szintézisében részt vevő fehérjék is energia (ATP) függőek. ATP hiányában az aminosavak koncentrációja is jelentősen megváltozhat, amely hozzájárulhat a toxicitáshoz.

Az MPTP adagolás rapid és jelentős ATP deficitet eredményez elsősorban a caudatus-putamenben, a frontális, a temporalis, ill. a cinguláris kéregben. A substantia nigra csak közepes fokban érintett. A cerebellum ill. a fehérállomány csak minimális szinten érintett. A striátumban 8 óra elteltével is alacsony maradt az ATP szint, ezzel szemben a cerebellumban már 4 óra elteltével normalizálódik.

A striátumban mindkét toxin esetén gyors és jelentős koncentráció-csökkenést tapasztaltunk, amely 12 óra elteltével normalizálódik, de addigra az apoptózis már iniciálódott. Ezzel ellentétesen a kéregben észlelt koncentrációcsökkenés 24 óra elteltével is fennáll, annak ellenére, hogy ott az ATP szint csökkenés nem olyan kifejezett, mint a striátumban. Másrészt az is igaz, hogy ezekhez a kifejezett metabolikus eltérésekhez csak limitált magatartásváltozások társultak.

A cerebellumban észlelt aminosavszint emelkedés lehet egyfajta kompenzációs mechanizmus is, mivel az aminosavak közül több neurotransmitter ill. neuromodulátor. A cerebellaris eltéréseknek ellentmond egy korábbi adat, ahol a Glu és Asp szintet változatlanok találták, bár igaz, hogy más adagolást használtak (Chan et al., 1994). Annak oka, hogy a kétféle toxin, hasonló hatásmechanizmusok ellenére, miért hat különböző módon az aminosav szintekre, nem teljesen tisztázott.

Az általunk észlelt aminosavszintek csökkenése magyarázható az ATP hiánnyal, azonban ezt olyan régiókban is észleltünk, amelyek nem érintettek a későbbi sejtpusztulásban (kéreg, ill. cerebellum). Ezek alapján a toxinok sejt-specifitását nem tudjuk megmagyarázni, de a változások időbeli lefolyása fontos adatot szolgáltat a kóros folyamatok megértéséhez.

Antioxidáns rendszerek vizsgálata Leber-féle opticus neuropathiás ill. sclerosis multiplexes betegekben

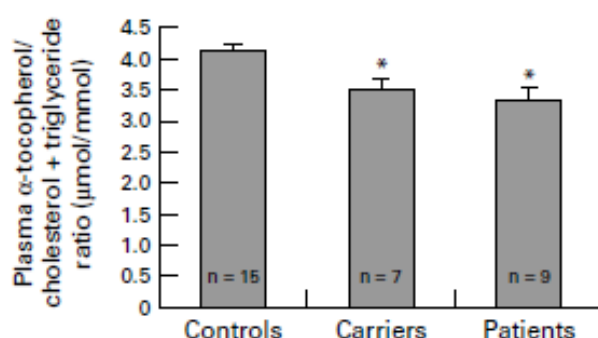
Leber-féle herditer opticus neuropathia (LHON)

LHON a mitokondriális komplex I génjének mutációi okozzák. Ezek a mutációk az enzim aktivitásának csökkenéséhez, energiadeficithez, ill. fokozott szabadgyök képződéshez vezetnek. Nem kellően tisztázott, hogy a komplex I mutációi miképpen vezetnek a retinális ganglion sejtek degenerációjához, hiszen ezek a mutációk minden szövetben megtalálhatóak, esetenként még a tünetmentes hordozókban is.

Mivel ebben a betegségben is fokozott szabadgyök képződés van, munkánk során arra kerestük a választ, hogy hogyan változnak az antioxidáns rendszerek a perifériás vérben. Az endogén antioxidáns védekezés egyik legfontosabb tagja a GSH/GSSG, ill. az α -tokoferol, mind a kettő nagyon hatásosan véd a lipid peroxidáció ellen. Ezeken kívül a lycopene-t, és β -carotene-t, szabad SH csoportokat, valamint a malondialdehidet mértük. Vizsgálatunkba betegeket, tünetmentes hordozókat, ill. kontroll személyeket vontunk be. A betegek, ill. a hordozók mindannyian homoplasmicus 11778 mutációt hordoztak. Ezen antioxidánsok közül csak a lipid szintekre normalizált α -tokoferol szintekben találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált csoportok között (4. ábra). Az antioxidáns védekezés általában ott történik, ahol a szabadgyökök képződnek, így pl. a mitokondriumnak nagyon jelentős védekezési mechanizmusa van. Ezek közül a legjelentősebb a GSH a mátrixban, az α -tokoferol a belső membránban (Bjorneboe et al., 1991). Eredményeink alapján arra lehet következtetni, hogy a csökkent tokoferol szint a mitokondriális defektus miatti fokozott felhasználás eredménye. Az, hogy a többi védekező rendszerben nem tudtunk különbséget kimutatni, feltehetően arra vezethető vissza, hogy ezek a molekulák a szabadgyökök képződési helyén használnak fel elsődlegesen, és egy olyan nagy és távoli kompartmentben, mint a perifériás vér, változásuk már nem detektálható. Ez persze nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy pl. a mitokondriumban koncentrációjuk nem változik. A csökkent antioxidáns kapacitást később mások is megerősítették, mind betegeken (Wang et al., 2008), mind cybridban (Floreani et al., 2005).

Eredményeink alapján a betegeknek az E vitamin szubsztitúció ajánlható.

	<i>Controls</i> (n=15)	<i>Carriers</i> (n=7)	<i>LHON patients</i> (n=9)
GSH ($\mu\text{mol/g hgb}$)	6.81 (0.14)	6.55 (0.22)	6.86 (0.36)
GSSG (nmol/g hgb)	9.25 (0.73)	9.66 (1.54)	8.78 (0.71)
GSSG/GSH	0.14 (0.01)	0.15 (0.03)	0.13 (0.01)
α -Tocopherol ($\mu\text{mol/l}$)	24.57 (1.02)	24.17 (1.72)	23.41 (1.52)
Cholesterol (mmol/l)	4.91 (0.2)	5.71 (0.37)	5.89 (0.23)
Triglyceride (mmol/l)	1.07 (0.28)	1.27 (0.24)	1.16 (0.13)
β -Carotene ($\mu\text{mol/l}$)	0.43 (0.06)	0.74 (0.24)	0.45 (0.08)
Lycopene ($\mu\text{mol/l}$)	0.56 (0.12)	0.38 (0.05)	0.55 (0.16)
SH Groups/protein ($\mu\text{mol/g}$)	2.33 (0.05)	2.51 (0.10)	2.57 (0.14)
Protein (g/l)	78.21 (1.01)	81.83 (1.51)	77.29 (1.48)
MDA ($\mu\text{mol/l}$)	0.41 (0.03)	0.49 (0.06)	0.42 (0.05)



4. ábra. Az antioxidáns rendszerek Leber-féle hereditár optikus neuropathiában és tünetmentes hordozókban. Átlag $\pm$ SEM, * $p<0,05$.

Sclerosis multiplex

A sclerosis multiplex oka nem ismert. A rendelkezésre álló adatok arra utalnak, hogy a gyulladásos folyamatok jelentős szerepet játszanak a pathomechanizmusban (összefoglaló: Stadelmann et al., 2011) Az A és E vitaminhiányt sokáig a betegség rizikófaktorának tartották (Warren et al., 1982), azonban ezt később nem tudták megerősíteni (Wong et al., 1993), míg az utóbbi években a D vitamin deficiencia szerepe látszik igazolódni (Solomon és Whitham, 2010)

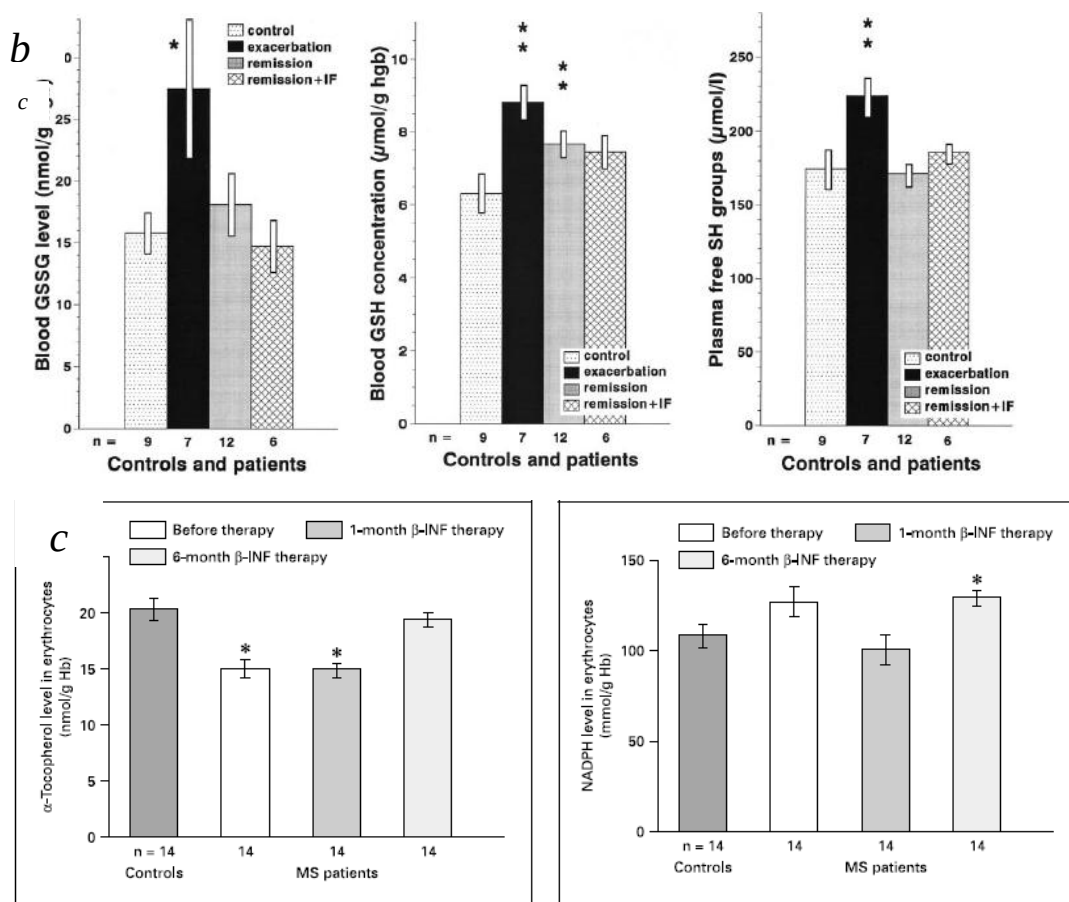
Számos közlemény igazolja, hogy a fokozott szabadgyök képződés és ezzel párhuzamosan a csökkent antioxidáns védekezés fontos szerepet játszhat a betegség kialakulásában (van Horssen et al, 2011). Az is egyre inkább körvonalazódik, hogy ezek az eltérések nem a kiváltó okok, hanem sokkal inkább következményei a pathomechanizmusnak. Éppen ezért elsősorban a nem enzimátikus antioxidánsok

használnának fel először, így ezek szintjében a betegség aktivitásától függő elváltozásokat észlelhetünk. Annak ellenére, hogy a kóros folyamatok elsődleges helyszíne a központi idegrendszer, a perifériás szövetekben is lehet eltéréseket kimutatni (Ristori et al., 2011, Guerrero et al., 2011, Ghabaee et al., 2010), mivel az antioxidáns védekezéshez a rendelkezésre álló molekulákat mindenhol mozgosítani kell. A vérben az egyik legfontosabb antioxidáns rendszer a vörösvértestek GSH/GSSG rendszere. E mellett fontos szerepe lehet a szabad szulfidril csoportoknak, a tokoferolnak, a retinolnak ill. a húgysavnak. Amennyiben fokozott oxidatív stressz alakul ki, ezeknek a molekulák fokozottan felhasználnának, így szintjük alacsonyabbá válik. Jelen munkánk során ezt szerettük volna igazolni. Az utóbbi években a betegség kezelése rohamtempóban fejlődik. Az aktív betegek hosszú távú kezelésére első választandó szerek a különböző β -interferon készítmények, amelyek hatásosan csökkentik az évenkénti állapotrosszabbodások számát, és ezáltal a betegség progresszióját. Arra is kíváncsiak voltunk, hogy az interferon kezelés csökkenti-e a fokozott szabadgyök képződést és az antioxidánsok fokozott felhasználódását. A lipid peroxidáció jellemzésére a malondialdehid szintet használtuk, amely 38%-os emelkedést mutatott az akut állapotrosszabbodásban szenvedő betegeknél, azonban ez, feltehetően a kis elemszám miatt, nem érte el a szignifikancia szintet. A vér GSH szintje szignifikánsan emelkedett mind remisszióban, mind exacerbációban, míg a GSSG szintje, ill. a szabad SH csoportok szintje csak exacerbációban. Ez az emelkedés β -interferon kezelés hatására nem mutatkozott. Az α -tokoferol szint állapotrosszabbodás során csökken, amely csökkenés nem mutatható ki remisszióban ill. interferon kezelés alatt. A húgysav, valamint a retinol szintekben nem észleltünk változást (5. ábra).

A GSSG szint emelkedése valamint a tokoferol szint csökkenése fokozott szabadgyök képződésre utal állapotrosszabbodás során. Ennek ellentmond a nem szignifikáns mértékben emelkedett malondialdehid szint, amely fakadhat technikai okokból is, de az irodalom is ellentmondásos ebben a tekintetben, hiszen mind normál, mind emelkedett értékeket közöltek már (Hunter et al., 1985, Korpela et al., 1989, Polidoro et al., 1984). Ugyancsak ez vonatkozik a GSH szintre is (Hunter et al., 1985, Jensen et al., 1986). Az alacsony érzékenységu módszerek mellett, a betegkiválasztás is szerepet játszhat az adatok ilyen mértékű szórásában, hiszen nem mindegy, hogy remisszióban vagy az exacerbáció melyik fázisában történik a mintavétel. Az emelkedett GSH szint viszont kompenzációs mechanizmusra is utalhat, amelyet

megerősít az a közlés is, hogy a betegek vörösvértestjei ellenállóbbak a hidrogénperoxid okozta károsodásnak (Hunter et al., 1985).

<i>a</i>	Control group (n = 9)	Exacerbation group (n = 7)	Remission group (n = 12)	Remission+IFN group (n = 6)
MDA ($\mu\text{mol/l}$)	1.32 ± 0.15	1.82 ± 0.21	1.66 ± 0.15	1.47 ± 0.15
Protein (g/l)	68.44 ± 2.63	63.91 ± 1.81	65.56 ± 1.67	67.17 ± 2.22
Retinol ($\mu\text{mol/l}$)	2.02 ± 0.55	2.00 ± 0.50	2.68 ± 0.38	2.58 ± 0.34
α -Tocopherol ($\mu\text{mol/l}$)	29.50 ± 2.33	$15.65 \pm 2.58^*$	34.88 ± 2.26	$39.88 \pm 4.23^{**}$
Triglycerides (mmol/l)	1.09 ± 0.12	0.84 ± 0.11	1.22 ± 0.13	1.34 ± 0.11
Cholesterol (mmol/l)	5.16 ± 0.30	5.18 ± 0.61	5.98 ± 0.34	5.86 ± 0.38
Uric acid ($\mu\text{mol/l}$)	247 ± 17	251 ± 22	238 ± 19	240 ± 21



5. ábra. Az antioxidáns rendszerek sclerosis multiplexes betegekben.

- a* antioxidánsok szintjei; * $p < 0,001$ a többi csoporthoz képest; ** $p < 0,001$ a kontroll és az exacerbációs csoporthoz képest.
- b* A GSH/GSSG, ill. a szabad SH csoportok szintjei. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$
- c* Az α -tokoferol és a NADPH szintek változása az eritrocitákban interferon terápia hatására. Átlag $\pm$ SEM * $p < 0,0001$ a kontroll csoporthoz és a 6 hónapos kezelt csoporthoz képest; ill. * $p = 0,0245$ a kontroll csoporthoz és az 1 hónapos kezelt csoporthoz képest.

Az emelkedett szabad SH csoportok feltehetően a magas GSH szinttel vannak összefüggésben. A normál húgysav szint azonban ellentmond a klinikai tapasztalatnak, hiszen gyakran látunk alacsony szintet, remisszióban, és állapotrosszabbodásban egyaránt.

Összességében igazoltnak látjuk a fokozott szabadgyök képződés jelentőségét a betegség kialakulásában, valamint a β -interferon oxidatív stressz gátló hatását, amelyet más vizsgálatok is megerősítettek (Ghabaee et al., 2010, Lutsik et al., 2007, Jin et al., 2007, Koch et al., 2006).

Aminosav szintek sclerosis multiplexben

A sclerosis multiplex kiváltó oka a mai napig nem ismert. A legelfogadottabb autoimmun teória mellett korábban felmerült az excitotoxicitás szerepe is a pathomechanizmusban. Az utóbbi időben ennek szerepét főleg a primer progresszív kórformában vizsgálták. Ez az elképzelés azon alapult, hogy a demyelinisatióért felelős oligodendroglia sejtek felszínén AMPA/kainát receptorokat találtak (Patneau et al., 1994). Az excitatoros mechanizmus vizsgálatára tanulmányoztuk számos aminosavnak a szintjét sclerosis multiplexben szenvedő betegek agy-gerincvelői folyadékában remisszióban. Eredményeink alapján nem találtunk korrelációt sem a betegséggel vagy egyéb klinikai paraméterrel egyik aminosav esetében sem (4. táblázat). Hozzá hasonlóan mások sem találtak lényegi eltéréseket az aminosav szintekben különböző kórformák esetében sem (Gårseth et al., 2001). Egy másik munkacsoport is csak akut relapsusban talált emelkedett Glu szintet (Sarchielli et al., 2003). Ezek az eredmények természetesen nem jelentik azt, hogy az excitotoxicitásnak semmilyen szerepe ne lenne a betegség kialakulásában. Az eltelt időben mind a betegség klasszifikációja (CIS, relapsus, különböző terápiás szerek hatása, stb.), mind detektálási technikák (mikrodialízis) sokat finomodtak, amelyekkel pontosabb képet kaphatnánk ezekről a folyamatokról.

aminosav	kontroll (n=9)	MS (n=17)
Alanin	161.96 ± 81.94	134.22 ± 47.76
Taurin/GABA	64.14 ± 24.80	57.05 ± 25.39
Methionin	135.07 ± 82.72	95.96 ± 39.49
Tryptophane	56.44 ± 41.40	42.85 ± 51.69
Leucine	97.78 ± 48.35	65.63 ± 32.85
Glutamate	27.87 ± 25.61	29.48 ± 15.14
Aspartate	39.92 ± 15.08	43.44 ± 11.10
Serine	132.28 ± 64.02	103.91 ± 45.47
Glutamine	1047.24 ± 236.94	1000.2 ± 270.25
Glycine	58.11 ± 27.64	65.50 ± 22.52
Threonine	212.66 ± 101.61	191.24 ± 75.45
Arginine	140.90 ± 49.89	142.97 ± 45.30

4. Táblázat. Az aminosav szintek sclerosis multiplexes betegek liquorában. (mmol/l; átlag±SD)

Állatmodelljeink longitudinális magatartásvizsgálata

Huntington kór transzgenikus modellje

A Huntington kór jellemző tünete a magatartásváltozás és a viselkedés megváltozása. A genetikai mutáció megismerésével számos különböző genetikai modell került kifejlesztésre, amelyek közül terápiás szerek vizsgálatára a R/2 és a N171-82Q törzseket használják széles körben. Annak ellenére, hogy a törzsek alapvető jellegzetességeit (túlélés, mozgáslelassulás, patológiai elváltozások, stb.) felhasználják a hatásosság megítélésére, de a kezdeti, motoros tüneteket megelőző viselkedésváltozásokról nem születtek tanulmányok. Ezért a mi vizsgálatunk célja az volt, hogy hosszmetsetben vizsgáljuk az általunk használt N171-82Q törzs motoros tüneteinek változását, ezt összehasonlítsuk egyéb törzsek közölt adataival és megpróbáljuk azonosítani olyan paramétereket, amelyek megelőzik a mozgászavart és esetleg felhasználhatók terápiás vizsgálatokban is, végpontként. Vizsgálatunkhoz „open-field” és „elevated plus maze” teszteket használtunk.

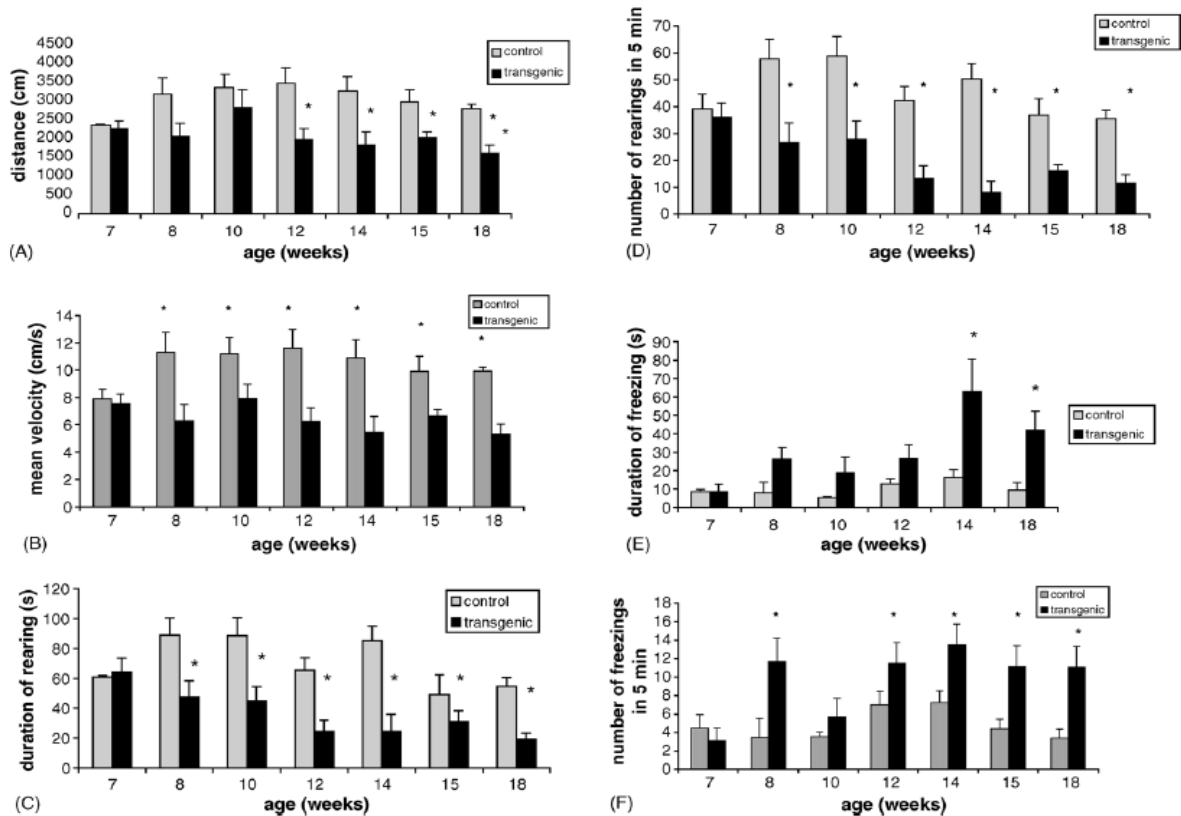
Az állatok által 5 perc alatt összes megtett út (mint a motoros teljesítmény jellemzője) 12 hetes kortól kezdődően csökkent, azonban a mozgásuk sebessége már 8 hetes korukban lassabb, mint a kontroll egereké. Szintén motoros tünetnek tartható a letapadás, amikor az állat az adott mozgás során hirtelen megreked. Ennek száma szintén 8 hetes korában kezd el emelkedni, míg időtartama csak a 14. héttől kezdődően nő meg szignifikánsan (6. ábra).

Az exploratív magatartást jellemző ágaskodások száma és tartalma szintén az egerek 8 hetes korától kezdve csökkent. A szorongás megnyilvánulásának a jele az egerek centrális és perifériás zónában való tartózkodásuk. A periférián, ill. a centrális zónában eltöltött idő egyik életkorban sem különbözött a két csoportban, míg a transzgenikus állatok 8 hetes koruktól kezdve kevesebbszer léptek be a perifériás zónába. Ennek megfelelően az „elevated plus maze” tesztben a transzgenikus egerek kevesebbszer tekintettek le a nyitott karból, mint a kontroll csoport, bár a nyitott és zárt karokban töltött idő nem különbözött a két csoport között. A zárt karokba való belépés gyakorisága viszont csökkent a HD egerekben 9. héttől kezdődően (7. ábra).

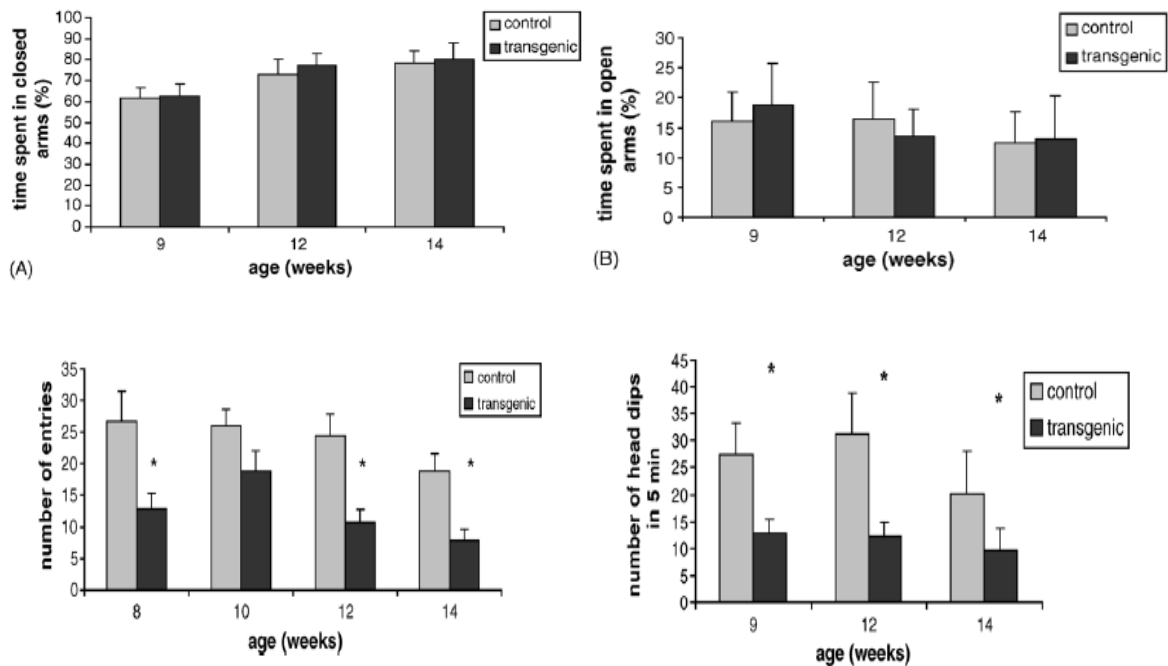
Sztereotíp mozgások közül a mosakodások száma és tartalma növekedett szignifikánsan 15 hetes koruktól kezdődően.

A vizsgált paraméterek változásai nem progresszívek a vizsgált időtartam alatt (vagyis nem romlottak tovább). Azt azonban meg kell jegyezni, hogy kb. a 18-ik hét után ezeket a magatartásvizsgálatokat nem tudtuk tovább folytatni az állatok súlyos tünetei, ill. a fokozódó mortalitás miatt.

Ezek az eredmények jól korreláltak egyéb törzseken közölt adatokkal a motoros teljesítményt illetően (12. hét) (Naver et al., 2003, Scattoni et al., 2004, Schilling et al., 1999), azonban mi sem az „elevated plus maze”, sem az „open field” tesztel nem tudunk különbséget kimutatni az állatok szorongásában a két csoport között. Ez azért fontos megfigyelés, mert az R/2 csoportban csökkent szorongást detektáltak (File et al., 1998). A különbség oka feltehetően a polyglutamin szakasz hosszával magyarázható (az R/2 egerekben 120, míg a mi esetünkben csak 82). Az exploratív magatartás zavarát (csökkent ágaskodás, ill. letekintés a nyitott karokból) már az egyértelmű motoros tünetek megjelenése előtt 8-9 hetes korban ki tudtuk mutatni. Ezek alapján ez a paraméter alkalmas a betegség kezdetének megállapítására és felhasználható terápiás vizsgálatokban a betegség késleltetésének megítélésére.



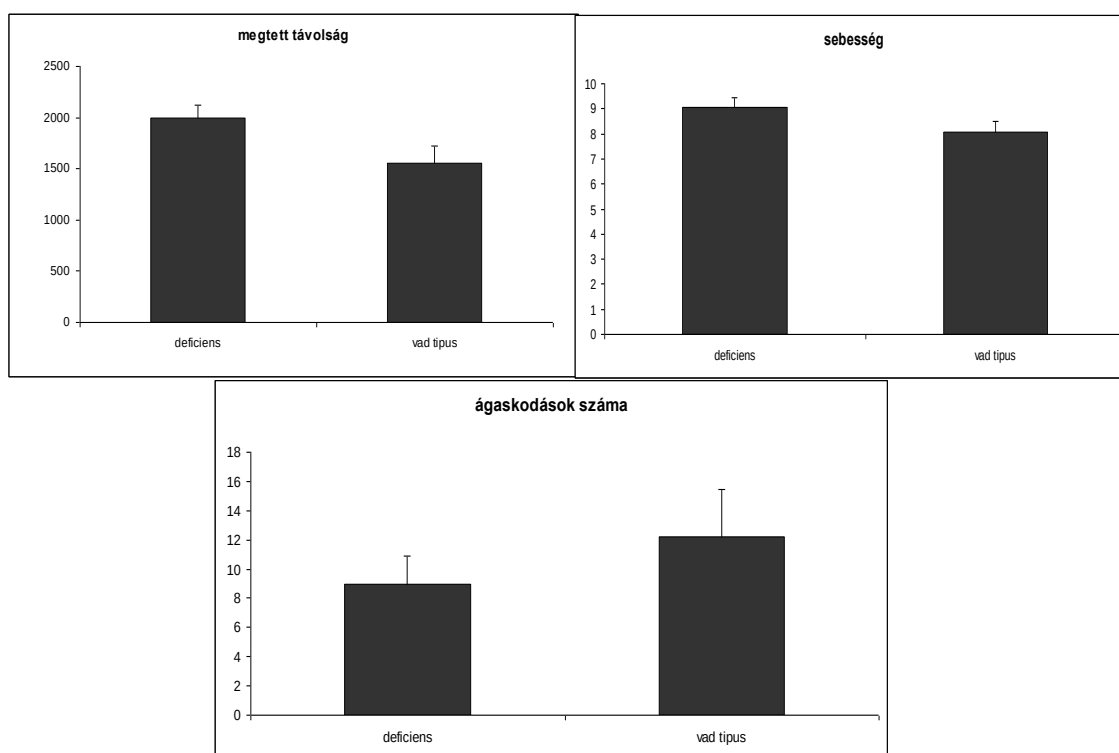
6. ábra. Magatartásvizsgálatok „open field” tesztben transzgenikus Huntington modellben. $t=5$ min., $*p<0,05$; megtett távolság (A); átlagsebesség (B); ágaskodások időtartalma (C); ágaskodások száma (D), lefagyások ideje (E); lefagyások száma (F).



7. ábra. Magatartásvizsgálatok „elevated plus maze” tesztben transzgenikus Huntington modellben. $*p<0,05$

PGC1- α deficiens egerek

A PPAR γ coactivator-1 (PGC-1) a transzkripciós koaktivátorok családjába tartozik, amelyek fontos szerepet töltenek be a glükóz és a lipid anyagcserében, az energia-termelésben, valamint a mitokondrium normál működésében. A PGC1 koaktivátorok különböző transzkripciós faktorokhoz kötődnek, mint pl. PPAR γ , PARa, ERR, LXR, HNF-4a, CREB, lipogen transzkripciós faktor, sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), vagy forkhead box O1 (FOXO1). A PGC1 α szerepe a neurodegenerációban akkor merült fel először, amikor kiderült, hogy a deficiens egerek hiperkinetikus mozgászavart, ill. striatális degenerációt mutatnak (Lin et al., 2004). Igazolódott, hogy ez a molekula mintegy karmester vezényli a sejtek működését, ill. energia termelését azáltal, hogy heteromer komplexeket képez számos transzkripciós faktoral. Fokozott expressziója, vagy farmakológiai aktivációja (SIRT1 aktivátorokon keresztül) protektív hatású, pl. a mutáns huntington okozta sejtpusztulás ellen (Wareski et al., 2009).



8. ábra. A PGC1 α deficiens állatok magatartásvizsgálata „open-field” tesztben.

Ezen felül posztmortem adatok igazolták Huntington betegekben a csökkent PGC1 α működést (Weydt et al., 2006). Ezek az adatok arra utalnak, hogy ez a faktor fontos szerepet tölthet be a neurodegenerációban. Mivel deficiens kolóniánk nehezen szaporodik, így vizsgálatainak még folyamatban vannak, de a magatartásvizsgálatokat elvégeztük (8. ábra).

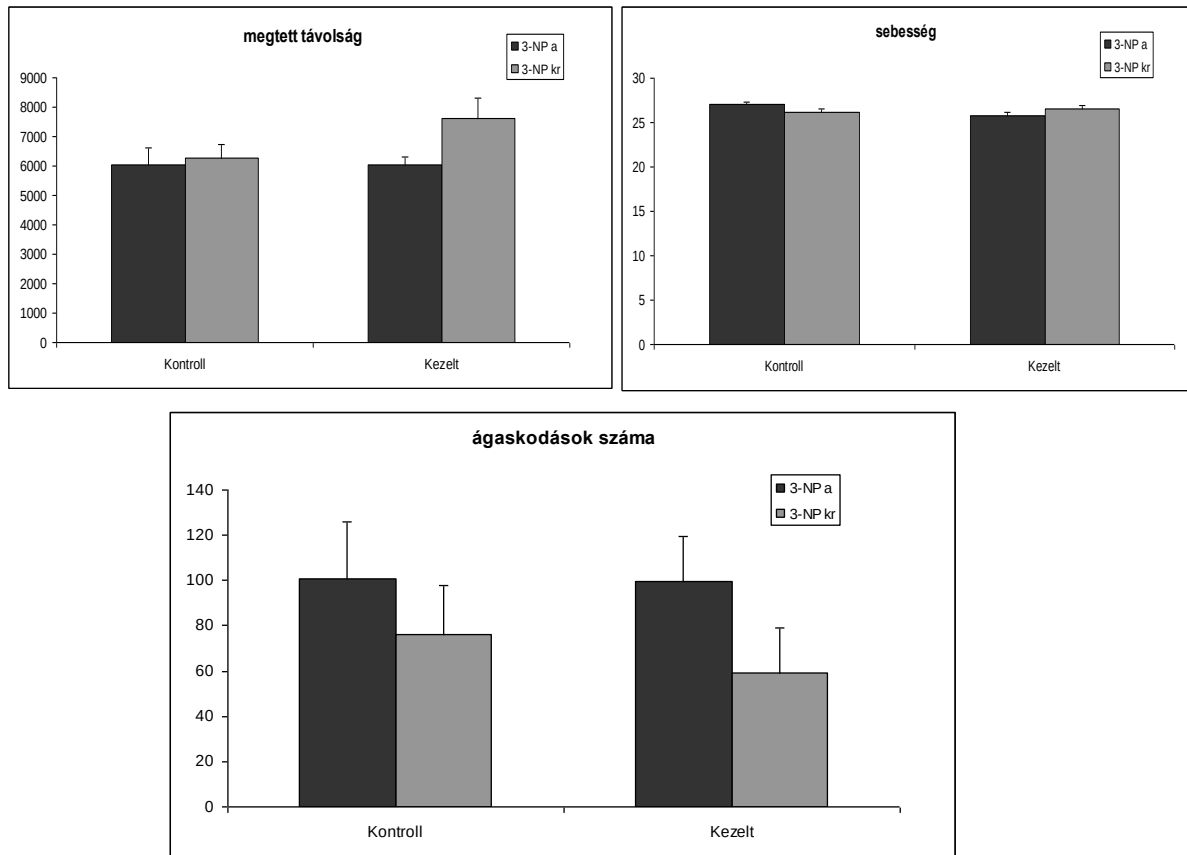
Huntington kór 3-NP modellje

A mitokondriális komplex II gátló 3-NP széleskörben használt modellje a Huntington kórnak, mivel patológiailag nagyon hasonló elváltozásokat okoz, mint amiket betegekben észleltünk. Azonban a modell használata nem egyszerű. A toxinérzékenység itt is faj specifikus egér-patkány-főemlős-ember sorrendben. Ráadásul a dozírozás is gyakran nehéz, mivel nagyobb adagok nektrózt okoznak a striátumban, míg ha nem elegendő a dózis, nem okoz szignifikáns mértékű sejtpusztulást. A kettő között szűk a határ. Ezért kezdtünk el olyan magatartási paramétert keresni, amely segítene előre jelezni a sejtpusztulás mértékét. Ezek a vizsgálatok még folyamatban vannak. A jelenlegi protokollunkban eddig úgy tűnik, nem sikerült megfelelő változót találni, mert úgy tűnik, hogy az összes paraméter normalizálódik a 3-NP abbahagyása után, kivéve az ágaskodások számát, amely azonban az eredmények nagy szórása miatt nem megbízható paraméter (nem közölt adatok; 9. ábra).

