

EGY MITOKONDRIÁLIS TOXIN, A 3-NITROPROPIONSÁV MAGATARTÁSI TOXIKUS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Lukács Anita doktorjelölt
értekezésének magyar nyelvű összefoglalója

A neurodegeneratív kórképek kialakulásának és patogenezisének pontos mechanizmusa mindmáig nincs tisztázva. Állatkísérletes modelleken ezen betegségek patomechanizmusa jól tanulmányozható, továbbá a jelenleg még megoldatlan terápiában használható szerek hatása is vizsgálható így.

A Huntington-kór (HD; egy autoszomális domináns öröklődésű neurodegeneratív elváltozás) patogenezisében az excitotoxicitás játssza a fő szerepet, amelyben a sejtpusztulás az ingerlő aminosav, általában glutaminsav, receptorának túlaktiválódása miatt következik be. A striatum, mint a bazális ganglionokhoz az agykéregből érkező glutamáterg pályák fő végződési helye, fokozottan érzékeny az excitotoxicitásra. Az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorok túlingerlődése a receptorokat hordozó sejtek apoptózisát vagy nekrozisát okozza, ami funkcionális és magatartásbeli változásokban nyilvánul meg. Ugyanezek a túlingerlődött sejtek, pusztulásukat megelőzően, dopamint szabadítanak fel, amely már önmagában is neurotoxikus hatású.

A mitokondriális toxinok közé tartozó 3-nitropropionsav (3-NP), állatkísérletekben ugyanolyan striatális léziókat okoz, amelyet a humán HD-ban is megfigyeltek, és a hisztológiai károsodás mellett magatartásbeli elváltozásokat is eredményez. Az állatkísérletekben tapasztalt csökkent motoros aktivitást és a károsodott szenzomotoros gátlást HD-betegekben is megfigyelték. A 3-NP magatartásbeli hatásainak pontos ismerete hozzájárulhat ahhoz, hogy a 3-NP a HD állatkísérletes modelljeiben nemcsak hisztológiai, hanem a magatartásbeli hatások is megjeleníthetők legyenek.

A 3-NP által okozott magatartástoxikológiai változások hátterében glutamáterg és dopaminerg hatások egyaránt feltételezhetőek. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a 3-NP hatását ezen neurotransmitter-rendszereken, az NMDA receptor antagonistá, dizocilpin maleát (MK-801); valamint egy dopamin D₂ receptor agonista, quinpirole (QP), és egy antagonistá, sulpiride (SP) került alkalmazásra.

A célkitűzésünk az volt, hogy pontosabban megismerjük a 3-NP által okozott magatartási változások hatásmechanizmusát, lehetővé téve egy kibővített – a jelenlegi ismert hisztológiai elváltozások mellett magatartási hatásokon is alapuló – betegségmodell.

A magatartási vizsgálatokhoz fiatal, felnőtt hím Wistar patkányokat használtunk. A kezelésekre, valamint az ezeket követő magatartási vizsgálatokra két – egy „azonnali” és egy „akut” – kísérleti sémában került sor. A kezelések előtt, valamint az „azonnali” kísérletben 30 perccel, míg az „akut” kísérletben 24 órával a kezelések után, került sor a vizsgálatok elvégzésére. A patkányok intraperitoneálisan kapták 20 mg/kg 3-NP, illetve 0.8 mg/kg MK-801 egyszeri adagját; külön-külön, illetve az anyagok kétféle – fordított sorrendben beadott – kombinációját oly módon, hogy az anyagok injektálása között 30 perc telt el. Emellett a patkányok 5 mg/kg quinpirole és 80 mg/kg sulpiride oldatot kaptak, 15 perccel a 3-NP illetve, az MK-801 adagolása előtt. A kontroll állatokat fiziológiás sóoldattal kezeltük.

A patkányok spontán lokomotoros aktivitását open field készülékben tanulmányoztuk, 10 perces intervallumokban. Az infravörös fénykapuk által detektált mozgások alapján horizontális, vertikális és lokális aktivitási paramétereket számítottunk. A három aktivitási paraméter, valamint a nyugalomban töltött idő kölcsönösen kizárták egymást és együtt teljesen lefedték a regisztrálási intervallumot.

A motoros koordinációs képesség mérésére rotarod tesztet alkalmaztunk. A tesztet megelőzően a patkányok előzetes betanításban részesültek, majd ezt követően került sor az egyenletesen gyorsulva forgó rúdon töltött idő meghatározására, 5 perces intervallumokban.

