



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2



**Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyész- és Biomérnöki Kar**

EGIS Nyrt. Preklinikai Kutatási Főosztály

**Gyógyszerhatóanyag-jelölt vegyületek fejlesztésére alkalmas in vitro
neurotoxicitási modellrendszer optimalizálása**

TDK Dolgozat

Készítette:

Hámornik Gábor Bence

Témavezető: Dr. Herberth Balázs

EGIS Gyógyszergyár Nyrt.

Preklinikai Kutatási Főosztály

Molekuláris Farmakológiai Kutatólaboratórium

Budapest, 2011

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés.....	2
II. Irodalmi áttekintés.....	3
1. A neurodegeneráció.....	3
1.1. Neurodegeneratív megbetegedések.....	3
1.2.. Idegsejtpusztulást eredményező stressz hatások.....	8
1.2.1. A ROS szerepe a neurodegeneratív folyamatokban	8
1.2.2. Az excitotoxicitás.....	10
1.2.3. Tápanyagmegvonás.....	11
1.3. Az idegsejtek pusztulásának molekuláris mechanizmusai.....	12
2. A neurotoxicitás in vitro vizsgálatának jelentősége.....	15
III. Célkitűzés.....	17
IV. Anyagok és módszerek.....	18
1. Tenyésztés.....	18
2. Életképesség vizsgálatok.....	19
3. Immuncitokémiai és morfológiai vizsgálatok.....	20
4. Fluoreszcens membránpotenciál esszé.....	20
5. A neurotoxicitási esszékhez felhasznált vegyszerek.....	21
6. Alkalmazott statisztikai módszerek.....	22
V. Eredmények.....	23
1. Vizsgálati módszerek beállítása.....	23
1.1. MTT esszé és DAPI mérés.....	23
1.2. Immuncitokémia - A különféle idegi sejt kultúrák összetételének ellenőrzése.....	25
1.3. FMP.....	27
2. In vitro toxicitási tesztek.....	30
2.1. Reaktív oxigén gyök (ROS) toxicitás vizsgálata.....	31
2.2. Glutamát toxicitás vizsgálata.....	35
2.3. Tápanyag megvonás.....	40
VI. Diskusszió	42
VII. Köszönetnyilvánítás.....	48
VIII: Irodalomjegyzék.....	49

I. Bevezetés

A neurodegeneráció jelensége fontos szerepet tölt be olyan gyakori központi idegrendszeri érintő megbetegedések kialakulásában, mint az Alzheimer-, a Huntington-kór vagy az időskori demencia, illetve a depresszió. A neurodegeneratív betegségek gyakoriságának folyamatos növekedése erősíti az igényt - ezen elváltozások kiküszöbölésére vagy visszafordítására alkalmas - neuroprotektív hatóanyagok kutatására és fejlesztésére.

Az originális gyógyszerkutatás korai fázisában szükség van egy modellrendszerre, amely segítségével vizsgálhatóak lehetnek ezen neurodegeneratív folyamatok, valamint a neuroprotektív-jelölt vegyületek hatásai. Az EGIS Preklinikai Kutatási Főosztály laboratóriumában nagyszámú vegyület tesztelésére alkalmas (a lehetőségekhez mérten megbízható, olcsó és gyors) neurotoxiciási modellrendszer létrehozásában és optimalizálásában vettem részt.

A megfelelő körülmények között tartott idegsejtek reális képet adhatnak a sejtszinten lejátszódó jelenségekről, mint az idegsejtek életben maradását - elpusztulását szabályozó folyamatok, ezért primer neurális tenyészeteken modelleztük az idegrendszeri degenerációk hátterében álló ismert és feltételezett sejtpusztító hatásokat. A vizsgálatok alatt az idegi sejtenyészeteket: **1.) reaktív oxigén gyök koncentrációnövekedésének, 2.) éheztetésnek** (különbféle összetételű médiumokkal kiváltott megvonási hatások) **3.) túlingerlés okozta sejtpusztulásnak** (megemelt glutaminsav koncentrációval indukált extraszinaptikus NMDA receptor mediálta excitotoxicitás) tettük ki.

A különféle modellekben kerestük a teljes és köztes toxikus kezelések mértékét, illetve összehasonlítottuk az eltérő vizsgálati módszerek hatékonyságát az egyes hatások kimutatásában.

Sikerült megállapítani egy olyan költséghatékony protokollt, amelyben immuncitokémiai eljárásokon alapuló előzetes vizsgálattal ellenőrzött tenyészeteken egyszerű életképességi teszt és a neuron-aktivitást vizsgáló membránpotenciál-változáson alapuló fluoreszcens eljárás kombinálásával a fenti hatások széles tartományban vizsgálhatóak.

II. Irodalmi áttekintés

1. A neurodegeneráció

A neurodegeneráció fogalma magában foglalja a neuronok mind funkcionális mind strukturális leromlását. Ez a jelenség számos napjainkban elterjedt központi idegrendszert érintő megbetegedésben játszik szerepet, úgymint az Alzheimer-, a Huntington, a Parkinson-kór vagy az amiotrófiás laterális szklerózis, valamint fontos szerepet tulajdonítanak neki a depresszió patogenezisében is [1].

Az idegrendszeri betegségek számának növekedésében, többek között az agyelöregedés is szignifikáns szerepet játszik, ezért azok legfőképpen az idősebb emberek körében fordulnak elő. A modern nyugati világban az átlag életkor meghosszabbodásával összefüggésben az említett megbetegedések gyakorisága is megnőtt.

A fentiek miatt az utóbbi időben a neurodegeneratív betegségek intenzív célpontjaivá váltak a gyógyszerkutatásnak. A hatóanyag fejlesztést nehezíti, hogy ezen betegségek pontos patomechanizmusa nem teljesen tisztázott, ezért a gyógyszerhatóanyag-jelölt vegyületek molekuláris támadáspontjainak meghatározása különösen nehéz feladat.

1. 1. Neurodegeneratív megbetegedések

Az **Alzheimer-kór (AD)** korunk legelterjedtebb neurodegeneratív betegsége, világszerte mintegy 26,6 millió ember szenved benne és főleg a 65 év feletti korosztályt érinti [2]. A betegség a nevét az őt először 1906-ban leíró német pszichiáter és neuropatológus, Alois Alzheimer után kapta [3].

Az AD kórképe nagyban függ a beteg személyiségétől, de létezik számos általános tünet is. Ilyen szimptómák a zavarodottság, a beszédképesség leromlása, a túlzott ingerlékenység, hangulatingadozások és az általános érzékszervi leromlás. A betegség végső soron az agyi funkciók elvesztéséhez és halálhoz vezet[4].

Az AD oka tulajdonképpen egyelőre ismeretlen, bár több elmélet létezik a betegség kialakulásának molekuláris hátterére. A legrégebbi elmélet a kolinerg hipotézis, amely szerint az AD hátterében az acetilkolin neurotranszmitter agyi szintézisének csökkenése áll [5]. Az elmélet nem nyert széles támogatottságot, mivel a kolinerg deficit elleni kezelések hatástalanok voltak a betegséggel szemben [6].

Újabb elmélet az amiloid hipotézis, amely szerint a betegség kialakulásnak oka az idegsejtek közti térben megjelenő amiloid béta ($A\beta$) fehérje plakkok [7]. Az $A\beta$ fehérje az amiloid béta prekursor proteinből (APP), transzmembrán fehérjéből keletkezik eddig nem ismert okok miatt. Egy másik elmélet szerint a szintén APP-ből enzimes hasítással keletkező N-APP felelős a neurodegeneratív folyamatok beindításáért. Az N-APP a DR6 ún. halál receptorokhoz kapcsolódva beindítja az idegsejtek önmegsemmisítő mechanizmusát. Ezek a receptorok pedig azokon az agyterületeken a legelterjedtebbek, amelyeket az AD okozta neurodegeneráció a leginkább érint [8].

A legújabb elmélet szerint az amiloid plakkok mennyisége nem jól korrelál a neuron vesztéssel [9]. Ez a megfigyelés vezetett az ún. tau hipotézishez, amelynek alapja a tau protein kiválása az agyban. Ez a központi idegrendszerben széles körben elterjedt fehérje stabilizálja a mikrotubulusokat az idegsejtekben. Ennek a proteinnek a hiperfoszforilált izoformája képes hozzá kapcsolódni más hiperfoszforilált tau proteinekhez, ezáltal a neuronokban ún. neurofibrilláris rostokat hoz létre, ha ez bekövetkezik, a sejtekben a mikrotubulus rendszer összeomlik és beindulnak a neurodegenerációs folyamatok [10].

Létezik még elmélet, amely szerint az AD oka közé sorolható a mielin hüvely időskori leépülése, amely az idegsejtek közti szinaptikus kapcsolat megszűnéséhez és a neuronok pusztulásához vezet. A mielin javítási mechanizmusának homeosztázisa összefüggésben van, olyan fehérje-kiválási folyamatokkal, mint amilyen a $A\beta$ -é és a tau proteiné [11].

Az AD kezelésére többféle gyógyszerhatóanyagot fejlesztettek ki a múltban. Ezek első csoportja a kolinészteráz-enzim gátlók, amelyek megakadályozzák az acetilkolin lebomlását, ezáltal növelik az acetilkolin koncentrációját a szinapszisokban [12]. Ezek közé a hatóanyagok közé tartozik a donepezil, rivastigmin és a galantamin, amelyek hatásosak lehetnek az AD korai szakaszában, a haladó fázisban azonban csak a donepezil alkalmazása javasolható. Továbbá számos mellékhatásuk is ismert, úgymint gyakori hányinger és hányás, ritkább esetben szívritmus zavar és evészavarok [13].

A hatóanyagok másik csoportját az NMDA (N-metil-D-aszparaginsav) receptor antagonisták alkotják. Az NMDA receptorok a serkentő glutamát neurotranszmitter rendszer tagjai, azonban a rendszer túlstimulálása sejtpusztuláshoz vezethet

(excitotoxicitás). Ez a toxikus folyamat lényeges szerepet játszik az AD patomechanizmusában. A memantin nem kompetitív antagonistája a receptornak, ezáltal blokkolja azt, és megakadályozza az excitotoxikus folyamatokat [14]. A hatóanyag hatásosnak bizonyult az AD mérsékelt fázisában, azonban a korai fázisban a hatása ismeretlen [15]. és számos kellemetlen mellékhatással rendelkezik, úgymint hallucinációk, fáradtság és fejfájás.

Mivel az eddig felfedezett hatóanyagok nem nyújtanak megfelelő hatást a betegség minden fázisára, valamint számos markáns mellékhatással rendelkeznek és betegség növekvő gyakorisága miatt, a lehetséges AD hatóanyagok kutatása és fejlesztése fontos célpontja az originális gyógyszerkutatásnak.

Szintén a 65 év feletti népesség körében gyakori a központ idegrendszeri másik neurodegeneratív idiopátiás betegsége a **Parkinson kór (PD)**, amelyet leírójáról James Parkinson után neveztek el.

A PD központi eseménye a középagy substantia nigra régiójában elhelyezkedő dopaminerg idegsejtjeinek pusztulása, amely folyamatnak a kiváltó oka egyelőre nem teljesen tisztázott [16].

A betegség legáltalánosabb szimptomái a motoros funkciók romlása, amely remegésben, görnyedt testtartásban, kóros merevségben és egyéb mozgás zavarokban nyilvánul meg. A PD későbbi szakaszában általános demencia lép fel, ami szenzoros, emocionális (depresszió, szorongás) és alvás zavarokban jelentkezik. Az agyban lejátszódó neuronpusztulás oka az α -szinuklein fehérjék aggregációja az idegsejtekben, amelyek alkotják az ún. Lewy-testeknek. A protein a neuronális citoszól fehérje tartalmának 1%-át alkotja, de a szerepe a normális idegsejt működésben nem tisztázott [17]. A PD másik lehetséges okozói, a dopamin és norepinefrin neurotranszmitterek enzimes bontatlan oxidatív metabolitjai által alkotta, neuromelanin lerakódások az idegsejtekben [31].

Egyelőre nem létezik olyan hatóanyag, amely alkalmazásával megszüntethető a PD, de léteznek motoros szimptomák kezelésre alkalmas vegyületek. Ezeknek három főcsoportjuk ismert, úgymint a levadopa típusú szerek (katekolamin O-metiltranszferáz és dopamin dekarboxiláz inhibitorok kombinált adása), dopamin agonisták és a MAO-B (monoamin oxidáz B) inhibitorok. Ezek a hatóanyagok a normális dopaminszint fenntartását próbálják biztosítani. Ilyen felsorolásképpen a carbidopa, a bromokriptin és a szelegilin. A kezelés másik problémái, a hatásosság mellett, az olyan gyakori mellékhatások, mint a diszkinézia

(akaratlan céltalan mozgásformák megjelenése) [18]. Előre haladott esetekben, amikor már a gyógyszeres kezelés nem hatásos mélyagyi stimulációt alkalmaznak a PD kezelésére [19].

