

# **NEUROPROTEKTÍV VEGYÜLETEK TESZTELÉSE A HUNTINGTON-KÓR EGY TRANSZGENIKUS EGÉR MODELLJÉBEN**

című PhD értekezés összefoglalója

**Zádori Dénes**

Kísérletes és Klinikai Idegtudományok képzési program

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető:

Dr. Klivényi Péter

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ

Neurológiai Klinika

Szeged

2011

## I. Bevezetés

A Huntington-kór egy autoszomális dominánsan öröklődő progresszív neurodegeneratív betegség, melynek tünetei közül klinikailag a motoros rendszer zavara tűnik a legjelentősebbnek. A tünetek háttérben álló fő patológiai elváltozás a striatum közepes méretű tüskés GABAerg idegsejtjeinek pusztulása. A kórképet a huntingtin fehérje N-terminális régióját kódoló génszakaszban a citozin-adenin-guanin ismétlődés kiterjedése okozza, rendellenes hosszúságú poliglutamin szakasz kialakulásához vezetve. Bár a Huntington-kór a fenti mutáció által genetikailag teljes mértékben meghatározott, a betegség patomechanizmusa még nem teljesen ismert. A mutáns huntingtin fehérje és abból képződő különböző nagyságú aggregátumok számos egyéb, az idegsejtek működésében fontos szerepet játszó fehérjével lépnek kapcsolatba, károsítva azok funkcióját. A csökkent hisztonacetiláció következtében bizonyos gének átíródásának zavara, a mitochondriumok funkciózavara és a glutamát excitotoxicitás biztosan szerepet játszik a kórkép kialakulásában.

Jelenleg a Huntington-kór kezelésében csak tüneti szerek állnak rendelkezésre. Bár a kórkép állatkísérletes modelljeiben számos vegyületet találtak protektívnek, a legtöbb esetben a klinikai vizsgálatok nem tudtak szignifikáns mértékű javulást igazolni. Ebből kifolyólag újabb, teoretikusan terápiás potenciállal bíró vegyületek tesztelésére irányuló vizsgálatok kitüntetett helyet foglalnak el az idegtudományokban.

A patomechanizmus fenti részjelenségeire koncentrálva a humán kórfolyamatot állatkísérletesen elég jól modellező N171-82Q transzgenikus egértörzset használva több, újonnan szintetizált, vagy már egyéb kórképek terápiájában sikeresen alkalmazott vegyület tesztelése és protektív hatás esetén azok szűk spektrumú mellékhatás profilvizsgálatának elvégzése merült fel.

Tesztelésre az alábbiakban részletezésre kerülő vegyületeket választottuk ki. A főként antiepileptikumként alkalmazott valproát bizonyított GABAerg, anti-excitotoxikus és hiszton deacetiláz inhibitor hatással is rendelkezik. Egy új kinurénsav (KYNA) analóg valamint a vér-agy gáton jól penetráló kinurénsav prekursor L-kinurenin (L-KYN) közvetlenül, illetve átalakulva valószínűleg komplex anti-excitotoxikus hatás kifejtésére képesek. Az agyban is előforduló természetes dipeptid, az L-karnozin, antioxidáns, antiglikátor és fémkelátor hatásokkal rendelkezik. A tiazolidindion antidiabetikum pioglitazon bizonyított peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma aktiváló hatásán keresztül valószínűleg javítja a mitochondriális funkciót. Az újonnan szintetizált BZS1514 pedig valószínűleg a mutáns huntingtin fehérje toxicitásáért felelős béta-redő szerkezet felszínéhez képes kapcsolódni.