Azid hatása az α -tokoferol szintre

A neurodegeneratív betegségek mitokondriális diszfunkcióval és fokozott szabadgyök képződéssel járnak. A mitokondriális légzési lánc gátlása is hasonló eltéréseket okoz. A sejtek szabadgyökök elleni védekező rendszereinek puffertoló kapacitása véges. A legfontosabb védekező rendszerek közé tartozik az α -tokoferol ill. a GSH/GSSG rendszer.

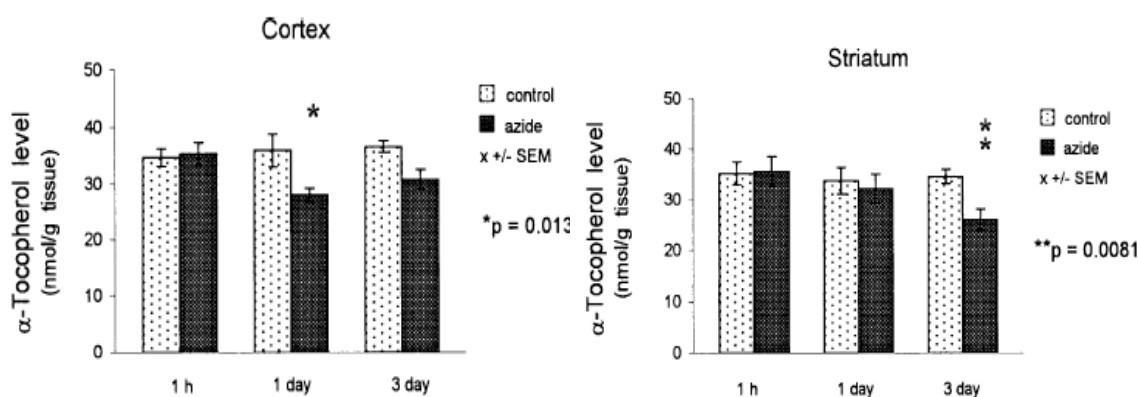
Munkánkban arra kerestük a választ, hogy a mitokondriális légzési lánc komplex IV gátlása aziddal hogyan befolyásolja az antioxidáns rendszereket. Az azid szisztémás adagolása patkányban a GSH rendszert nem befolyásolta (bár a GSSG nem szignifikáns mértékben emelkedett), míg az α -tokoferol szint a kéregben 1 nap után csökkent, de 3.



9. ábra A 3-NP magatartásvizsgálata akut (a) és krónikus (kr) adagolást követően.

napra ez a csökkenés nem érte el a szignifikancia szintet. Ezzel szemben a striátumban csak a 3. nap után találtunk szignifikáns csökkenést (10. ábra).

Vizsgálatunkból azt a következtetést vontuk le, hogy a komplex IV gátlás okozta szabadgyökképződés elleni védekezésben az α - tokoferol igen fontos szerepet tölt be. Annak oka, hogy a GSH rendszer érintettségét nem tudtuk kimutatni, nem feltétlenül utal arra, hogy ez nem vesz részt a védekezésben, fakadhat abból is, hogy alacsony volt az elemszám. Ugyancsak érdekes eredmény, hogy a kéregben hamarabb észleltünk csökkenést, mint a striátumban. Ennek feltehetően az az oka, hogy a kérgi neuronok érzékenysége az energia deficitre nagyobb, mint a striatum neuronjaié. Azonban azt is látni kell, hogy az antioxidáns rendszerek feltérképezése ebben az esetben nem volt teljes körű, így elképzelhető, hogy korábban már más rendszerek kompenzálják a kezdeti szabadgyök képződést.



10. ábra. Az α -tokoferol szintek azid kezelést követően. (Átlag $\pm$ SEM), n=6.

A komplex IV gátlás jelentőségét hangsúlyozza az a közlés, hogy Huntington kór transzgenikus modelljében, ill. Parkinson kóros betegek limfocitáiban is csökkent komplex IV aktivitást találtak (Tabrizi et al., 2000; Müftüoglu et al., 2004). Ennek tükrében Parkinson kóros betegek E vitamin szupplementációjának humán terápiás jelentősége is lehet.

Az α -synuclein hatása a mitokondriális toxinmodellekben

Az α -synuclein akkor került az érdeklődés középpontjába, amikor kiderült, hogy mutációja autoszomális dominánsan öröklődő Parkinson kórt okoz, ill. hogy a betegségre jellemző Lewy testek α -synucleint tartalmaznak (Polymeropoulos et al., 1997; Spillantini et al., 1998; Kruger et al., 1999). Később igazolódott, hogy a multisystemas atrophiaiban található gliaris citoplazmatikus zárványokban (Papp-Lantos testek) (Tu et al., 1998), ill. a Huntington kórban észlelhető intranuclearis zárványokban is megtalálható (Furlong et al., 2000; Mezey et al., 2000). Nagy betegszámú asszociációs vizsgálatok (GWAS) is igazolták, hogy csak az α -synuclein ill. a TAU protein génje hozható összefüggésbe Parkinson kórral (Simón-Sánchez et al., 2009).

Magának a protein normál funkciója nem teljesen ismert. A központi idegrendszerben mindenhol expresszálódik, és a preszinaptikus terminálokban található meg a szinaptikus vezikulákhoz asszociáltnak (Goedert et al., 2001; Cole et al., 2002). A protein jelentős konformációs változáson megy át a membránhoz kötődést követően, és ezáltal számos membránproteinnek ill. mikrotubulus proteinnel lép kapcsolatba

(Goedert et al., 2001). Ez a konformáció változás jelentős szerepet játszhat a betegség kialakulásában, mivel az α -synuclein számos ismert mutációja fokozza a nem fibrilláris szerkezetű oligomerek képződését, vagy gátolja a protofibrillumok átalakulását fibrillásis struktúrává (Conway et al., 2000). Az oxidatív károsodás során a proteinek bizonyos aminosavai nitrálódnak (pl. nitrotirozin), ill. ditirozin formában összekapcsolódnak in vitro, ezáltal gátolják a fibrilláris struktúra kialakulását (Souza et al., 2000; Paxinou et al., 2001). Ezt a mechanizmust támogatja az a megfigyelés is, hogy Parkinson kórban a Lewy testek is nitrálódtak (Giasson et al., 2000), amely peroxinitrit károsodásra utal.

Maga az α -synuclein is képes fokozni az oxidatív károsodást in vitro, ill. szenzitizálja a sejteket az oxidatív károsodásra (Hsu et al., 2000; Ko et al., 2000; Ostrerova-Golts et al., 2000). Az α -synuclein vad típusa ill. mutáns formája is toxikus drosophila, egér, ill. patkány-modellekben (Feany et al., 2000).

Annak megállapítására, hogy az α -synuclein hiánya hogyan befolyásolja a mitokondriális toxinok hatását, α -synuclein homozigóta ill. heterozigóta deficiens állatokat használtunk. A homozigóta egerekben nem volt kimutatható α -synuclein protein. Ezek az egerek életképesek voltak és normálisan fejlődtek.

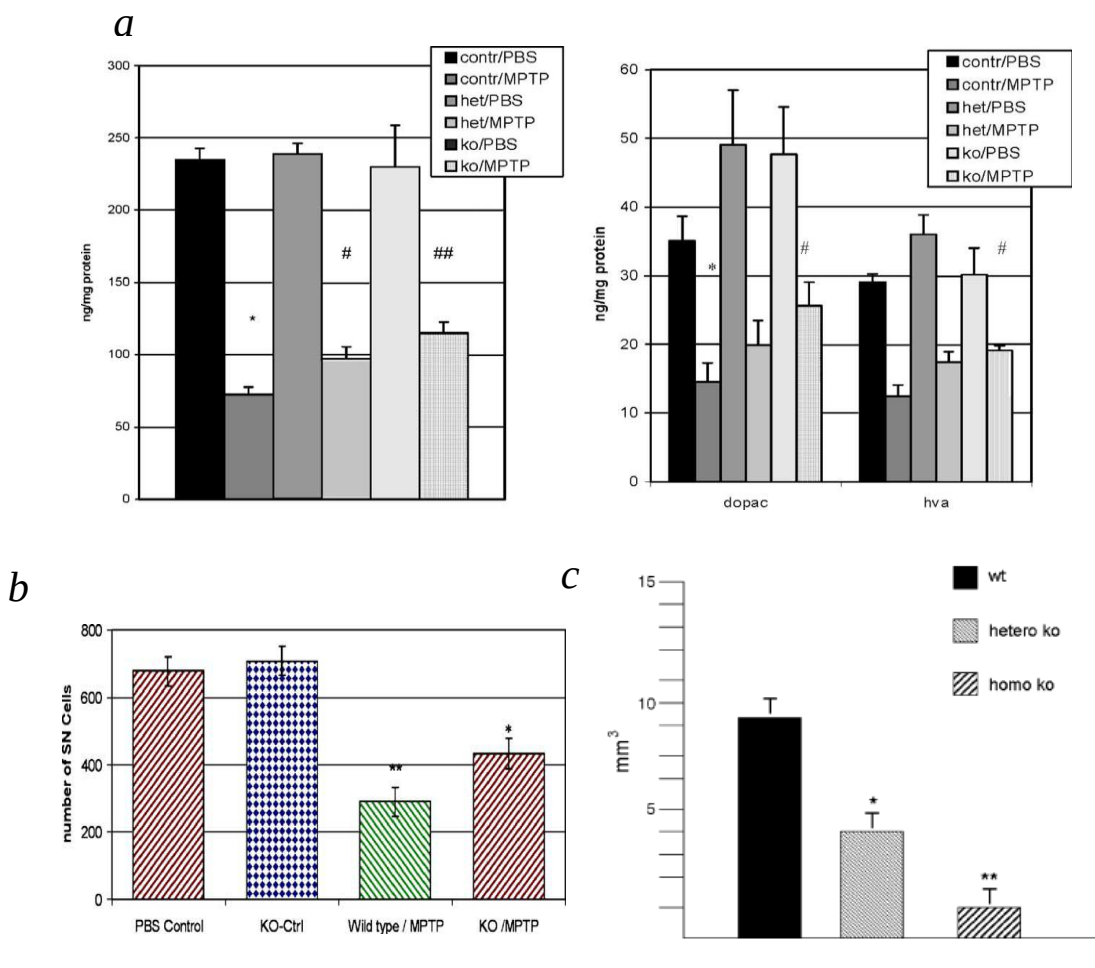
Azt találtuk, hogy a deficiens egerek dózis dependens módon kevésbé voltak érzékenyek az MPTP toxicitással szemben, mind a vad típusú egerek (70%-os dopamin deplécio a vad típus esetén, míg 49% heterozigóta ill. 41% homozigóta állatokban). Ugyancsak protektív hatást találtunk malonát és 3-NP toxicitással szemben is (11. ábra).

Annak igazolására, hogy az α -synuclein hozzájárul az oxidatív károsodás kialakulásához, a 4-HBA/3,4-DHBA átalakulást is mértük, mint a hidroxil gyökök okozta oxidatív károsodás egyik mértékét. Alaphelyzetben nem volt különbség az arányukban, míg 3-NP adagolás után a vad típusnál szignifikánsan fokozódott az átalakulás, amely dózis dependens módon csökkent α -synuclein hiányában.

Ezek az adatok arra utalnak, hogy az α -synuclein oxidatív stressz útján járulhat hozzá a Parkinson kór kialakulásához. Ezt támogatja az a megfigyelés is, mely szerint az MPTP fokozza az α -synuclein expresszióját, ill. mutáns α -synuclein overexpressziója fokozott szabadgyök képződéshez, és ezáltal sejtkárosodáshoz vezet

(Orth et al., 2004). Laboratóriumunkban az ez irányú vizsgálatok még folyamatban vannak. Szintén azóta közölték, hogy amíg az α -synuclein deficiencia csökkenti az MPTP toxicitását, addig a normál humán gén expressziója nem állítja vissza az érzékenységet, csak a mutáns (A53T) α -synuclein expressziója (Thomas et al., 2011).

Ezek az adatok is egyre inkább alátámasztják azt a teóriát, amely szerint az α -synucleinnek centrális szerepe van a Parkinson kór pathomechanizmusában (Eller et al., 2011).

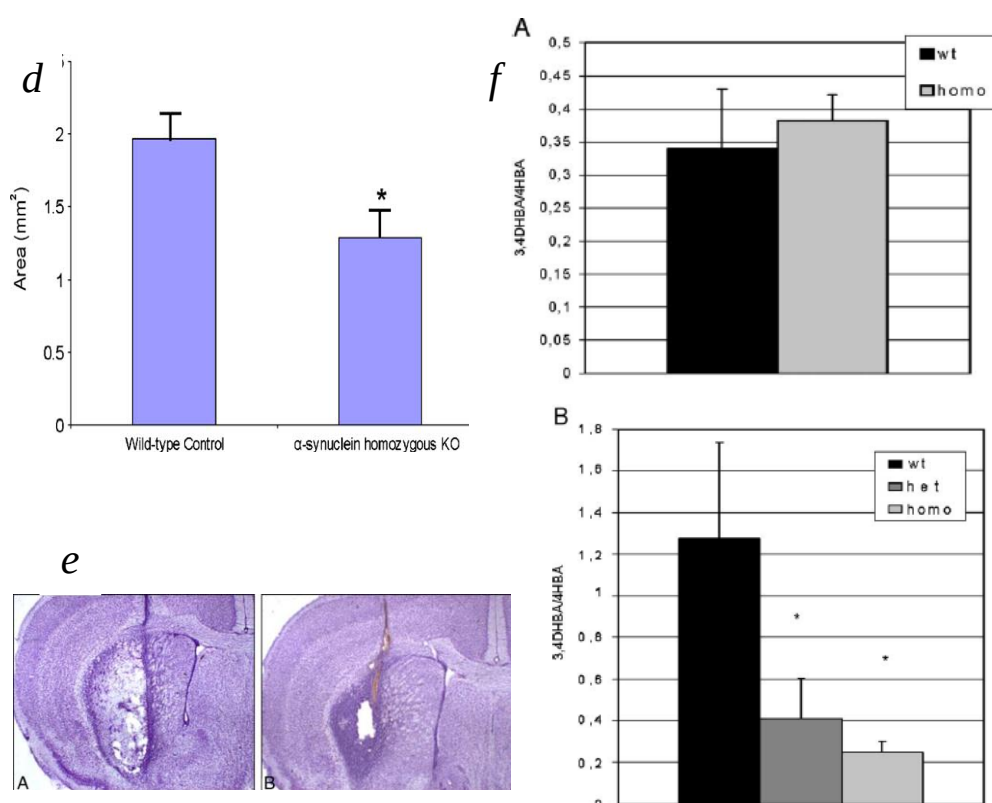


11. ábra. Az α -synuclein szerepe a mitokondriális toxinok okozta sejtpusztulásban.

a A dopamin és metabolitjainak szintje. Átlag $\pm$ SEM. * p <0.001, a kezeletlen vad típusú állatokhoz képest; # p <0.05 Az MPTP kontroll csoporthoz képest; ## p <0.002, az MPTP kontroll csoporthoz képest.

b A substantia nigra DAT pozitív sejtjei. ** p <0.01 a kezeletlen vad típusú csoporthoz képest; * p <0.05 az MPTP kontroll csoporthoz képest.

c A malonát okozta sejtpusztulás a striátumban Nissl festéssel. „A” vad típus; „B” α -synuclein deficiens állat



11. ábra. Az α -synuclein szerepe a mitokondriális toxinok okozta sejtpusztulásban (folytatás).

d A malonát okozta striatalis lezió nagysága. $*p<0.05$.

e A 3-NP okozta striatális sejtpusztulás nagysága. $*p<0.05$, $**p<0.01$.

f A 4HBA/3,4DHBA arány kontroll, és deficiens csoportban, valamint 3-NP adagolást követően. $*p<0.05$.

Különböző genetikai modifikációk hatása a mitokondriális toxinok okozta sejtpusztulásra

Glutation peroxidáz (GSHPx) deficiencia

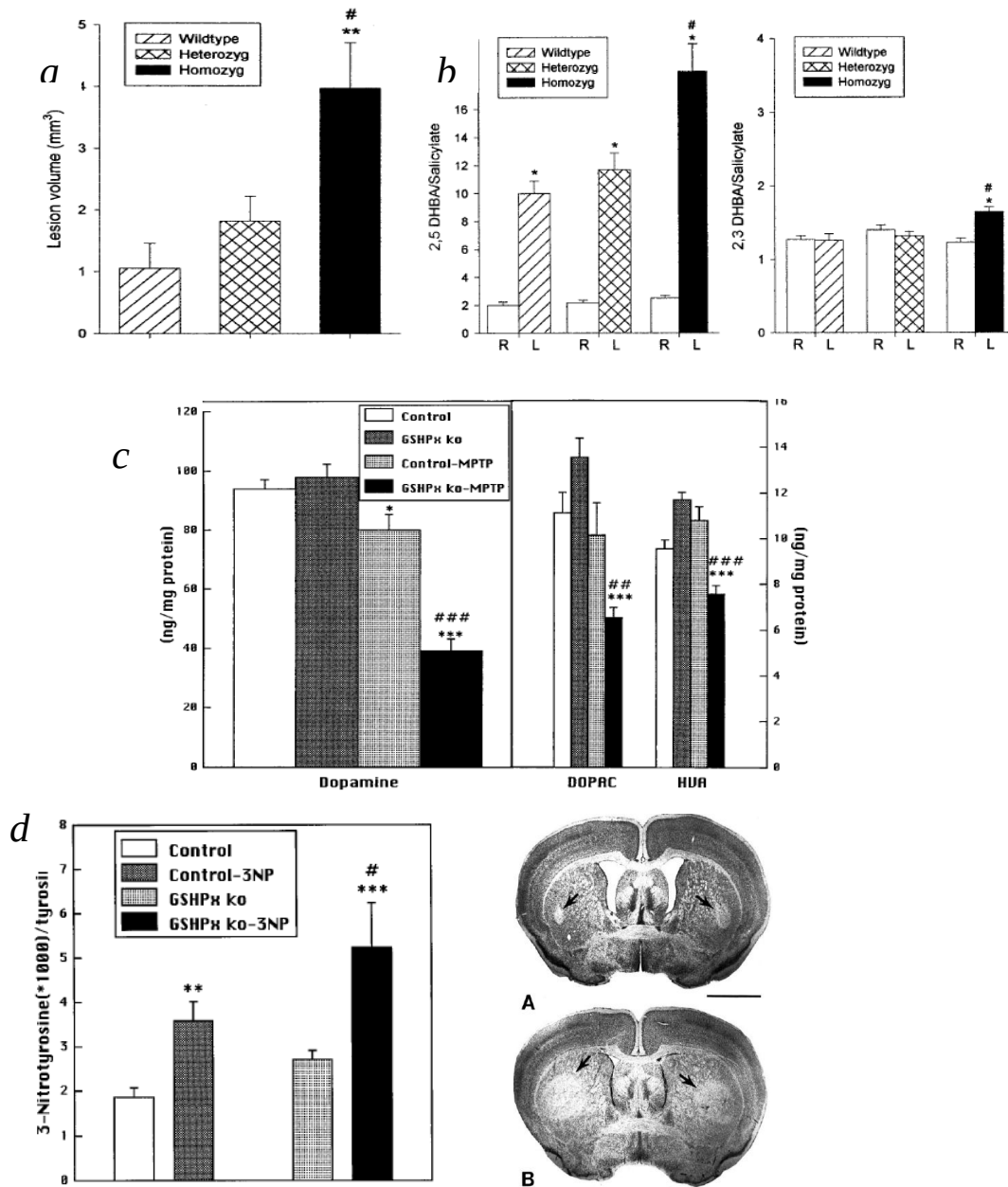
Az idegszövet antioxidáns enzimei közé tartozik a Cu/Zn szuperoxid diszmutáz, amely a szuperoxidot alakítja hidrogén peroxiddá, majd ezt a kataláz vagy a szelént tartalmazó glutation peroxidáz tovább alakítja vízzé. Az agyszövet relatíve kevés katalázt tartalmaz, így a peroxidáz csoport dominál. Ebbe a csoportba tartozik a szelént tartalmazó glutation peroxidáz I (GSHPx; GSH:H₂O₂ oxidoreduktáz, EC 1.11.19) és a

nemrégiben azonosított foszfolipid hidroperoxid glutation peroxidáz (Fisher et al., 1999). Az agyban csak a GSHPx bontja a hidrogén peroxidot, így ez a legfontosabb enzim a védekezésben (Jain et al., 1991). Ez az enzim ugyancsak részt vesz a peroxinitrit (ONOO_2) elleni védekezésben is (Sies et al., 1997). A GSHPx a neuronok és az astrocyták citoplazmájában és mitokondriumában is megtalálható (Vitorica et al., 1984), és expressziója a bazális ganglionok közül a substantia nigra pars compactában a legmagasabb (Kunikowska et al., 2002).

Ebben a munkánkban arra kerestük a választ, hogy a glutation peroxidáz rendszer mennyire játszik fontos szerepet a mitokondriális toxinok elleni védekezésben.

Ehhez homozigóta, ill heterozigóta knock out egereket használtunk. A homozigóta állatokban a kéreg GSHPx aktivitása csupán a kontroll 15%-a (Lawrence és Burk, 1976).

Az előzetes várakozásoknak megfelelően ezek az állatok érzékenyebbek voltak a toxinokra, mind az MPTP, mind a 3-NP, ill. a malonát indukálta sejtkárosodásra. Az alacsony dóziszú MPTP szignifikánsan nagyobb dopamin depléciót eredményezett a homozigóta állatokban, mint a vad típusú állatoknál. Hasonlóan a malonát és a 3-NP injekció is nagyobb léziót okozott a homozigóta állatokban, azonban a heterozigóta és a vad típusban a lezió nagyságát tekintve nem volt különbség malonát injekció után (12. ábra). A fokozott oxidatív károsodásra utal az is, hogy mind MPTP, mind 3-NP adagolása után a homozigóta egerekben a peroxinitrit károsodást jellemző 3-nitrotirozin szint szignifikánsan magasabb volt, mind vad típusú állatok esetén. Hasonlóan a hidroxilgyök képződést jelző szalicilát, 2,3 és 2,5-DHBA átalakulás is szignifikánsan nagyobb volt a deficiens törzsben. Eredményeinket más csoport is megerősítette (Zhang et al., 2000). Meglepő módon a mitokondrium antioxidáns védekezésében oly fontosnak tartott GSHPx komplett hiánya nem okozza az állatok elpusztulását, sőt patológiai feldolgozás során nem észleltek lényeges eltérést (Ho et al., 1997). Ez csak úgy képzelhető el, hogy a hidrogén peroxid ebben a helyzetben alternatív módon bomlik el, habár az agy kataláz aktivitása alacsony. Feltehetően ilyenkor aktivitása és/vagy expressziója fokozódik, hiszen külön-külön gátlásuk nem okoz lényeges csökkenést a hidrogén peroxid eliminálásában sejt kultúrában (Dringen és Hamprecht, 1997). Azóta az is kiderült, hogy ennek az enzimnek az indukciójához a $\text{PGC1}\alpha$ aktiválódása szükséges (St-Pierre et al., 2006).



12. ábra. A GSHPx deficiencia hatása a neurotoxicitásra.

- a* A malonát okozta lézió nagysága $**p < 0.01$ a kontrollhoz képest; $\#p < 0.05$ a heterozigóta egerekhez képest.
- b* A malonát okozta hidroxilgyök képződés $*p < 0.001$ az ellenoldali striatumhoz képest; $\#p < 0.001$ a kontrollcsoporthoz és a heterozigóta csoporthoz képest.
- c* A dopamin és metabolitjainak szintje. $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ a kontroll csoporthoz képest; $\#p < 0.01$, $###p < 0.001$ az MPTP csoporthoz képest. Átlag $\pm$ SEM.
- d* A 3-NP okozta 3-nitrotirozin szint emelkedés, valamint reprezentatív metszet a 3-NP okozta lézióról. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ a kontroll csoporthoz képest. A kontroll, B GSHPx deficiens állat. Mérték: 2mm.

Vizsgálatunkban azt igazoltuk, hogy habár normál körülmények között a kataláz tudja kompenzálni a GSHPx hiányát, azonban olyan állapotokban, amikor a szabadgyök képződés extrém fokban fokozódik, ez a kompenzáció kimerül. A neurodegeneratív betegségek esetén elképzelhető, hogy az antioxidáns védekezés defektusa kompenzálódik egészen addig, míg környezeti (toxikus) vagy egyéb genetikai faktor ki nem meríti a sejtek kompenzációs képességét.

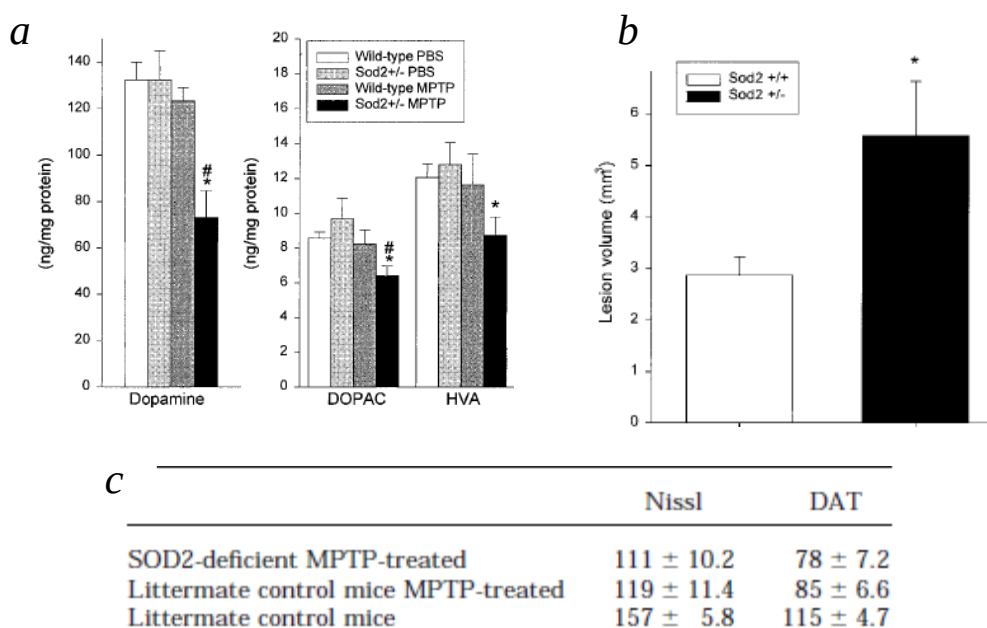
Mangán szuperoxid-diszmutáz (MnSOD) deficiencia

A szuperoxid diszmutáz fontos szerepet tölt be az antioxidáns védekezésben. A sejtben kétféle intracelluláris diszmutáz található: a Cu/Zn tartalmú SOD1, amely a citoplazmában és a magban található, valamint a Mn tartalmú SOD2, amely a mitokondriumba lokalizált. A basalis ganglionok közül a substantia nigra pars compactájában legmagassabb az expressziója (Kunikowska et al., 2002). A MnSOD2 kritikus fontosságú a sejt működésében, hiszen genetikai eliminációja myocardialis károsodáshoz, neurodegenerációhoz és korai perinatális halálhoz vezet (Lebovitz et al., 1996, Li et al., 1995). Ezzel szemben a heterozygóta állatok (50%-os reziduális SOD2 aktivitással) életképesek, nem mutatnak neurodegenerációt, de fokozottan érzékenyek fokális ischaemiával szemben (Murakami et al., 1998).

Ebben a munkában azt vizsgáltuk, hogy kompenzált állapotban levő, de deficiens törzs hogyan reagál mitokondriális toxinok okozta metabolikus stresszre. Eredményeink azt mutatták, hogy ezek az állatok fokozottan érzékenyek a toxinokkal szemben. Az az MPTP dózis, amely vad típusú állatokban nem okoz szignifikáns striatális dopamin csökkenést, a heterozygóta állatokban közel 40%-os csökkenést eredményezett, míg malonát ill. 3-NP injektálás esetén a striatális lézió nagysága közel 50%-kal volt nagyobb a kontroll csoporthoz képest (13. ábra).

Ezek az eredmények megerősítik azt a feltevést, hogy csökkent SOD2 aktivitás bizonyos körülmények között elegendő lehet a sejt életben maradásához, azonban metabolikus stressz esetén (pl. toxikus ártalmak, vagy hipoxiás állapot) a sejtek sokkal nagyobb arányban károsodnak, mint a vad típusú társaik. Ugyanezt a jelenséget észleltük a GSHPx deficiencia esetén is. A SOD2 aktivitáscsökkenése azonban nem

csak genetikai elimináció útján következhet be, hanem pl. a peroxinitrit is képes csökkenteni az aktivitását, amely elindíthatja a fenti kaszkádot és végül a sejt pusztulásához vezethet. Ennek szerepét támasztja alá az a megfigyelés is, hogy emelkedett nitrált SOD2 szintet találtak mind Parkinson kór, mind ALS ill. Alzheimer kórban szenvedő betegek agy-gerincvelői folyadékában (Aoyama et al., 2000). Ennek az enzimnek a szabályozásában sem hanyagolható el a PGC1 α rendszer (St-Pierre et al., 2006).



13. ábra. Az SOD2 deficiencia hatása a neurotoxicitásra.

- a* A dopamin és metabolitjainak szintje. Átlag $\pm$ SEM; n=8–10. *p<0.01 az SOD deficiens kontroll állatokhoz képest; #p<0.01 az MPTP kontrollhoz képest.
- b* A malonát okozta lézió nagysága. Átlag $\pm$ SEM; n=8. *p<0.05.
- c* A substantia nigra pars compacta DAT pozitív és Nissl festődésű sejtek száma. Átlag $\pm$ SEM.

Dihidrolipoamid dehidrogenáz deficiencia

Számos adat támogatja, hogy az α -ketoglutarát dehidrogenáz komplex (KGDHC) szerepet játszhat a neurodegenerációban, hiszen aktivitását posztmortem

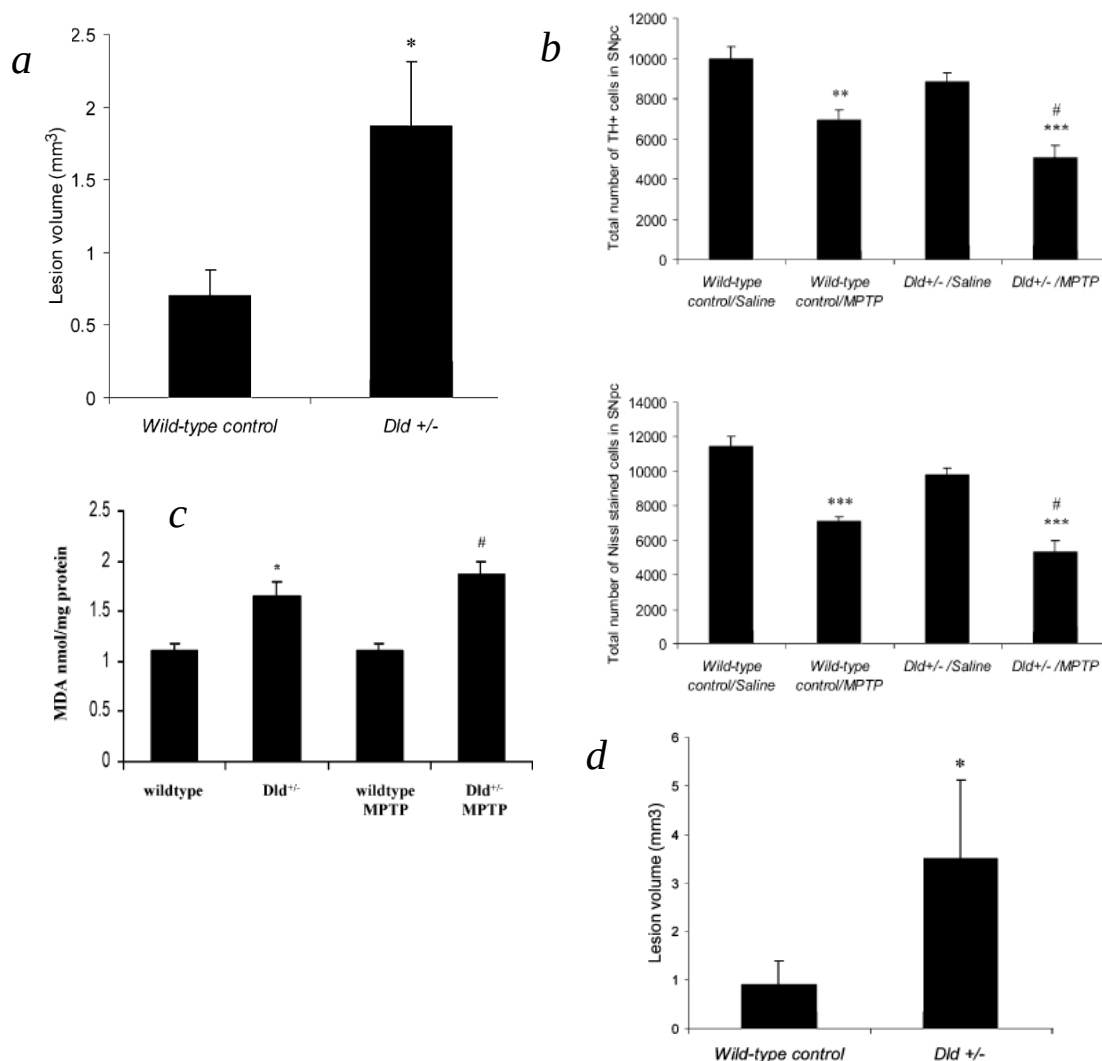
alacsonyabbnak találták mind Parkinson kórban, mind Alzheimer kórban (Mizuno et al. 1990, Gibson et al. 1988). Az enzim inaktiválódásához vezethetnek szabadgyökök, mint pl. peroxinitrit vagy a hidrégén peroxid (Park et al. 1999; Gibson et al. 2002), de endogén és exogén izoquinolin derivátumok, sőt az MPTP is (McNaught et al., 1998, Joffe et al., 1998). Az enzim gátlása a mitokondriumból citokrom C felszabadulást okoz és a kaszpáz 3 aktiválásával apoptózist okoz (Huang et al., 2003).

Ez az enzim tagja egy nagyobb családnak, amelyhez még a piruvat dehidrogenáz komplex (PDHC) és az elágazó láncú α -ketoacid dehidrogenáz komplex tartozik. A dihidrolipoamid dehidrogenáz (EC 1.6.4.3) (amit a Dld gén kódol) egy fontos alegysége mind a három dehidrogenáznak. Ez egy flavin tartalmú enzim, amely a NAD/NADH átalakulásban vesz részt és katalizálja az dihidrolipoil csoportok oxidációját mind a négy dehidrogenáz komplexben. A homozigóta Dld deficiens állatok korai gesztációs korokban in utero elpusztulnak, míg a heterozigóták életképesek, enzimaktivitásuk közel 50%-os (Johnson et al.1997).

Vizsgálatukban arra kerestük a választ, hogy a heterozigóta egerek vajon érzékenyebbek-e a mitokondriális toxinokra. Valóban azt találtuk, hogy mind az MPTP, mind a malonát valamint a 3-NP kifejezettebb neuronpusztulást eredményezett a Dld deficiens állatokban a kontroll csoporthoz képest (14. ábra). Többek közt az oxidatív stressz okozhatja a KGDHC aktivitáscsökkenést, amit posztmortem észleltek Parkinson, Alzheimer és Huntington kórban. Sőt, az MPTP aktív metabolitja is képes csökkenteni a komplex aktivitását (Mizuno et al. 1988). A Dld gén bizonyos polymorfizmusai rizikófaktornak tekinthetők, pl. Alzheimer kór kialakulásában (Sheu et al.1999). A KGDHC fontos szerepét hangsúlyozza egy későbbi vizsgálat is, amelyben azt igazolták, hogy egy másik alegység, a dihidrolipoil szukcinil transzferáz deficienciája is fokozott toxinérzékenységet mutat.

Foszfolipáz A₂ deficiencia

A PLA₂ egy olyan enzimcsalád, amely a foszfolipideket bontja szabad zsírsavakká és lizofoszfolipidekké. Ezek az enzimek részt vesznek a foszfolipid metabolizmusban, a membrán integrációjának fenntartásában, valamint prosztaglandinok, leukotriének és más fontos mediátorok képződésében (Farooqui et al., 1997). Számos adat támogatja,



14. ábra. A Dld deficiencia hatása a neurotoxicitásra.

a Malonát lézió nagysága. Átlag±SEM* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz képest.

b A substantia nigra par compacta TH pozitív és Nissl fesződésű neuronjainak száma. Átlag±SEM** $p < 0,01$ a kontroll csoporthoz képest; *** $p < 0,001$ a kezeletlen heterozigóta állatokhoz képest; # $p < 0,05$ az MPTP csoporthoz képest.