Ahogy az AD úgy a PD esetében is kijelenthető, hogy a tüneti kezeléson kívül, amelynek az eredményessége is kérdéses, hatékony ellenszert és teljes gyógyulást vagy visszafordíthatóságot biztosító hatékony farmakon továbbra sem létezik, ezért valamint a betegség elterjedtsége miatt élénken zajlanak a PD-ral kapcsolatos farmakológiai kutatások.

A modern társadalmakban elterjedt **hangulatzavarok**, mint amelyeknek a legelterjedtebb képviselője, a **depresszió** patogenezisében is felfedezték a neurodegeneráció szerepét [20, 21]. A betegség egyénenként változó, főbb tünetei között szerepel a kóros melankólia, a kilátástalanság, a reménytelenség, az indokolatlan büntudat és az önhibáztatás. Előre haladott állapotban a depresszió súlyos pszichózisokba csaphat át, úgymint kényszerképzetek és hallucinációk megjelenése.

A betegség molekuláris hátterében sokáig a monoamin-hipotézis volt uralkodó, amely szerint a monoamin neurotranszmitterek alacsony szintje, legfőképpen a szerotoniné okozza ezt a kóros hangulatzavart. Ezért számos szerotonin szint szabályzó hatóanyagot fejlesztettek ki a múltban, ilyenek egyik csoportja az SSRI-k (szelektív szerotonin reuptake inhibitorok), ezek legáltalánosabb képviselője a fluoxetin (Prozac). Egy másik csoportja a hatóanyagoknak a már említett MAOI-k, amelyek a szerotonin lebontását gátolják [22].

A depresszió patogenezisében azonban számos más folyamat is részt vesz, közéjük tartozhat az egyes agyterületeken bekövetkező neurodegeneráció. A depresszió esetén fellépő neurodegeneratív folyamatok oka és pontos mechanizmusa nem teljesen ismert, de egyes kutatások szerint a depresszióban szenvedők esetében gyakran fellépő stressz indukálta agyi gyulladásos folyamatok játszanak szerepet, amelyek többféle szignálútvonalon keresztül aktiválhatják az idegsejtek pusztulási mechanizmusait [23].

Ezen idegsejt-pusztulási folyamatokat megakadályozó és visszafordító neuroprotektív hatóanyagok, áttörést jelenthetnek a betegség kezelésében, mivel az eddig ismert antidepresszánsok számos mellékhatással rendelkeznek és főleg tüneti kezelésre alkalmasak [24].

Az eddig említett krónikus neurodegeneratív megbetegedéseken kívül léteznek akut behatások, amelyek hasonló neurodegeneratív elváltozásokat eredményezhetnek. Ezek közül a leggyakoribb a szélütés, azaz **stroke**, amely a világon a második leggyakoribb halálozási ok a WHO szerint.

A stroke-nak nevezzük azt az agyi érkatasztrófát, amely az agyműködés általános vagy gócos zavarával jellemezhető, gyorsan kialakuló tünet együttes és több mint 24 órán át fennáll (WHO definíció). A betegsége két típusra lehet osztani, úgymint az iszkémiás stroke, amely során az agyi vérellátás szenved kárt érzékszékület vagy érelzáródás következtében, ezáltal az érintett agyterület tápanyag és oxigén ellátottság csökken, időszakosan megszűnhet. A másik ritkább típus a vérzéses stroke, amely esetén agyi állományvérzés is bekövetkezik [25].

A stroke-nak számos tünete van köztük kettős látás, beszédformálási nehézségek, szédülés fejfájás és végül hirtelen eszméletvesztés. A bekövetkező stroke sürgősségi kezelése általában véralvadás gátlókkal történik, nagyobb erek elzáródása esetén műtéti beavatkozás szükséges [26].

A szélütés maradandó károsodásának mértéke nagyban függ a beavatkozás idejétől, valamint attól, hogy az érkatasztrófa mely agyterületet érintette. A stroke akár okozhat féloldali bénulást, látótér- és érzéskiesést és végső soron akár halálhoz is vezethet [26].

A betegség patomechanizmusa (iszkémiás kaszkád) a neuronokat ért oxigén és tápanyag ellátás következtében fellépő energiahányos állapoton alapul. Az energiahányos állapot miatt a sejt nem tudja fenntartani a megfelelő ion háztartását, ennek következtében a Ca^{2+} ionok koncentrációja megnő a sejtben. Ennek hatására a glutamát szabadul fel az idegsejtekből, ami a későbbiekben részletesen taglalt excitotoxikus sejtpusztulási folyamatokhoz vezet [27].

A stroke mechanizmusa számos támadáspontot biztosít a gyógyszerhatóanyagok számára, ezért a terápiás hatékonyság maximalizálásának érdekében jelenleg intenzív kutatások zajlanak hatékonyabb stroke ellenes készítmények kifejlesztésére.

Az előzőekben említett leggyakoribb neurodegeneratív elváltozásokon felül, még számos egyéb elterjedt krónikus és akut betegség létezik, amelyek ellen egyelőre nem létezik igazán hatékony terápiás készítmény. Ezek között megemlíthetjük a krónikus elváltozásként a **sclerosis multiplex (MS)**, az **amilotrófiása laterális sclerosis (ALS)**, a **Huntington-kór**, **bakteriotoxinok** hatása vagy egyéb agyat érintő **fizikai sérülések** [28] [29].

1.2. Idegsejtpusztulást eredményező stresszhatások

Habár a központi idegrendszert érintő betegségek kiváltó okai és hatásmechanizmusaik csak részleteiben ismertek, de a rájuk általánosan igaz, hogy az idegsejt pusztulást okozó közvetlen hatások és az azok által megindított sejtdegradációs folyamatok sok esetben már feltérképezettek. A különböző neurodegeneratív elváltozások során a közvetlen neurotoxikus hatások egymással szoros összefüggésbe lépnek fel, de a köztük lévő kapcsolatok szintjén sok kérdést rejtenek magukban.

A neuronok degradációjához, abnormális működéséhez esetenként pusztulásához az agyi elváltozásokat okozó megbetegedésekben a sejtek környezetének megváltozása vezet. A normális működést biztosító környezetet jelenti a megfelelő tápanyag és oxigén ellátottság mellett, a növekedési faktorok és egyéb intracelluláris szabályozó molekulák és az idegi impulzusok optimális szintje is. A neurodegeneratív betegségek szinte mindegyikében jelen lévő sejtszintű stressz forrás a megemelkedett reaktív oxigén gyökök koncentrációja, a túlzott extraszinaptikus ingerlést kiváltó hatások, vagy a megfelelő tápanyag hiánya. Egyes betegségek esetén konkrét kiváltó hatások is ismertek, mint a hangulati betegségeket kiváltható hosszú idejű magas stresszhormon-koncentráció [30], az AD során keletkező amiloidok jelenléte [7], a PD sejtpusztulásában szerepet játszó α -szinuklein és neuromelanin [31] vagy az idegrendszeri gyulladások során a különféle interleukinek megjelenése [32]. A felsorolt hatások következtében beinduló sejtdegradációs folyamatok, mint az apoptózis, nekrozis vagy a túlzott endocitózis következtében végbemenő autofágia elemeiben szintén ismert folyamatok, de pontos illeszkedésük az egyes kórképekbe nem tisztázott.

A fenti faktorok közül mindegyik szimulálására ismert in vitro modellrendszer, de jelen dolgozatomban csak a legáltalánosabbakkal, mint a szabad oxigéngyökök (ROS), az excitotoxicitás és a különféle tápanyagok hiányában fellépő sejtd degenerációval foglalkoztam.

1.2.1. A ROS szerepe a neurodegeneratív folyamatokban

A reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species, ROS) nevezzük az oxigént tartalmazó kémiaiailag reaktív molekulákat. A reaktivitásukat általában a párosítatlan vegyérték elektronjaiknak köszönhetik. A ROS vegyületek fontos szerepet játszanak a normális sejt

redox homeosztázisában, valamint egyes molekuláris szignálútvonalakban. Azonban számos külső vagy belső stressz behatás következtében a ROS szint kórosan megnövekedhet (oxidatív stressz), amely következtében a sejtstruktúra sérülhet és végső soron a sejt pusztulásához vezethet [33].

A reaktív oxigén gyökök nagy része a mitokondriumban keletkezhet, az elektrontranszport lánc I. és III. komplexének tökéletlen működésének következtében. Az I. komplex működése során a mitokondrium lumenében található NAD(P)H-k leadják elektronjaikat a flavinmononukleotidot és számos Fe-S fehérjét tartalmazó I. komplexnek, amely továbbítja a koenzim Q transzport molekulának. Ez a lépés nem mindig tökéletes, az ubikinonra nem kerül át mindkét elektron, az egyik vagy mindkettő kiléphet a transzport láncból. Az elszivárgó elektronok másik lehetséges forrás lehet a komplex III., amely során a koenzim Q-ról kerülnek az elektronok a citokróm C fehérjére. Ezekben az esetekben a citoszólba kiszabaduló elektronokat a sejtplazmában a szabad oxigén molekulák veszik fel, O^{2-} -t szabadgyököt alkotva. Ezeket és további származékait összefoglalóan nevezzük a reaktív oxigén gyököknek, azaz ROS vegyületeknek (I. táblázat [34]).

Szabadgyökök	
név	képlet
Hidroxil-gyök	$OH^{\bullet}$
Szuperoxid-gyök	$O_2^{\bullet-}$
Nitrogénoxid-gyök	$NOO^{\bullet}$
Lipidperoxil-gyök	$LOO^{\bullet}$
Nem gyökök	
név	képlet
Hidrogén-peroxid	H_2O_2
Szinglét oxigén	$^1O_2 (^1\Delta g)$
Hipoklórossav	$HOCl$
Ózon	O_3

1. Táblázat ROS vegyületek és származékainak összefoglaló táblázata.

Az reaktív oxigén gyököket normális körülmények között a sejtekben a szuperoxid-dizmutáz enzim alakítja H_2O_2 -vé, amelyet a kataláz vagy a glutation-peroxidáz enzim alakít végül vízzé és oxigénné. Valamint számos kismolekulájú antioxidáns is felelős a sejtek redox egyensúlyának fenntartásáért, úgymint az aszkorbinsav, a tokoferol és a glutation.

Amikor a mitokondriális elektrontranszportlánc sérül vagy az antioxidáns folyamatokban zavar lép fel, a reaktív oxigén gyökök koncentrációja megnő és azok oxidálhatják a sejtet felépítő biomolekulákat, úgymint a fehérjéket, lipideket (membránalkotó telítetlen lipidek a legveszélyeztetettebbek), DNS-t és RNS-t, amelyek ezáltal már nem tudják ellátni a funkciójukat és a folyamat végső soron sejthalálhoz vezet [35].

Az oxidatív stressz fontos szerepet játszik az előzőekben felsorolt neurodegeneratív betegségek molekuláris patomechanizmusában [36]. Az iszkémia során az emelkedett Ca^{2+} szint következtében, beindulnak az apoptikus folyamatok, amely eredményeképpen az elektrontranszport lánc tagja, a citokróm c kiválik a mitokondrium membránjából. A reperfüzió megindulása után, ugyan a sejt Ca^{2+} szintje helyre áll, de a sérült elektrontranszportlánc következtében a mitokondriális ROS termelődés megnő ([37]. Az olyan idiopátiás betegségek, mint amilyen az AD, a PD, az ALS és a Huntington kór gyulladásos folyamataiban is részt vesznek a ROS vegyületek az aktivált mikroglia sejtek révén, amelyek az központi idegrendszeri immunrendszer fontos tagjai [32]. Ugyanakkor egyes kutatások szerint, az amiloidok direkt is képesek a mitokondrium membránjában lipid peroxidációt előidézni, ami a membránban elhelyezkedő elektrontranszportlánc sérüléséhez vezet és ez ROS felszabadulást okoz [38].

Az öregedés szabad gyök teóriája szerint, a kór előre haladásával bekövetkező általános demencia hátterében a mitokondrium progresszív funkcióvesztésének köszönhetően, a növekvő ROS szint állhat. [38].

1.2.2. Az excitotoxicitás

Az excitotoxikus folyamatok fő mediátora a glutamát, amely fontos központi idegrendszeri serkentő neurotranszmitter aminosav is. A glutamát koncentrációja még a neuronok közti szinaptikus résben sem nagyobb 1mM-nál és ott is csak msec-okig van jelen. Azonban a szinapszison kívülre kerülve (például a visszavétel elégtelensége miatt) extraszinaptikus glutamát receptorokhoz (NMDA receptorok egy csoportja) kapcsolódik [39]. Az NMDA receptoroknak az agonista kapcsolódásának hatására Ca^{2+} permeábilis ioncsatornája kinyílik és a kalcium a sejtekbe áramlik. A megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} szint következtében számos enzim (foszfolipázok, proteázok, endonukleázok) aktiválódik, amely miatt beindulnak a sejtdegradációs folyamatai [1]

Az excitotoxicitás jelentős szerepet játszik az eddig taglalt neurodegeneratív elváltozásokban is [28]. Az AD nem glutamát eredetű, de fontos szerepe van a betegség kialakulásának előrehaladott szakaszában. Az A β okozta megemelkedett [Ca²⁺] szint a gliasejtek citoplazmában blokkolhatja a glutamát visszavétel az extracelluláris térből, ami glutamát szint emelkedését és a környező neuronokon excitotoxicitást okozhat [40]. Az excitotoxikus behatás miatt megnövekedett [Ca²⁺]_i szint kedvezhet az olyan hiperfoszforilációs folyamatoknak, mint a tau protein alkotta aggregátumok kialakulása [41].