## II. Célkitűzések

- (i) A valproát, a KYNA analóg *N*-(2-*N,N*-dimetilaminoetil)-4-oxo-1*H*-kinolin-2-karboxamid, az L-KYN, az L-karnozin, a pioglitazon és a BZS1514 N171-82Q transzgenikus egerek túlélésére gyakorolt befolyásának tesztelése.
- (ii) A túlélés-vizsgálatban hatékony szerek (valproát és a KYNA analóg) N171-82Q transzgenikus egerek jellegzetes magatartás-elváltozásaira (csökkent spontán lokomotoros és explorációs aktivitás) kifejtett hatásainak vizsgálata.
- (iii) Magának a kezelésnek (valproát és a KYNA analóg) a hatásának vizsgálata vad típusú állatok spontán lokomotoros és explorációs aktivitására. Továbbá a KYNA analóg magatartásmintát befolyásoló esetleges anxiolitikus vagy sztereotípiá-indukáló hatásának a vizsgálata.
- (iv) A dopamin (DA) és metabolitjainak striatalis koncentrációjának mérése krónikus valproát-kezelést követően esetleges magatartásmintára gyakorolt befolyás kizárása céljából.
- (v) A KYNA analóg az N171-82Q transzgenikus egerek jellegzetes anatómiai és hisztopatológiai elváltozásaira kifejtett hatásának vizsgálata a testtömeg és agytömeg mérése, valamint kifinomult sztereológiai módszerek által.

## III. Anyagok és módszerek

A valproátot, az L-KYN-t, az L-karnozint kereskedelmi forgalomból szereztük be, a pioglitazont a Takeda Pharmaceutical Co., Ltd. (Osaka, Japan) ajánlotta fel kísérleti céljainkra, míg a KYNA analóg *N*-(2-*N,N*-dimetilaminoetil)-4-oxo-1*H*-kinolin-2-karboxamid szintézise a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszerkémiai Intézetében, a BZS1514 szintézise pedig a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Orvosi Vegytani Intézetében történt.

Az eredetileg kereskedelmi forgalomból beszerzett N171-82Q transzgenikus törzset laboratóriumunkban szaporítottuk, a genotípus meghatározása PCR technikával farokmintákból történt.

A fenti 6 anyag transzgenikus állatok túlélésére kifejtett hatásának vizsgálata céljából az állatok 7 hetes korától a hét 5 napján intraperitoneális oltásokat végeztünk, míg az állatok éltek, kontrollként vivőanyaggal oltott transzgenikus egerek szolgáltak.

A valproát és a KYNA analóg a transzgenikus állatok csökkent spontán lokomotoros és explorációs aktivitására gyakorolt befolyásának vizsgálata céljából a fenti oltási sémát használva az állatok 15 hetes koráig végeztünk hetente open-field magatartásvizsgálatot. Ezen

felül az esetleges mellékhatások kizárása céljából vad típusú állatokon open-field tesztben vizsgáltuk a 2 anyag spontán lokomotoros és explorációs aktivitásra gyakorolt befolyását. A KYNA analóg esetleges anxiolitikus hatását elevated plus maze tesztben, sztereotípiaindukáló hatását pedig a sztereotípiasztyálozó skála segítségével tanulmányoztuk.

A kezelés 9. hetében a valproáttal kezelt és kontroll vad típusú állatokat dekapitáltuk, és striatumuk DA, 3,4-dihidroxifenilecetsav (DOPAC) és homovanillinsav (HVA) koncentrációját a megfelelő minta-előkészítést követően fordított fázisú ionpár-képzéses kromatográfiával elektrokémiai detektálás mellett mértük.

A KYNA analóggal kezelt transzgenikus és a kontroll transzgenikus és vad típusú állatok testtömegét hetente mértük, majd amikor elérték a 16 hetes kort, a striatumot tartalmazó agyrészt szövettanilag feldolgoztuk és a striatum térfogatát, a striatumban található idegsejtek számát, azok átlagos térfogatát, valamint a huntingtin aggregátumot tartalmazó idegsejtek számát a sztereológia módszerével becsültük.

A túlélés-vizsgálat eredményeinek statisztikai kiértékeléséhez a Mantel-Cox log rank tesztet használtuk. A többi vizsgálatnál, miután az adatok eloszlását és a varianciák homogenitását megvizsgáltuk, a megfelelő parametrikus, illetve nem parametrikus próbákat alkalmaztuk.