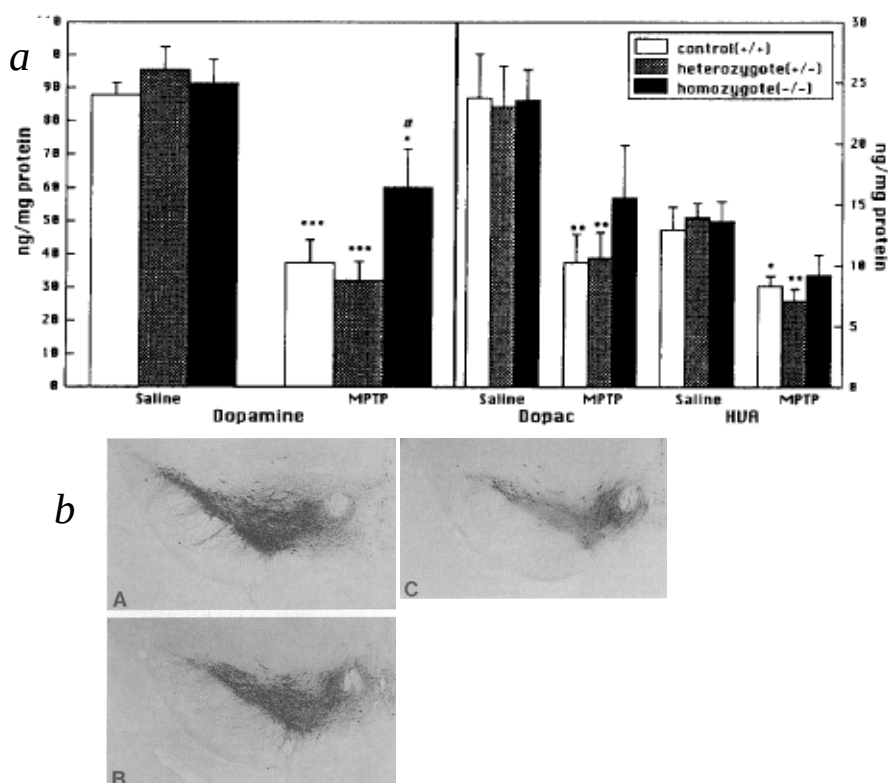
c A malondialdehid szintek. Átlag±SEM; * $p < 0.05$ a kontroll csoporthoz képest; # $p < 0.001$ az MPTP kontroll csoporthoz képest.

d A 3-NP okozta lezió nagysága. Átlag±SEM; * $p < 0.05$.

hogy patológiás körülmények között a fokozott PLA₂ aktivitás az esszenciális membrán foszfolipid összetevőinek zavarához, ezáltal membrán permeabilitás változáshoz, ioncsatornák nyitódásához és fokozott szabadgyök képződéshez vezethet (Bonventre és Koroshetz, 1993). Az enzimsalád szerepének tisztázását a neurodegenerációban hátráltatta az, hogy nem állt rendelkezésre specifikus inhibitor.

Ezt küszöbölte ki annak az egértörzsnek az előállítása, amely deficiens a citoplazmatikus PLA₂ 4 típusára. Ez a törzs infertilis és parciálisan rezisztens a fokális hypoxiára (Bonventre, 1997).

Ebben a munkában arra kerestük a választ, hogy ez a PLA₂ enzim milyen szerepet tölt be a MPTP toxicitásban. Azt találtuk, hogy a homozigóta állatokban szignifikánsan kevésbé csökkent a striatális dopamin szint, valamint a TH pozitív sejtek száma a substantia nigra pars compactájában (15. ábra). Az észlelt protekció mechanizmusa összetett lehet. A PLA₂ aktiválódása fokozott szabadgyök képződéshez vezet azáltal, hogy a ciklooxygenáznak ill. a lipooxygenáznak arachnoidsavat produkál, amely átalakulás szuperoxidot generál. A fokozott szabadgyök képződés károsítja a membránt, amely fokozza a lipid peroxidációt, aktiválja a mitokondriális PLA₂-t, amely tovább fokozza a szabadgyökképződést, ami egy pozitív visszacsatolást eredményezve fokozza a károsodást (Madesh és Balasubramanian, 1997, Rashba-Step wt al., 1997).



15. ábra. A PLA₂ deficiencia hatása az MPTP toxicitásra.

a A dopamin és metabolitjainak szintje. Átlag±SEM. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ a kontroll csoporthoz képest; # $p<0,05$ az MPTP csoporthoz képest. # $p<0,05$ az MPTP csoporthoz, a heterozigóta állatokhoz képest.

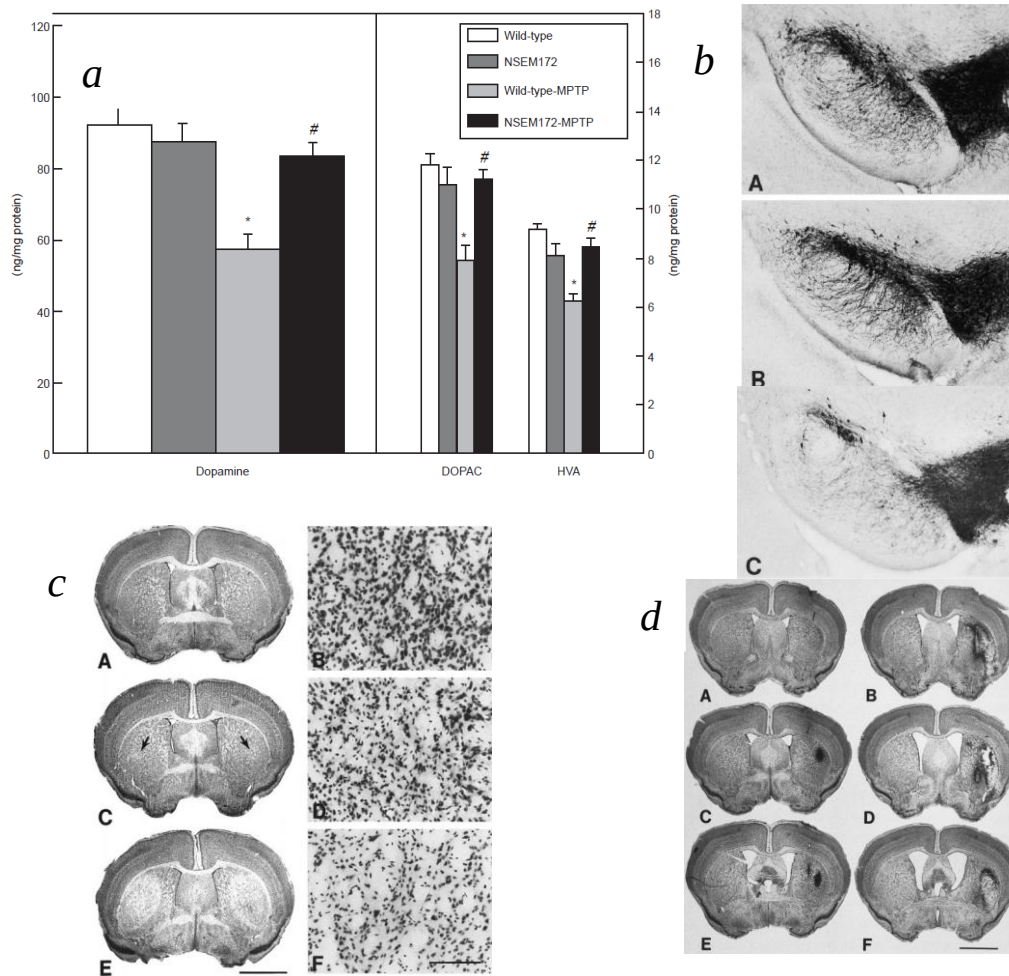
b A substantia nigra pars compacta TH pozitív neuronok reprezentatív metszete. „A” kontroll, „B” MPTP-vel kezelt homozigóta deficiens, „C” MPTP-vel kezelt vad típusú egerek.

Kaspáz 1 deficiencia

Neurodegeneratív kórképekben a sejtpusztulás leggyakrabban apoptotikus folyamat. Ebben vesznek részt a kaspázok (cisztein proteázok), amelyeknek jelenleg 14 altípusát ismerjük. A kaspázok inaktív formában szintetizálódnak, amelyeket proteolitikus enzimek aktiválnak hasítással. Ezeknek az enzimeknek a szerepe az apoptózisban jól ismert. Ezek egy része iniciálja az apoptózist, míg mások a végrehajtásban játszanak aktív szerepet (összefoglaló: Alenzi et al., 2010). A kaspáz 1 a vad típusú, és a mutáns huntingtin proteint is hasítja (Wellington et al., 1998) in vitro, valamint emelkedett kaspáz 1 aktivitást tudtak kimutatni mind HD betegekből, mind HD modellekben (Ona et al., 1999). Mások azt találták, hogy a mutáns protein aktiválja a kaspáz 3-at és kaspáz 8-at, 9-et (Miyashita et al., 1999). Az apoptózisra jellemző elváltozásokat többen is kimutatták Huntington kórban (Vonsattel et al., 2011). Mi a kaspáz-1 szerepét vizsgáltuk toxin modelljeinkben. Ehhez egy domináns negatív kaspáz 1 mutáns törzset használtunk, amelyben egy célzott mutáció az enzim aktivitását megszüntette, és a neuron specifikus promoterje domináns negatív gátlója a kaspáz 1 útvonalnak (Friedlander et al., 1997, Burne et al., 1996). Ennek az egértörzsnek a keresztezése transzgenikus Huntington törzsszel (R/2) megnövelte annak túlélését (Ona et al., 1999).

Ezek alapján azt tapasztaltuk, hogy a malonát szignifikánsan, 65,5%-kal kisebb sejtpusztulást okozott a mutáns egerekben, mint a kontroll állatokban (mutáns egerek: $4.38 \pm 0.66 \text{ mm}^3$; vad típus: $12.71 \pm 2.04 \text{ mm}^3$; $p < 0.001$). Még nagyobb arányú, 91%-os csökkenést figyeltünk meg 3-NP esetében (mutáns egerek: $0.9 \pm 0.3 \text{ mm}^3$; vad típus: $10.25 \pm 1.2 \text{ mm}^3$; $p < 0.001$). Az útvonal szerepét azzal vizsgáltuk, hogy megmértük a toxinok indukálta interleukin 1b szintet (mint a kaspáz 1 aktivitás jellemzőjét) mind a két csoportban. Azt találtuk, hogy a toxinok jelentős emelkedést okoznak az interleukin 1b szintben, de ez szignifikánsan alacsonyabb volt kaspáz 1 deficiens állatokban (kontroll vad típus: $39.6 \pm 1.7 \text{ pg/g}$ szövet, míg toxin után a vad típus: $125.2 \pm 19.6 \text{ pg/g}$ szövet és a mutáns egerek: $53.2 \pm 15.1 \text{ pg/g}$ szövet ($p < 0.02$) (16. ábra).

Ezek az eredmények igazolják a kaspáz-1 útvonal szerepét a neurodegenerációban és konzisztensek az irodalomban közölt adatokkal, miszerint kaspáz 1 deficiencia javítja a túlélést transzgenikus HD modellben, ill. csökkenti az infarktus nagyságát fokális ischaemiás károsodás esetén (Ona et al., 1999, Friedlander et al., 1997). A



16. ábra. A kaszpáz 1 deficiencia hatása az MPTP toxicitásra.

- a* A dopamin és metabolitjainak szintje. Átlag±SEM. * $p < 0,01$ a kontroll csoporthoz képest; # $p < 0,05$ az MPTP csoporthoz képest (NSE-M17: kaszpáz 1 deficiens csoport).
- b* A substantia nigra pars compacta TH pozitív neuronjainak reprezentatív metszete. „A” kontroll, „B” MPTP-vel kezelt deficiens állatok, „C” MPTP-vel kezelt vad típusú egerek.
- c* Malonát okozta lézió. Lépték 2mm. „A”, „C”, „E” deficiens állat, „B”, „D”, „F” kontroll állat.
- d* 3-NP okozta lézió. „A-B” kontroll állat, „C-D” 3-NP-vel kezelt deficiens állat, „E-F” 3-NP-vel kezelt kontroll állat. Lépték 2mm, ill. 200µm.

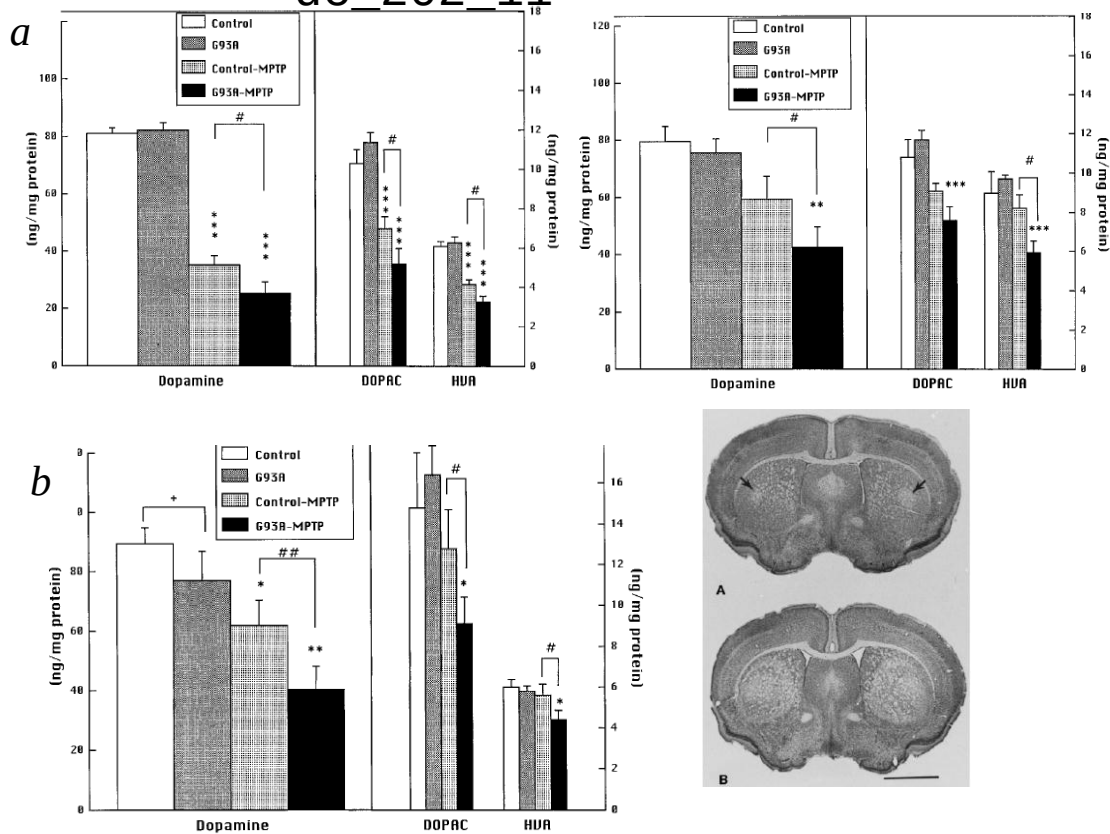
sejtpusztulásban azonban nemcsak a kaszpáz 1-nek van szerepe, hiszen a kaszpáz 2, 3 és 11 genetikai eliminációja is neuroprotektív hatású (Tiwari et al., 2011, Yamada et al., 2010, Furuya et al., 2004).

Más vizsgálatok azt igazolták, hogy ennek a finoman szabályozott rendszernek nem szuperszelektív farmakológiai gátlása daganatképződéshez, ill. immunológiai problémákhoz vezethet, amely miatt terápiás alkalmazása nehézségekbe ütközik.

Transzgenikus ALS modell toxin érzékenysége

Az ALS pathomechanizmusának tanulmányozásában nagy előrelépés volt a transzgenikus SOD1 mutáns egerek létrehozása. Az SOD 1 mutációja egy új, toxikus funkciót eredményez (funkciónyeréses mutáció), hiszen sem a gén eliminációja, sem a vad típus expressziója nem okoz motoneuron betegséget, míg a mutáns transzgén a motoneuronok pusztulásához vezet (összefoglaló: Grieb, 2004). Ez az új funkció abnormális protein aggregációt eredményezhet, ill. magának az enzimnek a konformációját változtatja meg, amely ezáltal elveszti a szubsztrátspecifitását. Ez a konformációváltozás fokozza a szabadgyök képződést, és 3-nitrotirozin emelkedést okoz (Ferrante et al., 1997). Ezen felül mitokondriális eltérések is észlelhetők ebben a modellben: a gyors neuronpusztulást megelőzi a mitokondriumok vakualizációja, ill. duzzadása (Kong J és Xu Z, 1998). Mivel mitokondriális érintettség bizonyítottnak tekinthető mind betegekben, mind modelljeiben, így arra kerestük a választ, hogy ez a modell hogyan reagál további mitokondriális diszfunkciót okozó toxikus hatásokra.

Ezek az egerek kb. 130-140 napig élnek. Korai stádiumban (50 nap), ill. középstádiumban (70 nap) nem találtunk különbséget a striatális dopamin szintben, míg végstádiumban (120 nap) a dopamin szint már kis mértékben, de szignifikánsan alacsonyabb transzgenikus állatokban, mint vad típusú társaikban. Különböző dóziszú MPTP adagolás életkortól függő, de szignifikánsan súlyosabb depléciót okozott a transzgén állatokban. Az MPTP szignifikáns sejtpusztulást idézett elő az állatokban, de nem volt különbség vad típus és transzgén egerek között sem 50 napos, sem 120 napos korban. A 3-NP adagolás, hasonlóan az MPTP-hez, nagyobb striatális sejtpusztulást okozott a transzgén állatokban a kontrollokhoz képest (17. ábra).



C	Nissl	TH	DAT
Littermate control mice	153 ± 6.3	124 ± 4.7	117 ± 5.3
G93A mice	143 ± 7.6	117 ± 4.8	110 ± 5.1
Littermate control mice, MPTP-treated	116 ± 16.1*	97 ± 12.9*	92 ± 11.2*
G93A mice, MPTP-treated	106 ± 17.1**	89 ± 14.6**	83 ± 13.8*
	Nissl	TH	DAT
Littermate control mice	149 ± 5.7	123 ± 5.3	111 ± 4.6
G93A mice	121 ± 14.1	84 ± 6.2	78 ± 7.1
Littermate control mice, MPTP-treated	72 ± 15.8*	57 ± 14.1**	52 ± 10.7**
G93A mice, MPTP-treated	45 ± 13.2**	38 ± 14.6**	34 ± 12.8**

17. ábra. Toxin szenzitivitás ALS transzgenikus modelljében.

- a** A dopamin és metabolitjainak szintje 50, 70 és 120 napos korban. Átlag±SEM. ⁺p<0,05 a kezeletlen transzgenikus állatokhoz képest; **p<0.01, ***p<0,001 a kontroll csoporthoz, ill. a kezeletlen transzgenikus egerekhez képest; #p< 0.05, ##p< 0.01 a kontroll csoporthoz és a transzgenikus MPTP csoporthoz képest. n=8–20.
- b** A 3-NP okozta lézió nagysága. A vad típus; B transzgenikus állat. Lépték 2mm.
- c** A substantia nigra pars compacta TH és DAT pozitív ill. Nissl festődésű neuronjainak száma 50 napos és 120 napos korban. *p<0.05, **p<0.01 a kontroll csoporthoz képest.

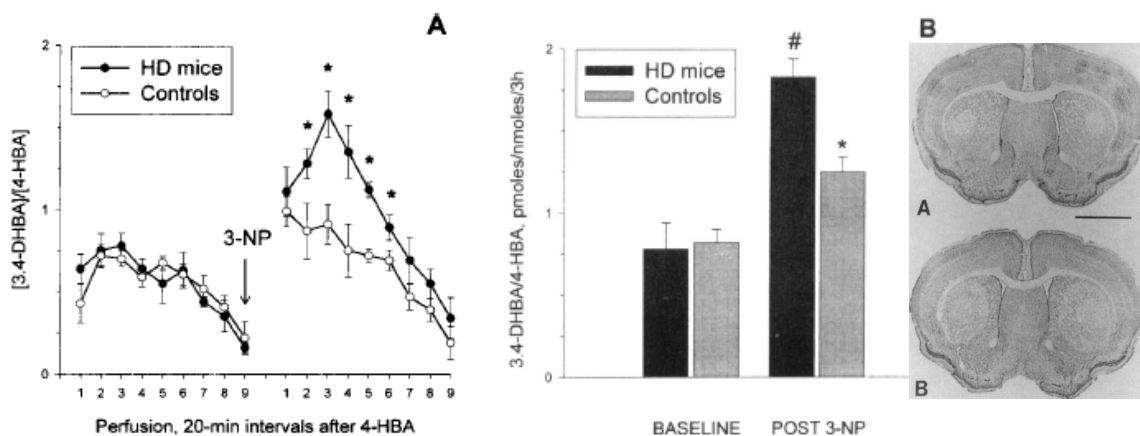
Ezek az eredmények azt igazolták, hogy ez a mutáció érzékennyé teszi az állatokat a mitokondriális károsodásra. Komplikálja a képet, hogy ebben a modellben a substantia nigra sejtjei az életkor előrehaladtával pusztulnak, ezért fontosnak tartottuk különböző időpontokban vizsgálni a toxinérzékenységet. Úgy találtuk, hogy az MPTP minden életkorban jobban csökkentette a dopamin szintet transzgén jelenlétében, mint anélkül. Ezeket az eredményeket az ALS más modelljében is megerősítették (G86R mutáció) (Good et al., 1997). Mikrodialízis vizsgálatok igazolták, hogy ebben a modellben, alaphelyzetben is fokozott a szabadgyök képződés (Bogdanov et al., 1998), amelyet tovább fokoznak a mitokondriális toxinok. Ezek az adatok egybecsengenek korábbi feltételezéseinkkel, hogy bizonyos genetikai defektusok, amelyek a szabadgyök képződést és/vagy antioxidáns védekezést érintik, környezeti (toxikus) hatások esetén sejtpusztuláshoz és neurodegenerációhoz vezethetnek.

Transzgenikus HD modell toxinérzékenysége

Huntington betegségben és modelljeiben is igazoltnak tekinthető a mitokondriális diszfunkció, az energia deficit és a fokozott szabadgyök képződés. Ezen patológias folyamatok mértéke az CAG ismétlődés számával arányos lehet, mivel a betegség kezdete, ill. progressziója is ezzel arányos. Ezek alapján arra kerestük a választ, hogy a mitokondriális komplex II gátló 3-NP, amely önmagában is képes Huntington kórhoz hasonló sejtpusztulást előidézni, hogyan befolyásolja a szabadgyök képződést. Ezt 4-HBA/3,4-DHBA átalakulással, mikrodialízis módszerével vizsgáltuk R6/2 törzsben, mivel ezekben az állatokban sokkal súlyosabb a betegség lefolyása.

Mikrodialízis során azt találtuk, hogy alaphelyzetben nincs különbség a 4HBA/3,4DHBA átalakulás (hidroxilgyök képződés) tekintetében. Azonban 3-NP adagolást követően, mind a kontroll, mind transzgén állatokban emelkedett ez az arány, de 20 perc elteltével ez az emelkedés szignifikánsan nagyobb volt a HD egerekben, majd csökkenő tendencia mellett ez a különbség 2 óra elteltével megszűnt. Hasonlatos módon a 3-NP okozta striatális sejtpusztulás is kifejezettebb volt az R6/2 egerekben a kontrollhoz képest ($9.4 \pm 3.1 \text{ mm}^3$ vs. $0.7 \pm 0.2 \text{ mm}^3$ $p < 0.001$; 18. ábra). Ismételten sikerült igazolni in vivo a fokozott toxinérzékenységet, az alaphelyzetben kompenzált

energiatermelést, ill. azt, hogy ezt a kompenzációt bizonyos toxikus ágensek képesek felborítani, amely sejtpusztuláshoz vezethet.



18. ábra. A 3-NP hatása Huntington kór állatmodelljében. „A” 3,4DHBA/4HBA arány, „B” reprezentatív metszet 3-NP kezelést követően. Átlag±SEM* $p < 0,05$ a kiindulási értékhez képest; # $p < 0,05$ az 3-NP-val kezelt vad típusú állatokhoz képest.

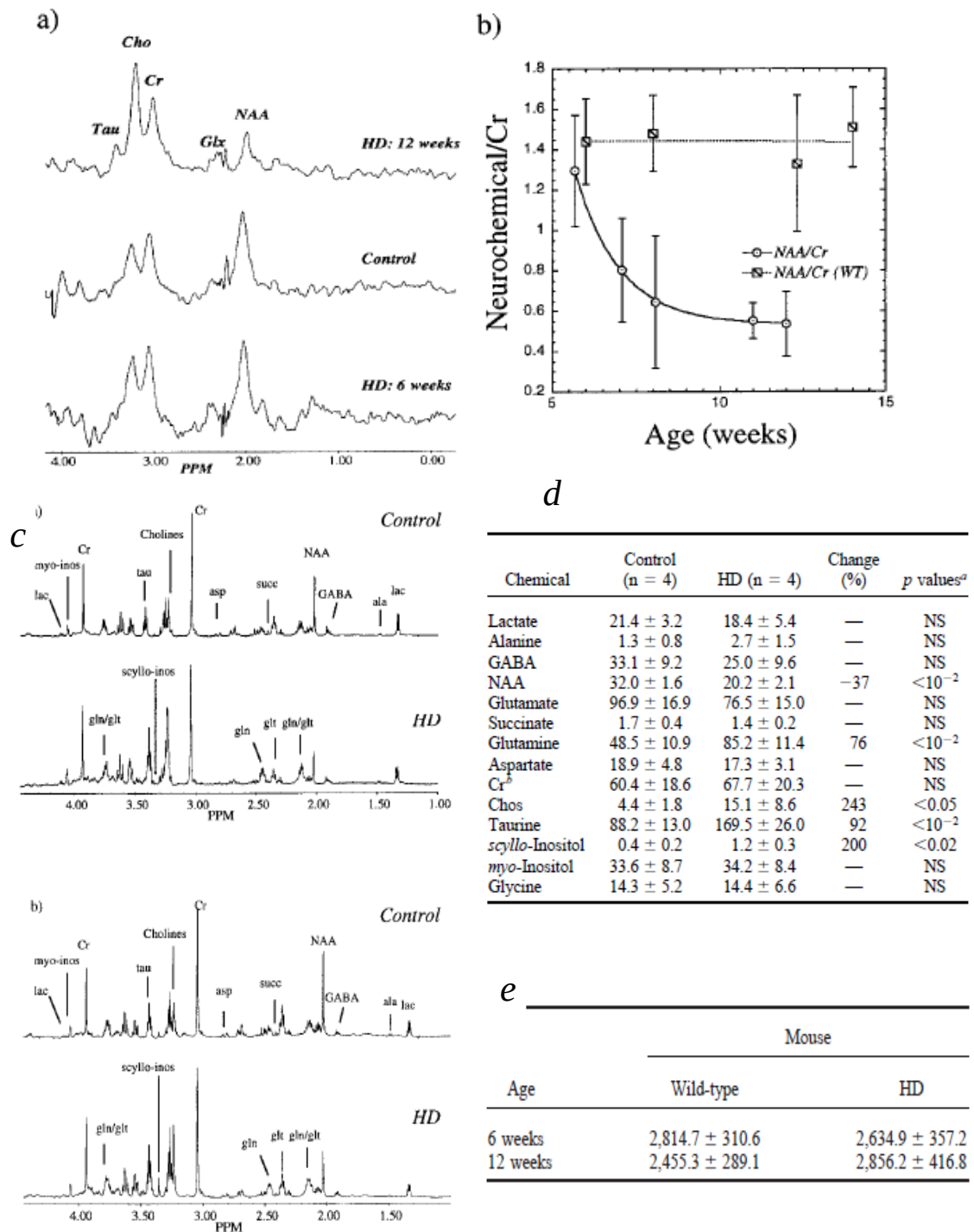
Anyagcsere folyamatok tanulmányozása Huntington kór modelljében

MR spektroszkópiás adatok

Huntington kórban az anyagcsere vonatkozásában számos posztmortem adatot ismerünk, mind humán vonatkozásban, mind modellekben. Azonban in vivo adat csak mikrodialízis segítségével volt nyerhető. A nem invazív MR spektroszkópiával in vivo ki lehet mutatni bizonyos anyagcseretermékeket, ill. metabolikus folyamatokat (Jenkins et al., 1999). Az egyik megbízhatóan detektálható komponens a N-acetil aszpartát (NAA), melyről azt tartják, hogy neuronális marker (Jenkins et al., 1997). NAA szint csökkenést észleltek egy sor neurodegeneratív megbetegedésben, mint pl. Alzheimer kórban (Klunk et al., 1992; Shiino et al., 1993; Shonk et al., 1995; Schuff et al., 1998), vagy Huntington kór (Dunlop et al., 1992; Jenkins et al., 1993). Azonban vannak olyan betegségek, amelyekben az akut szak elmúltával az NAA szint normalizálódik

(sclerosis multiplex, epilepszia vagy amyotrophias lateralsclerosis (Davie et al., 1994b; De Stefano et al., 1995; Cendes et al., 1997; Kalra et al., 1998). A munkacsoport korábban közölte, hogy az NAA csökkenés mértéke korrelál a betegek CAG ismétlődés számával (Jenkins et al., 1999).

Az NAA mellett számos egyéb molekula azonosítható ezzel a metódussal, így pl. kreatin (Cr), kolin (Cho), glutamat, glutamin, glukóz, taurin, szukcinat, és inzitol. Mivel az továbbra sem ismert, hogy a mutáció, hogyan okozza a betegséget, mi egy olyan modellt vizsgáltunk, amelyben nincs számottevő sejtpusztulás (R6/2 egértörzs). Mivel az egerek fenotípusa progresszív, ezért sorozatmérést végeztünk az állatok 5-12 hetes kora között. A mérések a Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School MGH-NMR Centerében (Charlestown, USA) Bruce G Jenkins vezetésével történtek. Nagyon kifejezett közel 40%-os, nem lineáris NAA szint csökkenést észleltünk 6 hetes kortól kezdődően, amit egy lineáris kolin szintemelkedés kísért. Ez a csökkenés megfelel annak az arány, amit humán in vivo MR spektroszkópiával nyerhető (Jenkins et al., 1998). Mivel a NAA-t neurális markernek tartják, szövettani vizsgálattal erősítettük meg, hogy nincs szignifikáns sejtpusztulás a kontroll csoporthoz képest, de a nukleáris zárványtest képződés folyamatos. Ez az eltérés arra utal, hogy sejtpusztulás nélkül is lehet NAA szint csökkenés, amelynek oka feltehetően a zárványtest képződésben keresendő. A kolin emelkedése gliózisra utalhat, de szövettani vizsgálattal ez sem volt észlelhető. In vivo adatainkat ex vivo HPLC mérésekkel is megerősítettük (19. ábra). In vitro mérések emelkedett glutamin, taurin és glukóz szintet mutattak, míg a glutamát szint csökkent. A magas glukóz szint kapcsán végzett vércukormérésekkel tudtuk igazolni, hogy ezek az állatok diabetes mellitusban szenvednek.



19. ábra. A transzgenikus Huntington egerek MR spektroszkópiás adatai.

a reprezentív in vivo spektrum

b Az NAA/Cr arány változása az idő függvényében

c reprezentív in vitro spektrum 12 hetes állatok striátumából (*a*), ill. kortexéből (*b*)

d Az MRS által detektálható anyagok szintje 12 hetes állatok striátumában in vitro. átlag±SD; mmol/g protein.

e A neuronok száma a striátumban Nissl festéssel. átlag± SD

Biokémiai adatok

A mutáns huntingtin protein okozta celluláris folyamatok nem teljesen tisztázottak, mint ahogy az sem, hogy a mutáció hogyan vezet a betegség kialakulásához. A megváltozott proteinnek számos interakcióját közölték különböző fehérjékkel és enzimrendszerekkel. Ezek közül az egyik első in vitro adat volt az gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenázhoz (GAPDH; EC 1.2.1.12) való kötődése (Burke et al., 1996). Posztmortem humán mintákban lehetett bizonyos agyterületeken GAPDH aktivitáscsökkenést detektálni, de ez csak marginális volt (Kish et al., 1998). Az, hogy maga az enzim befolyásolása, vagy az ezáltal kiváltott energiadeficit a felelős a sejtpusztulásért, nem egyértelmű. Ezért kezdtük el a glükolízist és a terminális oxidációt tanulmányozni Huntington kór modelljeiben az SZBK Enzimológiai Intézetében Ovádi Judit vezetésével (5. táblázat). Azt találtuk, hogy a GAPDH aktivitás valóban szignifikánsan alacsonyabb transzgenikus modellben, és ennek megfelelően szubsztrát koncentrációi a gliceraldehid-3-foszfát (GAP) és dihidroxiaceton foszfát (DHAP) megemelkednek, habár betegekben posztmortem közel változatlan aktivitást észleltek (Browne et al., 1997, Kish et al., 1998). A glükolitikus folyamatok megváltozására utal az is, hogy transzgenikus HD szövetekben közel kétszer nagyobb volt a laktát termelés in vitro, mint a kontroll mintákban. Ugyanakkor, mivel a mitokondriális komplexek aktivitásában nem találtunk lényeges különbséget, ez az energia termelés fokozódásához kell hogy vezessen. És valóban azt találtuk, hogy transzgenikus HD mintákban az ATP szint kétszer nagyobb volt a kontrollhoz képest. Ennek oka lehet a kissé emelkedett hexokináz aktivitás is. Ez látszólag jelentős ellenmondás a korábbi teóriákhoz képest, amelyek éppen az energia deficitre épülnek. Azonban az értékelésnél figyelembe kell venni, hogy vizsgálatainkhoz teljes agyszövetet használtunk, nem csak azt, amely elsődlegesen érintett a betegségben, valamint vannak arra utaló in vivo MR spektroszkópiás adatok, hogy az anyagcsere felgyorsul transzgenikus egerekben (Jenkins et al., 2000). Az értékelésnél azonban mindenképpen óvatosság ajánlott, mivel ez egy artficiális ex vivo rendszer, amelyben a folyamatok jellemzéséhez egy matematikai modellt használtunk. Ezen kívül nem szabad elfelejteni, hogy az anyagcsere folyamatok nem kiragadtan zajlanak a sejten belül, hanem sokkal inkább egy rendszer részeként ('system biology'), amelyek szintén befolyásolhatják az aktuális eredményeket.

Enzyme ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	Mice treated with 3-NP		Transgenic mice expressing N171-82Q	
	Control	3-NP	Control	N171-82Q
	CFLP strain		N171-82Q/ as control	B6C3F1 strain, wild-type littermates as control
HK	40 $\pm$ 12	70 $\pm$ 6 ($P < 0.01$)	11.4 $\pm$ 1.5	16.9 $\pm$ 1.6 ($P < 0.05$)
GPI	3290 $\pm$ 420	3210 $\pm$ 390	ND	ND
PFK	420 $\pm$ 52	566 $\pm$ 61 ($P < 0.10$)	247 $\pm$ 50	256 $\pm$ 14
Aldolase	287 $\pm$ 35	234 $\pm$ 49	276 $\pm$ 40	238 $\pm$ 25
TPI	13800 $\pm$ 1400	13200 $\pm$ 1100	11100 $\pm$ 1090	10990 $\pm$ 1100
GAPDH	1180 $\pm$ 190	857 $\pm$ 63 ($P < 0.10$)	676 $\pm$ 30	388 $\pm$ 17 ($P < 0.005$)
Enolase	ND	ND	682 $\pm$ 23	868 $\pm$ 70 ($P < 0.05$)
PK	868 $\pm$ 130	639 $\pm$ 64 ($P < 0.10$)	358 $\pm$ 41	520 $\pm$ 67 ($P < 0.10$)
LDH	3110 $\pm$ 270	3390 $\pm$ 300	2490 $\pm$ 110	2030 $\pm$ 290
GDH	ND	ND	170 $\pm$ 25	165 $\pm$ 19

Whole brain homogenate, ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	Control	Mice treated with 3-NP	Transgenic mice expressing N171-82Q
GLUDH	24 $\pm$ 4	38 $\pm$ 3 ($P < 0.05$)	37 $\pm$ 0.6 ($P < 0.05$)
Complex I	26 $\pm$ 3	26 $\pm$ 3	35 $\pm$ 2 ($P < 0.05$)
Complex II	141 $\pm$ 15	27 $\pm$ 2 ($P < 0.005$)	157 $\pm$ 27
Complex I/III	28 $\pm$ 6	ND	25 $\pm$ 4
Complex II/III	195 $\pm$ 13	ND	191 $\pm$ 10
Complex IV	1060 $\pm$ 220	ND	969 $\pm$ 34

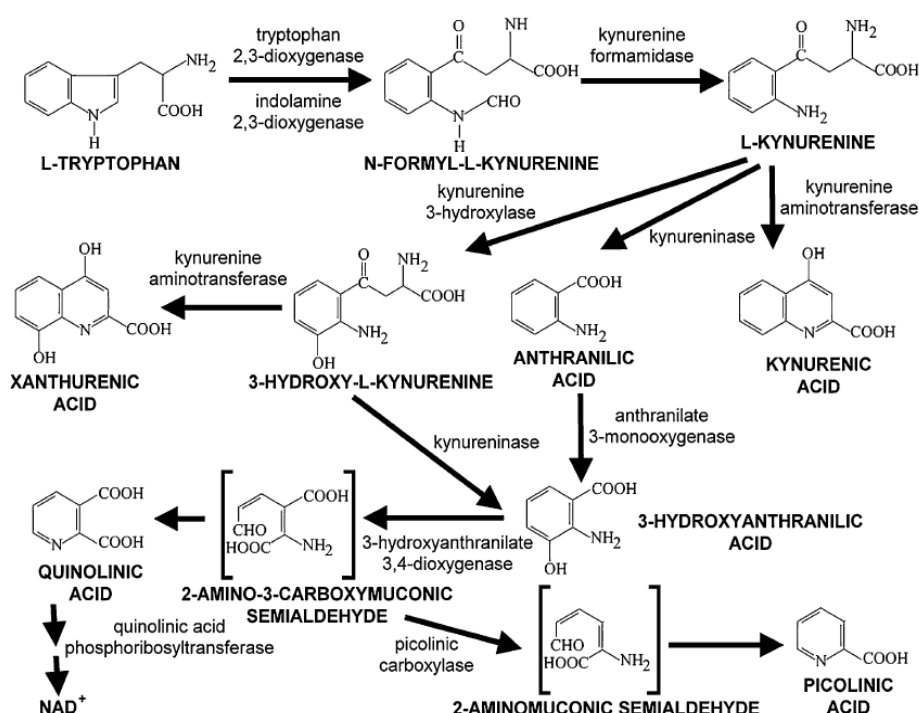
Posterior brain homogenate	Control	Transgenic mice expressing N171-82Q
CK ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	2040 $\pm$ 220	2308 $\pm$ 190
Creatine ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ protein)	149 $\pm$ 11	116 $\pm$ 20 ($P < 0.10$)
Lactate ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ protein)	402 $\pm$ 95	336 $\pm$ 81
ATP ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ protein)	2.8 $\pm$ 0.4	6.4 $\pm$ 1.4 ($P < 0.05$)

5. táblázat. A V_{max} aktivitás agyhomogenizátumokból. Átlag $\pm$ SEM.