Az excitotoxicitás jelentősége különösen nagy szereppel bír a stroke patomechanizmusában, mivel részfolyamata az iszkémiás kaszkádnak, amit később a tápmegvonással kapcsolatban részletezek.

Egyes kutatások alapján az unipoláris depresszió patogenezisében is fontos szerepet játszik az excitotoxicitás. A depresszióban szenvedők bizonyos agyterületein megnövekedett glutamát szintet lehet tapasztalni. Az NMDA receptor mediálta sejtpusztulás főleg a hippocampusz területre lokalizálódik, amely fontos szerepet játszik a hosszútávú memóriában és a depresszió egyik legjellemzőbb tünetében, a szorongásérzetben. Ezért nem meglepő, hogy számos NMDA antagonistáknak antidepresszáns tulajdonsággal [42]

1.2.3. Tápanyag megvonás

A tápanyag megvonásos körülményeket leegyszerűsítve két csoportra különíthetjük el. A tápanyagokra, amelyek közül legfontosabb a neuron főenergia forrására, a glükóz, az oxigén ellátottságra illetve a sejt közötti tér sokféle szabályozó molekulájának összetételében bekövetkező kóros változásokra.

A neuronok fő energia forrása a glükóz, másféle cukrot nem képesek hasznosítani. Ennek megvonása energiahiányt eredményez, ami az agysejtekben beindítja az ún. iszkémiás kaszkádot. Az érelzáródás (iszkémia) következtében fellépő energiahiány, ami az érintett neuronokban ATP hiányban nyilvánul meg. Emiatt az ATP-függő ion-pumpák nem tudják fenntartani az egészséges ion arányt, a sejtek depolarizálódnak, ennek eredményképpen kinyílnak a feszültségfüggő Ca²⁺ csatornák, minek következtében megnő a kalcium koncentráció a citoplazmában, ami glutamát felszabadulást eredményez. Ez beindítja az excitotoxikus folyamatokat, amelyek a neuron pusztulásához vezetnek [1].

Az agyba a véráram nem csupán tápanyagot és oxigént szállít, hanem számos faktort, amik a sejtek működésének összetett szabályozásában vesznek részt. A szabályozó molekulák, mint a különböző növekedési faktorok (BDNF, NT3, GDNF; agyi növekedési faktorok, glia növekedési faktor stb.), hormonok (kortikoszteron, adrenalin, inzulin stb.), vitaminok, interleukinek és citokinek stb. – ideális összetétele nélkülözhetetlen a neuronok egészséges működéséhez [43] [44].

Ezek közül a legfontosabb talán a BDNF, amelynek nagy jelentőséget tulajdonítanak számos neurodegeneratív elváltozás patogenezisében is [45]. Így számos depresszióban szenvedő beteg hippocampusz agyterületén mértek normálisnál alacsonyabb BDNF szintet [46]. Egyes kutatások szerint a BDNF szintemeléssel kivédhető lehet az amiloid okozta toxicitás [47] és gátolhatóak az excitotoxikus folyamatok is [48].

Napjaink kutatási eredményéből kitűnik, hogy a neurális faktorok és hormonok szerepe és kölcsönhatásai az agyban lejátszódó folyamatokban még számos kérdést vetnek fel a jövő tudósai számára.

2.1. Az idegsejtek pusztulásának molekuláris mechanizmusai

Az idegsejtek pusztulása mögött többféle molekuláris mechanizmus állhat, úgymint az apoptózis, a nekrozis és az autofágia. Fontos megjegyezni, hogy az idegsejtek nagyszámú pusztulása esetén az egyes sejthalál típusok egymás mellett és akár egymás következményeként is jelen lehetnek [49].

Az **apoptózis** a többsejtű élőlények programozott sejthalála. A folyamat során a sejt összezsugorodik, a citoskeleton és a DNS állomány feldarabolódik, de a membránok integritása és az organellek épen maradnak. A sejt zárt ún. apoptotikus testekre tagolódik szét. Az apoptotikus testeket a szervezetben a makrofágok gyorsan bekebelezik, mielőtt azok tartalma a környező sejtekben gyulladásos folyamatokat indítanának be, ellentétben a későbbiekben taglalt nekrozissal.

Ez a folyamat nem csak stressz behatás következtében játszódhat le, hanem a normális egyedfejlődés része. Ennek tipikus példája az ujjak kialakulása, amelyek embrió egyes stádiumában egyfajta úszóhártya köt össze, az ezeket alkotó sejtek apoptotikus úton pusztulnak el [1].

A szervezet sejtosztódás és sejtpusztulás homeosztázis szabályozásába is lényegesen szerepe van a programozott sejthalálnak, mivel naponta átlagosan az ember 10^{15} sejtéből

10^{12} elhal, és újra cserélődik ki (legintenzívebb a csontvelőben és a bélnyálka hártájában) [50]. Az apoptózis fontos szerepet játszik továbbá a veszélyesnek ítélt, például a rákos sejtek eltávolításában is [1].

Az apoptotikus sejtdegradációt kaspáz enzimek végzik, amelyeknek különböző tagjai proteolitikus és nukleáz aktivitással rendelkeznek. Két csoportjuk létezik az iniciátor (kaspáz 2, 8, 9 és 10) és az effektor kaspázok (kaspáz 3, 6 és 7). Az iniciátor kaspázok aktiválódnak először. Ezek proteolízis révén aktiválják az másik csoportot az effektor kaspázokat, amelyek ténylegesen a sejtalkotók lebontását végzik. A kaspázok inaktív formában (prokaspáz) folyamatosan jelen vannak a sejtekben [1].

A kaspáz aktiválásnak két féle molekuláris útvonala létezik az ún. extrinszik (külső) és intrinszik (belső), attól függően, hogy honnan érkezik, hol keletkezik a szignál, amely a sejt apoptotikus folyamatait beindítja. Az intrinszik útvonal középpontjában a mitokondrium áll. Amikor az aerob respiráció valamilyen stressz behatás miatt, például oxigén vagy energiamegvonás miatt összeomlik, a mitokondrium membránja pórusok keletkeznek, amiken keresztül az ún. SMAC (small mitochondria. derivated activator of caspase, kis mitokondriális kaspáz aktivátor) fehérjék a mitokondriumból kiáramolhatnak a citoszólba. Ott kötődnek, és deaktiválják az IAP (inhibitory of apoptosis proteins, apoptózis inhibitor fehérje) proteineket. Az IAP-ek az iniciátor kaspázokat inaktiválták eddig. Következő lépésekben a már aktív kaspázok végzik el a sejtdegradációs folyamatokat [51, 52].

A mitokondrium elektrontranszportlánc sérülése miatt a citoszólba kiszabadult citokróm c is iniciálhatja az apoptózist. A citoplazmában a citokróm c Apaf-1 (apoptotikus proteolitikus aktivátor faktor) proteinnel és a prokaspáz 9-cel alkotja, az ún. apoptozómát, ami aktiválja az effektor kaspázokat. A citokróm c kiszabadulása szintén a mitokondriális pórusokon keresztül történik, amelyek képződését a Bcl-2 (B-sejtleukémia) fehérje regulálja [53].

A másik útvonal az extrinszik, amely receptor mediált, a sejt a környezetéből kap jelet, amelyet az ún. halál receptoraival érzékel. A receptorokat két jellemző típusa van, a TNF vagy FAS receptorok. A receptorokhoz kapcsolódhatnak a szervezet gyulladásos folyamataiban keletkezett citokinek, vagy direkt a makrofágok ún. Fas-ligandjai is. Ez a szignálútvonal szintén a kaspáz kaskád beindulását eredményezheti, ami által bekövetkezik programozott sejthalál [1, 54].

A korábban felsorolt stressz hatások is indukálhatnak apoptózist. A ROS szint emelkedése a mitokondriumban Bcl-2 fehérjék aktiválta pórusképződést okoz, amelyen keresztül a kiszabadult citokróm c beindíthatja az apoptotikus folyamatokat [55]. Az excitotoxikus

folyamat során a Ca^{2+} aktiválja a kalpain (kalcium-függő nem lizoszomális cisztein proteáz) fehérjét, amely hasítás révén indítja be a kaspáz kaskád [56]. Az iszkémiás folyamatokban mind. a mitokondriális membrán károsodás útján létre jövő citokróm c felszabadulás mind az iszkémiás kaskád excitotoxikus részfolyamata is képes apoptózist előidézni [56, 57].

A sejt nem programozott sejthalála a **nekrózis**, amelynek legfőbb tulajdonsága, hogy a membránintegritás megszakad és a kontrollálatlan sejtlyzisz során a sejt beltartalma a környezetébe kerül, ami további gyulladásos, nekrotikus folyamatokat indíthat be a környező sejtekben. A nekrotikus sejthalál általában, valamilyen intenzív hirtelen stressz behatásnak köszönhető, mint például bakteriális fertőzés, számos toxinok, égési, fagyási sérülések és a hipoxia [58].

A nekrozis során szintén a Ca^{2+} koncentráció sejtbeli megnövekedése játszik fontos szerepet, amely aktiválja kalpainokat és katepszineket, amelyek elbontják a citoskeleton, a normális sejtciklusért felelős növekedési faktorokat és fontos szignál útvonalak enzimeit, mint a protein kináz C [59]. A nekrotikus folyamatok nem igényelnek ATP energiát, ellentétben az apoptózissal [60].

Az apoptotikus és nekrotikus folyamatokat egymással párhuzamosan is végbe mehetnek a sejtben, valamint a sejt energiaállapotától függően átcsaphatnak egyikből a másikba. Az ATP hiányos állapot a nekrotikus folyamatoknak kedvez, míg az aktív apoptózis ATP energiát igényel [61].

Az **autofágia** a sejt előregedett sejtalkotóinak a lizoszomális megemésztésében, azaz a sejtben belüli újrahasznosító folyamatokban játszik szerepet, amik nélkülözhetetlenek a sejtek normális működéséhez. Emlősökben például az autofágia szerepet játszik az embriógenézisben, a vörösvértestek érésében és az immunrendszer működésében. Az autofágia képes eltávolítani a károsodott, vagy feleslegessé vált sejt szervecskéket [1]. Zavara az emlősökben kontrollálatlan sejtosztódás (rák), neurodegeneratív elváltozások, szív és érrendszeri betegségek kialakulásához, valamint sejtben belüli paraziták megjelenéséhez vezethet [62].

A nem szükséges sejtalkotókat körbefogó autofagoszómák kialakulásában, irányításában és a folyamatok szabályozásában PIP_3 kinázok és ún. Atg (Bcl-1) proteinek vesznek részt. Az autofagoszóma kialakulását követően egyesül a lizoszómákkal, amelyekből érkező savas hidrolázok (D katepszinek) elbontják a fagocitált sejtalkotókat [63].

Az autofágiának fontos szerepe van a tápanyaghiányos, főképpen a növekedési hiányos állapotokban, hiszen ilyenkor a sejt rákényszerül a nem létfontosságú sejtservecskeinek felemésztésére energianyerés céljából. Ez a túlzott emésztés vagy az autofágiát szabályzó mechanizmusok zavara programozott sejthalálhoz vezethet [63].

Számos gyakori neurodegeneratív elváltozás esetében van szerepe az autofágiának (AD, PD, ALS és iszkémia) [64]. A jelentősebbek ezek közül, az AD esetében a katepszin D túlzott expressziója, ami a neurofibrilláris protein lerakódások kialakulásának valószínűségét növeli [65] és az alacsony növekedési faktor koncentráció miatti autofagoszóma szám növekedés [66].

2. A neurotoxicitás in vitro vizsgálatának jelentősége

Amíg az egyes kórképek szimulálásához bonyolult állat-modellek szükségesek, a sejt szintű események vizsgálatához az in vitro rendszerek is alkalmasak és bár csak közvetettebb modelljei lehetnek az egyes betegségeknek, nagyszámú vegyület tesztelését teszik lehetővé. Az in vitro rendszere előnye és hátránya azonos okra vezethető vissza: az in vitro rendszerekben a vizsgált események eredeti környezetükből kiragadva mennek végbe ennél fogva egyszerre nő meg a téves végkövetkeztetések esélye és válik egyszerűbbé az egyes események vizsgálata. Azonban a jól felállított in vitro rendszerekben, ha folyamatosan szem előtt tartjuk, hogy rendszerünk miben tér el az élő egésztől és a kérdéseket ennek megfelelően tesszük fel, továbbá megfelelő pozitív és negatív kontrollokat építünk be a kísérletekbe, akkor az in vitro teszt hatékony előkísérleteket jelenthetnek az általában jóval költségesebb in vivo vizsgálatokhoz.

