

Korábbi vizsgálataink során megállapítottuk az egészséges rágcsálók és a nem-humán főemlősök homeosztázisában a mitokondriális uncoupling protein 2-nek (UCP2) a jelenlétét. Szintén kimutattuk, hogy a neurodegeneráció különböző modelljeiben is az uncoupling proteinnek jelentős szerepe van. Ilyen pl. a Parkinson-kór nem humán főemlős modellje. Ezen kísérletekben a UCP2 kifejeződése összefüggésben volt a neuronok szubpopulációjával a degeneráció során és a sejtek várható leghosszabb túlélésével, a kezdeti beavatkozás után.

Előtanulmányaink során az emberi UCP2 hatására az egerekben csökkent a szabadgyök termelődésének a szintje, viszont az ATP és ADP szint emelkedett, és ez egyértelműen alacsonyabb sejthalálban nyilvánult meg a pilokarpin indukálta neurodegeneráció után. Egér kísérleteink bizonyítják, hogy koenzim-Q (CoQ) - amely a UCP2 kofaktora- adagolásának hatására a neuron elhalás és a dopamin depléciónak csökkent, az 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6 tetrahydropyridine (MPTP) kezelést követően. Ezek alapján, hipotézisünk szerint a Parkinson-kór esetén a UCP2, koenzim-Q által történő aktiválása a dopamin sejtek megnövekedett védelmét eredményezi a degenerációval szemben. Ezen hipotézisünk igazolására MPTP-t használtunk a dopamin sejtek pusztulásának a kiváltására.

Kutatás eredményeink hozzájárulnak egy újszerű mitokondriális mechanizmus felismeréséhez, amely döntő szerepet játszik a neurodegeneráció megakadályozásában.

Meghatároztuk a neuronok pusztulását a substantia nigra-ban, a UCP2 szintjét, és a mitokondriumok számát MPTP-vel kezelt állatokban, amelyek egy csoportja előzetes koenzim-Q kezelésben részesül, míg a másik csoportjuk nem kapott ilyen kezelést. A kontroll állatoknak csak koenzim-Q-t adtunk.

A neurodegeneráció egy olyan fiziológiai folyamat, amely végig kíséri az emberi életet az agy korai fejlődésétől a halálig. Azonban amikor az idegsejt halálának mértéke elér egy bizonyos szintet, ahol a normál idegműködés sérül, akkor a folyamatot már betegségnek tekintjük. Klinikai szempontból a kritikus kérdés felismerni azt amikor az idegsejt populáció könnyen sebezhetővé válik a patológiás neurodegeneráció számára, továbbá ezen folyamat megelőzése, és/vagy az elhaló félben lévő, illetve elhalt sejtek helyettesítése új idegsejtekkel, amelyek teljes mértékben helyettesíteni tudják az elpusztult sejteket. Ez utóbbi lehetőség egészen napjainkig igen távoli megoldásnak tűnt, azonban az ősi idegsejtek létezésének a felfedezésével és ezen sejteknek az egyes agyterületeknek megfelelő fenotípusú

sejteké való differenciálásával megnőtt a remény, hogy a közeljövőben lehetőség lesz a neurodegeneratív betegségek esetén az elhalt idegsejteknek egészségessel való helyettesítésére, és ezáltal a normál funkció helyreállítására.

A legtöbb esetben a neurodegeneratív betegségek etiológiája komplex mechanizmusokat foglal magában. Valójában a Parkinson-kór sem különbözik ettől, mivel ezen neurodegeneratív betegség kóroktanában is feltehetően több tényező játszik szerepet. Amíg a Parkinson-kór kiváltó oka is különböző lehet, addig ezen betegség során a neurodegenerációnak van egy közös sajátossága: a substantia nigra dopamin neuronjai véglegesen elpusztulnak. Amennyiben ezek a degeneratív mechanizmusok ellenőrizhetővé válnának, akkor a dopamin neuronok (és folyamataik) megmenthetőek lennének, a substantia nigra megtarthatná funkcióját, de legalább meghosszabbodna, függetlenül a degeneráció kezdeti okától. Előző tanulmányaink és megfigyeléseink alapján feltételezzük, hogy a mitokondriális uncoupling protein 2 (UCP2) döntő szerepet játszik a Parkinson-kór során a nagymértékű sejthalál megelőzésében, amely a koenzim-Q által tovább fokozható.