A patkányok akusztikus ijesztési reflex reakcióját egy hangszigetelt plexidoboz alján elhelyezett piezoelektromos erőmérő segítségével vizsgáltuk. 15-20 perces akklimatizációt követően, tíz alkalommal egymás után, 15 másodpercenként, 110 dB-es, 5000 Hz-es, 200 ms-os sípszóval váltottuk ki az „acoustic startle response”-t, és mértük a „zaj-pozitív” válaszok – ahol az izmok rángása 50 g tömeg által kifejtett súlyerőnél nagyobb erőt hoz létre – számát. Ezt követően a vizsgálatot megismételtük úgy, hogy újabb 15 perces várakozást követően az izomválaszt kiváltó fő ingert 200 ms-mal megelőzte egy 73 dB-es, 1000 Hz-es, 500 ms-os sípszó; mely ún. „pre-pulse inhibition”-t,

PPI-t idéz elő. Detektáltuk még a zaj-pozitív válaszok latenciáját, csúcsamplitúdóját, valamint a csúcsamplitúdó eléréséhez szükséges időt is.

A statisztikai kiértékelés SPSS 9.0 for Windows statisztikai programmal történt. Az adatok eloszlását Kolmogorov-Szmirnov teszttel vizsgáltuk. Normál eloszlás esetén egytényezős variancia-analízist (ANOVA), majd post hoc Scheffe-tesztet ($p < 0.05$) használtunk, nem-normál eloszlásnál pedig a Kruskal-Wallis tesztet ($p < 0.05$) alkalmaztuk. Az ijesztési reflex vizsgálatánál a „zaj-pozitív” válaszok elemzéséhez a χ^2 próbát használtuk ($p < 0.05$). Valamennyi kísérlet elvégzéséhez előzetesen megkaptuk az SZTE Állatkísérleti Tudományos Etikai Bizottság engedélyét.

Az azonnali kísérletben mind a 3-NP, mind az MK-801 összességében szignifikánsan csökkentette az állatok spontán lokomotoros aktivitását. Az MK-801-gyel történt kombinációs kezeléseket követően ugyanez a hatás volt megfigyelhető. Mind a QP mind a SP, 3-NP-val történő kombinációban, szignifikánsan csökkentette a patkányok horizontális aktivitással töltött idejét a kontroll csoportéhoz képest. Ugyanez a szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a vertikális aktivitásnál is, már nemcsak a kontroll, hanem a csak 3-NP-val kezelt patkányokhoz viszonyítva is. A lokális aktivitás mértékét szignifikánsan növelte a QP+3-NP kombinációs kezelés. A QP és a SP MK-801-gyel történő kombinációja a vertikális aktivitás szignifikáns csökkenését eredményezte.

Az MK-801 azonnali adagolása mind önállóan, mind kombinációban, az állatok koordinálatlan, ataxiás mozgását idézte elő, ezért a rotarod teszt nem volt kivitelezhető.

Az akusztikus ijesztési reflex tesztelésénél a zaj-pozitív válaszok számának szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető az MK-801 önálló adagolását követően. Ugyanez a trend látszott a 3-NP-val kombinált csoportokban is. A kontroll csoportnál megfigyelhető enyhe pre-pulse gátlás megszűnt a 3-NP kezelés hatására, amely az MK-801+3-NP kombinációt követően újra jelentkezett, míg az ellentétes irányú kombinációs kezelésnél inhibíció egyáltalán nem volt tapasztalható. A zaj-pozitív válaszok latenciája szignifikánsan csökkent a 3-NP kezelést követően. Ugyanez a trend volt megfigyelhető az MK-801 önálló és kombinációs adagolását követően is. A csúcsamplitúdó elérési ideje szignifikánsan csökkent az MK-801+3-NP kezelési csoportban. A pre-pulse gátlást mutatja, hogy a csúcsamplitúdó szignifikánsan csökkent a 3-NP kezelést követően.

A QP+3-NP kezelés szignifikánsan csökkentette a zaj-pozitív válaszok számát, míg a SP+3-NP kombináció szignifikáns mértékben növelte azt. A kontroll csoportnál

látható kis mértékű pre-pulse inhibíció megszűnt a 3-NP kezelés hatására, azonban a SP adagolása a 3-NP előtt, az eredetinel erősebb gátló hatást eredményezett. Az MK-801-gyel történő kombinációk esetében a QP és SP zaj-pozitív válaszokra kifejtett ellentétes hatása már nem különbözött szignifikánsan.