Az idegsejt tenyészetek fizikai és kémiai körülményei könnyen mérhetőek és kontrollálhatóak (CO_2 , O_2 , ozmolítás, tápanyag tartalom, hőmérséklet, pH) és egyszerűen változtathatóak a kísérletnek megfelelően. A kísérlet igényei szerint beállíthatóak a sejttenyészetet alkotó sejtek típusainak aránya. A sejttenyészeteken egy-egy tényező változtatásával célzottan vizsgálhatóak az egyes hatások, azok következményei az idegsejtek életképességére, fejlődésére vagy akár neurálisaktivására. Mivel a sejttenyészetek megfelelően kicsi mintákra lehet szétosztani (96-os, 384-es mikrotiterlemezek), amelyek így sok párhuzamos mérési pontot tudnak alkotni. A kisminta térfogat nagyban csökkenti a vizsgálatok reagens igényét az in vivo kísérletekhez képest, azáltal növeli a gazdaságosságot, ami fontos szempont a mai gyógyszerkutatások esetében.

Azt is meg kell említenünk, hogy az in vitro módszer nem vetnek fel olyan morális és etikai kérdéseket, mint az in vivo állatkísérletek.

Összefoglalva a neurodegeneratív betegségek igen komplex idegrendszeri elváltozások, amelyeket csak bonyolult állatmodellekben lehetne vizsgálni. Az in vitro sejtenyészetek segítségével a komplex történések egyes folyamatait kiragadva, azokra fókuszálva külön vizsgálhatóak e betegségek molekuláris háttere. A nagy mintaszám és a kis reagens igény következtében az ilyen tenyészetek alkalmasak a lehetséges neuroprotektív hatóanyagok szűrésére, valamint a már meglévő ismert neuroprotektív hatóanyagok molekuláris hatásmechanizmusának tisztázására.

A jelenlegi originális gyógyszerkutatás egyik főága fehérje target központú kis moláris tömegű vegyületek kifejlesztésére irányul. A módszer alapja az ismert fehérje target-re kombinatorikus kémiai elvei szerint in silico modellezett hatóanyagjelöltek nagy áteresztő képességű szűrése. Ennek a feltételnek az ún. HTS (High Troughput Screen, nagyáteresztő képességű szűrés) automatizált rendszert tesz eleget. Ebbe a rendszerbe az in vitro neuroprotektív esszék beilleszthetők, ezáltal nagyszámú gyógyszerhatóanyag-jelölt molekula vizsgálható hatékonyan.

III. Célkitűzés

Az originális gyógyszerkutatás korai fázisában, legyen szó bármilyen vegyület vizsgálatáról, fejlesztéséről szükség van olyan tesztrendszerre, amely segítségével hatékonyan lehet vizsgálni gyógyszerhatóanyag-jelölt molekulákat. A jól megválasztott in vitro modellrendszerek érzékeny, megbízható és jól reprodukálható, ugyanakkor olcsó és gyors tesztrendszert biztosítanak így lehetővé téve a nagyszámú vegyület hatékony vizsgálatát.

Az EGIS Preklinikai Kutatási Főosztály laboratóriumában egy komplex neurotoxicitási modell beállításában vettem részt. Célunk, hogy olyan modellrendszert alkossunk meg, amelyben külön-külön vizsgálhatóak az idegsejtek károsításában leírt, egymással szorosan összefüggő stressz hatások. Az első szakaszban a szabad $O^{\cdot-}$ gyökök, a tápanyaghiány és a túlzott ingerlés hatásainak modellezésére alkalmas rendszer kialakítása volt a cél. Elsődleges feladatom az irodalomban leírt in vitro stressz modellek az EGIS laboratóriumába történő integrálása és beállítása illetve azok hatásainak érzékeny és idegsejt-specifikus vizsgálatára alkalmas mérési módszerek megtalálása volt.

Az így felállított tesztrendszernek alkalmasnak kell lennie a gyógyszerjelölt molekulák neuroprotektív hatásának, hatékony vizsgálatára. A későbbiekben a megalkotott modell áteresztő képessége akár bővíthető lehessen a manapság szükséges nagy áteresztő képességű (High Throughput Screening (HTS)) tesztrendszer szintre.

IV. Anyagok és módszerek

1. Tenyésztés

A kísérleteim során patkány embrió vagy újszülött patkány agy kortikális és hippocampális területiből készült tenyészetet alkalmaztam. Az alkalmazott primer neurális tenyészetek kiültetéséhez a patkány fedeztetésétől számított 18 napos embriók (E18) és 1 napos újszülött, posztnatális (P1) egyedeket használtam fel. A tenyészetekbe vegyesen kerültek neuronok és az azokat támogató asztroglia sejtek (egyéb sejtek elenyésző mennyiségben; például epitél sejtek). A neuronok a letapadást követően egyrétegű kultúrát alkotnak, amely alá az osztódó asztroglia sejtek szőnyegszerű aljzatot hoznak létre és nagyban növelik a neuronok életképességeit. A kiültetést követő későbbi szakaszban bekövetkezik a neuronok nyúlványnövekedése és azok hálózattá kapcsolódása.

Az embrionális szövetből kiindulva több és nagyobb arányban kaphatunk idegsejteket, a posztnatális egyedeknél ugyanakkor az idegsejtek már fejlettebb szakában kerülnek kiültetésre. A posztnatális állatok használata esetén további előnyt jelent az (esetenként nem megoldható) időre pároztatás szükségtelensége. A megfelelően disszociált neuronok (P1 állatoknál (Miltényi-MACS kit; E18 tripszin és DN-áz kezelés) 10^5 sejt /cm² sejtszámban poli-L-lizinnel (Sigma) bevont 96-os, 24-es, 6-es vagy 4-es tenyésztőedényekbe (Grenier) kerültek. A kiültetést követő első napon a sejtek NeuroBasal-A (Gibco) médiumba kerültek, amely hozzáadott B27 (Gibco) adalékot, 20 mM KCl, 15mM glükózt (Sigma), glutamint (Gibco) és 5% főtális borjú szérumot (FCS, Sigma) tartalmazott. A B27 tartalmazza a speciális növekedési faktorokat és vitaminokat, az FCS a megfelelő környezetet biztosító szérum komponenseket, a glutamin egyszerre energia- és nitrogénforrás, a KCl az ideális neurális aktivitás fenntartásáért felelős, a glükóz pedig a neuronok legfőbb energia forrása.

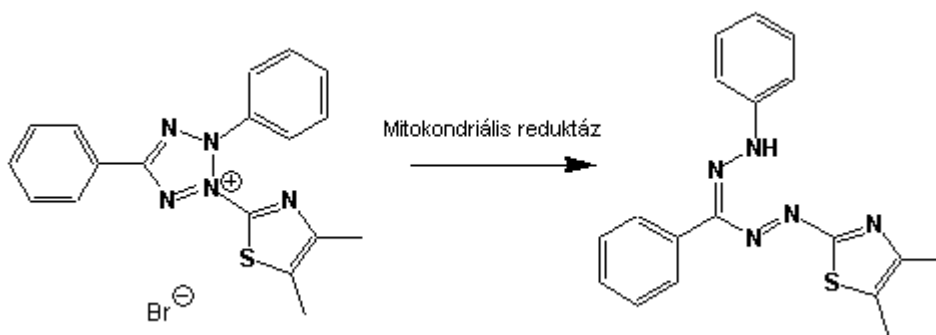
A tenyésztés második napján az asztroglia sejtek számának minél alacsonyabb szinten tartása érdekében megvontuk a szérumot és a 0,05 mM citozin-arabinóz (CAR, Sigma) kezelést alkalmaztunk. A CAR egy bázis analóg, amely beépül az újonnan szintetizált DNS láncba és blokkolja a DNS duplikációt a következő sejtosztódáskor, ezzel az osztódó sejtek elburjánzását, mint amilyen az asztroglia, gátolja. A következő tápcsere alkalmával már nem került a tenyésztő médiumba FCS (szintén a gliasejteknek kedvez). Ezt követően a tenyészetek tápoldatát 3 naponta cseréltük. A tenyészeteket 7-10 napos korukban kerülnek

kísérleti felhasználásra, mikorra az idegsejtek már kifejezik az érett idegsejtekre jellemző receptorokat.

Előkísérleteim során használtam HEK-293 (humán embrionális vese sejtvonala) sejteket. Ezen sejteket dMEM-ben (Dulbecco módosított Eagle médium, Sigma) és hozzáadott 5% FCS-ben tenyésztettem. Mindkét féle tenyészeteket 37°C-on, 100%-os páratartalmú és 5% CO₂ tartalmú termosztátban (Thermo scientific HERAcell 150i) tartottuk.

2. Életképességi vizsgálatok

A neuronok életképességi vizsgálatához és a toxicitás vizsgálatához MTT, azaz 3-(4,5-demetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromidot (Sigma) alkalmaztam. A sárga tetrazol forma redukálódva lila formazánná alakul (1. ábra), ami oldhatatlan kristályokat képez a sejtek belsejében. A reagens segítségével a sejtek életképességét azok redox kapacitása alapján lehet mérni, mivel a sejt redukáz enzimeinek kapacitása összefügg a sejt életképességével. (3. ábra)



1. ábra MTT reagens redukciója

A mérést 96-lyukú tenyészt edényekben végeztem, amelyekbe az MTT reagens 0,3 mg/ml végkoncentrációban került, majd ezt követően a tenyészetet 37°C-on 1 órán keresztül, gyakori mikroszkópos kontroll mellett, termosztátban inkubáltam.

Ezt követően a sejtekben képződött kristályokat tenyésztési médiummal azonos mennyiségű izopropanol (Thomasker) hozzáadásával oldjuk fel. A méréseket 570nm mért hullámhosszon (630nm referencia) abszorbancia (Optical Density O.D.) alapján fotométer (BioRad Microplate Reader) és szoftver (Microplate Manager) alkalmazásával végeztem.

3. Immuncitokémiai és morfológiai vizsgálatok

Az immuncitokémiai jelölésekhez a tenyészeteket 4%-os para-formaldehiddel (4%) fixáltam, a fixálót háromszoros PBS-es (foszfát-puffer, Gibco) mosással távolítottam el (ugyanazt a mosást végeztem az összes további lépés között is). A sejtmagokat DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) festéssel jelöltem, amely a DNS kettős lánc kis árkába kötődik, a festék fluoreszcensen detektálható (360nm-en gerjesztve és 460 nm-en mérve).

A sejtek membránját 0,1%-os Triton-X100 (Sigma) tártam fel mivel a keresett epitopok a sejtek belsejében találhatóak. Az ellenanyag aspecifikus kötődésének elkerülése a nem specifikus fehérje kötőhelyek blokkolására 5-10%-os FCS-t alkalmaztam. A blokkolást legalább 60 a tritonozást legalább 5 percen keresztül végeztem.

Az ideg és asztroglia sejtek kimutatásához a rájuk specifikus sejtíváz alkotók elleni ellenanyagokat mint a β III-tubulin (Sigma 1/1000 neuronokra) elleni és a glia specifikus savas fibriláris fehérje (GFAP Sigma 1/2000 az asztroglia sejtek) elleni antitesteket használtam. A mikroszkópos vizsgálatokhoz anti-egér ALEXA 488-t és anti-nyúl ALEXA 594-t (Sigma) használtunk. A kvantitatív immunfluoreszcens detektáláshoz a fluoreszcens jelölést és Biotek fotométert alkalmaztam.

. A fluoreszcensen megfestett kivethető lemezzel rendelkező minták kipreparálhatóak tárgylemezre (Menzel Glaser) és a tenyészet morfológiai tulajdonságai, különös tekintettel a neurotoxiciási kezelések következményire, a neuronokat és asztroglia sejteket ért sérülésekre.

A sejtmorfológiai vizsgálatokat inverz fluoreszcens mikroszkóp (Axiovert, Zeiss) alkalmazásával és a kiértékeléseket az Axiovision (Zeiss) program segítségével végeztem.

4. Fluoreszcens membránpotenciál esszé

A neurális aktivitást fluoreszcens membránpotenciál esszé (FMP) alkalmazásával vizsgáltam. A neuronok aktivitásának elvesztése az első lépés a stressz okozta működés zavarukban. Ezért fontos egy precíz és érzékeny módszer alkalmazása, mint amilyen az FMP. A módszer alapja egy speciális membránba ágyazódó festéken alapul, amely a sejtmembrán potenciál megváltozására fluoreszcensen gerjeszthetővé válik. Ez pedig alkalmassá teszi a neuron aktivitás mérésére, hiszen az arányos a neuronon található ioncsatorna-kapcsolt receptorok működésével.