Kinurenin rendszer

A kinurenin rendszer a triptofán metabolizmus egyik útvonala (20. ábra). Számos köztes terméke ismert, ezek közül több rendelkezik biológiai aktivitással. Az útvonal egyik terméke a kinurénsav, amely a szervezet egyik endogén glutamát receptor antagonistája. Az iontofor excitátoros aminosav receptor antagonista hatása mellett az

$\alpha 7$ nikotinerg acetilkolin receptor nem-kompetetív antagonistája is. A KYNA közvetlenül a L-kinureninből keletkezik és ezt az átalakulást a kinurenin aminotranszferáz (KAT) katalizálja. Ennek az enzimnek 2 izoformja van (KAT I, KAT II), amelynek eltérő a katalitikus aktivitásuk és a pH optimumuk is (Okuno et al., 1991). Az utóbbi időben azonosítottak két további izoformot is (KAT III, KAT IV), azonban ezek jelentősége a betegségek pathomechanizmusában nem ismert (Han et al., 2009, Han et al., 2011). Egy másik intermediér termék a quinolinsav, amely kifejezett toxikus hatással bír, lévén NMDA receptor agonista. Ugyancsak ismert az apoptózis indukáló hatása a kinurenin útvonal egy másik intermediérjének, a 3-hidroxikinureninnek is.

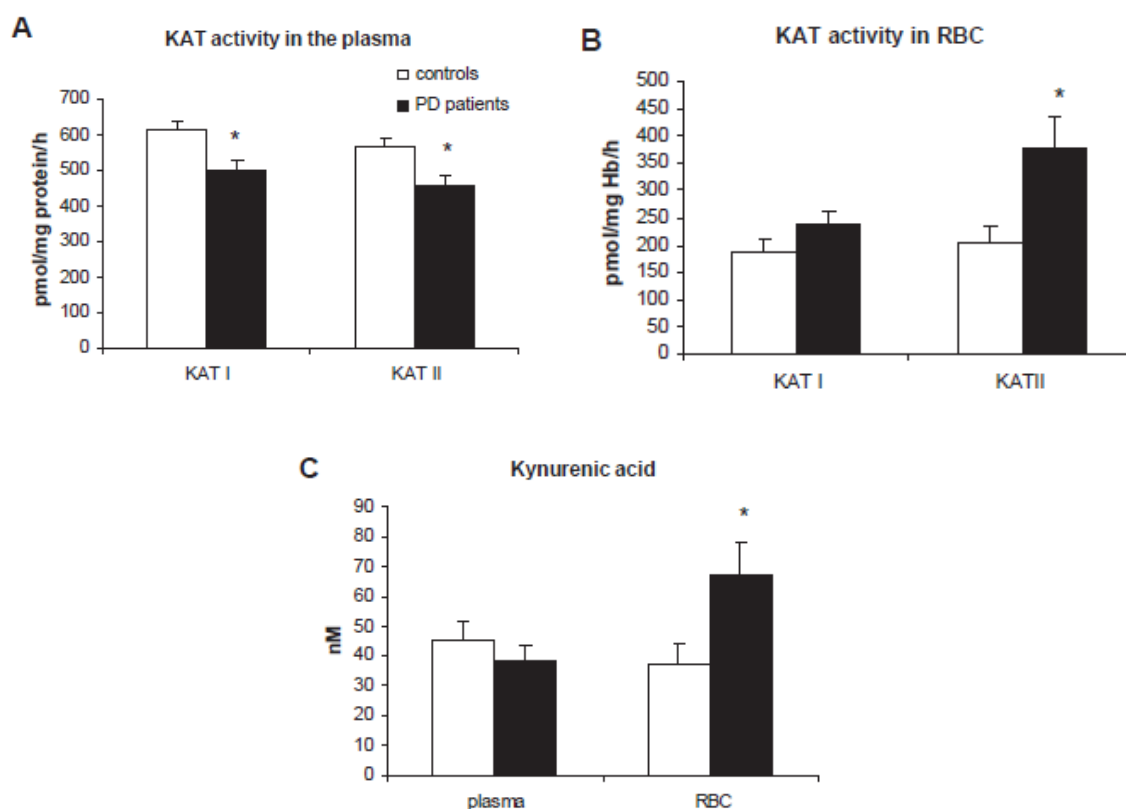


20. ábra. A triptofán metabolizmus kinurenin útvonala.

Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy a lépés-meghatározó enzim aktivitása, ill. az enzim terméke hogyan változik különböző betegségben szenvedő páciensek vérében. Annak ellenére, hogy a Parkinson kór, a sclerosis multiplex, ill. az idiopathiás dystonia is a központi idegrendszer betegsége, számos neurokémiai eltérést lehet detektálni perifériás szövetekben, így a vérben is (pl. csökkent antioxidáns védekező mechanizmusok Parkinson kórban (Ikeda et al., 2011, Ascherio et al., 2009);

potenciális biomarker megjelenése (Teunissen et al., 2011, Muller et al., 2005) vagy antioxidáns status változása sclerosis multiplexben (Ristori et al., 2011).

Munkánk során azt találtuk, hogy Parkinson kóros betegek szérumában mind a KAT I, mind a KAT II aktivitás csökken, míg a vörösvérsejtekben a KAT II aktivitás emelkedett, és ennek megfelelően a kinurénsav koncentrációja is (21. ábra). Ennek jelentőségét nehéz pontosan megítélni, mivel a két újonnan leírt izoformról nincsenek pontos adataink. Feltehetően fiziológias körülmények között a KAT II felelős a KYNA szintézis döntő többségéért. A vörösvértetekben levő KYNA emelkedés elképzelhető, hogy egy kompenzációs mechanizmus a centrális inzultus ellen. A vörösvérsejtekben jelentkező KYNA emelkedés következtében a plazmában észlelt enzimaktivitás-csökkenés ellenére a KYNA szint nem különbözik szignifikánsan a kontroll és a betegcsoport között.



21. ábra. A KAT I és KAT II aktivitás Parkinson kóros betegek plazmájában („A”; pmol/mg protein/h) és vörösvérteteiben („B”; pmol/mg Hg/h). A kinurénsav koncentrációja (nM) a plazmában, ill. a vörösvértetekben. Átlag $\pm$ SEM; kontroll csoport n=17; Parkinson kóros csoport n=19, *p<0,01 a kontroll csoporthoz képest.

A kinurenin rendszer változásait neurológiai betegségekben többen tanulmányozták. Parkinson kórban csökkent KYNA szintet találtak a frontális kortexben ill. a putamenben, míg emelkedett 3-HK szintjét mérték a putamenben és a substantia nigrában (Ogawa et al., 1992). Ugyanakkor, egy másik munkacsoport nem talált eltérést a KYNA szintekben, igaz már régiókban (gyrus precentralis, ill. nucleus caudatus) (Beal et al., 1992). A plazma KYNA szintjében is számos neurológiai betegségben találtak eltéréseket, mint pl. amyotrophiás lateralsclerosisban (Ilzecka et al., 2003) vagy komplex parciális epilepsziában (Heyes et al., 1994). Eredményeink jól korrelálnak az irodalomban közölt adatokkal, miszerint Parkinson kórban, mind a szérumban, mind a liquorban emelkedett KYN/Trp arányt találtak (Widner et al., 2002), amely arra utal, hogy a kinurenin útvonal fokozottan aktiválódott.

Sclerosis multiplexes betegek mintáiban is észleltünk eltéréseket. Vörösvértestekben mind a KAT I, mind a KAT II aktivitása megemelkedett, míg a KYNA szintje csak a plazmában növekedett szignifikánsan (6. táblázat). Ezek az eltérések is utalhatnak kompenzációs mechanizmusra, amelynek esetleg szerepe lehet a pathomechanizmusban.

Table 1 KAT I and KAT II activities and KYNA levels in the RBC and in the plasma of control subjects and patients with MS

	Controls (<i>n</i> = 14)	MS patients (<i>n</i> = 13)
KAT I activity in the RBC (pmol/mg Hb/h)	242.92 ± 58.03	411.94 ± 24.21*
KAT I activity in the plasma (pmol/mg protein/h)	691.60 ± 16.56	678.48 ± 35.05
KAT II activity in the RBC (pmol/mg Hb/h)	346.98 ± 36.14	474.87 ± 35.28*
KAT II activity in the plasma (pmol/mg protein/h)	908.95 ± 101.54	867.81 ± 94.77
KYNA levels in the RBC (nm)	37.54 ± 6.9	63.42 ± 12.6
KYNA levels in the plasma (nm)	45.12 ± 6.3	77.12 ± 5.9*

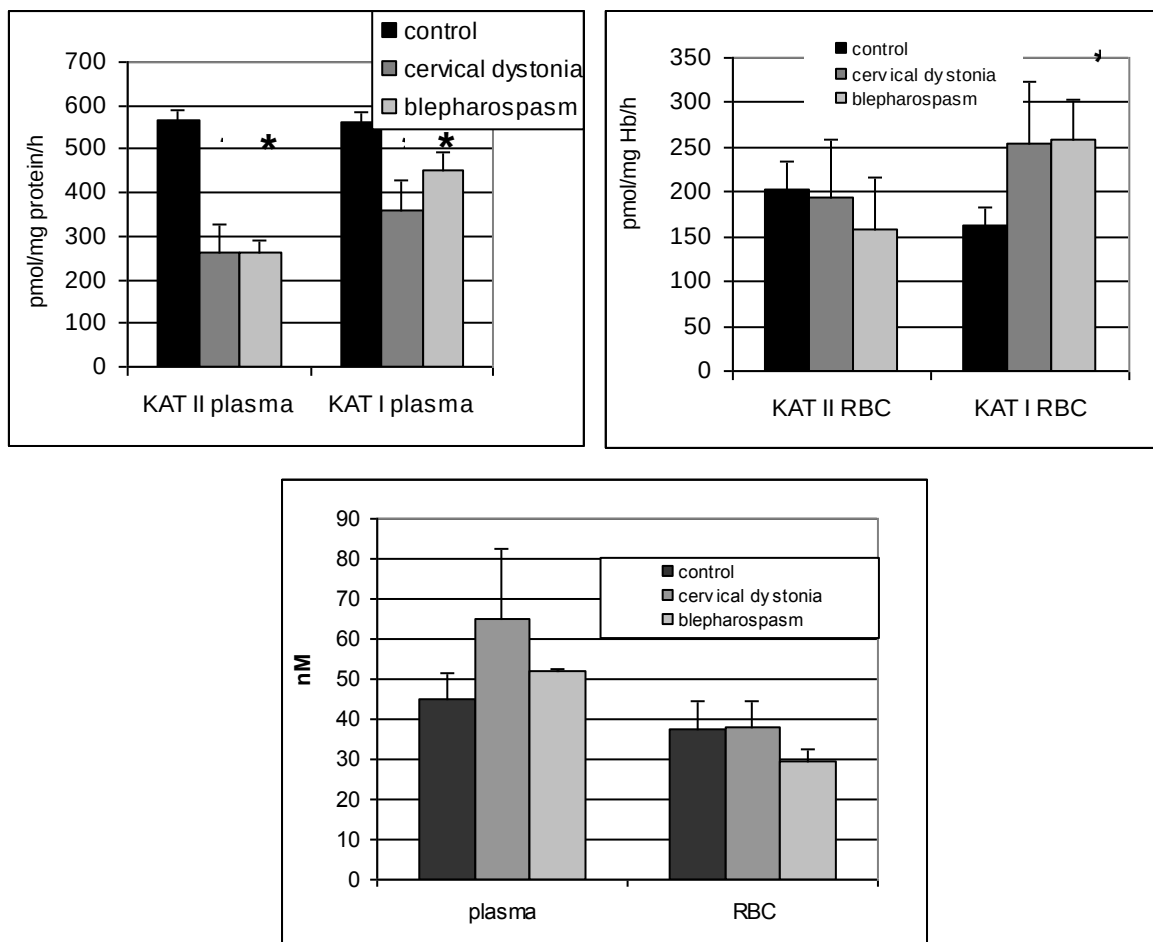
**P* < 0.05.

6. táblázat. A KAT I és a KAT II aktivitás, valamint a KYNA szintje sclerosis multiplexben szenvedő betegekben valamint kontroll személyeknél.

Ezt támogatja az a későbbi megfigyelés is, hogy a sclerosis multiplex kezelésére szolgáló β -interferon emeli a KYN/Trp arányt, vagyis aktiválja ezt az útvonalat (Rajda et al., 2005). Ennek ellentmond az a vizsgálat, amely a liquorban a KYNA szint csökkenést talált (Rejdak et al., 2002) ill., hogy korábban a plazmában nem találtak különbséget a KYNA szintben (Rajda et al., 2005). Ennek oka a metodikai háttér különbözősége mellett lehet az alacsony betegszám, a kissé eltérő átlagéletkor, ill. a betegség súlyossága, ill. hogy a kinurenin metabolizmus a quinolinsav irányába tolódott el. Azt is figyelembe kell venni, hogy a periférián észlelhető eltérések a központi idegrendszer betegségeiben csak korlátozottan értékelhetőek. Azonban a vérben tapasztalható folyamatok segíthetnek a klinikai értékelésben, ill. pl. a biomarker fejlesztésben, ezért jelentőségük mégsem elhanyagolható.

Az akaratlan tartós izomösszehúzódást okozó és abnormális ízületi pozíciót eredményező dystoniák csoportjába számos betegség tartozik. Vizsgálatunkban fokális dystoniában (cervicalis dystonia, ill. szemhéjgörcs) szenvedő betegeink plazmájában alacsonyabb KAT I és KAT II aktivitást észleltünk, míg a KYNA szint nem változott. A vörösvértestekben csak a KAT I aktivitás emelkedett, míg a KAT II aktivitás és a KYNA szint nem változott (22. ábra).

A KAT I enzim aktivitás-emelkedése nem feltétlenül releváns észlelés, mivel fiziológias körülmények között a KYNA szintézis döntő többségéért a KAT II enzim a felelős, bár ismételten hangsúlyozni kell, hogy az újonnan leírt izoenzimek szerepéről nem rendelkezünk adatokkal. Az irodalomban ugyanis a kinurenin útvonal szerepéről dystoniában nagyon kevés adat található. Primer generalizált dystoniában az agy KYNA szintje nem változott (Lim et al., 2001), míg transzgenikus modellben emelkedést mutattak ki (Richter et al., 1996). Ezeknek a fényében eredményeink csak óvatosan interpretálhatók, mert nincs elegendő adat, hogy az eltérések relevanciáját megítéljük.

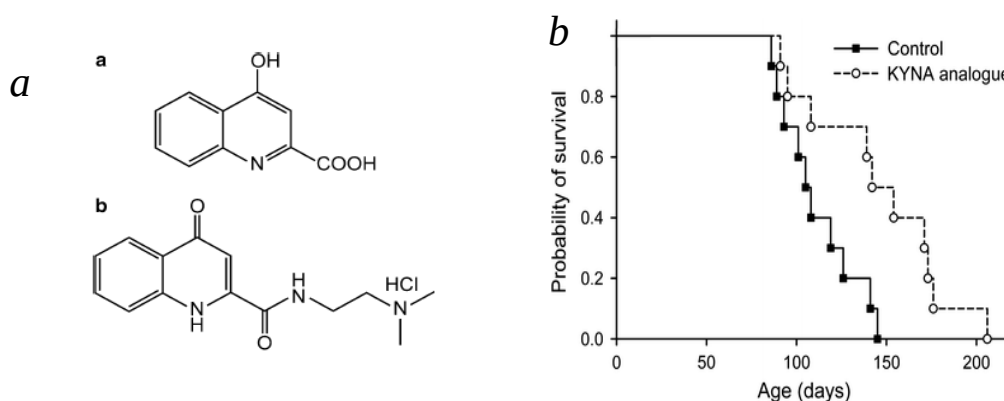


22. ábra. A KAT I és KAT II aktivitás fokális dystoniában szenvedő betegekben. Plazma (pmol/mg protein/h) és vörösvértest (pmol/mg Hg/h). A kinurénsav koncentrációja (nM) a plazmában, ill. a vörösvértestekben. Átlag±SEM; kontroll csoport n=18; cervicalis dystonia: n=7, szemhélygörcs: n=11, *p<0,01 a kontroll csoporthoz képest.

Ezek az eredmények vezettek ahhoz a gondolathoz, hogy érdemes lenne kihasználni a KYNA neuroprotektív hatását. Azonban a KYNA farmakológiai tulajdonságai jelentősen limitálják a szer használhatóságát, mivel nagyobb dózisok esetén nehezen oldódik, rosszul penetrál a vér-agy-gáton, és az organikus aminosav transzporterek segítségével gyorsan eliminálódik az agyból. Ezen kedvezőtlen tulajdonságok kiküszöbölésére a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani, ill. Gyógyszerkémiai Intézetével együttműködve számos analóg szintetizálására került sor, amelyek közül in vivo adatok alapján választottuk ki a modellrendszerünkben tesztelésre szánt anyagokat. Egy amid származék, a (N-(2-N,N-dimetilaminoetil)-4-

oxo-1H-kinolin-2-karboxamid hidokloid) intra- peritoneális adagolása Huntington kór transzgenikus egérmódeljében szignifikánsan növelte a túlélést, javította a motoros teljesítményt, csökkentette a súlyvesztést, valamint kivédte a striatális neuronok jellegzetes atrofiáját anélkül, hogy jelentős mellékhatásokat okozott volna (23. ábra).

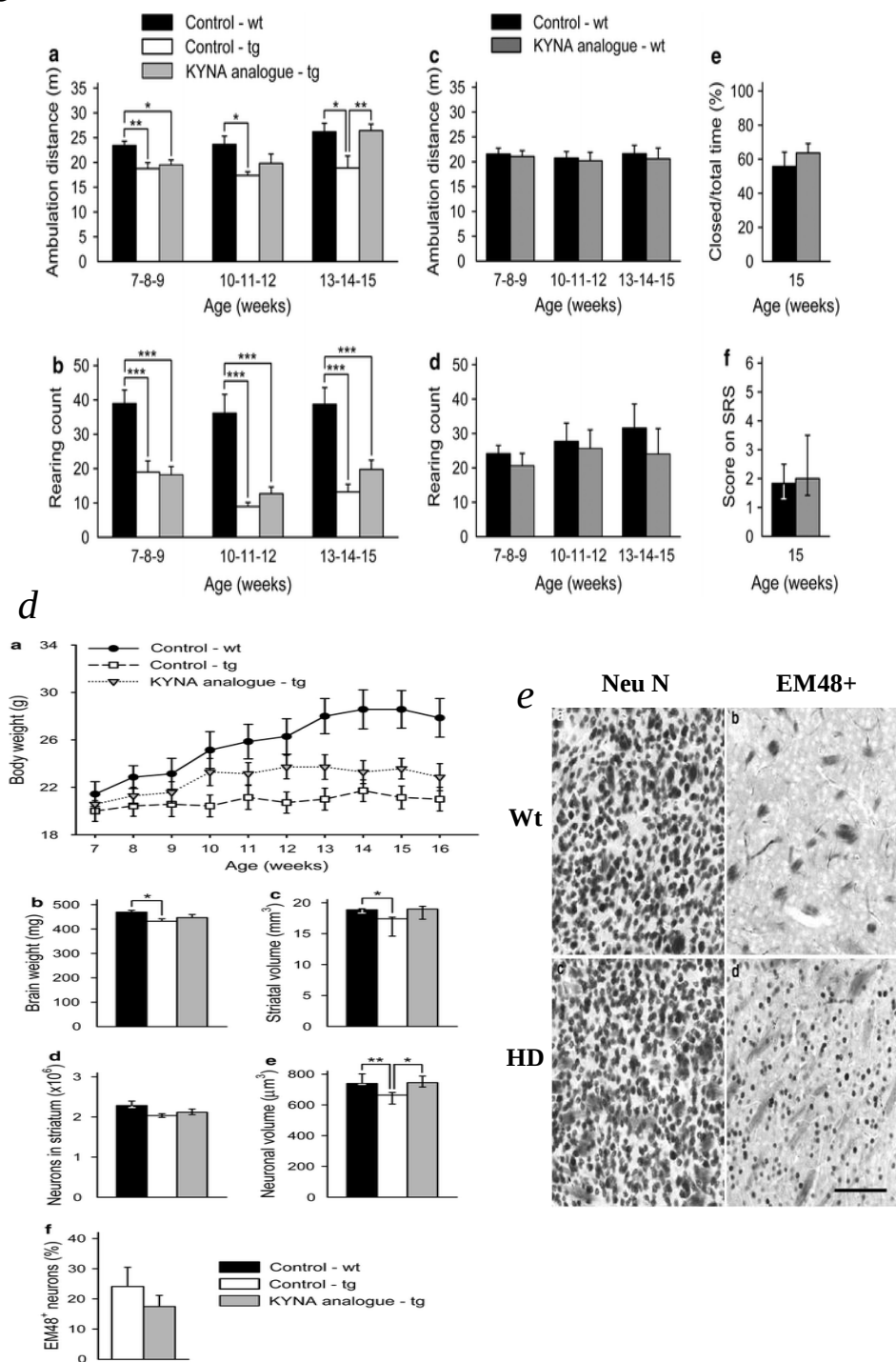
Huntington kórban már az 1990-es években közöltek adatokat a kinurenin útvonallal kapcsolatban. Posztmortem vizsgálatok relatíve csökkent KYNA szintet és KAT aktivitást mutattak a striatumban (Beal et al. 1990; Jauch et al. 1995), ill. a toxin modellekben is jelentősen csökkent KAT I aktivitás volt detektálható (Csillik et al. 2002 Knyihár-Csillik et al. 1999, 2004). Huntington kórra a GABAerg közepes tüskés neuronok szelektív pusztulása jellemző. Ezek a neuronok masszív glutamaterg innervációt kapnak a kéreg és a thalamus felől (összefoglaló: Smith et al. 2004) és ennek megfelelően jelentős számú NMDA receptor expresszálódik felszínükön (Landwehrmeyer et al. 1995), és alegységei közül is a NR2B található a legnagyobb számban. Ez lehet az alapja az glutamaterg excitotoxicitásnak (Liu et al. 2007; Heng et al. 2009), amit támogat az a megfigyelés is, hogy a mutáns huntingtin képes szenzitizálni a NR2B alegységet (Chen et al., 1999). Ez a mechanizmus okozhatja mind a direkt (NMDA receptor aktiválódás – erős excitotoxicitás), mind az indirekt excitotoxicitást (NMDA receptor szenzitizáció energia deficit következtében – gyenge excitotoxicitás) (Beal, 1992).



23. ábra. Az analóg hatása N171-82Q transzgenikus HD egerekben

- a** A KYNA és az analóg szerkezeti képlete
b Kaplan-Meier féle túlélési görbe (n = 10, p<0.05).

C



23. ábra. Az analóg hatása N171-82Q transzgenikus HD egerekben (folytatás).

- c** Magatartásvizsgálatok ($n=7-9$; átlag $\pm$ SEM (a–e) ill. median és interquartilis tartomány (f); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; tg transzgenikus, wt vad típus, SRS sztereotípiá pontozó skála)
- d** Az egerek testsúlyváltozása ($n=7$; $p < 0.001$), az agy súlyának változása, a striatalis térfogat változása és az aggregátumok száma a striátumban. (átlag $\pm$ SEM (a, b, f) ill. medián és interquartile range (c, d, e); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; tg transzgenikus, wt vad típus)
- e** 16 hetes egerek striátumának szövettani képe. (lépték: a/d: 100 μm, e/f: 10 μm).

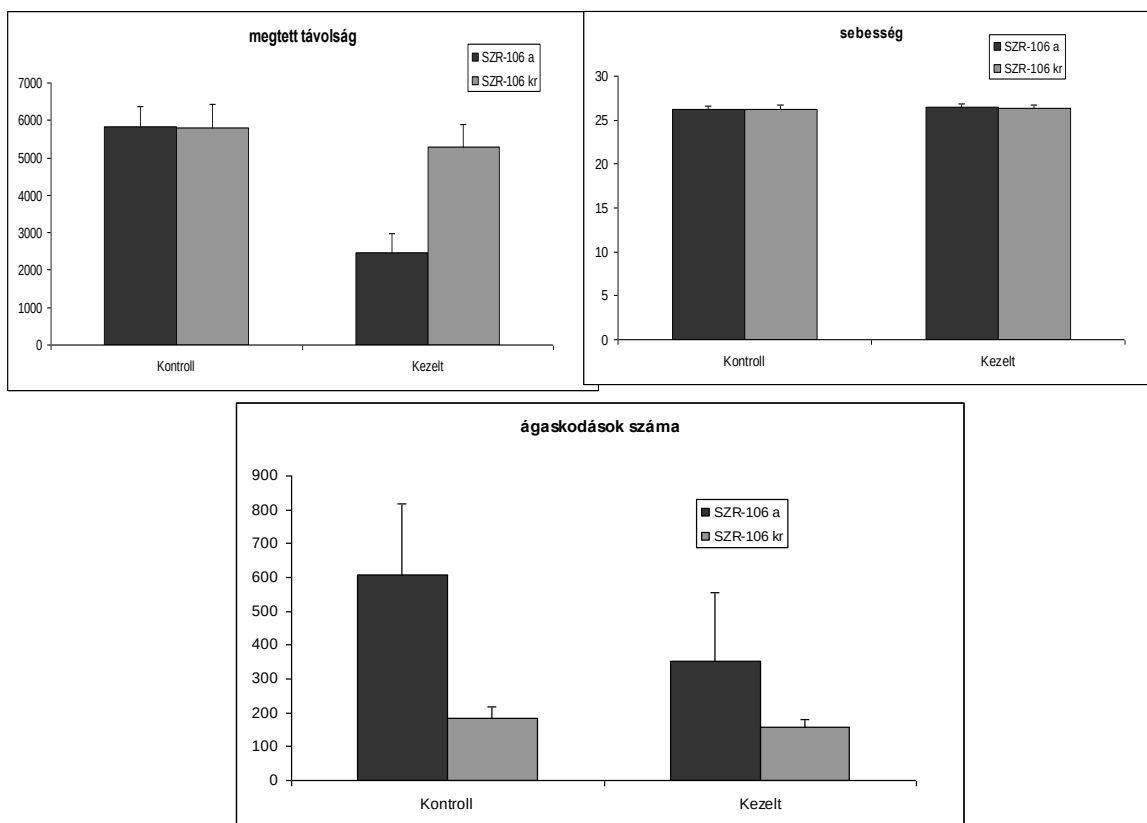
Az excitotoxicitás gátolható mind NMDA, mind AMPA receptor blokkolókkal, azonban ezen receptorok tartós gátlása olyan tüneteket eredményez, amely lehetetlenné teszi ezen szerek klinikai alkalmazását (katatónia, émelygés, hányás, hallucinációk, agitáció, vérnyomás emelkedés (összefoglaló: Muir és Lees, 1995). Ezen mellékhatás-profil alapján az NMDA receptor glicin, poliamin kötőhelye; az NR2B alegység specifikus antagonisták ill. az ioncsatorna blokkolók jönnek számításba (összefoglaló: Muir, 2006). A KYNA, amely egy széles spektrumú endogén ionotropikus excitatoros aminosav receptor antagonistája megfelelő lenne (Perkins és Stone, 1982), ugyanis micromolaris koncentrációban gátolja az NMDA receptort (a glicin-kötőhelyen (Kessler et al. 1989) és gyenge antagonistája az AMPA/kainát receptornak (Birch et al., 1988), valamint nem kompetitív inhibitora a $\alpha 7$ -nicotinerg acetilkolin receptornak (Hilmas et al., 2001). A preszinaptikus $\alpha 7$ -nicotinerg acetilkolin receptorok szerepet játszanak a glutamat felszabadulás szabályozásában (Marchi et al., 2002).

Ez az eredmény azért is kiemelkedő, mert túlélés szempontjából a legjelentősebbek között van (31%; 7. táblázat), valamint nemcsak a betegség kezdetét tolja ki, hanem úgy tűnik képes annak lassításra is (minél hosszabb volt a kezelés, annál tovább éltek az állatok). Ezen eredmények alapján nemzetközi szabadalmat jelentettünk be.

Vizsgálatainkat természetesen nem fejeztük be, folyamatosan szintetizálják az utód molekulákat még kedvezőbb hatásprofil elérése céljából. Jelenleg legígéretesebbnek a szintén amid származék, SZR-106 tűnik, bár az in vivo magatartási adatok akut toxicitást sejtetnek (nem közölt adatok, 24. ábra). A molekulával a további vizsgálatok folyamatban vannak.

Mitokondriális támadáspontú szerek vizsgálata

Számos megkérdőjelezhetetlen adat igazolja, hogy a mitokondriális károsodás szerepet játszik a neurodegeneratív betegségek kialakulásában. Ezen evidenciák közé tartoznak a humán posztmortem és in vivo adatok (összefoglaló: Beal, 1998), ill. az, hogy mitokondriális toxinokkal a humán betegségekhez sokban hasonló sejtpusztulást lehet állatokban előidézni (Brouillet et al., 1999). Ugyancsak ezt támogatja, hogy a monogén



24. ábra. A SZR-106 analóg hatása a magatartásparaméterekre.

(a: akut, kr: krónikus adagolás)

öröklődésű kórképeknél az azonosított fehérjék többsége mitokondriumhoz köthetők (1. táblázat). Habár a mitokondriumok elsődleges szerepe az energiatermelés, zavara számos patológiai folyamatot eredményez: excitotoxicitás (Peng és Greenamyre, 1998), fokozott szabadgyök termelés (Green és Reed, 1998), Ca^{++} homeostasis zavara (Steeghs et al., 1997), apoptózis (Green és Reed, 1998). Az is ismert, hogy az életkor előrehaladtával a mitokondriális DNS-ben egyre több mutáció észlelhető, amely szintén számos kórfolyamatért lehet felelős. Ráadásul a mitokondriális DNS, a nukleáris DNS-sel szemben, nem tekeredik fel hisztonokra, amely által sérülékenyebbé válik különböző mutagén hatásokra.

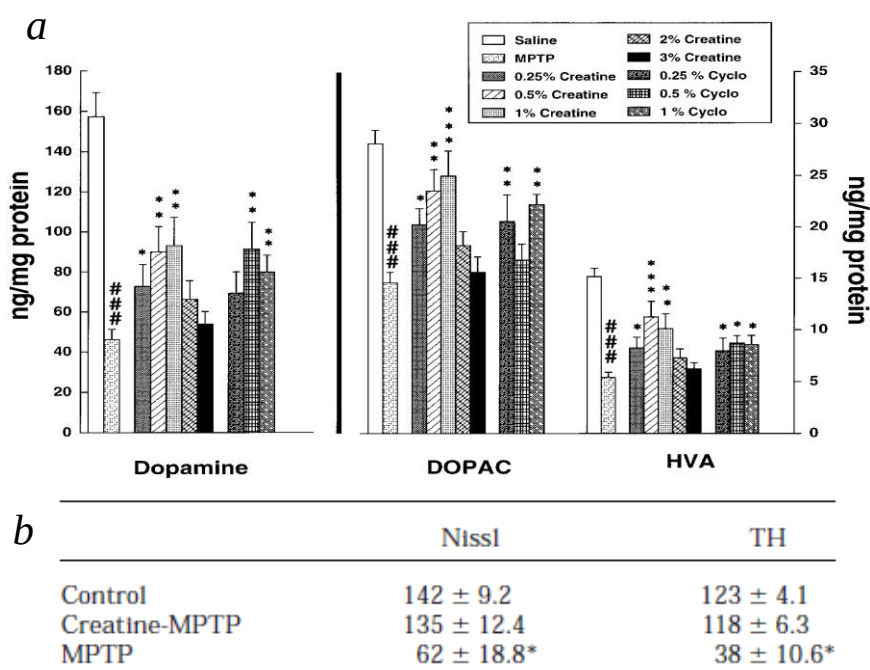
Ebből következett az a feltételezés, hogy olyan szerek, amelyek javítani tudják a mitokondrium funkcióját (és az energia termelését), neuroprotektívek lehetnek. A kreatin egy guanidin származék, amely megtalálható a táplálékunkban, de szervezetünkben a máj, vese és a pancreas is képes szintetizálni. A kreatin a

szervezetben szabad formában ill. foszfokreatin formában található. A nagy energiaigényű szövetekben (agy, izomzat) a foszfokreatin szolgál rövidtávú energiatárolásra. A kreatin az agyba egy Na-dependens transzporterrel keresztül jut be, amelyet az inzulin facilitál (Steenge et al., 1998). A kreatin adagolása emeli a foszfokreatin szintet, ill. fokozza az ATP szintézist (O’Gorman et al., 1996). A kreatin-foszfokreatin átalakulást a kreatin kináz katalizálja (EC 2.7.3.2), így ez az enzim kiemelt fontosságú a sejtek homeostasisának fenntartásában, ill. azok energiaigényének kiszolgálásában (Andres et al., 2008). A kreatin kináznak két izoenzimje ismert, az egyik a citosolban található dimer formában, míg a másik a mitokondrium membránjai között (mtCK), a tranziens pore-ral kapcsolatban, dimer vagy oktomer formában (O’Gorman et al., 1997). A mitokondriális formának is két szövet-specifikus formája ismert, az egyik csak a harántcsíkolt izomban található (sarcomeric mtCK), míg a másik minden szövetben, így az idegrendszerben is (ubiquitous mtCK). A citosolban található agyspecifikus kreatin kináz genetikai eliminációja jelentős deficitet okoz különböző tanulási és magatartási paradigmákban, ill. a mitokondriális forma eliminálása még súlyosabb fenotípust eredményez (Beal, 2011). A kreatin adagolás a mitokondriális kreatin kináz enzimet oktamer formában stabilizálja, ezáltal megakadályozza a mitokondriális tranziens pore aktiválódását, és így az apoptózist. Ezzel szemben különböző behatások, pl. fokozott szabadgyök képződés ezt az enzimet dimer formává alakítják, ezáltal lehetővé téve a tranziens pore megnyílását, és az apoptotikus folyamatok iniciálódását. Korábban a kreatin hatását főleg anyagcsere betegségeken vizsgálták (pl. guanidino-acetat-metiltranszferáz deficiencia vagy kreatin transzport deficiencia), de az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb teret kapott a neurodegeneratív betegségek kezelésében is. A kreatin szupplementáció hatásait részletesen vizsgálták és nem találtak, még nagy dózisok esetén sem, lényeges mellékhatást vagy vesekárosodást annak ellenére, hogy a szérumban a kreatinin szintjét megemelte. Korábban igazolták, hogy 3 hét kreatin szupplementáció dózis-dependens módon, szignifikánsan emelte az agy kreatin szintjét (Matthews et al., 1999).

A kreatin számos modellben neuroprotektív hatású: glutamát és β -amyloid okozta toxicitásban (Brewer és Wallimann, 2000); malonsav és 3-NP indukálta sejtkárosodásban (Matthews et al., 1998); traumás agysérülésben (Sullivan et al., 2000); Huntington kór transzgenikus modelljében (Andreassen et al., 2001; Ferrante et al., 2000).

A kreatin szupplementáció hatása Parkinson kór modelljében

Vizsgálatunkban a kreatint a rágsálók táplálékába kevertük (per os adagolás) emelkedő koncentrációban, az MPTP adagolást megelőzően két hétig előkezeltük, majd a kezelést még egy hétig folytattuk. Azt találtuk, hogy a kreatin Gauss görbe-szerűen csökkentette az MPTP indukálta substantia nigra sejtpusztulást, ill. a következményes dopamin és metabolit szintjeinek csökkenését 0.25%, 0.5% ill. 1%-os dózisban. 2 ill. 3 %-os adagolás esetén hatást nem tapasztaltunk (25. ábra). Ugyancsak hatásos volt a kreatin analógja is, a ciklokreatin, azonban ezt a későbbiekben hypoglikémizáló mellékhatása miatt nem használtuk. Annak az oka, hogy magasabb kreatin dózisok miért nem voltak hatásosak, nem egyértelmű. További vizsgálatok alapján úgy tűnik, a kreatin dózis-hatás összefüggése nagyban függ az vizsgálati paradigmától (1% majdnem 100% protekciót mutatott, ill. máskor 2% is szignifikáns volt). Kreatin adagolással az ATP szint emelhető, ill. tovább fenntartható, és így ezáltal az MPTP okozta sejtpusztulás mértéke csökkenthető.



25. ábra. A kreatin ill. a ciklokreatin hatása az MPTP toxicitásra.