#### **IV. Eredmények**

A valproát és a KYNA analóg szignifikánsan növelte az állatok túlélését, míg az L-KYN-nek, L-karnozinnak, a pioglitazonnak és a BZS1514-nek nem volt ilyen hatása.

A valproát és a KYNA analóg egyaránt szignifikánsan javították a transzgenikus állatok csökkent spontán lokomotoros aktivitásán open-field tesztel vizsgálva. Sőt a valproát szignifikánsan javította a transzgenikus állatok csökkent explorációs aktivitását is, szintén open-field tesztel vizsgálva. Ugyanakkor sem a valproát (vad típusú állatokon open-field tesztel vizsgálva a spontán lokomotoros és explorációs aktivitást, valamint nagy felbontású folyadékromatográfiával vizsgálva a DA, DOPAC és HVA striatalis szintjét), sem a KYNA analóg (vad típusú állatokon open-field tesztel vizsgálva a spontán lokomotoros és explorációs aktivitást, valamint elevated plus maze tesztben vizsgálva az esetleges anxiolitikus, és sztereotípiasztyálozó skála segítségével vizsgálva az esetleges sztereotípiaindukáló hatást) nem fejtett ki jelentős mellékhatást.

A KYNA analóggal történt kezelés szignifikánsan növelte a transzgenikus állatok csökkent testtömegét. Továbbá a kezelés kis mértékben mérsékelte az agytömeg csökkenését és a striatum atrofiját. A striatalis neuronszámban a humán patológiás elváltozásokkal

ellentétben, de a szakirodalmi adatokkal összhangban nem találtunk szignifikáns mértékű csökkenést a transzgenikus állatokban. Viszont a striatalis idegsejtek szignifikáns mértékű atrófiáját figyeltük meg, melynek kialakulását a kezelés teljes mértékben megelőzte. Az anti-huntingtin immunreaktív striatalis idegsejtek arányában a kezelés okozta javulás nem ért el szignifikáns mértéket.

## V. Megbeszélés

Kísérleteinkben a valproát által kifejtett protekció annak komplex farmakológiai hatásával magyarázható. A múlt század hetvenes éveiben számos klinikai vizsgálatot végeztek valproáttal Huntington-kóros betegekben, mely vizsgálatok nem tudtak pozitív hatást igazolni. Azonban 2, az elmúlt évtizedben elvégzett klinikai vizsgálat a valproát pozitív tüneti hatását mutatta. A fentiek tükrében preklinikai vizsgálatunk pozitív eredményeit célszerű fenntartások mellett értékelnünk. A talált hatás további megerősítésére újabb preklinikai vizsgálatok végzése szükséges, és amennyiben azok is a protektív hatást támogatják, újabb, jól megtervezett, a valproátot nagy dózisban mono- vagy kombinációs terápiában nagy betegszám mellett alkalmazó klinikai fázisvizsgálatok tervezhetőek.

Az új KYNA analóg, amely valószínűleg komplex anti-excitotoxikus hatás kifejtésére képes, szintén jelentősen mérsékelte a transzgen okozta jellegzetes elváltozásokat. A szer neuroprotektív hatását sztereológiai vizsgálatokkal sikerült igazolni, ezért a vegyület igen ígéretesnek tűnik további preklinikai és klinikai vizsgálatok szempontjából.

Fontos megemlíteni, különös tekintettel a jövőben végzendő vizsgálatokra, hogy a protektív dózisonál sem a valproát, sem a KYNA analóg esetében nem tudtunk kimutatni mellékhatást.

Az, hogy sem az L-KYN, sem az L-karnozin, sem a pioglitazon, sem a BZS1514 nem javította szignifikáns mértékben az állatok túlélését, esetleg azzal is magyarázható, hogy az anyagok alkalmazása nem a kellő dózisban történt, viszont sokkal valószínűbb, hogy nem képesek a valproáthoz vagy a KYNA analóghoz hasonló mértékű hatás kifejtésére. Mindazonáltal más dozírozás és adagolási mód mellett vagy kombinációs kezelés részeként esetleg alkalmasak lehetnek protekció elérésére, ha egyáltalán Huntington-kór esetén rendelkeznek ilyen hatással.