A technika során AMPA (2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav) receptor aktivitást vizsgálunk, amely a glutamát receptorcsalád főleg, Na^+ -ra, K^+ -ra permeábilis ioncsatorna-kapcsolt tagja, amely jellemzi a kortikális tenyészeteket. A csatorna hosszabb nyitvatartásának elősegítésére, azaz gyors deszenzitivációjának megakadályozására ciklotiazidot ($30\text{ }\mu\text{M}$, Sigma) alkalmaztam, így növelve a glutamát jelet, ezáltal a mérés érzékenységét.

A méréseket FlexStation 3 (Molecular Devices) berendezés segítségével végeztem el. Ez egy asztali készülék, ami egy multifunkciós mikrotiterlemez olvasó, amibe integrálva egy 8 vagy 16 csatornás automata pipettor található. A műszer nagy hatékonyságú monokromatikus optikai leolvasója képes abszorbanciát és fluoreszcencia intenzitást detektálni. A készülék lumineszcencia mérésekre is alkalmas.

A berendezést számítógép vezérli, amelyen SoftmaxPro szoftver segítségével, on-line követhetjük a mérést, illetve a program a megfelelő ábrázolásokat és kiértékeléseket is elvégzi.

A tenyészeteket fekete 96-os mikrotiterlemezre (Grenier) ültettem ki és ezen a plate-en végeztem a mérést is. A sejtenyészetet elő kell készíteni a méréshez. Első lépésben az inkubálóból kivett sejtekről el kell távolítani, ki kell mosni a tenyésztő puffert (Biotek Cellwasher). A mosás végeztével a sejtekre a készülék $40\mu\text{l}$ ún. Flex-puffert tölt. Ez a puffer, egy HBSS típusú oldat (Hank's balanced salt solution, aminek az összetétele: $0,137\text{ M NaCl}$, $5,4\text{ mM KCl}$, $0,25\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $0,44\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $1,3\text{ mM CaCl}_2$, $1,0\text{ mM MgSO}_4$, $4,2\text{ mM NaHCO}_3$), aminek a pH-ja HEPES hozzáadásával van beállítva 7,4-es értékre. A 37°C -ra felmelegített festék oldat (speciális FMP festék, Molecular Devices) $50\mu\text{l}$ -es mennyiségét nyolccsatornás pipettorral adjuk utolsóként a cellák tartalmához. Így kapjuk a $100\mu\text{l}$ -es végtérfogatot ($40\mu\text{l}$ puffer, $10\mu\text{l}$ hatóanyagoldat, $50\mu\text{l}$ festék). A titerlemezt 40 perces inkubációnak vetjük alá 37°C -on, Thermo iEMS típusú sejtkubátorban.

A FlexStation 3 készülék belsejében egy automata pipettor adja hozzá a megfelelő AMPA (Sigma) oldatokat a megfelelő cellákhoz és detektálja a fluoreszcens sejtválaszt. A számítógépen a program az eredményeket AUC (area under curve, azaz görbe alatti terület) és koncentráció logaritmusának függvényében írja ki és ez az érték alapján lehet viszonyítani a kontrollhoz képest az egyes kezelések hatását a neuronaktivásra.

5. A neurotoxicitási esszékhez felhasznált vegyszerek

A neurotoxicitási esszékhez számos vegyszert és médiumot használtam fel: ROS toxicitáshoz 30%-os hidrogén-peroxid törzs oldatot (Reanal), az excitotoxicitási esszékhez Na-glutamát sót (Sigma), a tápanyag megvonásos esszékhez 2-dezoxiglükóz (2-DG) port (Sigma), ACSF (Artificial cerebrospinal fluid, mesterséges agyfolyadék) oldatot (tartalma mM-ban: NaCl, 130; KCl, 3,5; CaCl₂, 2; MgCl₂, 2; NaH₂PO₄, 0,96; NaHCO₃10; az oldat pH-ja 7).

6. Alkalmazott statisztikai vizsgálatok

A kísérleteim eredményeinek értékelésekor egy utas ANOVA tesztet, valamint kétmintás t-próba statisztikát alkalmaztam Graphpad Prism 5 szoftver segítségével. A minták közti eltérést $\alpha=0,05$ szinten vettem szignifikánsnak.

V. Eredmények

1. Vizsgálati módszerek beállítása

Az EGIS Preklinikai laboratóriumában rendelkezésre álló az idegsejt-tenyészetek állapotának felmérésére alkalmas módszereket és jellemzőiket az 2. táblázatban foglaltam össze.

Módszer	Vizsgált tulajdonság	Vizsgálat közvetlen célja	Érzékenysége		Befektetés	
			Toxikusságra	Neuron-specifikusság	Ár	idő
MTT	Életképesség / Metabolikus aktivitás	redukciós kapacitás (NADP / NADPH)	Érzékeny	nincs	olcsó	1óra
Sejtszám	Tenyészet sejtszáma	Sejtmagok mennyisége (DNS tartalom)	Közvetett hatás	nincs	olcsó	1 óra
Immuncito-kémia	Tenyészetet alkotó sejttípusok	Sejttípus specifikus markerek	Közvetett hatás	nagy	drága	1 nap
FMP	Neuronok tenyészet szintű bioelektromos aktivitása	AMPA indukálta membránpotenciál változás	Nagyon érzékeny	nagy	drága	2 óra

2. Táblázat Módszerek összefoglalása

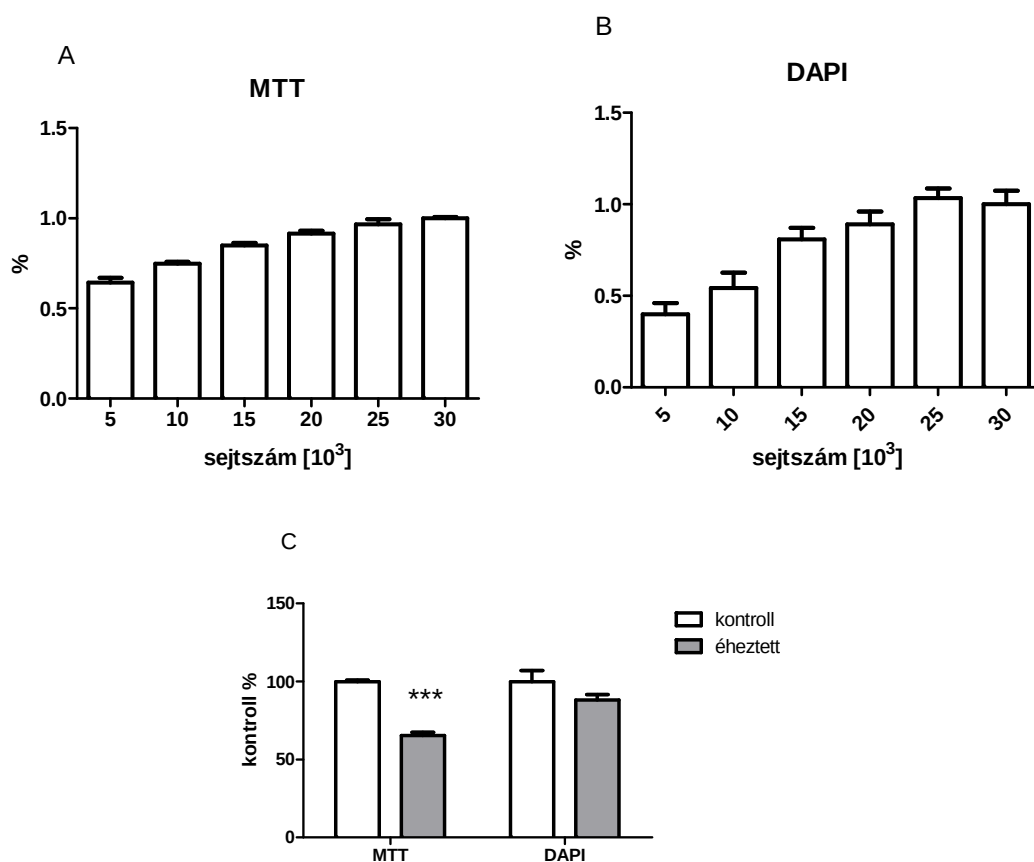
1.1. MTT esszé és DAPI mérés

Az MTT, mint azt az Anyagok és Módszerek c. fejezetben taglaltam a sejtek redox kapacitását méri, ami korrelál az életképességgel. A tenyészet életképessége szorosan összefügg a sejtszámmal és az egyes sejtek metabolikus aktivitásával (2/A. ábra), ennek megfelelően csak homogén (vagy közel homogén) sejttenyészetekről nyújt az egyes sejtekre is kiterjeszhető valós információt. Mivel nem neuron specifikus a gliasejtek nagyobb anyagcsere kapacitásuk miatt, már kis számban is, nagy háttérrel adhatnak. Ugyanakkor a módszer legnagyobb előnye, hogy olcsó, nem munkaigényes, érzékeny a sejtműködés elégtelenségére és nagyszámú vizsgálat elvégzését is lehetővé teszi. Az MTT további

előnye, hogy nem igényel tápcserét a tenyészetekhez reagensként adható, így realisabb eredmény érhető el.

A sejtszámot a sejtmagok kvantitatív módon történő jelölésével (DAPI segítségével) fluoreszcensen mérhetjük (2/B ábra). Ez a módszer szintén olcsó és gyors, de ez sem neuron specifikus, valamint csak a jelentős mértékű, sejtvessztéssel járó toxicitás mérésére alkalmas (2/C ábra). A HEK-sejtek sejtszámváltozását a tenyészetek konfluens állapotáig (25 ezer kiültetett sejt) az MTT (A) és a DAPI (B) mérés is jól nyomon követi.

A leghatékonyabb megoldás az MTT és DAPI kombinált alkalmazása biztosítja, mivel így sejtszám változást és a metabolikus aktivitás visszaesését párhuzamosan detektálhatjuk, amivel igazolhatjuk, hogy a toxicitás nem a sejtszámvesztésnek (leomosódás), hanem az életképesség csökkenésének köszönhető. A 16 órás éheztetés következtében végbement életképesség változást, csak a sejtek metabolikus aktivitásában jelenik meg (MTT), a tenyészetek sejtszáma nem változik (DAPI) (2/C). A továbbiakban a rövid távú (1-24 órás) stressz modellek vizsgálatánál az MTT életképesség vizsgálatot alkalmaztuk. A méréseket ideálisan olyan koncentráció mellett végezzük ahol a tenyészetek válasza 40-60% változást mutat.

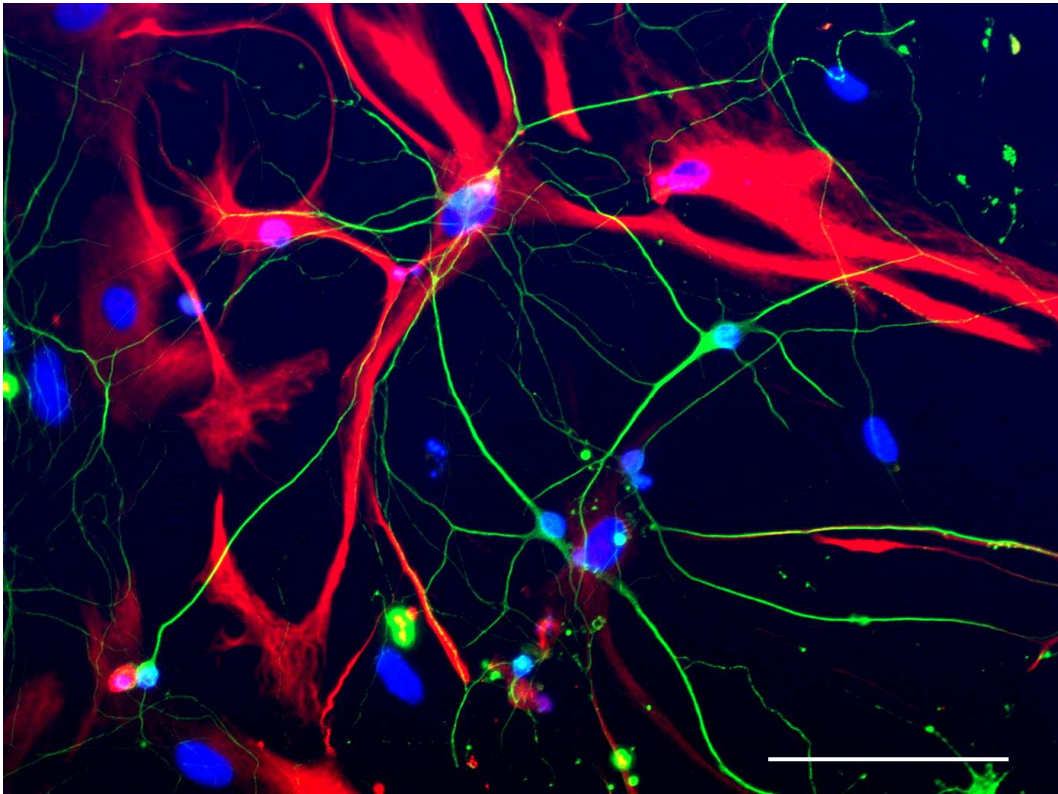


2. ábra HEK-293T sejteken végzett életképesség és sejtszám vizsgálat. (n=4 p <0,0001)