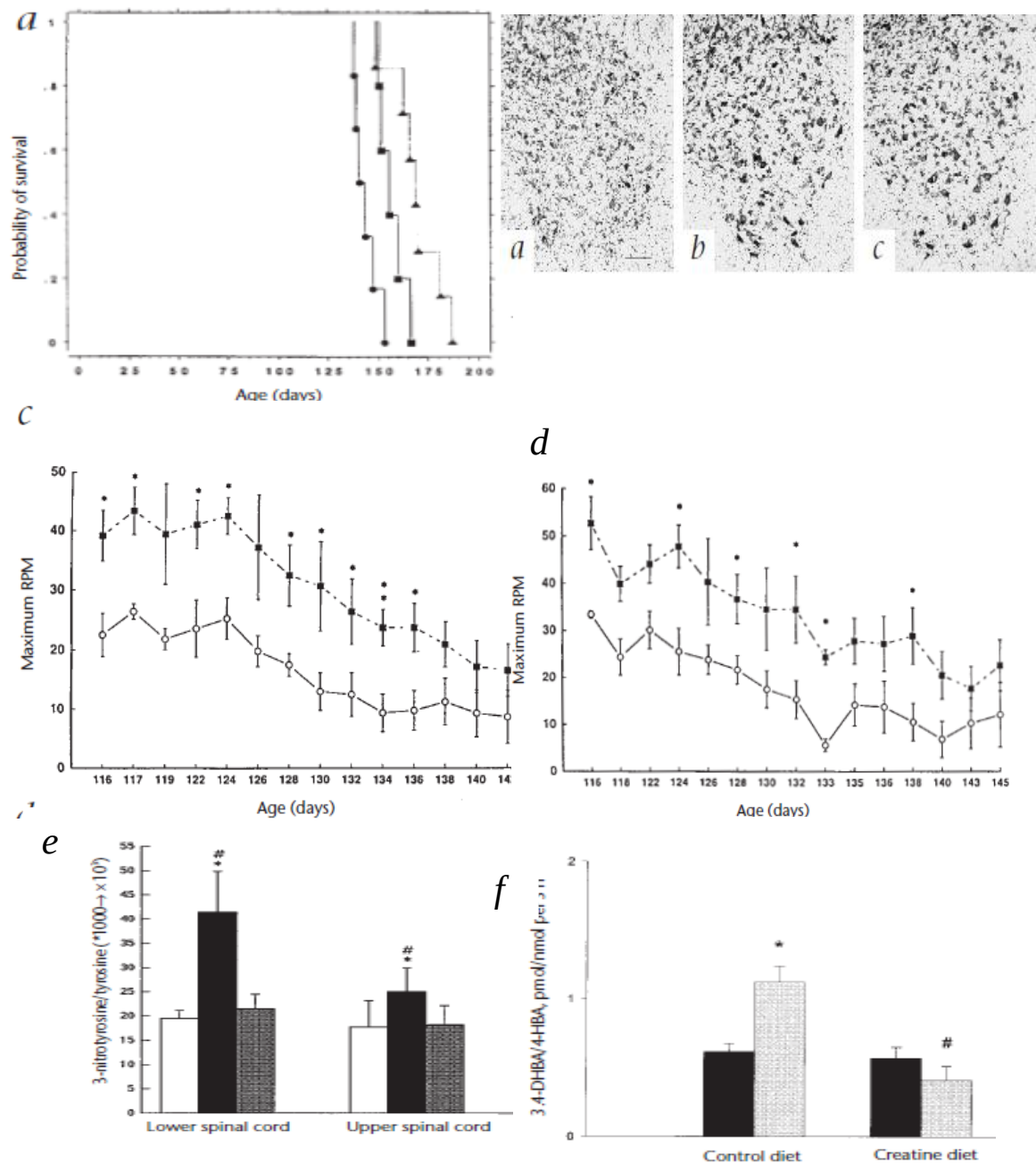
- a** A dopamin és metabolitjainak szintje. Átlag±SEM. ### $p<0,001$ a kontroll csoporthoz képest * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ az MPTP csoporthoz képest, $n=10$.
- b** A substantia nigra sejtszámai 1%-os kreatin adagolás után. * $p<0,001$.

Ezen eredmények alapján egy fázis II vizsgálat indult korai Parkinson kórban (NINDS NET-PD Investigators 2006), amely során azt találták, hogy a betegek állapota lassabban romlott, mint kreatin nélkül (a hatás marginális, de szignifikáns volt). Ezért ezt egy fázis III vizsgálat követte, több mint 1700 beteggel, amely jelenleg is zajlik (7 éves vizsgálat). Sőt, állatkísérletekben hatásosnak bizonyult különböző támadáspontú szerek kombinációjával (pl. kreatin és minociklin) is folytattak egy előzetes, biztonságossági vizsgálatot (NINDS NET-PD Investigators, 2008).

Kreatin szupplementáció hatása ALS modelljében

A G93A mutációt tartalmazó egerek táplálékába 1%-os ill. 2%-os arányban kreatint kevertünk és azt találtuk, hogy az egerek túlélése, motoros teljesítménye (rotarod méréssel) itt is dózis dependens módon, szignifikánsan javult, ill. csökkent a gerincvelői mellső szarvi motoneuronok pusztulása. A kreatinadagolás csökkentette az oxidatív károsodást is, amit a nitrotyrosin szinttel, ill. a 3,4 DHBA/4HBA átalakulással mértünk (26. ábra). Ezen biztató adatok alapján két humán klinikai vizsgálat is indult, amelyek azonban nem igazoltak klinikailag mérhető hatást ALS-ben (2 fázis II, ill. 2 fázis III). Ezek a kiábrándító eredmények nem feltétlenül jelzik azt, hogy a kreatin nem hatékony, vagy ennek alapjául szolgáló teória rossz, hanem inkább azt jelzi, hogy a G93A mutáció okozta motoneuron pusztulás nem megfelelő modellje a humán kórképnek. Ezt látszik igazolni az a tény is, hogy ebben a modellben TH pozitív sejtek is pusztulnak a substantia nigrában, amit a betegség egyik alcsoportjában lehet csak észlelni.

Az eredménytelenség hátterében az is felmerült, hogy az állatkísérletekből extrapolált dózisok nem megfelelőek, ezért visszaléptek a fázis I dóziskereső vizsgálatához a maximálisan tolerálható adag megállapítására (Atassi et al, 2010).



26. ábra. A kreatin adagolás hatása ALS modellben (folytatás).

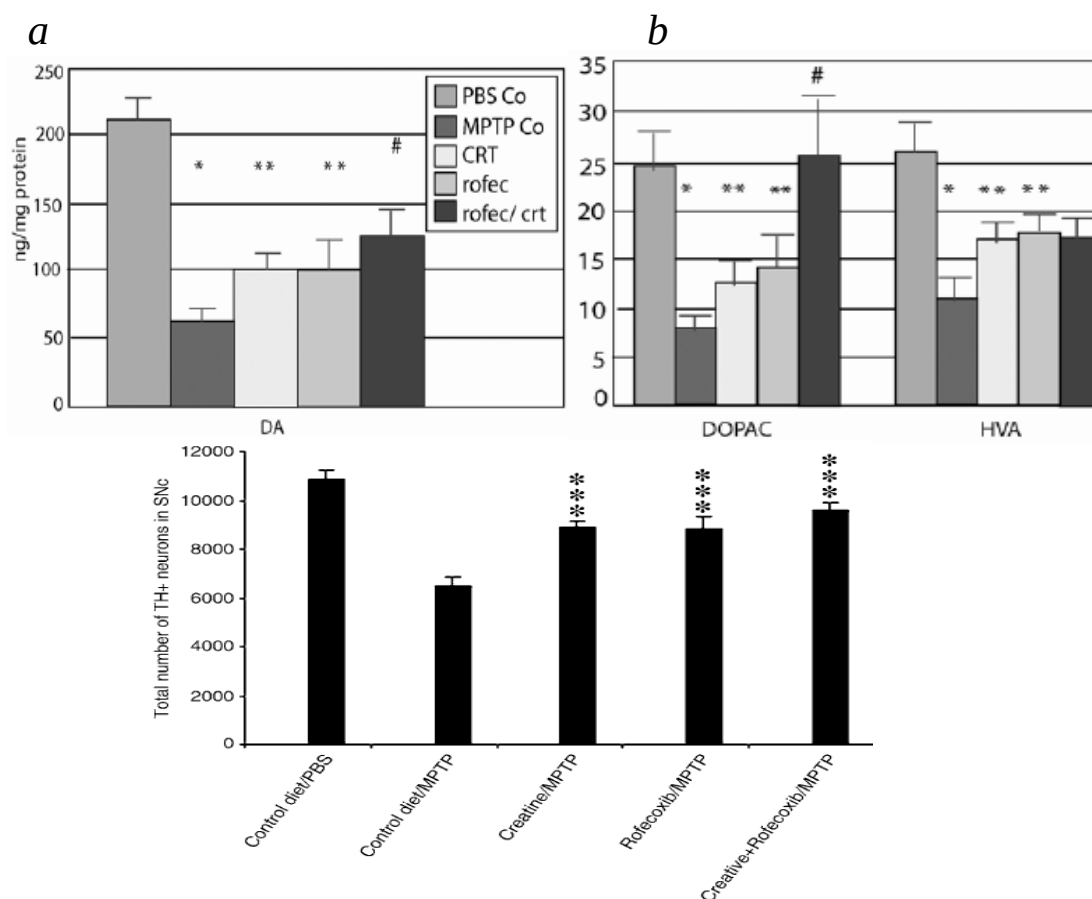
- a Kaplan-Meier féle túlélési görbe (● kontroll, ■ 1%-os kreatin, ▲ 2%-os kreatin)
- b A neuron pusztulás mértéke 120 napos korban a lumbális gerincvelő mellső szarvában. Kezeletlen állatok (a), 1% kreatin (b) vad típus (c). Lépték: 100 μ m.
- c 1%-os kreatin hatása a mozgásteljesítményre ($p < 0,05$).
- d 2%-os kreatin hatása a mozgásteljesítményre ($p < 0,05$).
- e A 70 napos korban elkezdett 1%-os kreatin szupplementáció hatása 3NT/tyr arányra 120 napos korban. □ vad típus, ■ transzgenikus egér normál táp, ▨ transzgenikus egér 1%-os kreatin táp. * $p < 0,05$ vad típushoz; # $p < 0,05$ a kreatin szupplementációhoz képest.
- f Az 1%-os kreatin adagolás hatása a 4HBA/3,4DHBA átalakulásra transzgenikus egerekben szisztémás 3NP adagolást követően. ■ kiindulási érték; ▨ 3-NP adagolás után. * $p < 0,05$ a kiindulási értékhez képest; # $p < 0,05$ a 3-NP normál táphoz képest.

Különböző támadáspontú szerek additív hatásának vizsgálata

Állatmodellekben számos különböző hatásmechanizmusú vegyület kedvező hatását tudtuk igazolni. Ez vezetett el ahhoz a feltételezéshez, hogy eltérő támadáspontú, hatásos szerek kombinációja additív hatással bírhat.

Parkinson kór

A neuroinflammáció szerepét neurodegeneratív folyamatokban, így Parkinson kórban is számos adat támogatja. Posztmortem reaktív gliosis lehet kimutatni idiopathiás Parkinson kóros betegek substantia nigrájában (McGeer et al., 1988), ill. MPTP mérgezést elszenvedett betegekben (Langston et al., 1999). A betegek liquorában emelkedett IL-1b, IL-6 és TNF- α koncentrációt észleltek, (Blum-Degen et al., 1995; Mogi et al., 1996; Muller et al., 1998; Mogi et al., 1994a; Mogi et al., 1994b), míg a substantia nigra sejtjeiben emelkedett TNF- α és IL-1b immunreaktív glia sejteket figyeltek meg (Hunot et al., 1999). A COX-1 minden sejtben expresszálódik, míg a COX-2 gyulladásos folyamatokban aktiválódik különböző citokinek hatására (IL-1b, TNF α). A COX-2 szerepét neurodegenerációban számos modellben vizsgálták (Almer et al., 2001; Iadecola et al., 2001; Hewitt et al., 2000). A COX-2 gátlás protektív effektusát korábban már igazolták MPTP modellben (Teismann et al., 2001, 2003). Ezek alapján merült fel, hogy az energiadeficitet javító, valamint a gyulladásos folyamatot csökkentő szerek kombinálásának lenne-e additív hatása. Így került tesztelésre a kreatin, ill. a rofecoxib kombinációja (2%-os, ill. 0,005%-os koncentrációban, orálisan adagolva). A kombinációs terápia szignifikánsan jobban csökkentette az MPTP okozta striatális dopamin depléciót, mint a két szer külön-külön (27. ábra). A TH pozitív sejtek száma a szignifikánsan emelkedett a kontroll csoportéhoz képest a két szer alkalmazásakor, azonban itt nem tudtunk szignifikáns additív hatást kimutatni. A kombinációs kezelés fokozott hatékonysága arra utalhat, hogy többek közt ez a két útvonal is szerepet játszik a pathomechanizmusban, de nem kizárólagosak, mivel nem tudtunk teljes protekciót elérni, vagy megközelíteni.



27. ábra. A kreatin és a rofecoxib hatása az MPTP toxicitásra.

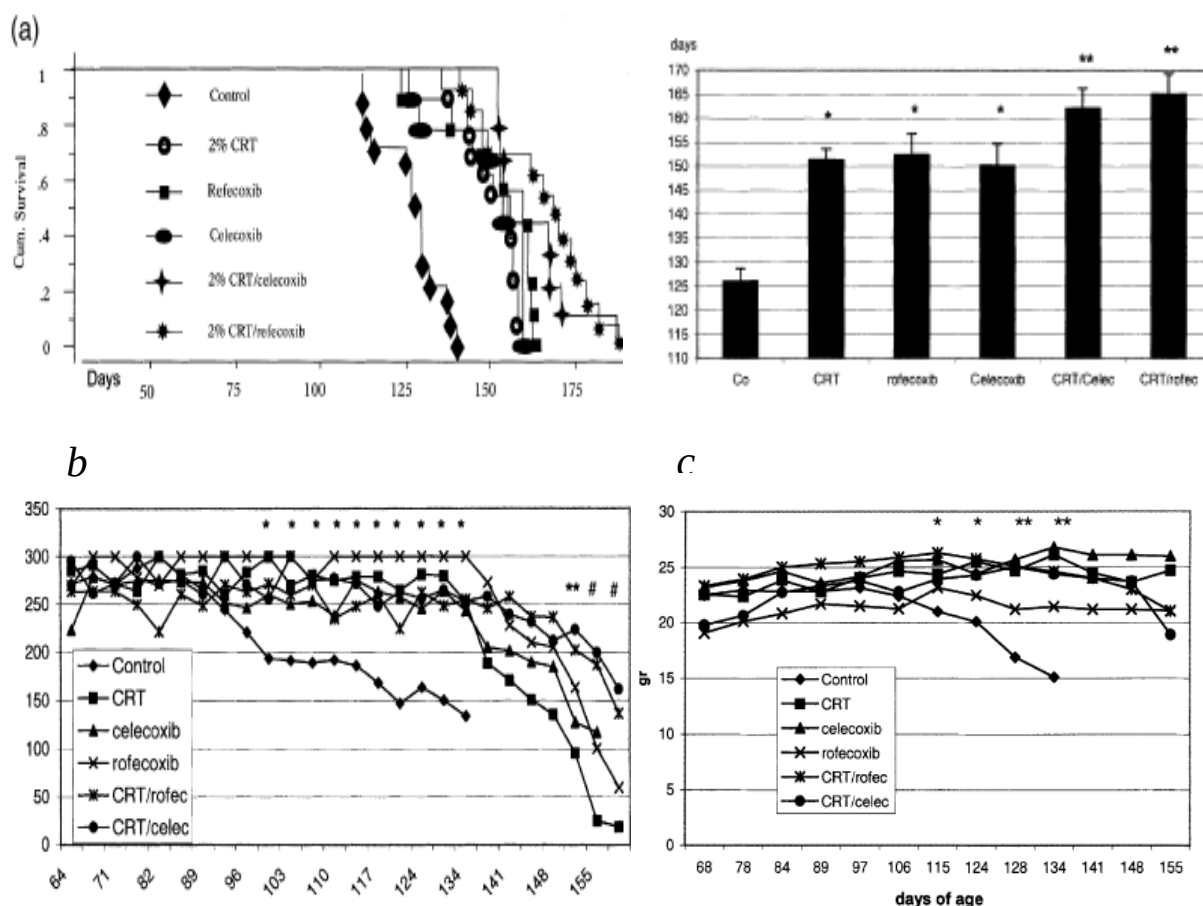
a A dopamin és metabolitjainak szintje. Átlag $\pm$ SEM. * $p < 0.01$ a kontroll csoporthoz képest; ** $p < 0.05$ az MPTP kontroll csoporthoz képest; # $p < 0.05$ a kreatin vagy rofecoxib csoporthoz képest.

b A substantia nigra pars compacta TH pozitív neuronjainak száma. Átlag $\pm$ S.E.M; $n=10$; kontroll PBS csoport $n=8$). *** $p < 0.001$ az MPTP normál táp csoporthoz képest.

Amyotrophias lateralsclerosis

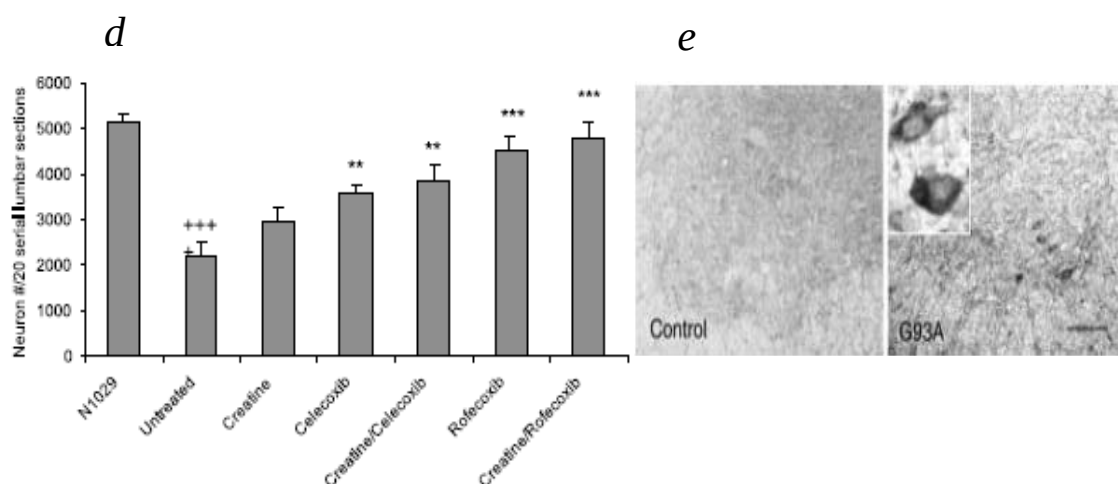
A gyulladásos folyamatok szerepét a neurodegenerációban számos adat támogatja: robosztus mikroglia aktiváció, emelkedett proinflammatorikus citokin (IL 1b, ill. IL6) szinteket, ill. COX-2 expressziót és PGE₂ szintet közöltek sporadikus ALS-ben, mind a szérumban, mind a liquorban ill. posztmortem agyszövetben is (Liet al., 2000; Sekizawa et al., 1998). Ezeket az észleléseket megerősítették az SOD1 mutáns egerekben is (Almer et al. 2001, 2002; Ilzecka et al., 2003). A COX-2-t fokozottan expresszáló transzgén egerek érzékenyebbek a kainát-indukálta toxicitásra, és a lipid peroxidáció is emelkedett ezekben az állatokban (Kelley et al.1999). Ezzel ellenkezőleg, a gén eliminációja csökkent érzékenységet mutatott fokális ischaemia

modellben, ill. az NMDA okozta sejtkárosodásban (Iadecola et al. 2001). A COX-2 gátlás protektív hatását többen igazolták ALS különböző modelljeiben (Drachman és Rothstein 2000; Drachman et al. 2002; Pompl et al. 2003). Ezért került tesztelésre a már korábban igazolt hatású kreatin és a COX-2 gátló celecoxib ill. rofecoxib kombinációja. 2% kreatin, ill. 0,005% rofecoxib, valamint 2% kreatin ill. 0.012% celecoxib kombinációja additív módon szignifikánsan jobban javította az állatok túlélését, a motoros teljesítményüket, csökkentette a súlyvesztésüket és a gerincvelői motoneuronok pusztulását, mint a szerek külön-külön (28. ábra). (Az alkalmazott dózisokat korábbi vizsgálatokból adoptáltuk). Ez az additív hatás a túlélés



28. ábra. A kreatin és a COX-2 gátlás hatása ALS transzgenikus modelljében.

- a* Kaplan-Meier féle túlélési görbe, ill. a túlélés átlaga. * $p < 0.001$ a kontroll csoporthoz képest; ** $p < 0.05$ a kreatin, ill. a COX-2 gátlók csoportjához képest.
- b* A rotorod teljesítmény másodpercben * $p < 0.05$ a kontroll csoporthoz képest; * $p < 0.05$ a kreatin és a celecoxib csoporthoz képest; # $p < 0.05$ a kreatin, ill. a COX-2 gátlók csoportjához képest.
- c* Az állatok súlyváltozása * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ a kontroll csoporthoz képest.



28. ábra. A kreatin és a COX-2 gátlás hatása ALS transzgenikus modelljében (folytatás).

- d* A neuronok átlagos száma a lumbális gerincvelőben. Átlag $\pm$ SEM. $^{+++}p < 0.0001$ a vad típushoz képest; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$ a kezeletlen csoportjához képest.
- e* A fokozott COX-2 immunreaktivitás a motoneuronokban. Lépték 100 μ m.

szempontjából az egyik legjelentősebb a farmakológiai kezelések között. A hipotézisünknek megfelelően a COX-2 aktivitás (amit a PGE_2 szinttel mértünk) emelkedett a kezeletlen transzgenikus állatok gerincvelőjében, ill. agykérgében, amely a kezelés hatására csökkent. Az a tény, hogy két különböző hatásmechanizmusú szer együttes hatása jobb, mint a szereké külön-külön, arra utalhat, hogy az ALS pathomechanizmusában többféle folyamat zajlik egyszerre, és ezek egyike sem kizárólagosan felelős a kórkép kialakulásáért. Ezek alapján e betegségek kezelésében különböző szerek kombinációja („koktél”), ill. multifunkcionális gyógyszerek lehetnek hatásosak (Van der Schyf et al., 2006).

A kreatin neuroprotektív hatásmechanizmusa: mitokondriális kreatin kináz deficiencia

A kreatin az energiaháztartás javítása mellett fokozza a glutamát újrafelvételt (Xu et al, 1996), ill. szabadgyökfogó képességgel is rendelkezik (Lawler et al., 2002). A kreatin-foszfokreatin átalakulás a mitokondriális kreatin kináz enzimhez kötődik. Ez az

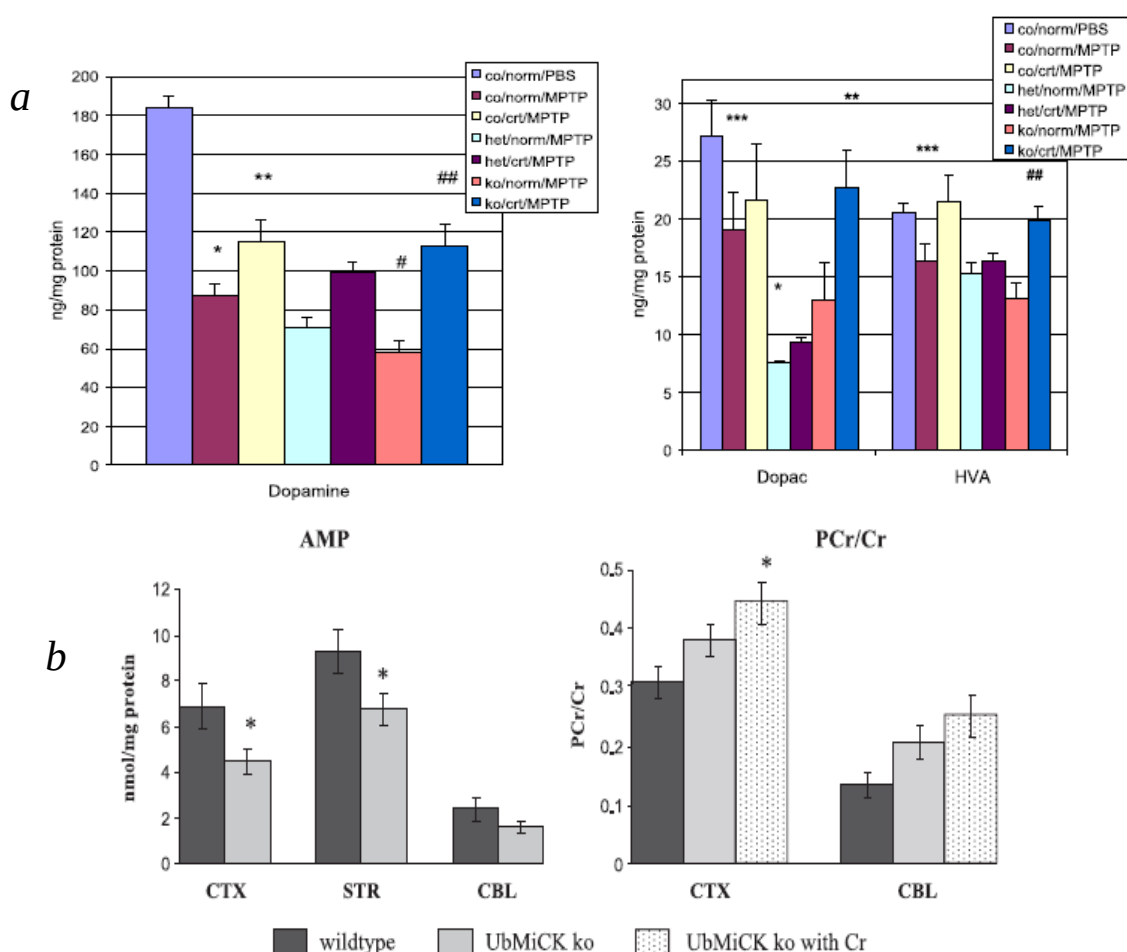
enzim szoros kapcsolatban van a mitokondriális permeabilitási tranziens csatornával, amely aktiválódása szerepet játszik mind a nekrozisban, mind az apoptózisban (Bemardi et al., 1998). A csatorna nyitását idézhet elő az emelkedett mitokondriális Ca^{++} , vagy a fokozott szabadgyök képződés. A nyitódás az egyik első lépése a sejtpusztulásnak, amely során citokróm C szabadul ki a citoplazmába. A kreatin a mitokondriális kreatin kináz enzimet oktomer formában stabilizálja. Ez az oktomer forma megakadályozza a tranziens pore aktiválódását (O’Gorman et al., 1997).

Annak eldöntésére, hogy a kreatin neuroprotektív hatásáért az energia homeostasis javítása, vagy a tranziens pore megnyílásának akadályozása felelős, egy mitokondriális kreatin kináz deficiens állattörzset használtunk. Ezek az állatok életképesek, fiziológiás körülmények között lényeges fenotípus-változást nem mutatnak (Steeegsh et al., 1995).

Az állatok agyában az ATP szint nem változott, míg az AMP szint csökkent, amely arra utalhat, hogy az adenylate kináz aktivitás növekedése biztosítja a normális ATP szintet. Azonban MPTP hatására a dopaminerg sejtpusztulás sokkal kifejezettebb, mint a vad típusú állatoknál, ami azt jelzi, hogy kóros körülmények között ez a kompenzáció már közel sem teljes. Vizsgálatunk során azt tapasztaltuk, hogy a kreatin az enzimhiányos állatokban is közel hasonló nagyságrendben eredményeztet protekciót az MPTP toxicitással szemben (mind biokémiailag, mind szövettanilag), mint a vad típusnál, azaz ez a hatás nem magyarázható a tranziens pore inaktiválásával, hanem az energiaháztartás javításával hozható összefüggésbe (29. ábra). Ezt az eredményt igazolja az a tény is, hogy izolált mitokondriumban a kreatin nem befolyásolta a permeabilitási pore működését (Brustovesky et al., 2001).

Karnitin hatása Huntington modellben

Az L-karnitin (4-N-trimetilammonium-3-hidroxi-vajsav) szerepet játszik a mitokondriális acil-koenzim A/koenzim A arány fenntartásában, a zsírsavak oxidációjában és a ketontest képződésben, valamint antioxidáns hatással is rendelkezik (Bahl et al., 1987, Koudelova et al., 1994). Egy korábbi, kettős vak humán vizsgálat nem talált szignifikáns hatást Huntington kóros betegekben (Goety et al., 1990). Ennek az is lehet az oka, hogy nem megfelelő dózisban alkalmazták a szert (45mg/kg), ezért mi magasabb adagban (250 mg/kg) vizsgáltuk az L-karnitin hatását N171-82Q transzgén modellünkben.



Experimental group	Tyrosine hydroxylase	Nissl
Control/normal diet/PBS	9151 ± 460	10629 ± 396
Control/normal diet/MPTP	6326 ± 540**	6903 ± 265***
Control/creatine/MPTP	8085 ± 424 [#]	9639 ± 547 ^{###}
Knockout/normal diet/PBS	9305 ± 761	10848 ± 606
Knockout/normal diet/MPTP	6285 ± 134 ^{xx}	6778 ± 269 ^{xxx}
Knockout/creatine/MPTP	8052 ± 485 ⁺	9512 ± 460 ⁺⁺

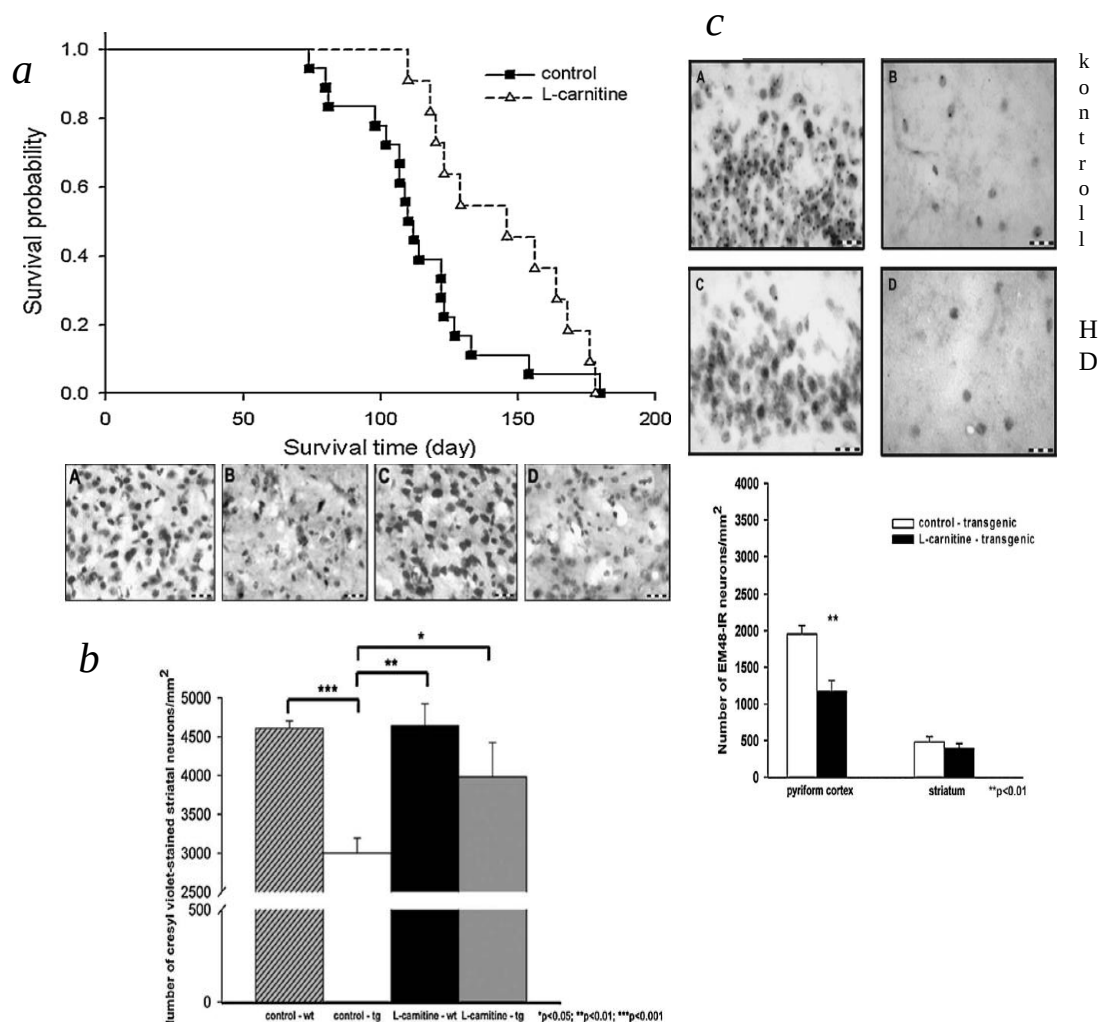
29. ábra. A kreatin hatása az MPTP toxicitásra MiCK deficiens állatokban.

a A dopamin és metabolitjainak szintje. Átlag±SEM. * $p < 0.001$; *** $p < 0.05$ a vad típushoz képest; ** $p < 0.05$ az MPTP kontrollhoz képest, [#] $p < 0.05$, az MPTP kontrollhoz képest, ^{##} $p < 0.002$, a homozigóta MPTP csoporthoz képest.

b Az AMP és a PCr/Cr koncentrációja 2 hét kreatin szupplementációt követően. * $p < 0.001$.

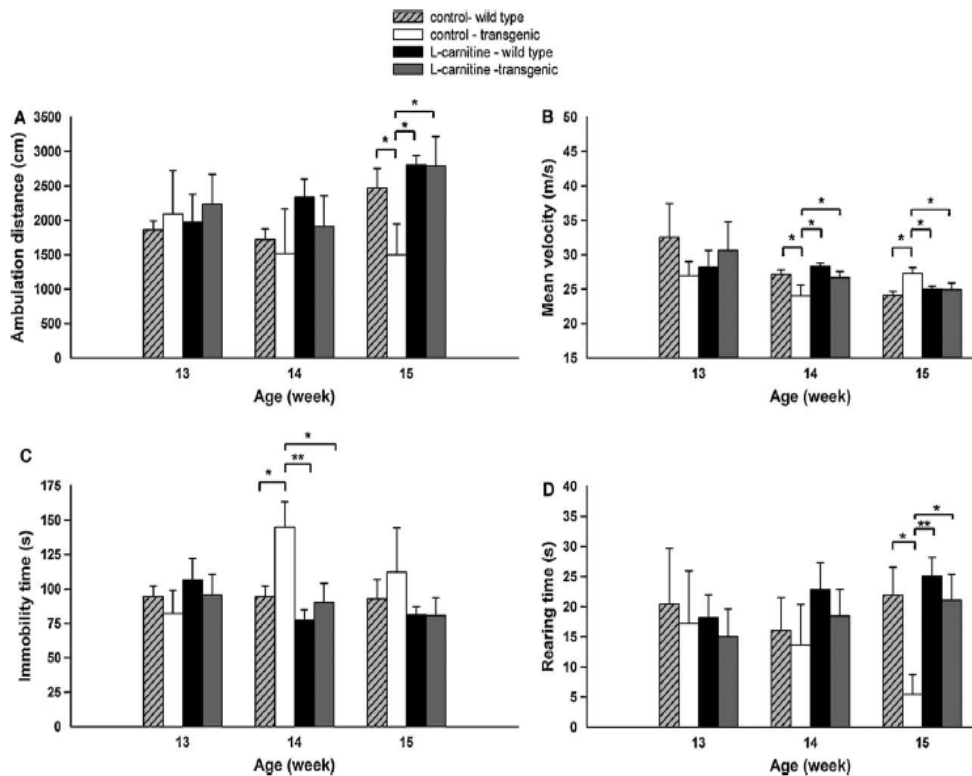
c A neuronok száma a substantia nigra pars compact-jában. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ a kezelt vad típushoz képest; [#] $p < 0.05$, ^{###} $p < 0.001$ az MPTP kontroll csoporthoz képest; ^{xx} $p < 0.01$, ^{xxx} $p < 0.001$ a deficiens kontroll csoporthoz képest; ⁺ $p < 0.05$, ⁺⁺ $p < 0.01$ a deficiens MPTP csoporthoz képest.

Azt találtuk, hogy az L- karnitin szignifikánsan javította a transzgén egerek túlélését, motoros teljesítményét, ill. csökkentette a striatális neuronpusztulást, és csökkentette a huntingtin pozitív intranukleáris zárványok számát a piriformis kéregben a kontroll csoporthoz képest (30. ábra).



30. ábra. Az L-karnitin hatása Huntington kór transzgenikus modelljében.

- a* Kaplan-Meier féle túlélési görbe; * $p<0.05$.
- b* Huntingtin pozitív kortikális (A/C) és striatális (B/D) neuronok száma 16 hetes korban. Lépték: 25 μ m
- c* A neuronok száma a striatumban 16 hetes korban kristályibolya festődéssel. A vad típus; B kezeletlen transzgenikus csoport; C karnitinnal kezelt vad típus; D karnitinnal kezelt transzgenikus csoport. Lépték 25 μ m.

d

30. ábra. Az L-karnitin hatása Huntington kór transzgenikus modelljében (folytatás).

d A magatartás vizsgálatok eredményei; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Ez a protektív hatás összemérhető egyéb antioxidáns hatással rendelkező molekulákkal (BN82451, remacemide, koenzim Q10, cysteamine) elért hatással (Klivenyi et al., 2003, Dedeogle et al., 2002, Ferrante et al., 2002). Ez arra utalhat, hogy a fokozott szabadgyök képződés, kb. ilyen arányban tehető felelőssé a kóros folyamatokban. Az eredmények alapján felmerülhet a humán klinikai vizsgálat megismétlése a korábbinál magasabb dózisban.