Az akusztikus ijesztési reflex számszerű paraméterei közül a QP+3-NP kezelés szignifikánsan növelte a latenciát és a csúcsamplitúdó eléréséhez szükséges időt, mind pre-pulse stimulus alkalmazásával, mind anélkül. A zaj-pozitív válaszok csúcsamplitúdója szignifikánsan csökkent a QP+3-NP kezelési csoportban, míg a SP+3-NP kombinációt követően szignifikáns emelkedést mutatott. A QP és SP ellentétes hatása az MK-801-el történt kombinációkban is megfigyelhető volt, kivéve a csúcsamplitúdót, ami mindkét anyag hatására szignifikánsan csökkent a pre-pulse gátlás tesztelésekor.

Mind a 3-NP, mind az MK-801 akut séma szerinti adagolásának hatására csökkent a patkányok spontán lokomotoros aktivitása, ennek mértéke azonban kisebb volt, mint ami az azonnali kezeléseket követően megfigyelhető volt. A SP+3-NP kombinációs kezelés hatására szignifikánsan csökkent a patkányok vertikális aktivitása. A SP és az MK-801 kombinációját követően szignifikáns mértékű horizontális aktivitáscsökkenés jött létre.

Szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető a patkányok rotarodon nyújtott teljesítménye között.

A zaj-pozitív válaszok száma minden kezelési csoportban növekvő tendenciát mutatott. A 3-NP és az MK-801+3-NP kezeléseket követően kifejezett pre-pulse gátló hatás volt megfigyelhető.

A 3-NP kezelés szignifikánsan csökkentette a zaj-pozitív válaszok latenciáját, míg növelte a csúcsamplitúdót a kontroll csoportéhoz képest. A pre-pulse gátlás tesztelésénél pedig a csúcsamplitúdó eléréséhez szükséges idő csökkent szignifikáns mértékben. Ugyanezek a változások a kombinációs csoportokban is megfigyelhetőek voltak, csak nem szignifikáns mértékben.

A QP és a SP akut adagolása sem a 3-NP, sem az MK-801 esetén nem befolyásolta számottevően sem a zaj-pozitív válaszok számát, sem a pre-pulse gátló hatást.

A 3-NP kezelés szignifikánsan növelte a csúcsamplitúdót, amely a QP hatására szignifikánsan lecsökkent. A pre-pulse gátlás tesztelésénél a 3-NP szignifikánsan

csökkentette a csúcsamplitúdó elérési idejét. Szignifikánsan kisebb csúcsamplitúdó volt megfigyelhető a QP+3-NP kezelést követően.

A fenti eredményekből az alábbi következtetéseket lehet levonni:

- A 3-NP által okozott csökkent spontán lokomotoros aktivitás a caudato-putamenben történő csökkent dopamin felszabadulással hozható összefüggésbe – ez alátámasztja a fennálló hisztológiai betegségmodellt.
- A csökkent dopamin felszabadulást kortikostriatális axonok közvetítik, amelyek preszinaptikus gátló hatást fejtenek ki a caudato-putamen dopamin-felszabadítására.
- Az NMDA-antagonista MK-801 – a 3-NP-hoz hasonlóan – szintén csökkent lokomotoros aktivitást okozott, ami ellentétes az irodalmi adatok alapján várt hatással.
- A 3-NP magatartási hatásait – legalábbis részben – nemcsak glutamáterg, hanem dopaminerg mechanizmusok is szabályozzák.
- A 3-NP pozitív hatása az ijesztési reflex reakcióra fokozott dopamin-felszabadulásra utal a nucleus accumbensben.
- A D₂ receptor antagonista SP-del történő kombináció helyreállította a 3-NP által okozott csökkent pre-pulse gátlást, amely alapján feltételezhető, hogy a 3-NP a nucleus accumbens posztzinaptikus D₂ receptorai közvetítésével fejt ki stimuláló hatását.
- A 3-NP-t nem szükséges olyan hosszú ideig alkalmazni, hogy az már a striatális dopaminerg neuronok pusztulását okozza; ugyanis azok a magatartási hatások, amelyek a modell szempontjából lényegesek, már az azonnali adagolását követően is jelentkeztek, és ugyancsak dopaminerg deficiten alapulnak.
- A magatartási metodika lehetőséget adhat a HD szempontjából lényeges károsodásokat előidézni ill. kivédeni képes anyagok hatásának neminvazív tanulmányozására; ellentétben a jelenlegi szövettani modellekkel, ahol a vizsgálat egy állatban nem megismételhető.
- A HD modellezésén túl a bemutatott eredmények hozzájárulhatnak más krónikus neurodegeneratív betegségek terápiájának továbbfejlesztéséhez is.