1.2. Immuncitokémia - A különféle idegi sejt kultúrák összetételének ellenőrzése

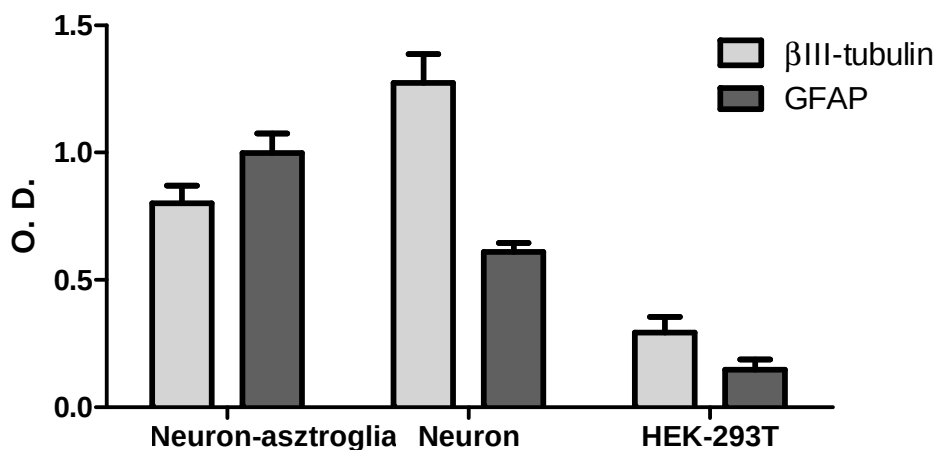
Az immuncitokémiai jelölések a tenyészetet alkotó sejt típusok vizsgálatára szolgálnak, ezért alkalmazásának fontos szerepe van a kiültetés és a fenntartás egyes szakaszaiban, a tenyészet állapotának meghatározásakor. A módszer toxicitás részletes, egyes sejt típusokra gyakorolt esetlegesen különböző hatásának vizsgálatára is alkalmas. A toxicitás csak közvetve a sejteket felépítő szerkezeti molekulák mennyiségének csökkenésével (axon rövidülés, nyúlvány letöredezés) és sejtvesztéssel korrelálva ad információt, viszont a neuronok és a gliasejtek specifikusan mérhetőek vele. A módszer további hátránya a munkaigénye (több óra / 1 nap) és az immunfestésekre jellemző költségigénye.

Az egyes sejt típusok festését konzekvensen alkalmaztam a morfológiai vizsgálatokhoz készített immuncitokémiai preparátumokon (3. ábra) és a tenyészetek sejt típus mérései során alkalmazott fluoreszcens kvantitatív mérések során (4. ábra) is. A neuronokra specifikus β III-tubulin és az asztroglia sejtekre specifikus GFAP fehérjék elleni ellenanyagokkal végzett jelöléssel a tenyésztés bármely szakaszában meggyőződhetünk annak összetételéről.



3. ábra 10 napos kortikális eredetű tenyészetben a sejtmagokat kézzel (DAPI, 360 nm) a neuronokat zöld színnel (IIIβ-tubulin, Alexa 488 nm) és az asztroglia sejteket pirossal (GFAP, Alexa 594 nm) jelöltem. (méret 50 μm)

A neuroprotektív hatások vizsgálatára alkalmas stressz-modellrendszerekhez tiszta idegsejt tenyészetek szükségesek, a lehető legkevesebb asztroglia szennyezéssel. Az ideg és asztroglia sejtek arányának ismerete, különösen a módszerek beállításának szakaszában, szükséges ahhoz, hogy a dönteni tudjunk a neurotoxiciási kezelések mértékéről és az alkalmazható toxicitási tesztekéről. A neuron/asztroglia arány meghatározására immunfluoreszcens mérést alkalmaztunk, a módszer beállításához vegyes: „neuron-asztroglia” (ideg és asztroglia sejteket is tartalmazó), idegsejtekben gazdag: „neuron” és HEK sejtek tenyészeit hasonlítottuk össze.



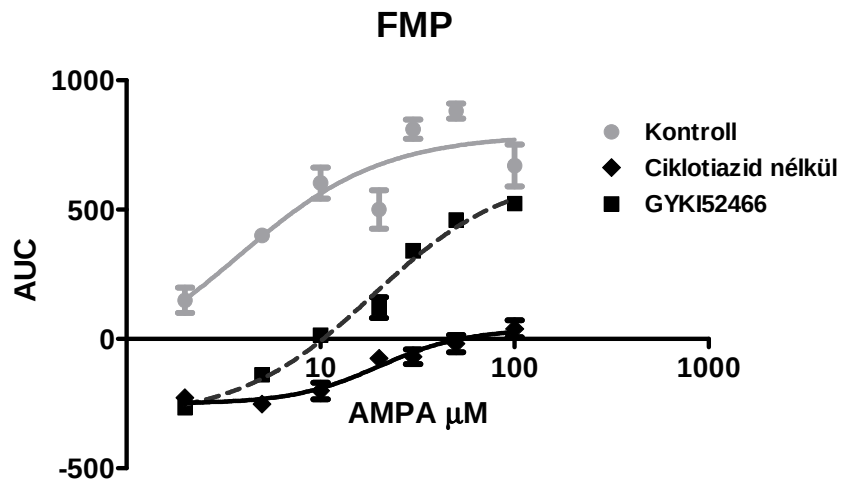
4. ábra Különböző sejtösszetételű tenyészetek immunfluoreszcens festésének mérése.

Az első oszlopban a gliasejteket is nagy számban tartalmazó tenyészet eredményei láthatóak, amelynél a legmagasabb GFAP jelet tapasztaltunk, a második a neuronban gazdag tenyészet, amelynél a legmagasabb a neuron specifikus β III-tubulin válaszjele. Ez igazolja az ellenanyagok specifikusságát és azt, hogy alkalmazhatóak a további vizsgálódásaink során. A harmadik oszlop a semelyik biomarkert sem tartalmazó HEK-293 sejtek eredményeit mutatják, amin az ellenanyagok aspecifikus kötődését vizsgáltuk.

1.3. FMP

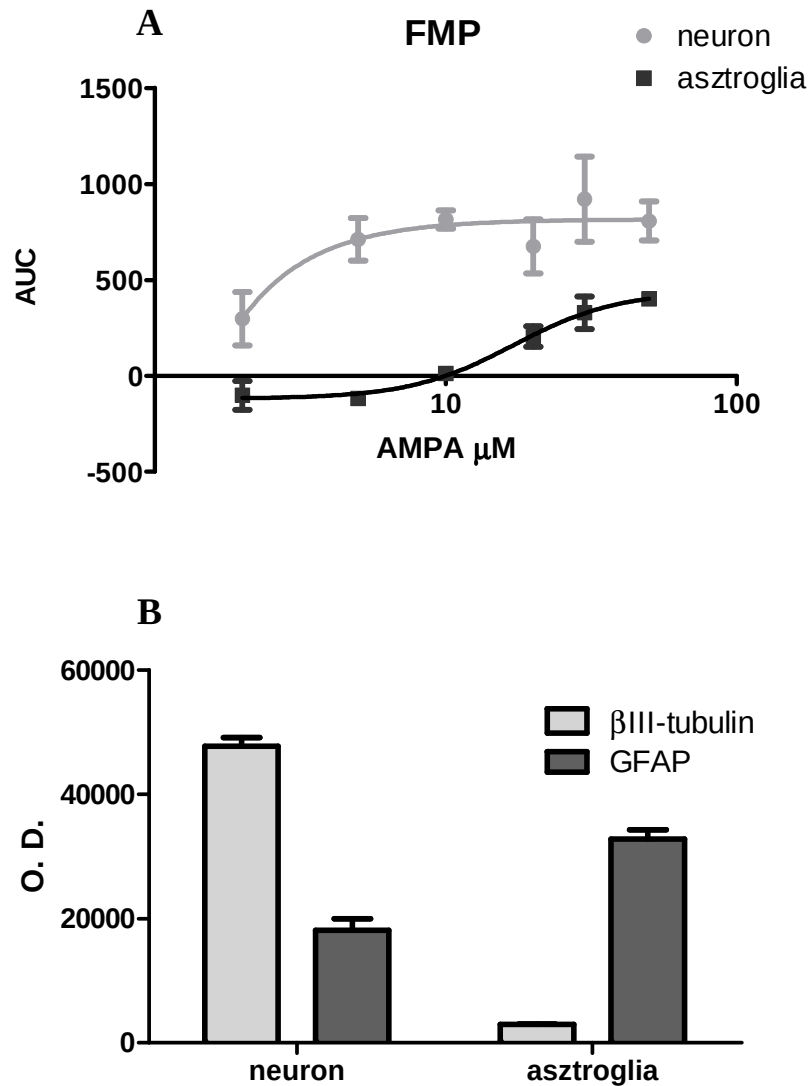
A Fluoreszcens Membrán Potenciál-mérés lehetővé teszi az idegsejtek aktivitásának nyomonkövetését. A módszer neuronspecifikus és érzékeny, hátránya drágaságában és nagy munkaigényében rejlik. Ezért csak a neurotoxicitási vizsgálatok késői szakaszában alkalmazzuk, az egyes hatások határeseiteinek megállapítására.

A neuronaktivitás FMP módszerrel való mérésére a neuronokra jellemző AMPA receptor közvetítette membránpotenciál változást mértem. A kísérlet során AMPA koncentráció sorra (0, 2, 5, 10, 20, 30, 50 μ M) adott választ vettem fel a ciklotiazid (AMPA receptor deszenzitizáció gátló) jelenlétében és anélkül (5. ábra). Az FMP esszé másodperces felbontása miatt csak ciklotiazid mellett mérhető a gyors AMPA csatornák közvetítette sejtválasz, annak hiányában csak igen kismértékű választ tudtunk detektálni. A jel specifikusságát az AMPA receptor nem kompetitív antagonistája GYKI 52466 (10 μ M) jelenlétében végzett mérések igazolták.



5. ábra Kortikális tenyészet FMP mérése (n=8).

Az 5. ábrán látható, hogy a növekvő AMPA koncentrációval arányosan nő a válaszjel (AUC) egészen az AMPA receptorok telítődéséig, míg a GYKI 52466 antagonistája csökkentette a neuron-aktivitást. A tenyészetek 10 μM AMPA koncentrációra közel maximális és specifikus (GYKI 52466-val teljes mértékben gátolható) választ adtak.



6. ábra FMP mérés különböző tenyészeteken (A, n=4) és a tenyészetek összetételének ellenőrzése immunfluoreszcens méréssel (B, n=4).

A következő kísérletben megvizsgáltam az FMP mérés neuron specifikusságát asztrogliaiban szegény „neuron” és idegsejtben szegény „asztroglia” tenyészetek AMPA válaszánaak összehasonlításával vizsgáltam. A két tenyészet sejtösszetételét immunfluoreszcens méréssel igazoltam (6/B ábra) Az eredmények alapján látható (6/A ábra), hogy növekvő AMPA koncentrációk mellett a neuronok aktivitása nő, míg a gliasejtek válaszejele csak 30 μ M-nál jelentkezik és később sem ér el magas értéket. A mérések alapján kijelenthető, hogy a neurális tenyészetek idegi aktivitásának mérésére alkalmas az FMP módszer, az 5 és 10 μ M AMPA koncentrációra adott válaszok tekinthetőek neuronspecifikusnak.

2. In vitro toxicitási tesztek

A 3. táblázatban látható a három alkalmazni kívánt toxicitási modell. Az excitotoxicitási modell a kórosan magas agyi glutamát szint modellezésre szolgál, ami részfolyamata az iszkémiás kaszkádnak és jelentős szerepet tulajdonítanak neki az olyan neurodegeneratív betegségekben, mint a AD, PD és az depresszió. A toxicitásban, mint azt már korábban részletesen kifejtettem az extraszinaptikus NMDA receptorok játszanak kulcsszerepet.

Az éheztetési kísérletek szintén az iszkémiás állapot és más sejttanyagcsere meghibásodás következtében fellépő energiahányos állapot in vitro modelljeként szolgálnak, valamint a növekedési és egyéb faktor megvonás reális képet adhat az idegrendszer sejtek közötti kommunikációjába előforduló meghibásodásra.

Az oxidatív stressz modell a neuronokban bekövetkező ROS koncentráció modellezésére szolgál, amely általános jelenség a gyulladásos folyamatokban, valamint a legtöbb neurodegeneratív kórban és iszkémia okozta energiahányos állapotban is.