Hisztón deacetiláz gátló szerek vizsgálata

A Huntington kór kialakulásáért felelőssé tehető mutálódott huntingtin protein pontos funkciója nem ismert. Tudjuk azonban, hogy számos enzim, ill. receptor transzkripciója zavart szenved azáltal, hogy a mutáns gén különböző transzkripciós faktorhoz tud kötődni, mint pl. Sp1, TFIIF, vagy TFII130 PDX-1, CBP és p300 (összefoglaló: Kazantsev és Hersch, 2007). Transzkripciós faktorhoz való kötődés eredményezi azt, hogy a juvenilis Huntington kórban, valamint a nagy ismétlődésszámú modellekben (R6/2) diabetes fejlődik ki (Andreassen et al., 2002). A mutáns huntingtin interferál többek között a cAMP-responsive element (CRE)-binding protein (CREB) és a TFIID transzkripciós faktorokkal, ezáltal csökkent PGC1- α gén expressziót és protein szintet eredményez, amely bizonyos mitokondriális gének csökkent átíródásához vezet.

A gén expresszió szabályozásában igen fontos szerepet játszik a DNS fehérjékkel való interakciója. Inaktív állapotban a DNS kompakt módon fel van tekerve a hisztón nevű proteinekre, meggátolva az expresszióhoz szükséges faktorok kötődését. Amikor szükséges a DNS letekerődik, kinyílik és megkezdődhet az átíródás. A DNS e két állapotát a hisztón acetilálódása szabályozza. Ha a hisztón lizin rezidumai acetilálódnak (hisztón acetiltransferáz – HAT enzim segítségével), akkor a DNS kinyílik (és ezáltal a transzkripciós faktorok számára elérhetővé válik), míg ha deacetilálódnak (hisztón deacetiláz – HDAC enzim által), akkor a DNS egy kompakt formát vesz fel (és ezáltal a transzkripció gátlódik). Számos adat támogatja azt, hogy az acetiláció-deacetiláció arányának megváltozása hozzájárulhat a neurodegeneratív megbetegedések pathomechanizmusához, így a Huntington kóréhoz is (Sadri Vakili et al., 2006). Ezek alapján a hisztón deacetiláció gátlása (HDAC inhibíció) neuroprotektív hatású lehet. Ilyen hatása számos szernek van, pl. az antiepileptikum és hangulat-stabilizátorként a humán gyógyászatban is használatos valproátnak is.

Egy másik HDAC inhibitornak, a fenilbutirátnak alkalmazása jelentősen növelte a *Drosophila* élettartamát, emelte a mangán tartalmú SOD expresszióját (Kang et al., 2002), ill. egyéb antioxidáns enzimek és chaperone proteinek expresszióját.

HDAC inhibitorok acetilálják a Sp1 transzkripciós faktort, amely az oxidatív stressz elleni rezisztenciában játszik szerepet (Ryu et al., 2003), de befolyásolják a mitokondrium működésének a szabályozását is.

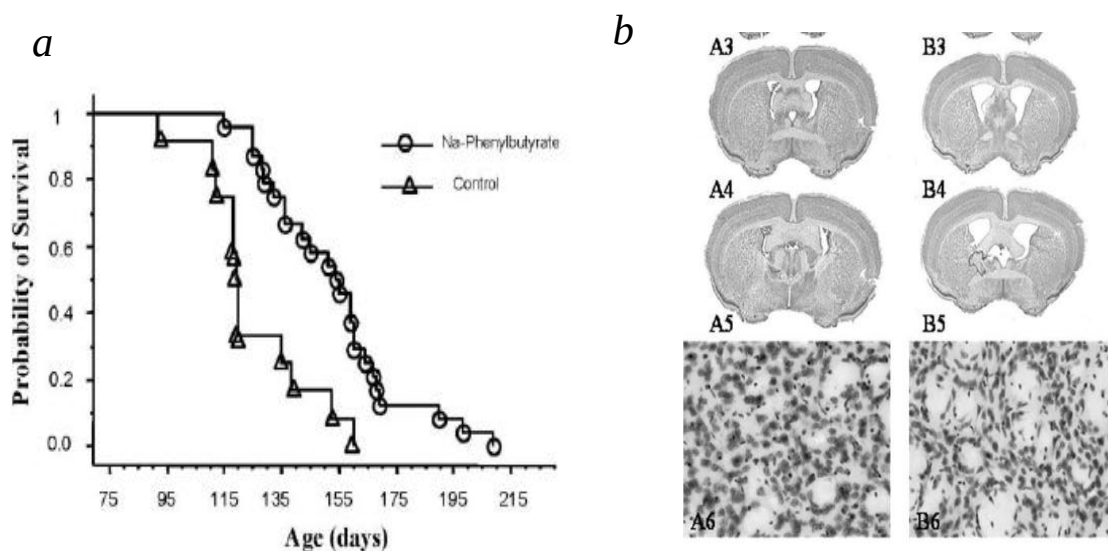
Ezek a szerek gátolják a gyulladásos folyamatok kialakulását is azáltal, hogy

csökkentik a citokinek termelődését. Az egyik első generációs inhibitor a SAHA adagolása dózis-dependens módon csökkentette a lipopolyszaharid indukálta TNF- α , IL-1 β , IL-6 és az IFN- γ szinteket (Leoni et al., 2002).

Az ugyancsak HDAC gátló Na-butyrate szignifikánsan csökkentette a 3-NP okozta striatális sejtpusztulást (Ryu et al., 2003).

Fenilbutirát hatása Huntington kór modelljére

Ezen előzmények alapján munkánk során arra kerestük a választ, hogy a jól ismert, vér agy gáton jól penetráló HDAC inhibitor, a fenilbutirát, hogyan hat a transzgenikus Huntington egértörzs túlélésére, ill. motoros teljesítményére. Korábbi adatok azt igazolták, hogy ha HDAC gátlást preszimptomatikusan kezdik el, akkor nő az állatok túlélése. Azonban ez csak preszimptomatikus hordozó betegeknél jelenthet terápiás alternatívát, a már kifejlődött kórkép esetén ez a hatás nem elegendő. Mi úgy találtuk, hogy az állatok 75 napos korában elkezdett adagolás is szignifikánsan növelte a túlélést (jobban, mint más támadáspontú szerek), de nem javította a motoros teljesítményt, ill. nem gátolta meg az oly jellemző súlyvesztést (31. ábra). Azonban, mivel ez egy fatális kórkép, ennek jelentősége sem elhanyagolható.



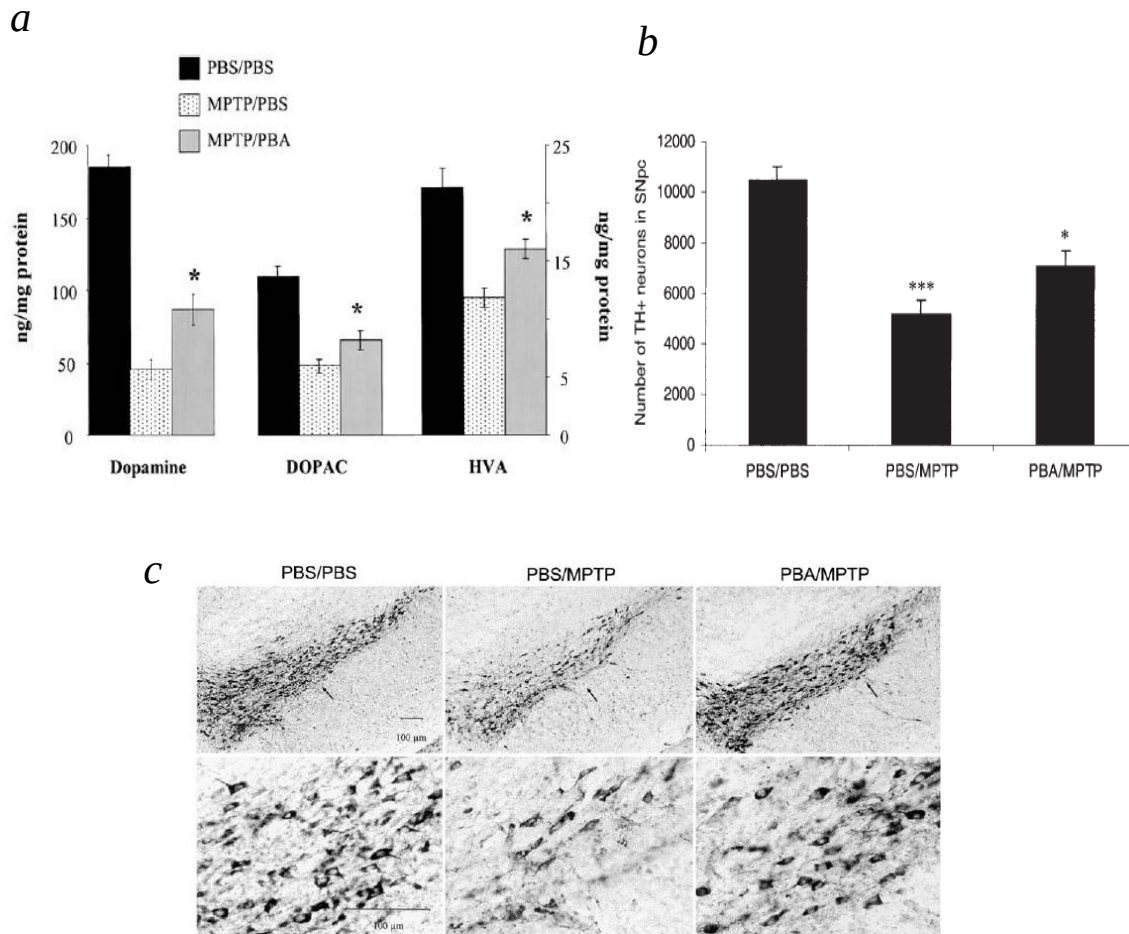
31. ábra. Fenilbutirát hatása transzgenikus Huntington modellben.

a Kaplan-Meier féle túlélési görbe ($p < 0,0001$).

b Neuropathológia metszetek az agykamrák megnagyobbodására, ill. Nissl festés a sejtek atrófiájára (jobb oldal kezeletlen, bal oldal fenilbutirat kezelt állatok).

Fenilbutirát hatása Parkinson kór modelljére

A fenilbutirát ugyancsak hatásos volt az MPTP okozta dopaminerg sejtpusztulás kivédésében, amit substantia nigra túlélő TH pozitív sejteinek számával, ill. a striatum dopamin szintjével mértünk (32. ábra).



32. ábra. A fenilbutirát hatása az MPTP toxicitásra.

- a* A dopamin és metabolitjainak szintje. Átlag±SEM. * $p < 0,05$ az MPTP csoporthoz képest.
- b* A TH pozitív neuronok száma a substantia nigra pars compactában. $n=5$ ill. 9-9. * $p < 0,05$ az MPTP kontrollhoz képest, *** $p < 0,001$ a PBS kontrollhoz képest.
- c* reprezentatív metszetek.

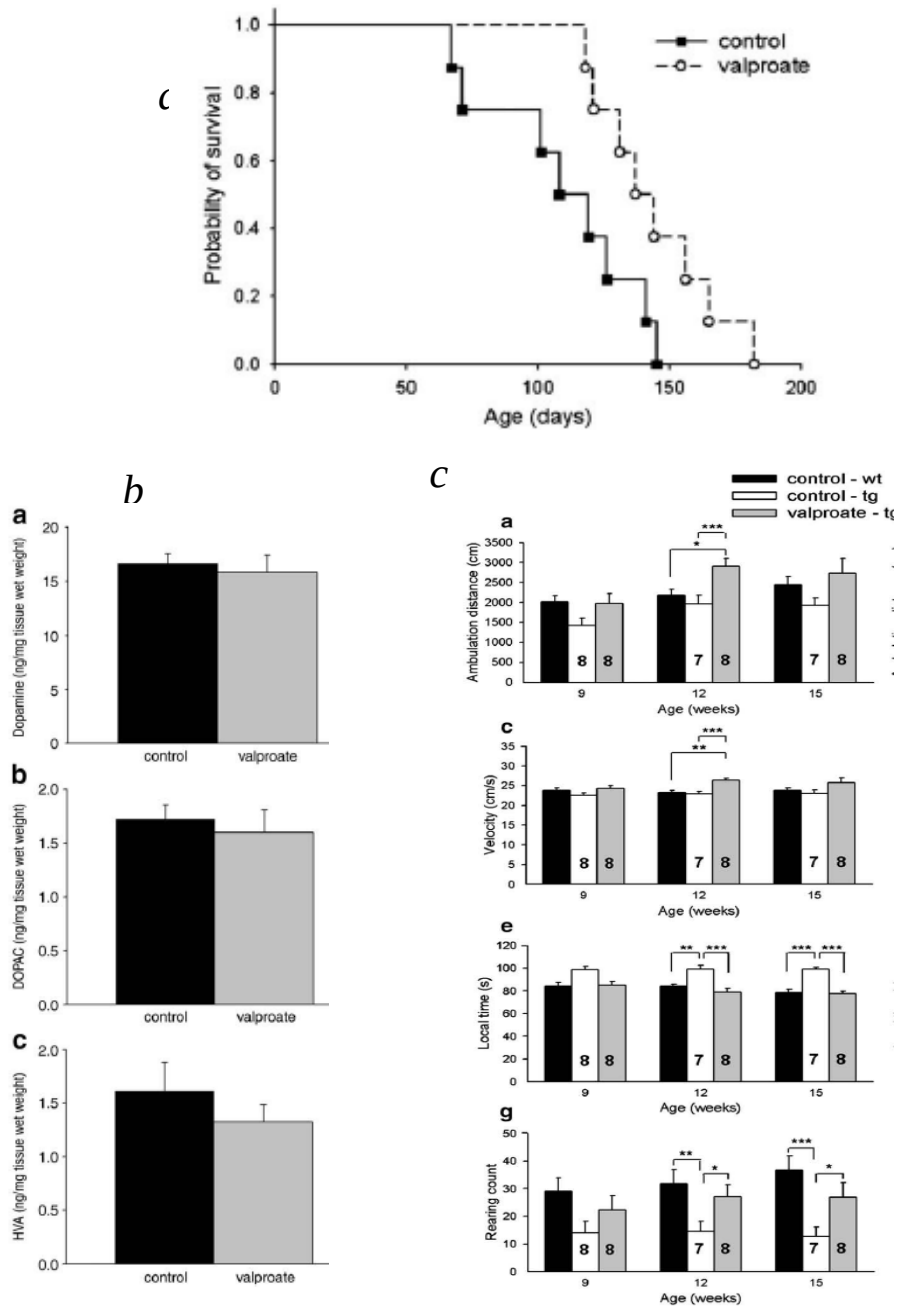
Valproát hatása Huntington kór modelljére

A valproát (2-propilpentanoic sav) széles körben alkalmazott gyógyszer. Ismert hatásmechanizmusa összetett: emeli a GABA szintet az agyban (Taberner et al., 1980) a GABA-transzamináz aktivitáscsökkentésén, ill. a glutamat dekarboxiláz aktivitás fokozásán át (Löschner, 1981a, b); csökkenti az NMDA-kiváltotta depolarizációt (Zeise et al., 1991), valamint HDAC gátló hatással is rendelkezik (1. csoportú HDAC-t gátol szelektíven) (Johannessen et al., 2003). Korábban igazolták a valproát protektív hatását Huntington kór malonát modelljében (Morland et al., 2004).

A mi vizsgálatunkban a valproátot 100mg/kg dózisban adtuk hetente 5 napon át a N171-82Q transzgenikus Huntington egereknek intraperitoneálisan. Azt tapasztaltuk, hogy ez a kezelési rezsim szignifikánsan javította az állatok túlélését és motoros teljesítményét, anélkül, hogy a dopaminerg rendszert károsította volna, hiszen az állatok striátumában a dopamin és metabolitjainak szintje nem különbözött a kontroll csoportétól (33. ábra). Ezt azért tartottuk fontosnak megvizsgálni, mivel korábbi adataink arra utaltak, hogy a valproát magasabb dózisa dopaminerg toxicitással rendelkeznek.

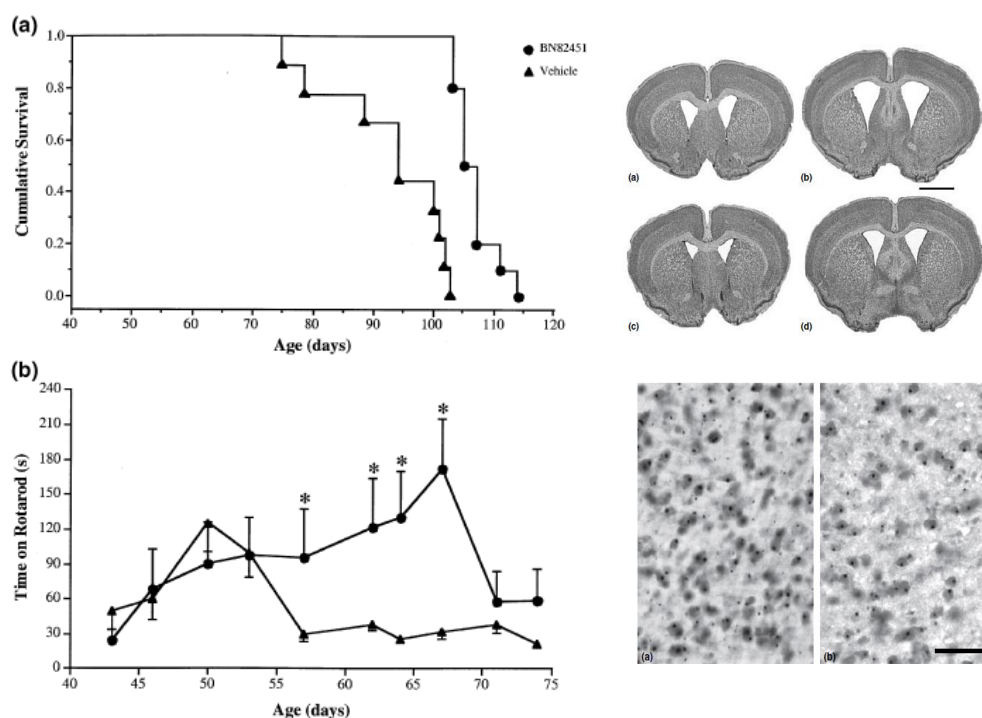
Antioxidáns hatású molekulák tesztelése**BN82451 hibrid molekula hatása Huntington kór modelljében**

A neuroprotektív szerek vizsgálata során egyértelművé vált, hogy a neurodegenerációt nem egyetlen útvonal aktiválódása vagy gátlása idézi elő, hanem sokkal inkább egymással szorosan összefüggő patológias folyamatok összessége. Ezen felismerés mentén kezdődött az ún. kis molekulású, multifunkcionális vagy hibrid molekulák kifejlesztése. Ezek sorába tartozik a BN82451 is, amely orálisan is aktív, vér-agy-gáton jól penetráló antioxidáns és antinflammatorikus hatással rendelkező molekula. Gyulladáscsökkentő hatása a COX-2 gátlása révén alakul ki, ezen kívül gátolja a Na^+ csatornákat is. Ezzel a hibrid molekulával való kezelés szignifikánsan javította a túlélést, ill. a motoros teljesítményt az R6/2 Huntington kóros egértörzsben (34. ábra). A kezelés ugyancsak csökkentette az agy atrophiját, valamint a huntington pozitív zárványok számát, de nem tudta kivédeni a progresszív súlyvesztést.



33. ábra. A valproát hatása transzgenikus Huntington modellben

- a* Kaplan-Meier féle túlélési görbe.
- b* A dopamin és metabolit szintjeinek változása Tg Huntington és kontroll egerekben. Átlag $\pm$ SEM.
- c* A magatartási paraméterek változása. n=8; átlag $\pm$ SEM; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).



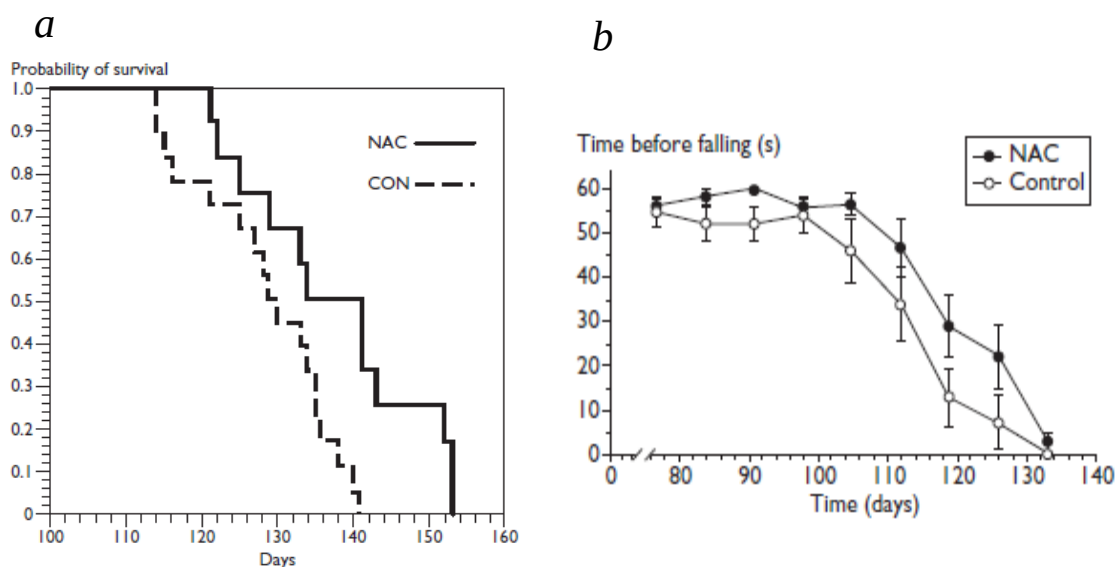
34. ábra. A BN82451 hatása transzgenikus Huntington modellben.

- a* Kaplan-Meier féle túlélési görbe
- b* A rotarod teljesítmény változása R6/2 egerekben.
- c* Az intranukleáris zárványok száma kezeletlen (a) és kezelt (b) állatok agykérgében 10 hetes korban.
- d* Az oldalkamra mérete kezelt (a/c) és kezeletlen (b/d)

N-acetil-L-cisztein hatása ALS modellben

Az antioxidáns védekezésben fontos szerepet tölt be a glutathion azáltal, hogy detoxifikálja a hidrogén peroxidot, a lipid peroxidokat, valamint különböző elektrofil molekulákat, pl. redox-aktív fém ionokat. Az endogén glutathion szint emelhető a szintézis lépés-meghatározó prekursorának az L-ciszteinnek az adagolásával. Az N-acetil-L-cisztein egy vízdékony, orálisan is hatékony, jól tolerálható, széles körben alkalmazott nyákdó. Orálisan alkalmazva gyorsan emeli a plazma glutathion szintjét (Holdiness et al., 1991, Burgunder et al., 1989). NAC kezelés sejt kultúrában fokozza a neuronok viabilitását apoptózis, ill. SOD1 gátlás során (Rothstein et al., 1994, Mayer et al., 1994). ezek alapján kezdtük el vizsgálni a NAC hatását ALS SOD1 transzgenikus modelljében. Az tapasztaltuk, hogy ez az ivóvizükben alkalmazott NAC kezelés (2mg/kg dózisban) szignifikánsan javította az egerek túlélését és motoros

teljesítményét, míg a súlyvesztésüket nem befolyásolta (35. ábra). A túlélésre gyakorolt hatása nagyjából megfelel a fém kelátorokkal elért eredményeknek (amelyek szintén antioxidáns hatásúak) (Hottinger et al., 1997, Nagano et al., 1999).



35. ábra. Az N-acetil-cisztin hatása transzgenikus ALS modellben

- a* Kaplan-Meier féle túlélési görbe,
b A rotarod teljesítmény változása FALS egerekben. n=12/csoport, ill. n=18 a túlélés kontrollcsoportjában.

Ez az eredmény összhangban van egy korábbi megfigyeléssel, hogy a hasonló dózisú NAC kezelés alsó motoneuron betegség modelljében szintén csökkentette a sejtpusztulást, valamint emelte a glutatyon peroxidáz szintet (Henderson et al., 1996).

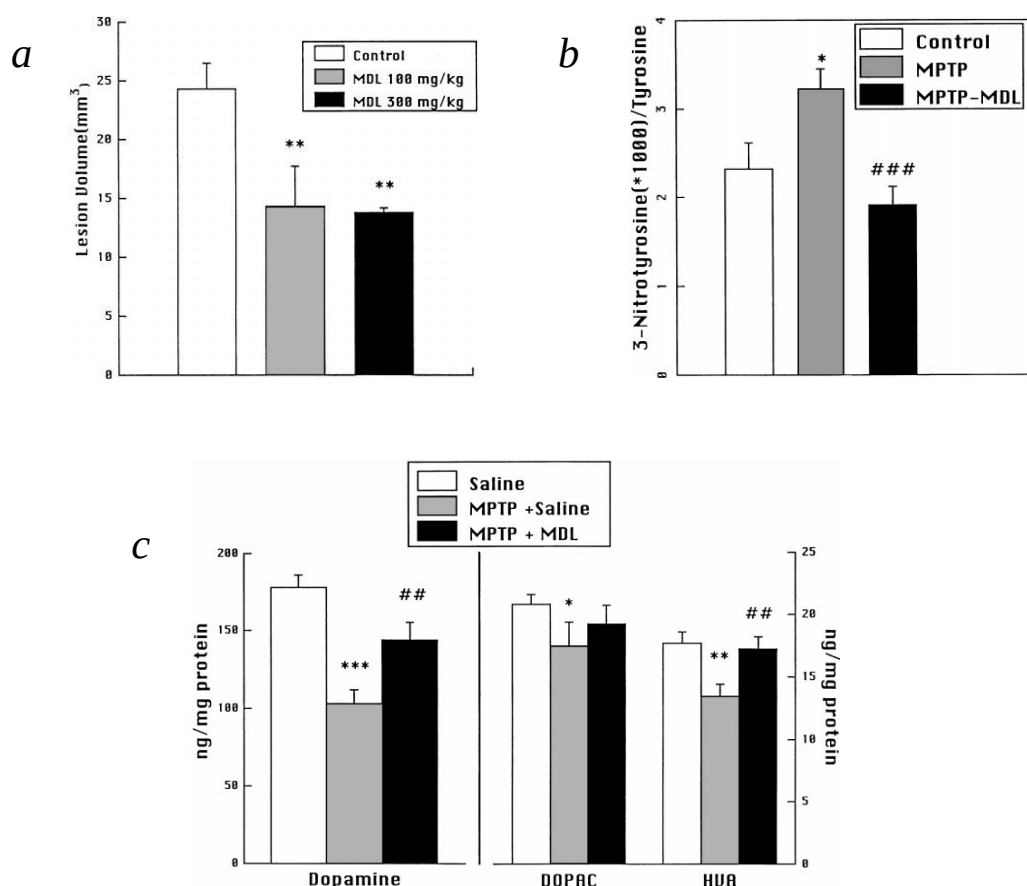
Adatainknak ellentmond annak a randomizált, kettős-vak vizsgálatnak az eredménye, amely nem sokkal magasabb dózisban sem igazolt klinikai hatást bulbáris formában, csak szkeletális formában, de ott sem érte el a szignifikancia szintet (Louwerse et al., 1995). A kissé ellentmondásos adatok ellenére egy nagyobb klinikai vizsgálat indítása még magasabb dózisokkal, ill. kombinációs formában megfontolandó lehet.

A szabadgyök csapdák (spin trap) hatása MPTP, 3NP és malonát toxicitásra

Mivel a fokozott szabadgyök-képződés az összes neurodegenerációhoz vezető patológiai folyamatban részt vesz, így olyan molekulák tervezése került előtérbe, amely különösen nagy affinitással képes megkötni a különböző reaktív oxigén és nitrogén gyököket. A szabadgyök csapdáknak az alapvegyülete N-tert-butyl-a-(2-sulfophenyl)-nitron (S-PBN), amely dózis dependens módon csökkenti a malonát és az alacsony dózisu MPTP toxicitását (Schulz és Beal, 1995). Ennek a molekulának a szubsztituálatlan ciklikus módosítása (**MDL 101 002**) 8-szor potensebb lipid peroxidáció csökkentő és 25-ször hatékonyabb hiroxilgyök-fogó (Thomas et al., 1996).

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a szabadgyök csapdák protektív hatásúak, glutamát és NMDA toxicitással (Yue et al., 1992), ill. az öregedés során jelentkező oxidatív fehérje károsodással (Butterfield et al., 1997, Carney et al., 1991, Edamatsu et al., 1995, Sack et al., 1996), reperfüziós károsodással (Oliver et al., 1990, Phillis et al., 1990, Yue et al., 1992) ill. artériás elzáródással szemben (Cao et al., 1994, Zhao et al., 1994).

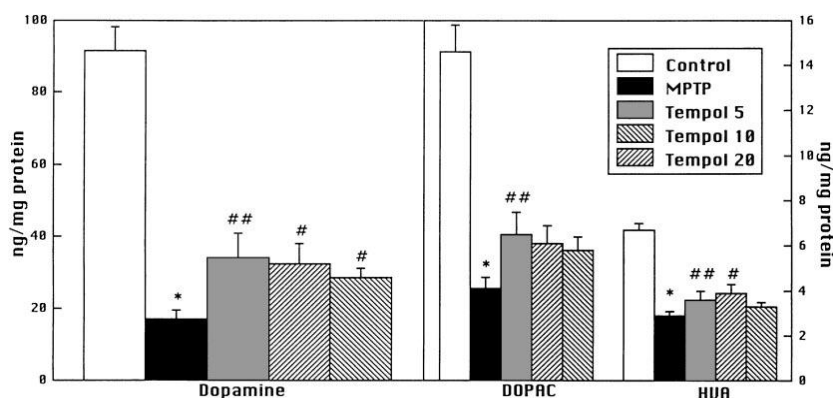
Az MDL 101 002 adagolása szignifikánsan csökkentette a malonát indukálta striatális sejtpusztulást (amit a malonát okozta lézió volumenjével mértünk), ill. az MPTP okozta dopamin depléciót. Ez azonban csak alacsonyabb dózisban használható (100mg/kg), mivel a nagyobb dózis toxikus volt (300mg/kg). Mindemellett a protekció mértéke sem volt nagyon kifejezett, dopamin depléció esetében csak 14%, amely arra utalhat, hogy maguknak a hiroxil gyököknek csak limitált szerepük lehet a toxicitásban. A peroxinitrit károsodás csökkenését a 3-nitrotirozin szint emelkedésének mérséklése jelentette (36. ábra).



36. ábra. Az MDL 101 002 hatása a malonát és az MPTP neurotoxicitásra.

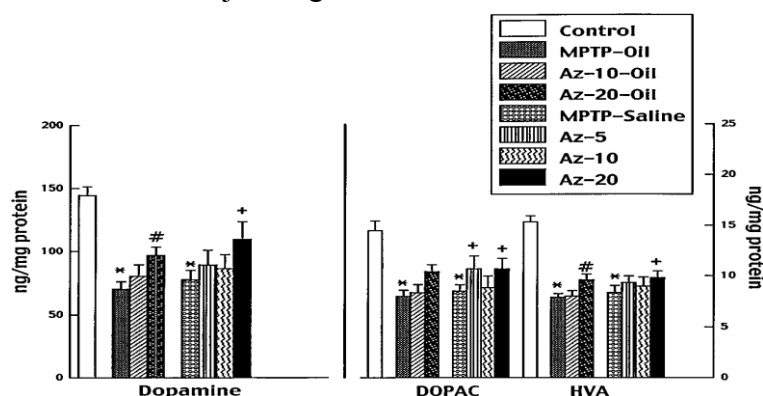
- a* A malonát okozta lézió nagysága. ** $p < 0.01$
- b* A 3-nitrotirozin szint változása 3 órával az MPTP adagolást követően. * $p < 0.05$, a kontroll csoporthoz képest, ### $p < 0.001$ Az MPTP csoporthoz képest.
- c* A dopamin és metabolitjainak szintje. Átlag $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ a kontroll csoporthoz képest; ## $p < 0.01$ Az MPTP csoporthoz képest.

Egy más struktúrájú vegyület a **Tempol** (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl), amely különösen hatékonyan köti meg a peroxinitrit gyököket (Dikalov et al., 1997). A Tempol kezelés (5, 10 ill. 20mg/kg dózisban) kifejezettebb dopamin depléciót (75%) okozó MPTP dózis rezsim mellett mérsékelt de szignifikáns protekciót észleltünk (37. ábra). Dózis-hatás összefüggést nem észleltünk, és toxikus mellékhatásokat magasabb dózisok esetén sem tapasztaltunk.



37. ábra. A Tempol hatása az MPTP okozta neurotoxicitásra. Átlag $\pm$ SEM, * p <0.001 a kontroll csoporthoz képest; # p < 0.05, ## p <0.01 az MPTP csoporthoz képest.

Az **azulenyl** nevű szabadgyök-csapda egy továbbfejlesztett guaiazulene gyűrűs molekula, amely sokkal alacsonyabb oxidációs potenciállal rendelkezik, mint a korábban kifejlesztésre kerül molekulák és struktúrájának köszönhetően sokkal könnyebben penetrál a vér-agy gáton. Vizsgálatunkhoz mind vízőldékony, mind zsíróldékony formáját használtuk. Mind a két molekula dózis-dependens módon csökkentette az MPTP toxicitását, amelyet a striatális dopamin depléción mértékével jellemeztünk (38. ábra). A protektív hatást súlyosabb dopamin depléción (kifejezettebb MPTP toxicitás) mellett észleltük, az alapvegyület csak mérsékelt toxicitásnál észlelhető hatásával szemben, amely arra utal, hogy a molekula továbbfejlesztése javította az antioxidáns tulajdonságát.



38. ábra. Az azulenyl szabadgyökcsapda hatása az MPTP indukálta dopamin depléción. Átlag $\pm$ SEM * p <0.001 a kontrollhoz képest, # p < 0.05 az MPTP csoporthoz képest.

A szabadgyökcsapdák mind in vivo, mind in vitro neuroprotektívek, amelynek mechanizmusa többféle lehet: direkt szabadgyökfogó hatás, metal-independens szuperoxid diszmutáz aktivitás, a fémionok oxidációja, amely meggátolja a Fenton reakciót és nitrogén oxid szintáz aktiválódás gátlása (Krishna et al., 1996, Miyajima et al., 1997, Monti et al., 1996).

Annak ellenére, hogy a fokozott szabadgyök képződés úgy tűnik, kiemelt szerepet játszik a neurodegenerációban, az antioxidáns terápiák ígéretes állatkísérletes eredmények ellenére nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket a humán vizsgálatok során. Ez nem jelenti azt, hogy a szabadgyök okozta károsodás nem játszik szerepet a pathomechanizmusban, inkább jelentheti azt, hogy a rendelkezésre álló szerek nem jutnak el megfelelő koncentrációban a szabadgyök képződés fő helyére a mitokondriumba. Ezért az utóbbi években olyan molekulákat (SS-10 vagy MitoQ) fejlesztettek ki, amelyek sokkal nagyobb koncentrációban halmozódnak fel a mitokondriumban, mint a korábbi szerek (MitoQ esetében 1000-szeresen). A MitoQ-val már sikeresen befejeződött a fázis II vizsgálat. Ezzel egyidejűleg több olyan faktor is ismertté vált, amelyek befolyásolni képesek a mitokondrium működését, és ezáltal új terápiás célponttá válhatnak. Ezek közé tartozik a PGC-1 α , amely fontos szerepet tölt be a mitokondrium működésében. Az ulmi egyetem Neurológiai Klinikájával kollaborációban nemrégiben sikerült PGC-1 α deficiens egértörzs kolóniát alakítanunk ki, így érdeklődésünk erre és a PPAR γ agonisták felé fordult.