A neurodegeneratív betegségek nagy része az agy meghatározott területén, a sejt metabolizmus zavarával kezdődik. A mitokondriumon belül a különböző eredetű enzimek populációja (mitokondriális vagy magi DNS által kódolva) egy meghatározott topográfia alapján helyezkedik el, és így látja el a különböző feladatokat. A UCP2 kifejeződésére és funkciójára vonatkozó adataink viszont arra utalnak, hogy döntő különbség van a mitokondriumok belső membrán sérülése miatt bekövetkező $\Delta\Psi_m$ veszteség és a mitokondriális uncoupling fehérjék megnövekedett aktivitása között, amely a sejt sorsának szempontjából teljesen ellentétes eredményhez vezet. A belső membrán egységének felborulásakor szétkapcsolódik a légzési lánc és/vagy a gátlása, mert a citokróm-C felszabadulása a superoxid anion fokozott termelődését, a redox ekvivalensek (NAD(P)H, glutation stb.) deplécióját és a megnövekedett reactive oxygen species (ROS) okozta károsodást eredményezi. Ezzel ellentétben feltételezzük, hogy az uncoupling fehérjék csökkentik a $\Delta\Psi_m$ -t párhuzamosan a csökkent ROS termelődéssel, és ezért természeténél fogva anti-apoptoticus és anti-necroticus hatásuk lehet. Azon felfedezésünk, hogy a UCP2 fokozott mértékű jelenléte, a mitokondriális proliferációt és a sejt megnövekedett ATP szintjét eredményezi csökkent szabad gyök termeléssel bizonyítja, hogy a UCP2

indukciója a substantia nigrában a Parkinson-kór során védi a neuronokat a degenerációval szemben.

Sajnos, a fenti témában elnyert OTKA pályázat pénzügyi kerete csak 2004. végétől állt rendelkezésünkre, ezért a 2004. évre tervezett kísérletsorozatok éppen csak el tudtuk kezdeni.

Az előkísérleteket ugyan már a 2004. év elején indítottuk el, részben tanszékünkön, részben a Yale egyetemen. Itt júniusban 1 hónapot töltöttem, Dr. Horváth Tamás meghívására, aki egyéb pályázataiból származó pénzügyi forrásból finanszírozta kinttartózkodásom és az előkísérletek folytatásának költségeit.

Egyben a fenti OTKA témához csak tágabb értelemben kapcsolódó kísérleteink eredményeit dolgoztuk fel, és elkészítettünk egy közleményt, amely a European Journal of Neuroscience-ben jelent meg.

Előkísérleteinkben, mint ahogy azt a pályázatban is írtuk („Ahhoz, hogy ez a kutatás sikeres legyen fontos, az MPTP dózisének pontos beállítása, mert csak így hozza létre a neurodegeneráció mintázatát, amelynek szignifikáns eltérése várható”) elvégeztük a megfelelő neurodegenerációs mintázat kiváltásához szükséges MPTP pontos dózisének beállítását.

A munkatervben foglaltaknak megfelelően az MPTP bevitelét PBS-ben végeztük, krónikus adagoló rendszer alkalmazásával, intramuscularisan, és az állatokat 6 csoportra osztottuk, csoportonként 5-5 állattal, amelyek naponta ötször az alábbiak szerint lettek kezelve.

- I. Kontroll - PBS-t kapott.
- II. 0.2 mg/kg mennyiségben
- III. 0.3 mg/kg mennyiségben
- IV. 0.4 mg/kg mennyiségben
- V. 0.5 mg/kg mennyiségben
- VI. 0.6 mg/kg mennyiségben

Az állatokat a kezelések megkezdését követően a 20. napon extermináltuk, a mesencephalont 4%-os paraformaldehidbe fixáltuk, majd szövettani és EM-os vizsgálatok céljára feldolgoztuk.

Számunkra a legmegfelelőbb és egyöntetűbb neurodegenerációs mintázatot IV. csoportba tartozó állatoknál végzett kezelések eredményezték. A II. csoportba tartozó

állatoknál a neurodegeneráció mértéke alig volt értékelhető, a III. csoporthoz tartozó állatok már mutatták a neurodegenerációs mintázatot, de egyedi eltérésekkel. Az V. és VI. csoportban több állat is elpusztult. Így, a későbbiekben beállított patkány kísérleteink során a 0.4 mg/kg MPTP dózist használtuk.