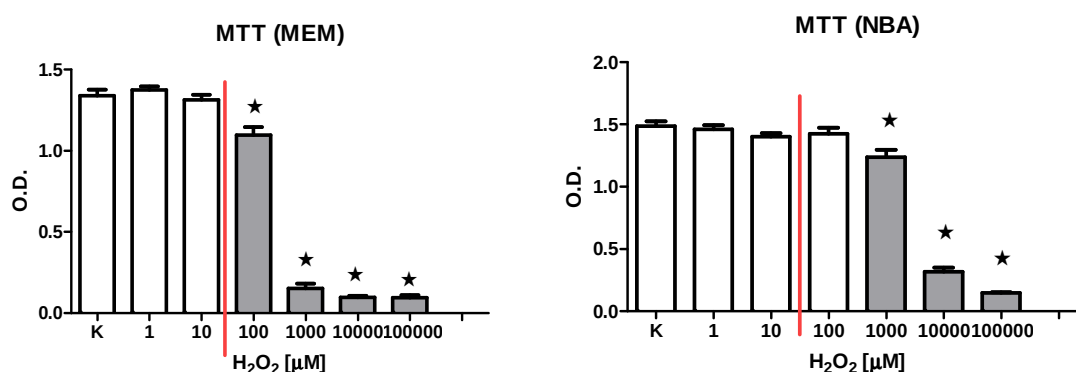
Toxicitás	Patológiás eset	In vitro előidézés	Feltételezett hatásmechanizmus
Excitotoxicitás	Túlzott idegi aktivitás, iszkémia, AD, PD	Glutamát kezelés	Extraszinaptikus NMDA receptor mediált
Éheztetés	Iszkémia	Növekedési faktor, tápanyag megvonás	Összetett
Oxidatív stressz	Gyulladás, AD, PD, iszkémia	H ₂ O ₂ kezelés	ROS abnormális sejtműködést és sejthalált okoznak

3. táblázat Az alkalmazott toxicitási esszék és az általuk in vitro modellezett patológiás esetek összefoglalása

2.1. Reaktív oxigén gyök (ROS) toxicitás vizsgálata

A reaktív oxigén gyökök koncentrációnövekedése okozta hatások vizsgálatára H_2O_2 kezelést alkalmaztam, mivel ez a vegyület a sejtekben képződött oxidatív gyökökhöz hasonlóan egy erős oxidáló ágens, valamint könnyen bediffundál a citoplazmába. A peroxid használatát annak kedvező ára és könnyű beszerezhetősége is indokolhatja.

A H_2O_2 alkalmazása során felmerült a kérdés, hogy az idegsejtek tenyésztéséhez használt NBA/B27 médium antioxidáns tartalma miatt milyen mértékben befolyásolhatja, a hidrogén-peroxid hatásosságát. Ennek tisztázására az idegsejt-tenyészeteken a H_2O_2 koncentráció sort két féle médiumban vettem fel (7. ábra).



7. ábra Hidrogén-peroxid kezelés két különböző médiumban, NeuroBasal médiumban, valamint MEM-ben. Piros vonal a MEM médiumban hatásos koncentrációt jelzi, szürke oszlopok az egyes médiumokban hatásos koncentrációkat. (MTT, $n=6$ $p < 0,05$)

Az oxidáló ágens hatékonysága médiumtól függően egy nagyságrenddel eltolódott. MEM-ben a peroxid hatása már koncentrációnál tapasztalható volt a neuronok életképességére (MTT), míg párhuzamos tenyészeteken NBA-ban csak 10-szer nagyobb ($1000\mu\text{M}$) koncentrációnál kaptam ugyanezt a hatást szignifikánsan.

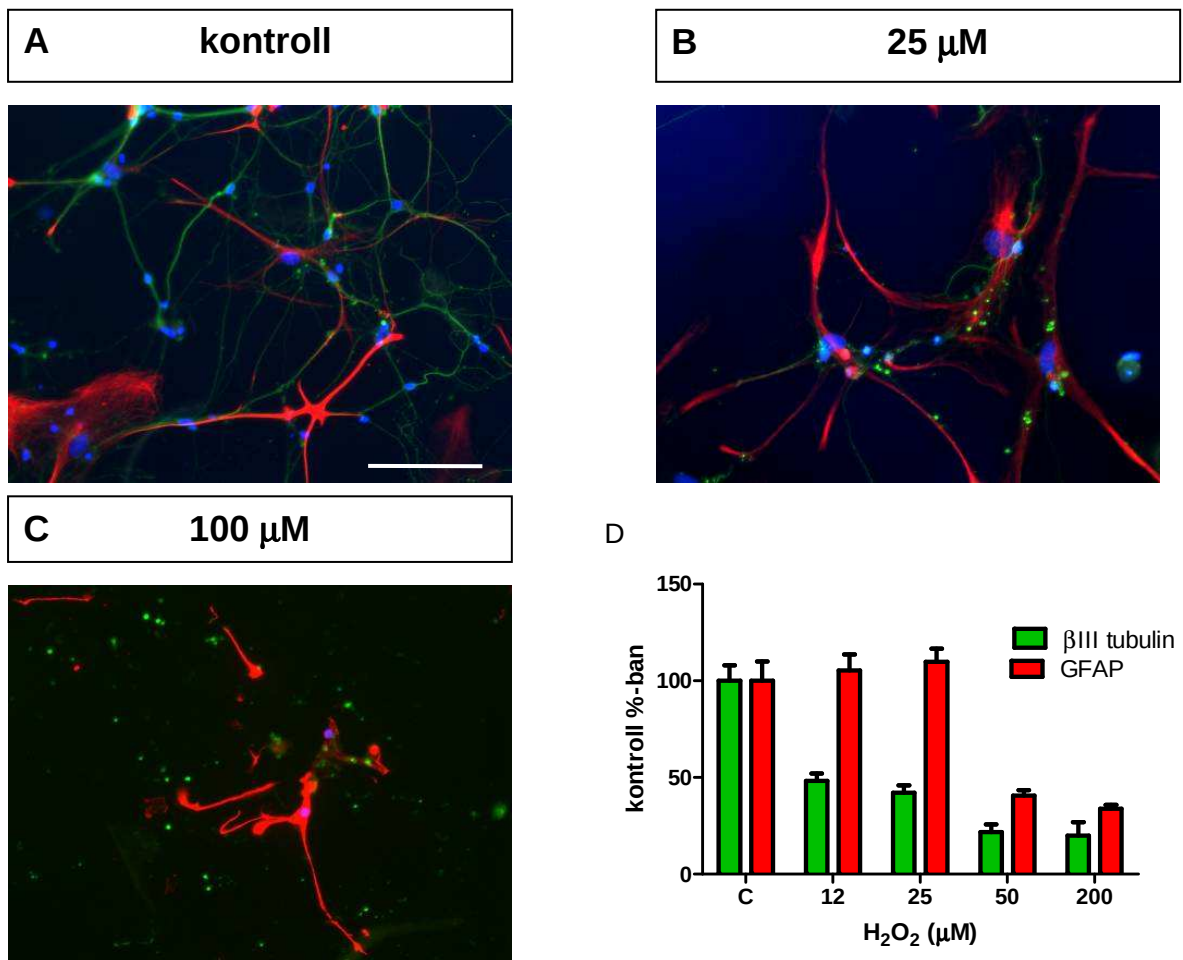
A H_2O_2 általános sejtkárosító hatással rendelkezik, de az érzékenyebb idegsejtek tűrőképessége vélhetően alacsonyabb. A H_2O_2 a különböző sejtípusokra kifejtett hatását a kezelést követő immuncitokémiai jelöléssel vizsgáltam (8. ábra) morfológiai és immunfluoreszcens méréssel egyaránt. A vizsgálatokat a kezelést követő 2. napon végeztük, így az elpusztult sejtek könnyebben lemoshatóak voltak a tenyészetekről.

A tenyészetek mikroszkópos vizsgálata egyértelműen megmutatta, hogy amíg a kontroll (8/A) tenyészethez képest a neuronokban bekövetkező pusztulási folyamatok már a 3 μM koncentrációjú H_2O_2 -vel kezelt tenyészetekben megkezdődik (a neuronok nyúlványai megtöredeznek), az 25 μM koncentráció esetében szinte minden neuron elpusztul (8/B) addig a kis számban jelenlévő asztroglia sejtek túléltek a kezelést. Az $\text{O}^\cdot$ általános sejt-toxicitását mutatja, hogy a legnagyobb koncentráció (100 μM) esetében már az asztroglia sejtek is elpusztultak (8/C).

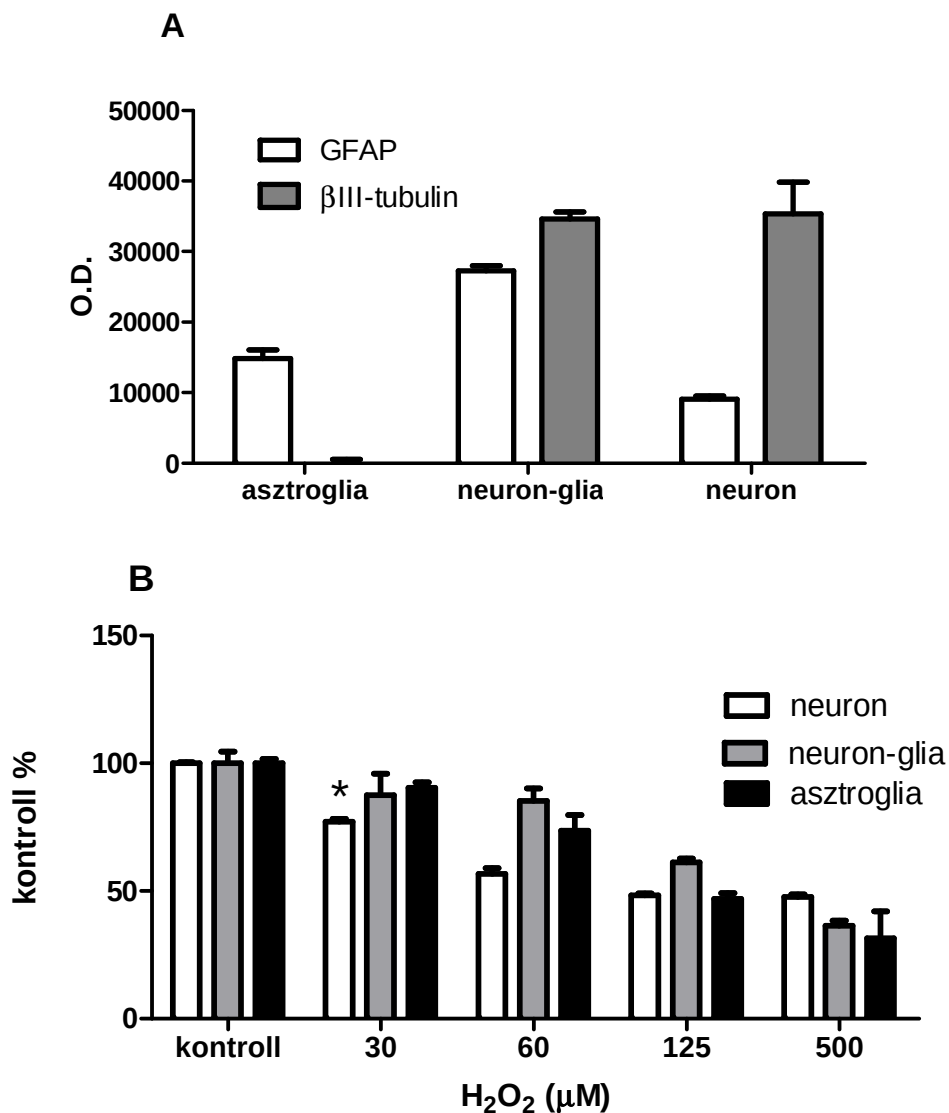
Az $\text{O}^\cdot$ hatásának eredményét immun-fluoreszcens módszerrel mértük ahol magasabb GFAP értékek igazolják, hogy a gliasejtek ellenállóbbak az oxidatív stressznek, mint a neuronok. Ahogyan a morfológia vizsgálatokon is tapasztalható az 50 μM -nál nagyobb hidrogén-peroxid koncentráció a gliasejtekre is toxikus volt, míg a neuronok már a legkisebb koncentráció alkalmazásakor elpusztultak.