Exogen pirimidin (triacetil-uridin) hatása az MPTP és malonát toxicitásra

A pirimidin és derivátumai olyan alapvető biológiai folyamatokban játszanak fontos szerepet, mint pl. DNS és RNS szintézis. Korábban közölték, hogy a mitokondrium deficiens Rho⁰ sejtek növekedéséhez uridin szükséges. (King et al., 1989). Az uridin ill. a pirimidin szintézis egyik fontos enzimje a mitokondrium belső membránjában elhelyezkedő dihidroorotate dehidrogenáz enzim. Arról is jelent meg közlemény, hogy a respiratórikus légzési lánc zavara csökkenti ennek az enzimnek az aktivitását, és ezáltal a pirimidin raktárat. (Loffler et al., 1997). Azonban arra vonatkozólag nincs adat, hogy mitokondriális érintettséggel járó betegségekben

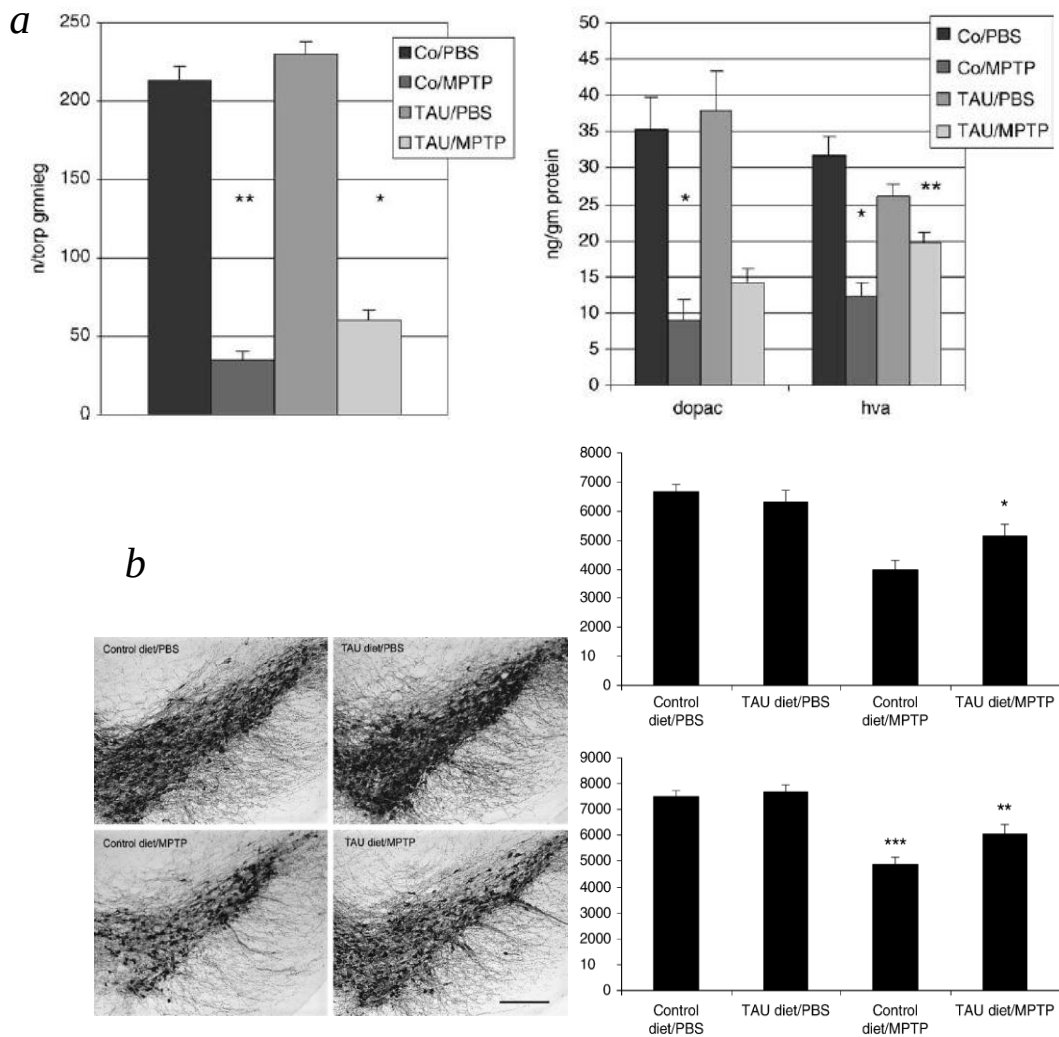
pirimidin deficiencia lenne (Saydoff et al., 2003). Az uridin alkalmazásával javítani lehet a mitokondrium funkcióját és így terápiás alternatívát jelenthet. A triacil uridin jobb orális farmakokinetikai paraméterekkel rendelkezik, mint az uridin. Korábbi tanulmányok már igazolták protektív hatását 3-NP, valamint azid indukálta toxicitás esetében (Saydoff et al., 2001).

Vizsgálatunkhoz rágcsálótápra kevert 6% triacetil-uridint (TAU) használtunk. Azt tapasztaltunk, hogy ez a szer szignifikánsan csökkentette az MPTP indukálta dopamin depleciót (81% a kontroll csoportban, míg 71% a kezelt csoportban), valamint a malonát okozat striatális lézió nagyságát (39. ábra).

Azóta a TAU protektív hatását Huntington kór két transzgenikus modelljében is igazolták (Saydoff et al., 2006). Mivel korábban nem igazoltak pirimidin deficienciát sem a betegségben, sem a modelljeiben, ill. maga a mitokondriális légzési lánc komplex 1 gátlása sem okozza a lépésmeghatározó enzim gátlását, így a protektív hatás más mechanizmussal magyarázható. A TAU orálisan jól felszívódik, majd a keringésben nem specifikus észterázok uridinné alakítják át és specifikus nukleozid transzporterek segítségével jut be az agyba. Nagy dózisú uridin infúziója javítja az agy anyagcseréjét, oxidatív foszforilációját, csökkenti a laktát acidózist, ill. a szuperoxid termelődését. Ezek a mechanizmusok játszhatnak szerepet a kedvező hatásban, de további vizsgálatok szükségesek a mechanizmus tisztázásához.

A nNOS gátlás szerepe a mitokondriális toxinok okozta sejtpusztulásra

Korábbi adatok alapján a nNOS gátlása protektív hatású mitokondriális toxinokkal szemben (Hantraye et al., 1996, Matthews et al., 1997). A hatásosságot befolyásolta, hogy az akkor rendelkezésre álló inhibitorok nem voltak szelektívek (7-nitroindazol, S-metil-tiocitrullin). Ezen felül igazolódott, hogy ezek közül az inhibitorok közül néhány potens MAO-B inhibitor is, amely miatt az MPTP toxicitásban észlelt protektív hatásuk megkérdőjeleződött. Ezért került kifejlesztésre egy nagyon szelektív nNOS inhibitor az ARR17338 (imino-tiofen-2-yl-metil)-(1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolin-7-yl)-amin) jelű szer, amely nem rendelkezik MAO-B inhibitor hatással.

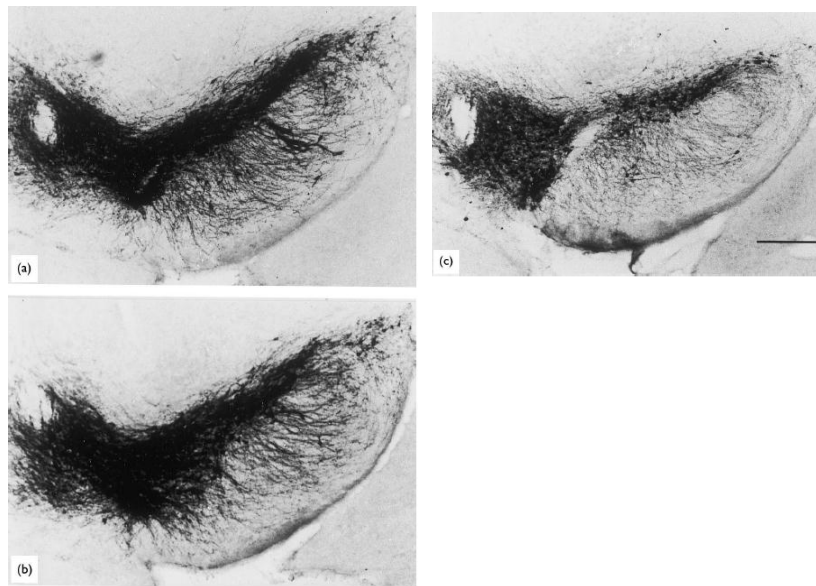
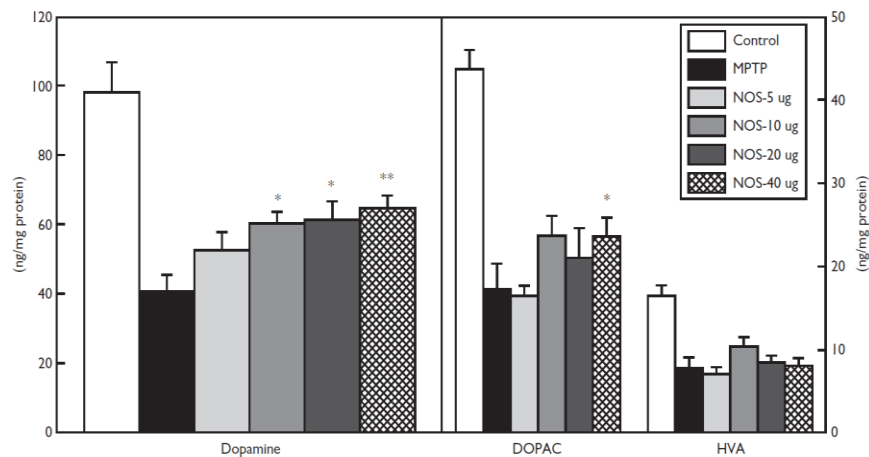


39. ábra. A triaciluridin hatása az MPTP toxicitásra.

- a** A dopamin és metabolitjainak szintje. Átlag $\pm$ SEM* $p < 0.01$ a kontroll csoporthoz képest; ** $p < 0.05$ az MPTP kontroll csoporthoz képest.
- b** A substantia nigra pars compacta TH pozitív valamint Nissl festődésű neuronok száma, ill. reprezentatív metszetei. Átlag $\pm$ SEM* $p < 0.05$ az MPTP kontroll csoporthoz képest; * $p < 0.01$ az MPTP kontroll csoporthoz képest; *** $p < 0.001$, a kontroll csoportokhoz képest.

Ennek a szernek az alkalmazása dózis-dependens módon szignifikánsan csökkentette az MPTP indukálta neuronpusztulást, amelyet a striatális dopamin szint mérésével, valamint a substantia nigra TH pozitív sejteinek számával mértünk (40. ábra). A neuronális NOS gátlása csökkenti a peroxinitrit képződést és ezáltal a

peroxinitrit okozta sejt- és DNA károsodást, azonban nem szelektív NOS gátlás L-nitroargininnel nem eredményezett neuroprotekcíót (Mackenzie et al., 1997). A nNOS gátlás jelentőségét többféle inhibitorral és többféle modellben igazolták (Di Monte et al., 1997). Későbbiekben kiderült, hogy általában a fokozott szabadgyök képződés és ezen belül a peroxinitrit károsítás a neurodegenerációban csak részlegesen tehető felelőssé, így ennek a mechanizmusnak a gátlása nem jutott el a klinikai kipróbálásig.



40. ábra. A nNOS gátlás hatása az MPTP toxicitásra.

A dopamin és metabolitjainak szintje. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ az MPTP kontroll csoporthoz képest.

Reprezentatív metszet a substantia nigra pars compacta-ból. Kontroll csoport (a), kezelt csoport (b), MPTP kontroll (c).

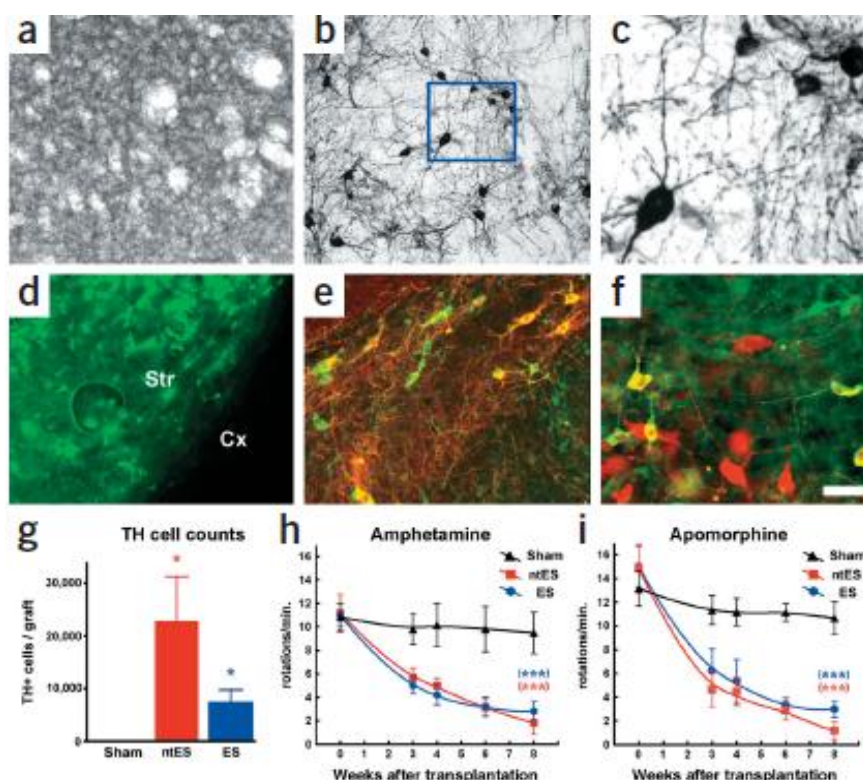
Embrionális őssejt transzplantációval elérhető eredmények Parkinson kór modelljében

Az orvosi kutatásban évtizedekkel korábban felmerült annak igénye, hogy az elpusztult, vagy károsodott sejteket új sejtekkel helyettesítsék (regeneratív medicina). Ennek a regeneratív mechanizmusnak az egyik kiinduló pontja az őssejt. A fejlődést sokáig az gátolta, hogy nem lehetett ezeket a pluripotens sejteket a kívánt sejtvonal irányába differenciáltatni. Később kidolgozásra kerültek olyan in vitro rendszerek, amelyekkel megfelelő irányú differenciálódás érhető el (Kawasaki et al., 2000, Lee et al., 2000, Brustle et al., 1999), azonban nem lehetett minden neurontípus kifejlődését elérni, és annak eredményessége is nagy variabilitást mutatott (Okabe et al., 1996, Wakayama et al., 2001). Ezért Lorenz Studer vezetésével a New York-i Memorial Sloan-Kettering Cancer Centerben különböző faktorok alkalmazásával olyan rendszert dolgoztak ki, amely alkalmas volt neuronális irányú differenciálódásra és azon túl dopaminerg, serotonerg, kolinerg és GABAerg idegsejteké váló átalakulásra. Ebben a munkában én az in vivo kísérleteket végeztem, amely során a fenti módszerrel nyert őssejteket a Parkinson kór 6-OHDA modelljében teszteltük. A 6-OHDA intracerebro-ventrikuláris adagolás után egyoldali striatális sejtpusztulást okoz, amely rotációs mozgást eredményez. Az állatok egy idő után ezt kompenzálják és alaphelyzetben nem észlelhető magatartásváltozás. Azonban amfetamin hatására ez a rotációs mozgás ismételtelen megjelenik. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a jelentős mértékben dopaminerg irányba differenciálódott embrionális őssejt transzplantáció mennyire képes kivédeni ezt a rotációs mozgást (vagyis mennyire integrálódnak és funkcionálnak a beültetett sejtek).

8 héttel a 6-OHDA egyoldali adagolása után a középagy dopaminerg sejtjeinek $69.4\% \pm 7.6\%$ -a pusztult el. 10^5 differenciáltatott embrionális őssejtet injektáltunk az ipsilaterális striatumba. Szövettani vizsgálat azt mutatta, hogy a transzplantált sejtek a striatum nagy részét kitöltötték és a TH pozitív sejtek legnagyobb sűrűségben a host/graft határon rendeződtek el, anélkül hogy a környező kortikális területekbe bejutottak volna. DAT expressziós vizsgálatok igazolták, hogy a TH pozitív sejtek 70%-a dopaminerg sejt. A sejtek működését amfetamin és az apomorfín indukálta rotációs magatartás vizsgálattal teszteltük (41. ábra). A transzplantált állatok

mindegyike legalább 70%-kal kevesebbet forgott az áloperált kontroll csoporthoz képest. Ebben a munkában igazoltuk, hogy a munkacsoport által kifejlesztett új technológiával gyorsabban és hatékonyabban lehet neuronális differenciálódást elérni, sőt meghatározott neuron populációkat is ki lehet tenyészteni. Azon túl, hogy az őssejtek neuronális irányba differenciálhatók, ezek a sejtek mind morfológiailag, mind funkcionálisan, képesek átvenni az elpusztult neuronok helyét, amelyet *in vivo* is igazoltunk. Ráadásul ezzel a módszerrel a transzplantált neuronok túlélési aránya 8 hét elteltével megduplázódott (40%-ról 80%-ra).

Ez a munka volt az első, amely a központi idegrendszerben, nukleáris transzfer módszerrel előállított embrionális őssejtek terápiás effektusát *in vivo* kimutatta. Azonban, mint később kiderült, a differenciálatlan alakok teljes eltávolítása kritikus, mivel a differenciálatlanul maradt sejtekből előbb utóbb daganat képződik, legtöbbször teratoma.



41. ábra. Az embrionális őssejt transzplantáció *in vivo* eredményei.

TH immunhisztológia: a kontralateralis oldal; b transzplantált oldal, c nagyobb nagyítás a transzplantátumból; d a transzplantált sejtek csak a striatumban maradtak és nem jutottak át a kortexbe; e,f kettős immunfestés: zöld TH, piros DAT/AADC kolokalizált a legtöbb neuronban; g a túlélő TH pozitív neuronok száma (átlag $\pm$ SEM, $p < 0,05$); h,i amfetamin és apomorfín és indukálta rotációs mozgás száma (átlag $\pm$ SEM, $p < 0,001$). Lépték (f képen): 100 μ m (a, b, d); 50 μ m (e, f), 25 μ m (c).

dc_202_11

szerek	túlélés (nap; átlag ± SEM)	Túlélés %-ban	p érték
kontroll	109.8 ± 9.7	31.4%	0.034
Valproát	144.3 ± 7.9		
kontroll	111.3 ± 6.6	30.7%	0.016
KYNA analóg	145.5 ± 12.0		
kontroll	111.3 ± 6.6	4.4%	0.985
L-KYN	116.2 ± 4.4		
kontroll	122.5 ± 5.4	9.6%	0.134
L-carnozin	134.2 ± 6.2		
kontroll	117.1 ± 8.0	-6.3%	0.845
Pioglitazon	109.7 ± 9.7		
kontroll	124.8 ± 8.2	10.5%	0.362
BZS1514	137.9 ± 9.4		
kontroll	127,4 ± 11.7	20.5%	<0.05
Remacemid/ Koenzim Q10	153,3±13,7		
kontroll	129.5±2.1	8,2%	<0,001
liponsav	140.3±5.2		
kontroll	127.1±3.0	9,8%	<0,01
dikloroacetat	139.5 ± 3.7		
kontroll	131,5±1,8	19%	<0,001
2% kreatin	156.4 ± 3.9		

7. táblázat. Néhány általunk tesztelt, ill. az irodalomban közölt anyag hatása transzgenikus Huntington modellben.

Új megállapítások

1. Igazoltuk a kinurenin útvonal részvételét és a fokozott szabadgyök képződést több neurológiai kórképben (sclerosis multiplex, Parkinson kór, dystonia, Leber betegség).
2. Kimutattuk, hogy a mitokondriális toxinoknak az idegrendszer különböző részeiben eltérő hatásuk van az agyi aminosav, ill. az E vitamin szintekre.
3. Indirekt módon igazoltuk, hogy az α -synucleinnek fontos szerepe van a neuronpusztulásban.
4. Számos különféle hatásmechanizmusú szer neuroprotektív hatást igazoltuk in vivo (antioxidáns hatású molekulák, mitokondriális támadáspontú szerek, kinurénsav analóg, HDAC inhibitorok, nNOS gátló, pirimidin származék).
5. Kimutattuk, hogy az antioxidáns védekezésben részt vevő enzimek hiánya (MnSOD, GSHPx) fokozottan érzékennyé teszi a sejteket az exogén toxikus ágensekkel szemben, ezzel szemben bizonyos enzimrendszerek (PLA₂, kaszpáz 1) genetikai kiiktatása neuroprotektív hatású.
6. Azt is igazoltuk, hogy a humán betegséget okozó gének mutációi (HD, ALS) fokozott szabadgyök képződést eredményeznek in vivo egerekben.
7. Demonstráltuk, hogy megfelelő technikával dopaminerg irányba differenciáltatott embrionális őssejtek képesek integrálódni és működni egérmodellben in vivo.
8. Kimutattuk in vivo, hogy Huntington kór modelljében a neuronális markerként ismert NAA szintje sejtpusztulás nélkül is csökken, valamint azt, hogy alapvető anyagcsere-folyamatok megváltoznak.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is kifejezem köszönetemet Vécsei László akadémikusnak, tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki tudományos munkámat elindította, azt messzemenően támogatta és emberfeletti erővel folyamatosan munkára serkentett. Ugyancsak legalább ekkora hálával tartozom Flint M. Beal Professzornak is, akitől a céltudatos munkát, és a tudomány iránti határtalan tiszteletet sajátíthattam el. Munkám javarésze kollaborációban történt, ennek megfelelően köszönettel tartozom az Szegedi Tudományegyetem Gyermekgyógyászati Klinika és Gyermekegészségügyi Központ, az Orvosi Vegytani, Gyógyszerkémiai, Biokémiai Intézetek, ill. az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék munkatársainak, valamint az SZBK Enzimológiai Intézetben Óvádi Juditnak és munkatársainak, valamint Kovács G. Gábornak (Medical University of Vienna), akik a neurodegeneráció tanulmányozása iránti lelkesedésemet osztották. Köszönöm kollégáimnak is a segítséget, nemcsak azoknak, akikkel közös tudományos munkát végeztem, hanem azoknak is, akik ez idő alatt helyettem dolgoztak a betegellátásban.

Nem utolsó sorban feleségemnek tartozom köszönettel, aki mindezt elszenvedte és mindvégig támogatott, valamint gyermekeimnek, akik leggyakrabban a számítógép előtt ülve találtak.

Tudományos munkámat édesapámnak emlékének szentelem, aki éppen csak azt érthette meg, hogy elkezdtem az orvosegyetemet.

A disszertációt megalapozó tudományos munkák jegyzéke

PhD fokozat megszerzését megelőző eredeti közlemények:

1. **Klivenyi P**, Kekesi K, Juhasz G, Vecsei L: Amino acid concentrations in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 95:96-98, 1997.
2. **Klivenyi P**, Wermer M, Matthews RT, Beal MF: Azulenyl, a nitron spin trap protects against MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol* 152:163-166, 1998.
3. **Klivenyi P**, Beal MF, Ferrante RJ, Andreassen OA, Wermer M, Chin MR, Bonventre JV: Mice deficient in group IV cytosolic phospholipase A₂ are resistant to MPTP neurotoxicity. *J Neurochem* 71:2634-2637, 1998.
4. Bogdanov MB, Ferrante RJ, Kuemmerle S, **Klivenyi P**, Beal MF: Increased vulnerability to 3-nitropropionic acid in an animal model of Huntington's disease. *J Neurochem* 71: 2642-644, 1998.
5. **Klivenyi P**, St Clair D, Wermer M, Yen HC, Oberley T, Yang L, Beal MF: Manganese superoxide dismutase overexpression attenuates MPTP toxicity. *Neurobiol Dis* 5:253-58, 1998.
6. **Klivenyi P**, Andreassen O, Ferrante RJ, Schleicher JR Jr, Friedlander RM, Beal MF: transgenic mice expressing a dominant negative mutant interleukin-1 β converting enzyme show resistance to MPTP neurotoxicity. *Neuroreport* 10:635-638, 1999.
7. **Klivenyi P**, Ferrante RJ, Matthews RT, Bogdanov MB, Klein AM, Andreassen OA, Mueller G, Wermer M, Kaddurah-Daouk R, Beal MF: Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Med* 5:347-350, 1999.
8. Matthews RT, Ferrante RJ, **Klivenyi P**, Yang L, Klein AM, Mueller G, Kaddurah-Daouk R, Beal MF: Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol* 157:142-149, 1999.
9. Matthews RT, **Klivenyi P**, Mueller G, Yang L, Wermer M, Thomas CE, Beal MF: Novel free radical spin traps protect against malonate and MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol* 157:120-126, 1999.
10. Karg E, **Klivenyi P**, Németh I, Bencsik K, Pintér S, Vecsei L: Nonenzymatic antioxidants of blood in multiple sclerosis. *J Neurol* 246:533-539, 1999.
11. **Klivenyi P**, Andreassen OA, Ferrante RJ, Dedeoglu A, Mueller G, Lancelot E, Bogdanov M, Andersen JK, Jiang D, Beal MF: Mice deficient in cellular glutathione

peroxidase show increased vulnerability to malonate, 3-nitropropionic acid, and 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. J Neurosci 20:1-7, 2000.

A PhD fokozat megszerzést követő eredeti közlemények:

12. Andreassen OA, Ferrante RJ, **Klivenyi P**, Klein A, Epstein CJ, Beal MF: Partial deficiency of manganese superoxide dismutase exacerbates a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 47:447-455, 2000.
13. Jenkins BG, **Klivenyi P**, Kuestermann E, Andreassen OA, Ferrante RJ, Rosen BR, Beal MF: Nonlinear decrease over time in N-acetyl-aspartate levels in the absence of neuronal loss and increases in glutamine and glucose in transgenic Huntington's disease mice. J Neurochem 74, 2108-2119, 2000.
14. **Klivenyi P**, Andreassen OA, Ferrante RJ, Lancelot E, Reif D, Beal MF: Inhibition of neuronal nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity. Neuroreport 11:1265-1268, 2000.
15. Andreassen OA, Ferrante RJ, Hughes, DB, **Klivenyi P**, Alpaslan D, Ona, VO, Friedlander RM, Beal MF: Malonate and 3-nitropropionic acid neurotoxicity are reduced in transgenic mice expressing a caspase-1 dominant-negative mutant. J Neurochem 75:847-852, 2000.
16. Andreassen OA, Dedeoglu A, **Klivenyi P**, Beal MF, Bush AI: N-acetyl-L-cysteine improves survival and preserves motor performance in an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Neuroreport 11:2491-2493, 2000.
17. Andreassen OA, Ferrante RJ, Dedeoglu A, Albers DW, **Klivenyi P**, Carlson EJ, Epstein CJ, Beal MF: Mice with a partial deficiency of manganese superoxide dismutase show increased vulnerability to the mitochondrial toxins malonate, 3-nitropropionic acid, and MPTP. Exp Neurol 167:189-195, 2001.
18. **Klivenyi P**, Karg E, Rozsa Cs, Horvath R, Komoly S, Nemeth I, Vecsei L.: Non-enzymatic antioxidants of blood in patients with Leber's hereditary optic neuropathy and asymptomatic carriers of 11778 mtDNA mutation. J Neurol Neurosurg Psych 70:359-362, 2001.
19. Vecsei L, Tajti J, **Klivenyi P**, Pinter S, Karg E: Sodium azide treatment decreases striatal and cortical concentrations of alpha-tocopherol in rats. J Neural Transm 108:273-278, 2001.
20. Andreassen OA, Ferrante RJ, **Klivenyi P**, Klein AM, Dedeoglu A, Albers DS, Kowall NW, Beal MF: Transgenic ALS Mice Show Increased Vulnerability to the Mitochondrial Toxins MPTP and 3-Nitropropionic Acid. Exp Neurol 168:356-363, 2001.

21. **Klivenyi P**, Ferrante RJ, Gardian G, Browne S, Chabrier P, Beal MF: Increased survival and neuroprotective effects of BN82451 in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 86:267-272, 2003.
22. Barberi T, **Klivenyi P**, Callingasan N, Lee H, Kawamoto H, Loonam K, Perrier A, Bruses J, Rubio M, Topf N, Tabar V, Harrison N, Beal MF, Moore M, Studer L: Specification of Neural Subtypes from Fertilization and Nuclear Transfer ES Cells and Therapeutic Application in Parkinsonian Mice. *Nat Biotechnol* 21:1200-1207, 2003.
23. Karg E, **Klivenyi P**, Bencsik K, Turi S, Vecsei L.: Alpha-Tocopherol and NADPH in the Erythrocytes and Plasma of Multiple Sclerosis Patients. Effect of Interferon-beta-1b Treatment. *Eur Neurol* 50:215-219, 2003.
24. **Klivenyi P**, Gardian G, Calingasan NY, Yang L, Beal MF: Additive Neuroprotective Effects of Creatine and a Cyclooxygenase 2 Inhibitor Against Dopamine Depletion in the 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP) Mouse Model of Parkinson's Disease. *J Mol Neurosci* 21:191-198, 2003.
25. **Klivenyi P**, Kiaei M, Gardian G, Calingasan N, Beal MF: Additive neuroprotective effects of creatine and cyclooxygenase 2 inhibitors in a transgenic mouse model of ALS. *J Neurochem* 88:576-582, 2004.
26. **Klivenyi P**, Starkov AA, Calingasan NY, Gardian G, Browne SE, Yang L, Bubber P, Gibson GE, Patel MS, Beal MF: Mice deficient in dihydrolipoamide dehydrogenase show increased vulnerability to MPTP, malonate and 3-nitropropionic acid neurotoxicity. *J Neurochem* 88:1352-1360, 2004.
27. **Klivenyi P**, Calingasan N, Starkov A, Stavrovskaya IG, Kristal B, Yang L, Wieringa B, Beal MF: Neuroprotective mechanisms of creatine occur in the absence of mitochondrial creatine kinase. *Neurobiol Dis* 15:610-617, 2004.
28. Gardian G, Yang L, Cleren C, Calingasan NY, **Klivenyi P**, Beal MF.: Neuroprotective Effects of Phenylbutyrate Against MPTP Neurotoxicity. *Neuromolecular Med* 5:235-242, 2004.
29. **Klivenyi P**, Gardian G, Calingasan NY, Yang L, Borstel R, Saydoff J, Browne SE, Beal MF: Neuroprotective effects of oral administration of triacetyluridine against MPTP neurotoxicity. *Neuromol Med* 6:87-92, 2004.
30. Gardian G, Browne SE, Choi DK, **Klivenyi P**, Gregorio J, Kubilus JK, Ryu H, Langley B, Ratan RR, Ferrante RJ, Beal MF. Neuroprotective Effects of Phenylbutyrate in the N171-82Q Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. *J Biol Chem* 280:556-563, 2005.
31. Hartai Zs, **Klivenyi P**, Janaky T, Penke B, Dux L, Vecsei L: Kynurenine metabolism in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 112:93-96, 2005.

32. Hartai Z, **Klivenyi P**, Janaky T, Penke B, Dux L, Vecsei L: Kynurenine metabolism in plasma and in red blood cells in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 239:31-35, 2005.
33. **Klivenyi P**, Kekesi KA, Hartai Z, Juhasz G, Vecsei L: Effects of mitochondrial toxins on the brain amino acid concentrations. *Neurochem Res* 30:1421-1427, 2005.
34. **Klivenyi P**, Siwek D, Gardian G, Yang L, Starkov A, Cleren C, Ferrante RJ, Kowall NW, Abeliovich A, Beal MF: Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins. *Neurobiol Dis* 21:541-548, 2006.
35. **Klivenyi P**, Bende Z, Hartai Z, Penke Z, Nemeth H, Toldi J, Vecsei L: Behaviour changes in a transgenic model of Huntington's disease. *Behav Brain Res* 169:137-141, 2006.
36. Hartai Z, **Klivenyi P**, Janaky T, Penke B, Dux L, Vecsei L: Peripheral kynurenine metabolism in focal dystonia. *Med Chem* 3:285-288, 2007.
37. Olah J, **Klivenyi P**, Gardian G, Vecsei L, Orosz F, Kovacs GG, Westerhoff HV, Ovadi J Increased glucose metabolism and ATP level in brain tissue of Huntington's disease transgenic mice. *FEBS J* 275:4740-4755, 2008.
38. Vamos E, Voros K, Zadori D, Vecsei L, **Klivenyi P**: Neuroprotective effects of probenecid in a transgenic animal model of Huntington's disease. *J Neural Transm.* 116:1079-1086, 2009.
39. Zadori D, Geisz A, Vamos E, Vecsei L, **Klivenyi P**: Valproate ameliorates the survival and the motor performance in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 94:148-153, 2009.
40. Zadori D, Geisz A, Vamos E, Vecsei L, **Klivenyi P**: Valproate ameliorates the survival and the motor performance in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 94:148-53, 2009.
41. Vamos E, Voros K, Vecsei L, **Klivenyi P**: Neuroprotective effects of L-carnitine in a transgenic animal model of Huntington's disease. *Biomed Pharmacother.* 64:282-6, 2010.
42. Zadori D, Nyiri G, Szonyi A, Szatmari I, Fulop F, Toldi J, Freund TF, Vecsei L, **Klivenyi P**: Neuroprotective effects of a novel kynurenic acid analogue in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neural Transm.* 118:865-75, 2011.

A disszertációhoz kapcsolódó idézhető absztraktok:

1. Andreassen OA, Hughes DB, **Klivenyi P**, Ferrante RJ, Ona VO, Schleicher JR, Friedlander RM, Beal MF: Transgenic mice expressing a dominant negative mutant interleukin-1 beta converting enzyme show resistance to neurotoxins. *J Neurochem* 73: (Suppl.S) S15-S15, 1999

2. Vecsei L, Tajti J, **Klivenyi P**, Pinter S, Karg E: Effects of sodium azide treatment on striatal and cortical concentrations of alpha-tocopherol and glutathione in rats. *Movement Dis* 5(Suppl. 3):13, 2000.
3. Kanyo B, Dibo G, **Klivenyi P**, Argyelan M, Vecsei L, Pavics L: Correlation between clinical appearance of Parkinson's disease and 99mTc-TRODAT uptake values. *Eur J Nucl Med Mol Imag* 31:S369-S370, 2004.
4. **Klivenyi P**, Hartai Zs, Bende Zs, Borbely E, Penke Zs, Toldi J, Vecsei L: Behaviour changes in a transgenic model of Huntington's disease. *Parkinsonism Rel Dis* 11 (Suppl.2), 226, 2005.
5. **Klivenyi P**, Kekesi KA, Hartai Zs, Juhasz G, Vecsei L: Effect of MPTP on the brain amino acid concentrations. *Mov Disord* 21(Suppl.13):S68, 2006.
6. Vamos E, Csati A, **Klivenyi P**, Vecsei L: Effects of valproate on dopaminergic system in mice. *Parkinsonism Rel D* 13: S81-S81, 2007.
7. **Klivenyi, P**; Vamos, E; Vecsei, L: Neuroprotective effect of probenecid in a transgenic model of Huntington's disease. *Movement Dis* 23(Suppl.1): S188, 2008.
8. Csati A, Vamos E, **Klivenyi P**, Vecsei L: Dose dependent effect of valproate on motor activity in mice. *Eur J Neurol* 15:106, 2008.
9. **Klivenyi P**, Zadori D, Fulop F, Toldi J, Vecsei L. Neuroprotective effects of kynurenic acid analog in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Movement Dis* 24: (Suppl. 1), S166-S166, 2009.
10. **Klivenyi P**, Zadori D, Geisz A, Vamos E, Vecsei, L: Valproate increases the survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease *Movement Dis* 25(Suppl. S) :S273-S273, 2010.
11. Plangar I, Zadori D, **Klivenyi P**, Vecsei L: The role of carnosine administration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Eur J Neurol* 17(Suppl3):384-384, 2010.

A disszertációhoz kapcsolódó per-review összefoglalók

1. Vécsei L, **Klivenyi P**: Somatostatin and Alzheimer's disease. *Arch Gerontol Geriatr* 21:35-41, 1995.
2. **Klivenyi P**, Vécsei L: Neurodegeneráció: öregedés és demencia. Elektrontranszport-zavar, mint etiopatogenetikai tényező. Terápiás lehetőségek. *Orvosi Hetilap* 138:331-335, 1997.

3. Gárdián G, **Klivényi P**, Jakab K, Vecsei L: Adatok a Parkinson kór pathomechanizmusához. Hippocrates 2:346-348, 2000.
4. Vámos E, Pardutz A, **Klivényi P**, Toldi J, Vecsei L. The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: possibilities for neuroprotection. J Neurol Sci. 283:21-27, 2009.
5. Rákóczi K, **Klivényi P**, Vecsei L. neuroprotekcio Parkinson kóiban és más neurodegenerative megbetegedésekben: kísérletes és klinikai adatok. Ideggyogy Sz. 30:62:25-34, 2009.
6. Zadori D, **Klivényi P**, Vámos E, Fulop F, Toldi J, Vecsei L: Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies. J Neural Transm. 116:1403-149, 2009.
7. Zadori D, **Klivényi P**, Plangar I, Toldi J, Vecsei L. Endogenous neuroprotection in chronic neurodegenerative disorders: with particular regard to the kynurenines. J Cell Mol Med 15:701-17, 2011.
8. Plangar I, Zadori D, **Klivényi P**, Toldi J, Vecsei L. Targeting the kynurenine pathway-related alterations in Alzheimer's disease: a future therapeutic strategy. J Alzheimers Dis 24 Suppl 2:199-209, 2011.
9. Zadori D, **Klivényi P**, Toldi J, Fulop F, Vecsei L. Kynurenines in Parkinson's disease: therapeutic perspectives. J Neural Transm. in press, 2011.