Az 1. sorozatú patkány kísérletekben az állatokat 4 csoportba osztottuk, csoportonként 6-6 állattal:

I. csoport: kezeletlen kontroll. A csoport tagjai az MPTP-vel egyenlő mennyiségű PBS-t kaptak.

II. csoport: koenzim-Q₁₀-el kezelt. Az állatoknak 10mg/kg/nap koenzim-Q₁₀-et aplikáltunk szájon át. A koenzim-Q₁₀ adagolását 20 nappal, a III. csoport MPTP-vel való kezelését megelőzően kezdtük, és az állatok exterminációjáig folytattuk.

III. csoport: MPTP-vel kezelt. Az MPTP bevitelét PBS-ben végeztük, krónikus adagoló rendszer alkalmazásával, intramuscularisan, naponta ötször, 0.4 mg/kg mennyiségben.

IV. csoport: MPTP és koenzim-Q₁₀-el egyaránt kezelt állatok. A kísérlet során a koenzim-Q₁₀-t az MPTP adását 20 nappal megelőzően kezdtük, majd mindkét vegyületet az állatok exterminációjáig aplikáltuk.

A kísérleti állatok végleges elaltatását, pentobarbitál túladagolást követően, hideg fiziológiás sóoldat traszkardiális perfúziójával végeztük. Ezt követően minden állatból a két striata közül az egyiket eltávolítottuk, majd rögtön száraz jégen lefagyasztva – 80°C-on tároltuk.

A másik fél előagy szintén száraz jégen került lefagyasztásra, amely izopentánnal hűtöttünk. A mintákból cryostattal 20µm vastagságú metszeteket készítettünk.

Az agy többi részét, amely a mesencephalont is tartalmazta, 4 %-os paraformaldehidbe helyeztük, majd 4°C-on 24 órán át fixáltuk, és ezt követően 20%-os glicerollal átítattuk, majd fagyasztottuk.

A minták feldolgozása folyamatosan történt.

Az elvégzett kvantitatív Real-time-PCR (RT-PCR)-mérési eredményeink azt támasztják alá, hogy a substantia nigra UCP2 mRNS mennyiségében nincs különbség

a kontrol és a koenzim-Q₁₀-el kezelt csoportok között. Ezen tény megerősíteni látszik a koenzim-Q₁₀ jelentőségét, mint a UCP kofaktora.

A munkatervben foglaltaknak megfelelően a 2005. évre tervezett 2. és 3. sorozatú patkány kísérleteket az 1. sorozatú vizsgálatok alapján, az alábbiakban megadott protokoll szerint végeztük.

I. csoport: kezeletlen kontroll. A csoport tagjai az MPTP-vel egyenlő mennyiségű PBS-t kaptak.

II. csoport: koenzim-Q₁₀-el kezelt. Az állatoknak 10mg/kg/nap koenzim-Q₁₀-et aplikáltunk szájon át. A koenzim-Q₁₀ adagolását 20 nappal, a III. csoport MPTP-vel való kezelését megelőzően kezdtük, és az állatok exterminációjáig folytattuk.

III. csoport: MPTP-vel kezelt. Az MPTP bevitelét PBS-ben végeztük, krónikus adagoló rendszer alkalmazásával, intramuscularisan, naponta ötször, 0.4 mg/kg mennyiségben.

IV. csoport: MPTP és koenzim-Q₁₀-el egyaránt kezelt állatok. A kísérlet során a koenzim-Q₁₀-t az MPTP adását 20 nappal megelőzően kezdtük, majd mindkét vegyületet az állatok exterminációjáig aplikáltuk.

A kísérleti állatok végleges elaltatását, pentobarbitál túladagolást követően, hideg fiziológiás sóoldat traszkardiális perfúziójával végeztük. Ezt követően minden állatból a két striata közül az egyiket eltávolítottuk, majd rögtön száraz jégen lefagyasztva 80 C-on tároltuk.

A másik fél előagy szintén száraz jégen került lefagyasztásra, amely izopentánnal hűtöttünk. A mintákból cryostattal 20mikro-méter vastagságú metszeteket készítettünk.

Az agy többi részét, amely a mesencephalont is tartalmazta, 4 %-os paraformaldehidbe helyeztük, majd 4 C-on 24 órán át fixáltuk, és ezt követően 20%-os glicerollal átitattuk, majd fagyasztottuk.

A minták szövettani vizsgálatát, feldolgozását és elemzését a kvantitatív Real-time-PCR (RT-PCR)-mérésekkel párhuzamosan végeztük és az eredményeket értékeltük a Yale Egyetemen, Horváth Prof. laboratóriumával szoros kollaborációban.

Az elmúlt évben két új kísérletet sorozatot hajtottunk végre a UCP2-vel.