Rövidítések

3-NP	3-nitropopionsav
3,4 DHBA	3,4 dihidrobenzoesav
4 HBA	4 hidroxibenzoesav
6-OHDA	6-hidroxi dopamin
AD	Alzheimer kór
ALS	amyotrophias lateralsclerosis
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionát
ATP	adenozin trifoszfát
CAG	citozin-adenin-guanozin bázis hármass
Cho	kolinn
CIS	klínikailag izolált szindróma (sclerosis multiplexben)
CSF	liquor
COX	ciklooxygenáz
CRT/Cr	kreatinn
GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
DAT	dopamin transzporter
DOPAC	3,4-dihydroxyphenylacetic acid
GSH	redukált glutation
GSSG	oxidált glutation
GSHPx	glutation peroxidáz
HVA	homovanilinsav
HD	Huntington kór
HDAC	hiszton deaciláz
IL	interleukinn
IT15	interesting transcript 15
KA	kainátt
KAT	kinureninn aminotranszferáz
KGDHC	α -ketoglutarát dehidrogenáz komplex
KYN	kinureninn
KYNA	kinurénsav
LHON	Leber-féle optikus neuropathia
LLRK2	leukine rich repeat kinase 2
MAO-B	monoaminooxidáz B
MDA	malondialdehid
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridinium
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropiridin
MRI	mágneses rezonanciavizsgálat

dc_202_11

NAA	N acetil aszpartát
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid foszfát
NADPH	redukált nikotinamid adenin dinukleotid foszfát
NMDA	N-metil-D-aszpartát
NOS	nitrogénoxid szintáz
PNB	N-tert-butyl-alpha-phenyl nitrone
PCr	foszfokreatin
PD	Parkinson kór
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PGC1 α	PPAR γ koaktivátor 1 α
PINK-1	PTEN-induced putative kinase 1
PLA ₂	foszfolipáz A ₂
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PDHC	piruvát dehidrogenáz komplex
SM	sclerosis multiplex
SOD	szuperoxid diszmutáz
TAU	triacil-uridin
TBA	2-tiobarbiturát
TH	tirozon hirdoxiláz
tg	transzgenikus
TNF	tumor nekrosis faktor

Irodalom

- Alenzi FQ, Lotfy M, Wyse R. Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010;11:271-80.
- Almasy L, Bressman SB, Raymond Det al. Idiopathic torsion dystonia linked to chromosome 8 in two Mennonite families. *Ann Neurol* 1997;42:670-3.
- Almer G, Guegan C, Teismann P, et al. Increased expression of the proinflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol* 2001;49:176–185.
- Almer G, Teismann P, Stevic Z, et al. Increased levels of the proinflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurology* 2002;56, A463.
- Alzheimer's Association, Thies W, Bleiler L. 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 2011;7:208-44.
- Amirkhani A, Rajda C, Arvidsson B, et al., Interferon-beta affects the tryptophan metabolism in multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 2005;12:625-31.
- Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante RJ, et al. Creatine increase survival and delays motor symptoms in a transgenic animal model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2001;8:479–91.
- Andreassen OA, Dedeoglu A, Stanojevic V, et al. Huntington's disease of the endocrine pancreas: insulin deficiency and diabetes mellitus due to impaired insulin gene expression. *Neurobiol Dis* 2002;11:410-24.
- Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, et al. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull* 2008;76:329-43.
- Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull* 2008;76:329-43.
- Aoyama K, Matsubara K, Fujikawa Y. et al. Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 2000;47: 524–27.
- Ascherio A, LeWitt PA, Xu K et al. Urate as a predictor of the rate of clinical decline in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2009;66:1460-8.
- Atassi N, Ratai EM, Greenblatt DJ, et al. A phase I, pharmacokinetic, dosage escalation study of creatine monohydrate in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2010;11:508-13
- Bahl JJ, Bressler R. The pharmacology of carnitine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1987;27:257–77.
- Beal M.F., Matson W.R., Swartz K.J, et al. Kynurenine pathway measurements in Huntington's disease striatum: evidence for reduced formation of kynurenic acid. *J Neurochem* 1990;55:1327-39.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, et al. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 199;13:4181-92.
- Beal MF, Matson WR, Storey E, et al. Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex. *J Neurol Sci* 1992;108:80–7.
- Beal MF. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J* 1992;6:3338-44.
- Beal MF. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366: 211-3.
- Beal MF. Neuroprotective effects of creatine. *Amino Acids* 2011;40:1305-13

- Bentivoglio AR, Del Grosso N, Albanese A, et al. Non-DYT1 dystonia in a large Italian family. *J Neurol Neurosurg Psych* 1997;62:357-60.
- Bernardi P, Basso E, Colonna R, et al. Perspectives of the mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys Acta* 1998;1365, 200–06.
- Bjorneboe A, Nenseter MS, Hagen BF, et al. Effect of dietary deficiency and supplement with alpha-tocopherol on hepatic content in rats. *J Nutr* 1991;121: 1208–13.
- Blum-Degen D, Muller T, Kuhn W, et al. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 1995;202, 17–20.
- Bogdanov MB, Ramos LE, Xu X, Beal MF. Elevated "hydroxyl radical" generation in vivo in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 1998;71:1321–24.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006;312:1389–92.
- Bonventre JV and Koroshetz WJ Phospholipase A2 (PLA2) activity in gerbil brain: characterization of cytosolic and membrane-associated forms and effects of ischemia and reperfusion on enzymatic activity. *J Lipid Med* 1993;6, 457—71.
- Bonventre JV, Huang Z, Taheri M et al. Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. *Nature* 1997;390:622-5.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:197-11.
- Brewer GJ and Wallimann TW. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and h-amyloid in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 2000;74, 1968–78.
- Brouillet E, Condé F, Beal MF, Hantraye P. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 1999;59:427-68.
- Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, et al. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 1997;41:646-53.
- Brustle O, Jones KN, Learish RD, et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: A source of myelinating transplants. *Science* 1999;285, 754-56.
- Brustovetsky N, Brustovetsky T, Dubinsky JM. On the mechanisms of neuroprotection by creatine and phosphocreatine. *J Neurochem* 2001;76,425– 34.
- Burgunder JM, Varriale A and Lauterburg BH. Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration. *Eur J Clin Pharmacol* 1989;36,127-31.
- Burke JR, Enghild JJ, Martin ME, et al. Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat Med* 1996;2,347–50.
- Burne JF, Staple JK, and Raff MC. Glial cells are increased proportionally in transgenic optic nerves with increased numbers of axons. *J Neurosci* 1996;16,2064–73.
- Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S, et al. Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation of N-tert-butyl-a-phenyl nitron. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:674–78.
- Cao X and Phillis J. a-Phenyl-tert-butyl nitron reduced cortical infarct and edema in rats subjected to focal ischemia. *Brain Res* 1994;644:267–72.
- Carney J and Floyd R. Protection against oxidative damage to CNS by a-phenyl-tert-butyl nitron and

- other spin trapping agents: A novel series of nonlipid free radical scavengers. *J Mol Neurosci* 1991;3:47–7.
- Chan P, Di Monte DA, Langston JW. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on levels of glutamate and aspartate in the mouse brain. *Brain* 1994; 647:249-54
- Chen N, Luo T, Wellington C, et al. Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. *J Neurochem* 1999;72, 1890-98.
- Chow CY, Landers JE, Bergren SK, et al. Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *Am. J Hum Genet*, 2009;84: 85-8.
- Cole NB and Murphy DD. The cell biology of α -synuclein. *Neuromolec Med* 2002;1, 95-109.
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, et al. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97, 571-76.
- Csillik A., Knyihár E., Okuno E., et al. Effect of 3-nitropropionic acid on kynurenine aminotransferase in rat brain. *Exp Neurol* 2002;177, 233-41.
- Dawson R Jr, Beal MF, Bondy SC, et al. Excitotoxins, aging, and environmental neurotoxins: implications for understanding human neurodegenerative diseases. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;134:1-17.
- de Carvalho LP, Bochet P, Rossier J The endogenous agonist quinolinic acid and the non endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunits. *Neurochem Int* 1996;28, 445-52.
- Dedeoglu A, Kubilus JK, Jeitner TM, et al. Therapeutic effects of cystamine in a murine model of Huntington's disease. *J Neurosci* 2002;22:8942–50.
- Di Monte D, Royland JE, Anderson A et al. Inhibition of monoamine oxidase contributes to the protective effect of 7-nitroindazole against MPTP neurotoxicity. *J Neurochem* 1997;69:1771-3.
- Dikalov S, Skatchkov M, Bassenge E. Spin trapping of superoxide radicals and peroxynitrite by 1-hydroxy-3-carboxypyrrolidine and 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine and the stability of corresponding nitroxyl radicals towards biological reductants. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;231: 701–4.
- disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 1997;41, 646–53.
- Drachman DB and Rothstein JD Inhibition of cyclooxygenase-2 protects motor neurons in an organotypic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2000;8:792–5.
- Drachman DB, Frank K, Dykes-Hoberg M, et al. Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol* 2002;52,771–8.
- Dringen R, Hamprecht B. Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res* 1997;759:67–5.
- Edamatsu R, Mori A, Packer L. The spin-trap N-tert-a-phenyl-butyl nitron prolongs the life span of the senescence accelerated mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;211: 847–9.
- Elden AC, Kim HJ, Hart MP, et al., Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 2010;466:1069-75.
- Eller M and Williams DR. α -Synuclein in Parkinson disease and other neurodegenerative disorders. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:403-8.
- Farooqui AA, Yang HC, Rosenberger TA, Horrocks LA. Phospholipase A2 and its role in brain tissue. *J Neurochem* 1997;69, 889—901.
- Feany MB and Bender WW. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 2002;404, 394-98.

- Ferrante RJ, Andreassen OA, Dedeoglu A, et al. Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci* 2002;22:1592–9.
- Ferrante RJ, Andreassen OA, Jenkins BG, et al. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 2000;20, 4389– 97.
- Ferrante RJ, Shinobu LA, Schulz JB, et al. Increased 3-nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Ann Neurol* 1997;42: 326–34.
- File SE, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP. Striking changes in anxiety in Huntington's disease transgenic mice. *Brain Res* 1998;805:234–40.
- Floresani M, Napoli E, Martinuzzi A, et al. Antioxidant defences in cybrids harboring mtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *FEBS J* 2005;272:1124-35.
- Friedlander RM, Gagliardini V, Hara H, et al. Expression of a dominant negative mutant of interleukin-1 β converting enzyme in transgenic mice prevents neuronal cell death induced by trophic factor withdrawal and ischemic brain injury. *J Exp Med* 1997;185, 933–40.
- Furlong RA, Narain Y, Rankin J, et al. Alpha synuclein overexpression promotes aggregation of mutant huntingtin. *Biochem J* 2000;346,577-81.
- Furuya T, Hayakawa H, Yamada M, et al. Caspase-1 mediates inflammatory dopaminergic cell death in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2004;24: 1865-72
- Gárdián G. Animal models of Huntington's disease. *Ideggyogy Sz* 2006;59:396-9.
- Gårseth M, White LR, Aasly J Little change in cerebrospinal fluid amino acids in subtypes of multiple sclerosis compared with acute polyradiculoneuropathy. *Neurochem Int* 2001;39:111-5.
- Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek ZK, et al. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet* 1998;18:262–265.
- Ghabaee M, Jabedari B, Al-E-Shagh N, et al. Serum and cerebrospinal fluid antioxidant activity and lipid peroxidation in Guillain-Barre syndrome and multiple sclerosis patients. *Int J Neurosci* 2010;120:301-4.
- Giasson BI, Duda JE, Murray IV, et al Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 2000;290, 985-89.
- Gibson GE, Sheu RKF, Blass JP, et al. Reduced activities of thiaminedependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1998;45, 836–40.
- Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2001;2, 492-501.
- Goety CG, Tanner CM, Cohen JA, et al. L acetyl- carnitine in Huntington's disease: double-blind placebo controlled crossover study of drug effects on movement disorder and dementia. *Mov Disord* 1990;5:263–5.
- Good PF, Olanow CW, Hsu A, Gordon JW. SOD-1 G86R transgenic mice have decreased striatal dopamine and a greater sensitivity to MPTP than control mice. *Soc Neurosci Abstr* 1997;23: 1877.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309–12.
- Grieb P. Transgenic models of amyotrophic lateral sclerosis. *Folia Neuropathol* 2004;42:239-48.
- Grimes DA, Han F, Lang AE, St et al. A novel locus for inherited myoclonus-dystonia on 18p11. *Neurology* 2002;59:1183-6.
- Guerrero AL, Gutiérrez F, Iglesias F, et al. Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients inversely correlate with disability. *Neurol Sci* 2011;32:347-50.

- Gul S, Smith AD, Thompson RHS, et al. Fatty acid composition of phospholipids from platelets and erythrocytes in multiple sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psych* 1970;33:506–10
- Han Q, Robinson H, Cai T, et al. Biochemical and structural characterization of mouse mitochondrial aspartate aminotransferase, a newly identified kynurenine aminotransferase-IV. *Biosci Rep* 2011;31:323-32.
- Han Q, Robinson H, Cai T, et al. Biochemical and structural properties of mouse kynurenine aminotransferase III. *Mol Cell Biol* 2009;29:784-93.
- Hand CK, Khoris J, Salachas F, et al. A novel locus for familial amyotrophic lateral sclerosis, on chromosome 18q. *Am J Hum Genet* 2002;70:251-6.
- Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nat Med* 1996;2:1017-21.
- Healy DG, Abou-Sleiman PM, Valente EM, et al. DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psych* 2004;75:144–5.
- Henderson JT, Javaheri M, Kopko S, Roder JC. Reduction of lower motor neuron degeneration in wobbler mice by N-acetyl-L-cysteine. *J Neurosci* 1996;16:7574-82.
- Heng M.Y., Detloff P.J, Wang P.L., et al. In vivo evidence for NMDA receptor-mediated excitotoxicity in a murine genetic model of Huntington disease. *J Neurosci* 2009;29, 3200-5.
- Hentati A, Ouahchi K, Pericak-Vance MA, et al. Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15-q22 markers. *Neurogenetics* 1998;2:55-60.
- Heyes MP, Saito K, Devinsky O, Nadi NS. Kynurenine pathway metabolites in cerebrospinal fluid and serum in complex partial seizures. *Epilepsia* 1994;35:251–7.
- Hicks AA, Petursson H, Jonsson T et al. A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2002;52: 549–55.
- Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, et al. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci* 2001;21, 7463-73.
- Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, et al. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* 1997;272:16644 –51.
- Holdiness M. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clin Pharmacokinet* 1991;20:123-34.
- Hottinger AF, Fine EG, Gurney ME et al. The copper chelator d-penicillamine delays onset of disease and extends survival in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 1997;9:1548-51.
- Hsu L. J, Sagara Y., Arroyo A., et al. α -synuclein promotes mitochondrial deficit and *Am J Pathol* 2000;157:401-10.
- Huang HM, Ou HC, Xu H, et al. Inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex promotes cytochrome c release from mitochondria, caspase-3 activation, and necrotic cell death. *J Neurosci Res* 2003;74:309-17.
- Hunter MIS, Nlemadim BC, Davidson DLW. Lipid peroxidation products and antioxidant proteins in plasma and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *J Neurochem Res* 1985;10:1645–52
- Iadecola C., Niwa K., Nogawa S., et al. Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98,

1294–9.

Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, et al. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat Genet* 1994;8:236–42.

Ikeda K, Nakamura Y, Kiyozuka T, et al. Serological profiles of urate, paraoxonase-1, ferritin and lipid in Parkinson's disease: changes linked to disease progression. *Neurodegener Dis* 2011;8:252–8.

Ilzecka J Prostaglandin E₂ is increased in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2003;108,125–9.

Ilzecka J, Kocki T, Stelmasiak Z, Turski WA. Endogenous protectant kynurenic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2003;107:412–8.

Jauch D, Urbańska EM, Guidetti P, et al. Dysfunction of brain kynurenic acid metabolism in Huntington's disease: focus on kynurenine aminotransferases. *J Neurol Sci* 1995;130,39–47.

Jenkins BG, Chen YI, Kuestermann E, et al. An integrated strategy for evaluation of metabolic and oxidative defects in neurodegenerative illness using magnetic resonance techniques. *Ann NY Acad Sci* 1999;93:214–42.

Jensen GE, Clausen J Glutathione peroxidase and reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and catalase activities in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1984;63:45–53

Jin S, Kawanokuchi J, Mizuno T, et al. Interferon-beta is neuroprotective against the toxicity induced by activated microglia. *Brain Res* 2007;1179:140–6.

Joffe GT, Parks JK, Parker WD Jr. Secondary inhibition of 2-ketoglutarate dehydrogenase complex by MPTP. *Neuroreport* 1998;9:2781–3.

Johannessen CU, Johannessen SI. Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Rev* 2003;9:199–216.

Johnson MT, Yang HS., Magnuson T, Patel MS. Targeted disruption of the murine dihydrolipoamide dehydrogenase gene (Dld) results in perigastrulation lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94,14512–7.

Kang HL, Benzer S, Min KT. Life extension in *Drosophila* by feeding a drug. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99, 838–43.

Kawasaki H, Mizuseki A, Nishikawa S, et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from es cells by stromal cell–derived inducing activity. *Neuron* 2000;28, 31–40.

Kazantsev AG, Hersch SM. Drug targeting of dysregulated transcription in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 2007;83:249–59.

Kelley KA, Ho L, Winger D, et al.. Potentiation of excitotoxicity in transgenic mice overexpressing neuronal cyclooxygenase-2. *Am J Pathol* 1999;155, 995–1004.

Kessler M., Terramani T., Lynch G., Baudry M. A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. *J Neurochem* 1989;52,1319–28.

King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989;246, 500–3.

Kish SJ, Lopes-Cendes I, Guttman M, et al. Brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in human trinucleotide repeat disorders. *Arch Neurol* 1998;55,1299–1304.

Kish SJ, Lopes-Cendes I, Guttman M, et al., Brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in human trinucleotide repeat disorders. *Arch Neurol* 1998;55, 1299–1304.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile

parkinsonism. *Nature* 1998;392:605–8.

Klivenyi P, Ferrante RJ, Gardian G, et al. Increased survival and neuroprotective effects of BN82451 in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 2003;86:267–72.

Knyihar-Csillik E., Csillik B., Pakaski M., et al. Decreased expression of kynurenine aminotransferase-I (KAT-I) in the substantia nigra of mice after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment. *Neuroscience* 2004;126:899-914.

Knyihár-Csillik E., Okuno E., Vecsei L. Effects of in vivo sodium azide administration on the immuno-histochemical localization of kynurenine aminotransferase in the rat brain. *Neuroscience* 1999;94, 269-77.

Ko L, Mehta ND, Farrer Met al. Sensitization of neuronal cells to oxidative stress with mutated human alpha-synuclein. *J Neurochem* 2000;75, 2546-54.

Koch M, Ramsaransing GS, Arutjunyan AV, et al. Oxidative stress in serum and peripheral blood leukocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis. *J Neurol* 2006;253:483-7.

Konat GW and Wiggins RC. Effect of reactive oxygen species on myelin proteins. *J Neurochem* 1985;45: 1113–8.

Kong J, Z. Xu. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci* 1998;18:3241–50.

Korpela H, Kinnunen E, Juntunen J, et al. Serum selenium concentration, glutathione peroxidase activity and lipid peroxides in a co-twin control study on multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1998;91:79–84.

Koudelova J, Mourek J, Drahota Z, Rauchova H. Protective effect of carnitine on lipoperoxide formation in rat brain. *Physiol Res* 1994;43:387–9.

Kramer PL, Mineta M, Klein C, Schilling K, et al. Rapid-onset dystonia-parkinsonism: linkage to chromosome 19q13. *Ann Neurol* 1999;46:176-82.

Krishna MC, Russo A, Mitchell JB, et al. Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O₂ or as SOD mimics? *J Biol Chem* 1996;271: 26026–31.

Kruger R, Vieira-Saecker AM, Kuhn W et al. Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined alphasynuclein/ apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol* 1999;45, 611-7.

Kunikowska G and Jenner P. The distribution of copper, zinc- and manganese-superoxide dismutase, and glutathione peroxidase messenger ribonucleic acid in rat basal ganglia. *Biochem Pharmacol* 2002;63: 1159-64.

La Russa A, Cittadella R, Andreoli V, et al. Leber's hereditary optic neuropathy associated with a multiple-sclerosis-like picture in a man. *Mult Scler* 201;17:763-6.

Landwehrmeyer GB, Standaert DG, Testa CM, et al. NMDA receptor subunit mRNA expression by projection neurons and interneurons in rat striatum. *J Neurosci* 1995;15, 5297-5307.

Langeman H, Kabiersch A, Newcombe J Measurement of low-molecular weight antioxidants, uric acid, tyrosine and tryptophan in plaques and white matter from patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 1992;32 : 248–52

Langston JW, Forno LS, Tetrud J Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans yr after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 1999;46,598–605.

Lawler JM, Barnes WS, Wu G, et al. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290, 47–52.

- Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H et al. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2000;18, 675-9.
- Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 9782-7.
- Leoni F., Zaliani A., Bertolini G., et al. The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99, 2995-3000.
- LeRoy E, Boyer R, Auburger G, et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998;395:451-2
- Leube B, Rudnicki D, Ratzlaff T, et al. Idiopathic torsion dystonia: assignment of a gene to chromosome 18p in a German family with adult onset, autosomal dominant inheritance and purely focal distribution. *Hum Mol Genet* 1996;5:1673-7.
- Li M, Ona VO, Guegan C, et al. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 2000;288, 335-9.
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995;11: 376-81.
- Lim VK, Altenmüller E, Bradshaw JL. Focal dystonia: current theories. *Hum Mov Sci* 2001;20:875-914.
- Lin J, Wu PH, Tarr PT, et al. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell* 2004;119,121-35.
- Liu Y, Wong TP, Aarts M, et al NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 2007;27, 2846-57.
- Löffler M, Jockel J, Schuster G, Becker C, et al. Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. *Mol Cell Biochem* 1997;174, 125-9.
- Louwerse ES, Weverling GJ, Bossuyt PM et al. Randomized, double-blind, controlled trial of acetylcysteine in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 1995;52, 559-64.
- Löscher W. Effect of inhibitors of GABA aminotransferase on the metabolism of GABA in brain tissue and synaptosomal fractions. *J Neurochem* 1981a;36:1521-7.
- Löscher W. Valproate induced changes in GABA metabolism at the subcellular level. *Biochem Pharmacol* 1981b;30:1364-6.
- Lutsikii MA, Esaulenko IE. Oxidant stress in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurosci Behav Physiol* 2007;37:209-13.
- Lüdecke B, Dworniczak B, Bartholomé K. A point mutation in the tyrosine hydroxylase gene associated with Segawa's syndrome. *Hum Genet* 1995;95:123-5.
- Mackenzie GM, Jackson MJ, Jenner P and Marsden CD. Nitric oxide synthase inhibition and MPTP-induced toxicity in the common marmoset. *Synapse* 1997;26, 301-316.
- Madesh M, Balasubramanian KA. Activation of liver mitochondrial phospholipase A2 by superoxide. *Arch Biochem Biophys* 1997;346, 187-92.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Sellar M et al. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 1996;87:493-506.
- Marchi M, Risso F, Viola C, et al. Direct evidence that release-stimulating alpha7-nicotinic cholinergic receptors are localized on human and rat brain glutamatergic axon terminals. *J Neurochem* 2002;80,1071-8.

- Maruyama H, Morino H, Ito H, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2010;465:223-6.
- Matthews RT, Ferrante RJ, Klivenyi P, et al. Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol* 1999;157:142-9.
- Matthews RT, Yang L, Beal MF. S-Methylthiocitrulline, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, protects against malonate and MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol* 1997;143:282-6.
- Matthews RT, Yang L, Jenkins BG, et al. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J Neurosci* 1998;18,156– 63
- Mayer M and Noble M. N-acetyl-L-cysteine is a pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic factor-mediated cell survival in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91, 7496-7500.
- McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG. Inflammation in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 2001;86, 83–9.
- McNaught KS, Carrupt PA, Altomare C, et al. Isoquinoline derivatives as endogenous neurotoxins in the aetiology of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 1998;56:921-33.
- Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1- like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97, 3655-60.
- Miyajima T, Kotake Y. Optimal time and dosage of phenyl N-tert-butyl nitron (PBN) for the inhibition of nitric oxide synthase induction in mice. *Free Radical Biol Med* 1997;22:463–470.
- Miyashita T, Matsui J, Ohtsuka Y. Expression of extended polyglutamine sequentially activates initiator and effector caspases. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257, 724–730.
- Mizuno Y, Suzuki K, Ohta S. Postmortem changes in mitochondria respiratory enzymes in brain and a preliminary observation in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1990;96, 49–57.
- Mogi M, Harada M, Kondo T, et al Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 1994a;180, 147–150.
- Mogi M, Harada M, Riederer P, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 1994b;165, 208–210.
- Mogi M, Harada M, Narabayashi H, et al. Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1996;211, 13–6.
- Mogi M, Togari A, Ogawa M, et al. Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice on interleukin-1beta and nerve growth factor in the striatum. *Neurosci Lett* 1998;250,25–8.
- Monti E, Cova D, Guido E, et al. Protective effect of the nitroxide tempol against the cardiotoxicity of adriamycin. *Free Radical Biol Med* 1996;21:463–70.
- Morland C, Boldingh KA, Iversen EG, Hassel B. Valproate is neuroprotective against malonate toxicity in rat striatum: an association with augmentation of high affinity glutamate uptake. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:1226–34.
- Muir KW and Lees KR. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 1995;26, 503-13.

- Muir KW. Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6:53-60.
- Muller T, Blum-Degen D, Przuntek H, Kuhn W. Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid inversely correlate to severity of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 1998;98:142-4.
- Muller UJ, Frick B, Winkler C, et al. Homocysteine and serum markers of immune activation in primary dystonia. *Mov Disord* 2005;20:1663-7.
- Murakami K, Kondo T, Kawase M. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J Neurosci* 1998;18:205-13.
- Müftüoglu M, Elibol B, Dalmizrak O, et al. Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations *Mov Disord* 2004;19:544-8.
- Nagano S, Ogawa Y, Yanagihara T and Sakoda S. Benefit of a combined treatment with trientine and ascorbate in familial amyotrophic lateral sclerosis model mice. *Neurosci Lett* 1999;265, 159-62.
- Naver B, Stub C, Moller M, et al. Molecular and behavioral analysis of the R6/1 Huntington's disease transgenic mouse. *Neuroscience* 2003;122:1049-57.
- Nessler S, Bruck W. Advances in multiple sclerosis research in 2009. *J Neurol* 2010;257:1590-3
- NINDS NET-PD Investigators. A pilot clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease: 18-month results. *Clin Neuropharmacol* 2008;31:141-50.
- Ogawa T, Matson WR, Beal MF, et al. Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurology* 1992;42:1702-6.
- O'Gorman E, Beutner G, Dolder M, et al. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 1997;414:253-7.
- O'Gorman E, Beutner G, Wallimann T, Brdiczka D. Differential effects of creatine depletion on the regulation of enzyme activities and on creatine-stimulated mitochondrial respiration in skeletal muscle, heart, and brain. *Biochim Biophys Acta* 1996;1276:161-70.
- Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, et al. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* 1996;59, 89-102.
- Okuno E, Nakamura M, Schwarcz R. Two kynurenine aminotransferases in human brain. *Brain Res* 1991;542:307-12.
- Oliver CN, Starke-Reed PE, Stadtman ER et al. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5144-7.
- Olsen NK, Hansen AW, Nørby S, et al. Leber's hereditary optic neuropathy associated with a disorder indistinguishable from multiple sclerosis in a male harbouring the mitochondrial DNA 11778 mutation. *Acta Neurol Scand* 1995;91:326-9.
- Ona VO, Li M, Vonsattel JP, et al. Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* 1999;399, 263-7.
- Ostrerova-Golts N, Petrucelli L, Hardy J, et al. The A53T alpha-synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity. *J Neurosci* 2000;20, 6048-54.
- Ozelius LJ and Bressman SB. Genetic and clinical features of primary torsion dystonia. *Neurobiol Dis*

2011;42:127-35.

Ozelius LJ, Hewett J, Kramer P, et al. Fine localization of the torsion dystonia gene (DYT1) on human chromosome 9q34: YAC map and linkage disequilibrium. *Genome Res* 1997;7:483-94.

Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK et al. Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations. *Am J Hum Genet* 2002;71: 124–135

Park LC, Zhang H, Sheu K et al. Metabolic impairment induces oxidative stress, compromises inflammatory responses, and inactivates a key mitochondrial enzyme in microglia. *J Neurochem* 1999;72:1948-58.

Patneau DK, Wright PW, Winter SC et al. Glial cells of the oligodendrocyte lineage express both kainate and AMPA preferring subtypes of glutamate receptor. *Neuron* 1994 12: 357-71.

Paxinou E., Chen Q., Weisse M., et al. Induction of α -synuclein aggregation by intracellular nitrate insult. *J Neurosci.* 2001;21, 8053-61.

Peng TI, Greenamyre JT. Privileged access to mitochondria of calcium influx through N-methyl-D-aspartate receptors. *Molecular Pharmacology* 1998;53:974–980.

Perkins MN and Stone TW. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res* 1982;247, 184-7.

Phillis JW and Clough-Helfman CC. Protection from cerebral ischemic injury in gerbils with the spin trap agent N-tert-butyl- α -phenyl nitroxide (PBN). *Neurosci. Lett.* 1990;116: 315–9.

Polidoro G, Di-Ilio C, Arduini A, et al. Superoxide dismutase, reduced glutathione and TBA-reactive products in erythrocytes of patients with multiple sclerosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1984;16 :505–9.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276,2045-7.

Pompl PN, Ho L, Bianchi M, et al. A therapeutic role for cyclooxygenase-2 inhibitors in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J* 2003; 17:725-7.

Poorkaj P, Tsuang D, Wijsman E, et al., TAU as a susceptibility gene for amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex of Guam. *Arch Neurol* 2001;58:1871-8.

Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006;38:1184-91.

Rashba-Step J, Tatoyan A, Duncan R, et al. Phospholipid peroxidation induces cytosolic phospholipase A2 activity: membrane effects versus enzyme phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* 1997;343:44-54.

Rejdak K, Bartosik-Psujek H, Dobosz B, et al. Decreased level of kynurenic acid in cerebrospinal fluid of relapsing-onset multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett.* 2002;331:63-5.

Richter A; Loscher W, Baran H; Gramer M. Increased levels of kynurenic acid in brains of genetically dystonic hamsters. *Brain Res Dev. Brain Res*, 1996, 92, 111-6.

Ristori G, Brescianini S, Pino A, et al. Serum elements and oxidative status in clinically isolated syndromes: imbalance and predictivity. *Neurology* 2011;76:549-55.

Rothstein JD, Bristol LA, Hosler B et al. Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91,4155-9.

Ryu H., Lee J, Olofsson B. A., et al. Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100,4281–6.

- Sack CA, Socci DJ, Crandall BM, Arendash GW. Antioxidant treatment with phenyl-a-tert-butyl nitron (PBN) improves the cognitive performance and survival of aging rats. *Neurosci. Lett.* 1996;205: 181–4.
- Sadri-Vakili G, Cha JH. Histone deacetylase inhibitors: a novel therapeutic approach to Huntington's disease (complex mechanism of neuronal death). *Curr Alzheimer Res* 2006;3:403–8.
- Sapp PC, Hosler BA, McKenna-Yasek D, et al. Identification of two novel loci for dominantly inherited familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet.* 2003;73:397-403.
- Sarchielli P, Greco L, Floridi A, et al. Excitatory amino acids and multiple sclerosis: evidence from cerebrospinal fluid. *Arch Neurol* 2003;60:1082-8.
- Saydoff JA, Garcia RA, Browne SE, et al. Oral uridine pro-drug PN401 is neuroprotective in the R6/2 and N171-82Q mouse models of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2006;24:455-65.
- Saydoff JA, Liu LS, Garcia RA et al. Oral uridine pro-drug PN401 decreases neurodegeneration, behavioral impairment, weight loss and mortality in the 3-nitropropionic acid mitochondrial toxin model of Huntington's disease. *Brain Res* 2003;994:44-54.
- Saydoff JA, Liu LS, Hu ZY, et al. Oral uridine Pro-drug P N 401 protects against azide toxicity in vivo: Studies on the mechanism of uridine neuroprotection in vitro. *Soc. Neurosci.* 2001;27, 2360.
- Scattoni ML, Valanzano A, Popoli P, et al. Progressive behavioural changes in the spatial open-field in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Behav Brain Res* 2004;152:375–83.
- Schilling G, Becher MW, Sharp AH, et al. Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum Mol Genet* 1999;8:397–407.
- Schulz JB, Henshaw DR, Matthews RT, Beal MF. Coenzyme Q10 and nicotinamide and a free radical spin trap protect against MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol* 1995a;132: 279–283.
- Schulz JB, Henshaw DR, Siwek D, et al. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J Neurochem* 1995b;64: 2239–2247.
- Sekizawa T, Openshaw H, Ohbo K, et al. Cerebrospinal fluid interleukin 6 in amyotrophic lateral sclerosis: immunological parameter and comparison with inflammatory and non-inflammatory central nervous system diseases. *J Neurol Sci.* 1998;154, 194–9.
- Sheu KF, Brown AM, Kristal BS, et al. A DLST gene associated with reduced risk for Alzheimer's disease. *Neurology* 1999;52, 1505–7.
- Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, et al.: Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat. Genet* 2009;41:1308-12.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al. a-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302:841–4.
- Smith Y, Raju DV, Pare JF, Sidibe M. The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci.* 2004;27: 520-7.
- Solomon AJ and Whitham RH. Multiple sclerosis and vitamin D: a review and recommendations. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2010;10:389-96.
- Souza JM, Giasson BI, Chen Q, et al. Dityrosine crosslinking promotes formation of stable alpha - synuclein polymers. Implication of nitrative and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies. *J Biol. Chem.* 2000;275, 18344-9.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, et al. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies

- from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95, 6469-73.
- Stadelmann C, Wegner C, Brück W. Inflammation, demyelination, and degeneration - recent insights from MS pathology. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812:275-82.
- Steeghs K, Benders A, Oerlemans F, et al. Altered Ca²⁺ responses in muscles with combined mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies. *Cell* 1997;89:93–103
- Steeghs, K., Oerlemans, F., Wieringa, B. Mice deficient in ubiquitous mitochondrial creatine kinase are viable and fertile. *Biochim. Biophys Acta* 1995;1230, 130–8.
- Steenge GR, Lambourne J, Casey A, et al. Stimulatory effect of insulin on creatine accumulation in human skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1998;275:E974-9.
- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 2006;127:397-408.
- Sullivan PG, Geiger JD, Mattson M., Scheff SW. Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury. *Ann. Neurol* 2000;48, 723–9.
- Szeinberg A, Golan R, Ben-Ezzer J, et al. Decreased erythrocyte glutathione peroxidase activity in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1979;60 :265–71
- Taberner PV, Charington CB, Unwin JW. Effects of GAD and GABA-T inhibitors on GABA metabolism in vivo. *Brain Res Bull* 1980;5(Suppl. 2):621–5.
- Tabrizi SJ, Workman J, Hart PE, et al. Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R 6/2 transgenic mouse. *Ann Neurol* 2000;47:80–6
- Teismann P, Ferger B. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse* 2001;39,167–174.
- Teismann P, Tieu K, Choi DK, et al. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003;100,5473–8.
- Teunissen CE, Koel-Simmelink MJ, Pham TV, et al. Identification of biomarkers for diagnosis and progression of MS by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mult Scler*. 2011;17:838-50.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group: A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*. 1993;72:971-83.
- Thomas B, Mandir AS, West N, et al. Resistance to MPTP-neurotoxicity in α -synuclein knockout mice is complemented by human α -synuclein and associated with increased β -synuclein and Akt activation. *PLoS One* 2011;6:e16706.
- Thomas CE, Ohlweiler DF, Carr AA, et al. Characterization of the radical trapping activity of a novel series of cyclic nitron spin traps. *J Biol Chem* 1996;271: 3097–3104.
- Tiwari M, Herman B, Morgan WW. A knockout of the caspase 2 gene produces increased resistance of the nigrostriatal dopaminergic pathway to MPTP-induced toxicity. *Exp Neurol* 2011;229:421-8.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; 304:1158–60.
- Van der Schyf CJ, Geldenhuys WJ, Youdim MB. Multifunctional drugs with different CNS targets for neuropsychiatric disorders. *J Neurochem* 2006;99:1033-48.
- van Horssen J, Witte ME, Schreibeit G, de Vries HE. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812):141-50

- Vonsattel JP, Keller C, Cortes Ramirez EP. Huntington's disease - neuropathology. *Handb Clin Neurol* 2011;100:83-100.
- Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, et al. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 2001;292, 740-3.
- Wang JY, Gu YS, Wang J, Tong Y. Oxidative stress in Chinese patients with Leber's hereditary optic neuropathy. *J Int Med Res* 2008;36:544-50.
- Wareski P, Vaarmann A, Choubey V, et al. PGC-1 α and PGC-1 β regulate mitochondrial density in neurons. *J Biol Chem* 2009;284:21379-85.
- Warren TR. Multiple sclerosis and infants fed on diets deficient in vitamin A or in selenium and vitamin E. *Med Hypotheses*. 1982;8:443-54.
- Wellington CL, Ellerby LM, Hackam AS, et al. Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol. Chem.* 1998;273, 9158–67.
- Weydt P, Pineda VV, Torrence AE, et al. Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1 α in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab.* 2006;4:349-62.
- Widner B, Leblhuber F, Fuchs D. Increased neopterin production and tryptophan degradation in advanced Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2002;109:181-9.
- Wong EK Jr, Enomoto H, Leopold IH, et al. Phosphocreatine-dependent glutamate uptake by synaptic vesicles. *J Biol. Chem.* 1996;271, 13435– 40.
- Yamada M, Kida K, Amutuhair W, et al. Gene disruption of caspase-3 prevents MPTP-induced Parkinson's disease in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;402:312-8.
- Yang Y, Hentati A, Deng HX, et al. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2001; 29:160-5.
- Yue TL, Gun JL, Lysko PG, et al. Neuroprotective effects of phenyl-t-butyl nitron in gerbil global brain ischemia and in cultured rat cerebellar neurons. *Brain Res* 1992;574: 193–7.
- Zeise ML, Kasparow S, Zieglgänsberger W. Valproate suppresses N-methyl-D-aspartate evoked, transient depolarizations in the rat neocortex in vitro. *Brain Res* 1991;544:345–8.
- Zhang J, Graham DG, Montine TJ, Ho YS. Enhanced N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity in mice deficient in CuZn-superoxide dismutase or glutathione peroxidase. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:53-61.
- Zhao Q, Pahlmark K, Smith ML, Siesjö BK. Delayed treatment with the spin trap alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta Physiol Scand.* 1994;152:349-50.
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004; 44:601–7.
- Zimprich A, Grabowski M, Asmus F, et al. Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome. *Nat Genet* 2001;29:66-9.
- Zuccato C, Valenza M, Cattaneo E. Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol Rev.* 2010;90:905-81.