Az egyikben azt vizsgáltuk, hogy UCP2 aktiválása a gyomorból származó metabolikus hormone, ghrelin által szerepet játszik-e dopamine sejtek védelmében MPTP-indukált degeneráció során.

A munkatervben foglaltaknak megfelelően a 4. sorozatú patkánykísérletekben az MPTP bevitelét PBS-ben végeztük, krónikus adagoló rendszer alkalmazásával, intramuscularisan, és az állatokat 4 csoportra osztottuk (2 wild type és 2 ghrelin KO csoport), csoportonként 5-5 állattal, amelyek naponta ötször az alábbiak szerint kezeltünk. I. Kontroll - PBS-t kapott, II. MPTP 0.4 mg/kg mennyiségben.

Az állatokat a kezelések megkezdését követően a 20. napon extermináltuk, a mesencephalont 4%-os paraformaldehidbe fixáltuk, majd szövettani és EM-os vizsgálatok céljára feldolgoztuk. Ezekben a kísérletekben azt találtuk, hogy MPTP indukált sejthalál szignifikánsan alacsonyabb volt a ghrelin KO kezelt állatokban, mint a kontroll (wild type) állatokban. Ezen eredmények arra utalnak, hogy ghrelin hiánya csökkenti a dopamine sejtek túlélési lehetőségét MPTP-által indukált neurodegenerációban.

Annak eldöntésére, hogy emelt ghrelin szintvédő hatást fejt-e ki a dopamine sejtekre, a fenti kísérleteket elvégeztük olyan kontroll állatokon, melyek vagy PBS-vel, vagy ghrelinnel voltak előkezelve. A kísérletek azt mutatták, hogy azon állatokban, melyek a ghrelin előkezelésben részesültek az exogen ghrelin alkalmazása után, kisebb morbiditást mutattak és kevesebb dopamine sejtjük pusztult el a szubsztantia nigrában. Ezen kísérletek eredményei a jelenleg is tartó részletes feldolgozás után kerülnek publikálásra.

Egy másik kísérletsorozatban arra kerestük a választ, hogy UCP2 szerepet játszik-e szinaptikus plaszticitás regulálásában. Erre azért fordítottunk figyelmet, mert a ghrelinre, fentiekben leírtak alapján) bizonyítást nyert, hogy segíti a dopamine sejtek túlélését, támogatja a szinaptikus plaszticitást mind a közepagy dopamine sejtekben, mind pedig a hippocampusban. Amennyiben UCP2 valóban sejten belüli mediátora a ghrelinnek, akkor a UCP2 hiánya befolyással kell hogy legyen szinaptikus plaszticitásra is. Ennek

tanulmányozására a hippocampalis gyrus dentatust választottuk, mivel korábbi vizsgálatok alapján bizonyítást nyert, hogy mind ghrelin receptorok, mind pedig UCP2 jelen van ezen a rendkívül plasztikus agyterületen.

Négy csoport állatait vizsgáltuk: kontrol állatok és UCP2 KO állatok standard laborkörülmények között, futókerék nélkül (mókuserék), valamint kontrol és UCP2 KO állatok futókerékkel. Megállapítottuk, hogy mind a kontrol mind pedig UCP2 KO állatok nagy hajlandóságot mutattak a mókuserékben való gyakori futásra. Három hét elteltével, analizáltuk gyrus dentatus-ból izolált mitokondriumok oxigén fogyasztását. Megállapítást nyert, hogy a kontrol állatoknál a szabadon futás megemelte mind a mitokondriális oxigénfogyasztást, mind az ATP produkcióhoz mind pedig hőtermeléshez kapcsolt oxidációban. Ezen változások az UCP2 KO egerekben nem voltak megfigyelhetők.

Egy másik a fenti csoportbeosztásnak megfelelően beállított kísérletsorozat alapján megfigyelhető volt, hogy míg a kontrol állatokban a futás megemelte a mitokondriumok, valamint a dendritikus szinapszisok számát a gyrus dentatus sejteiben, ezen változások nem voltak észlelhetők a UCP2 KO kezelt állatokban. Összevetve, megállapítottuk, hogy a mitokondriális mechanizmusok regulálják az adekvált szinaptikus plaszticitást, ezeken belül is a mitokondriális UCP2-nek különleges szerepe van.

További kísérleteinkben arra keressük a választ, hogy a ghrelin által kiváltott védettsége a közepagy dopamine sejteknek, milyen mértékben társul szinaptikus plaszticitással.