A H_2O_2 kezelések esetén az egyes kiültetések között jellemzően nagy volt a hatékony koncentrációk közötti eltérés. Felmerült a lehetősége, hogy a tenyészetek akár kismértékben eltérő asztroglia tartalma okozhatja a nagyfokú változékonyságot, ezért vizsgáltam a neurális kultúra összetételének hatását a peroxid toxicitásra. A kísérlet során a tiszta asztroglia, vegyes neuron-glia és neuronban gazdag, gliában szegény neuron kultúrát hasonlítottam össze. A tenyészetek eltérő összetételét immunfluoreszcens méréssel igazoltuk (9/A. ábra) Az eredmények azt mutatják, hogy az asztrogliaiban gazdagabb tenyészetek érzékenysége a tiszta asztroglia tenyészetekével azonos, azaz MTT-vel már a vegyes tenyészetekben sem mérhető szelektív neuronpusztulás (9/B)

Mivel a gliasejtek jelenléte jelentős befolyással van a szükséges H_2O_2 koncentráció nagyságára és az asztroglia sejtek arányától függően a különböző preparálások során kapott tenyészetekben az ideális koncentráció tartomány eltérhet, ezért az optimális koncentráció előzetes ellenőrzése és/vagy az asztroglia sejtek arányának megállapítása szükséges.

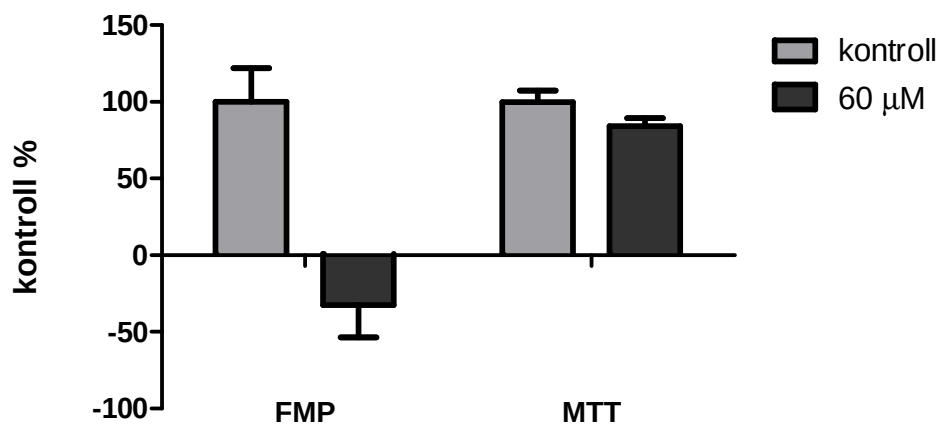


8. ábra A hidrogén peroxid hatása a neuronokra illetve a gliasejtekre különböző H₂O₂ kezelés hatása (A) kontroll (B) 25 μM, (C), 100 μM βIII-tubulin, GFAP és DAPI immunfestés (20x) (A-C), és immunfluoreszcens válasz (D) (méret 50μM)



9. ábra Hidrogén-peroxid kezelés különböző összetételű tenyészetekre (n=4). A tenyészetek összetételének immunfluoreszcens vizsgálata (A) és a H_2O_2 kezelés okozta MTT változás a kezeletlen tenyészetek százalékában (B, n=6).

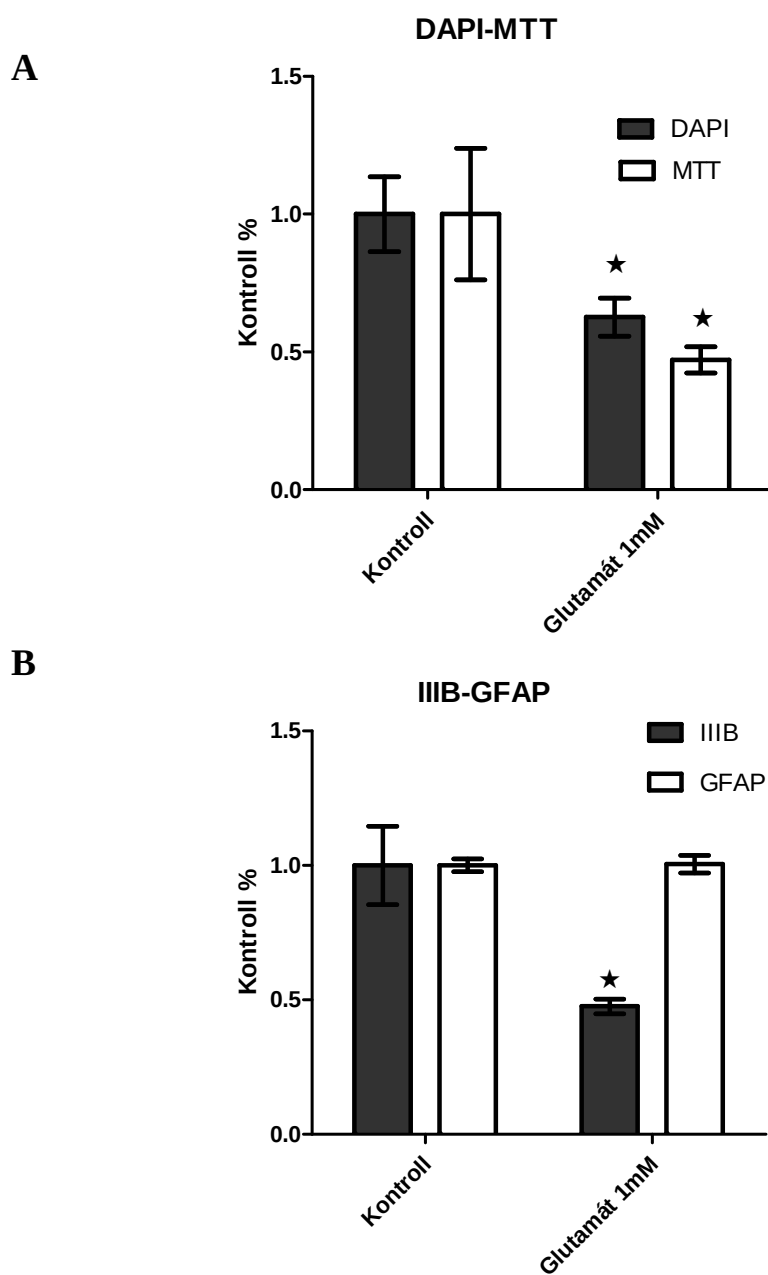
A fluoreszcens membránpotenciál mérés (FMP) segítségével a H_2O_2 idegsejteket károsító hatása már olyan koncentrációban is egyértelmű volt, ahol az adott tenyészetek esetén az MTT mérés nem vagy csak igen kis különbséget jelzett (10. ábra). Az FMP és MTT vizsgálat párhuzamos elvégzésével NBA tápfolyadékban a 60 μM H_2O_2 az AMPA válasz teljes elmaradását mértük.



10. ábra A H_2O_2 kezelés hatása 10 napos testvér tenyészeteken, a tenyészeteken mérhető AMPA válaszra (FMP) és életképességre (MTT) a kontroll tenyészetek adta fluoreszcens jel százalékában (n=4)

2.2. Glutamát toxicitás vizsgálata

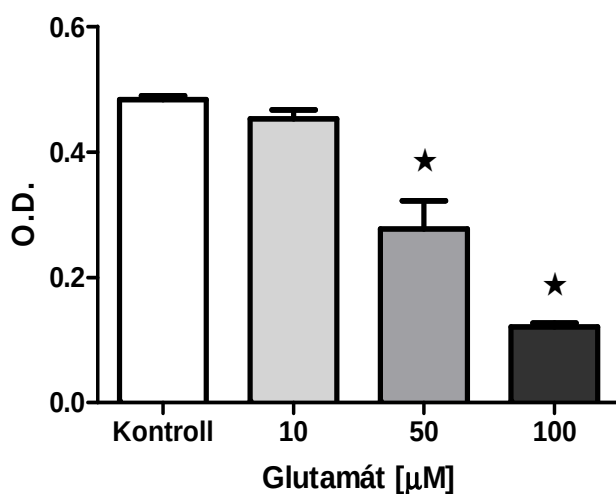
Az excitotoxicitás in vitro modellezésére glutamát kezelést alkalmaztam. Első lépésben 1000 μ M glutamát koncentráció hatását vizsgáltam (11. ábra).



11. ábra Glutamát kezelés (1mM) hatása a neurális tenyészetekre ábrázolva a kezeletlen kontroll tenyészetek adta optikai jel százalékában. Vizsgáltam az életképességet (MTT, A), sejtszámot (DAPI, A) és a sejtípus arányt (B) (n=6 p <0,001).

A glutamát kezelés következtében mind sejtszámban mind, életképességben közel 50%-os visszaesést tapasztaltam (11A). A 11/B ábrán az immunfluoreszcens mérés eredményi mutatják, hogy a glutamát csak az NMDA receptorral rendelkező neuronokra volt szelektíven toxikus hatással a gliasejtekre nem (11/B).

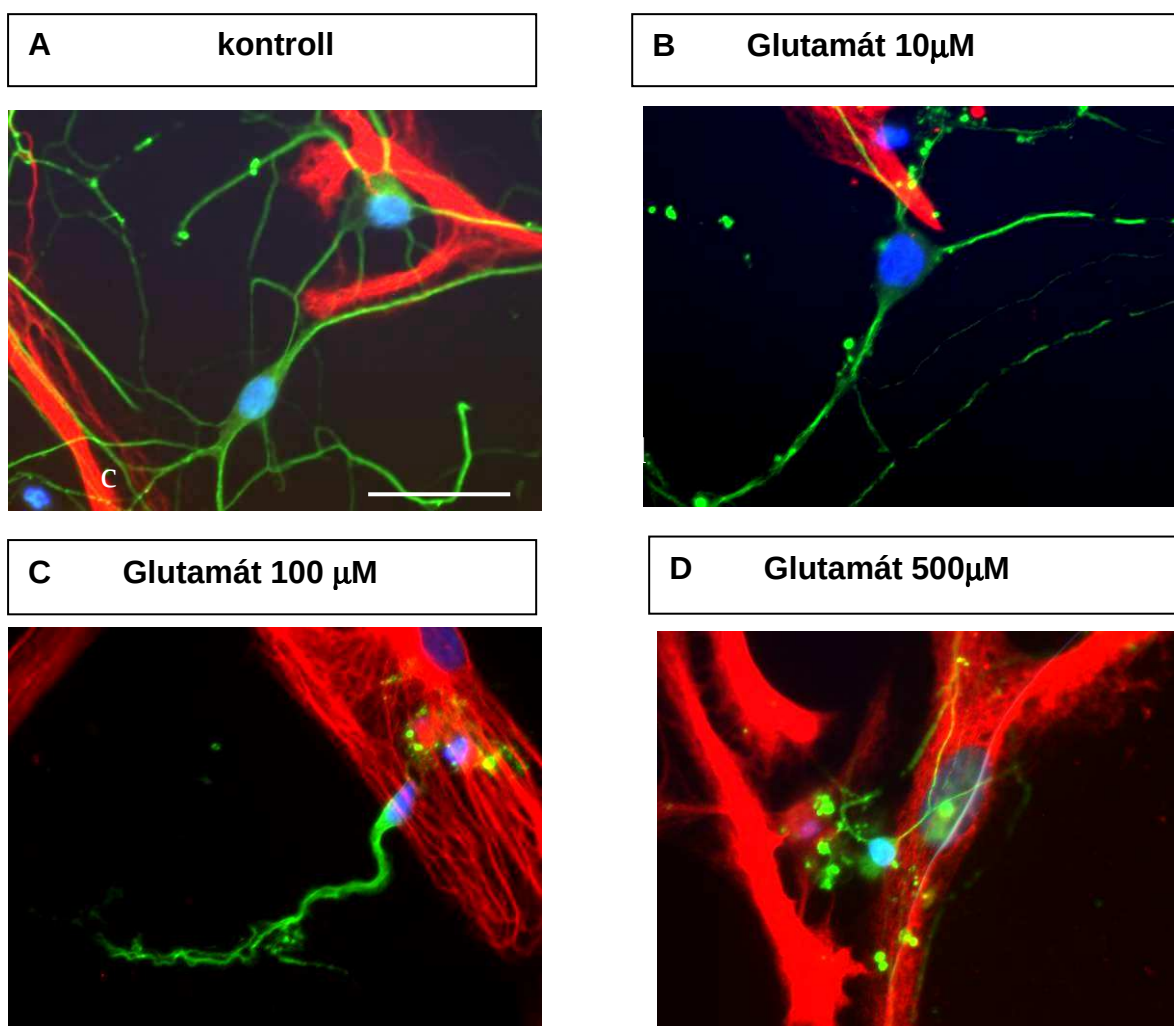
A következő lépésben a megfelelő glutamát koncentráció tartomány kiválasztása volt a cél (12. ábra).



12. ábra A különböző glutamát koncentrációk hatása 8 napos kortikális idegsejt kultúra életképességére (MTT, n=6 p < 0,0001).

Az irodalmi adatokkal összeegyeztethetően [67] 10 és 100μM koncentráció tartományban a sejtéletképesség csökkenése a glutamát koncentráció növekedésével változik. A 10 μM-os koncentráció tartományba nem történt, az 50 μM -os koncentráció esetében 50%-os és 100 μM glutamát koncentráció esetében 80%-os a metabolikus aktivitás csökkenése.

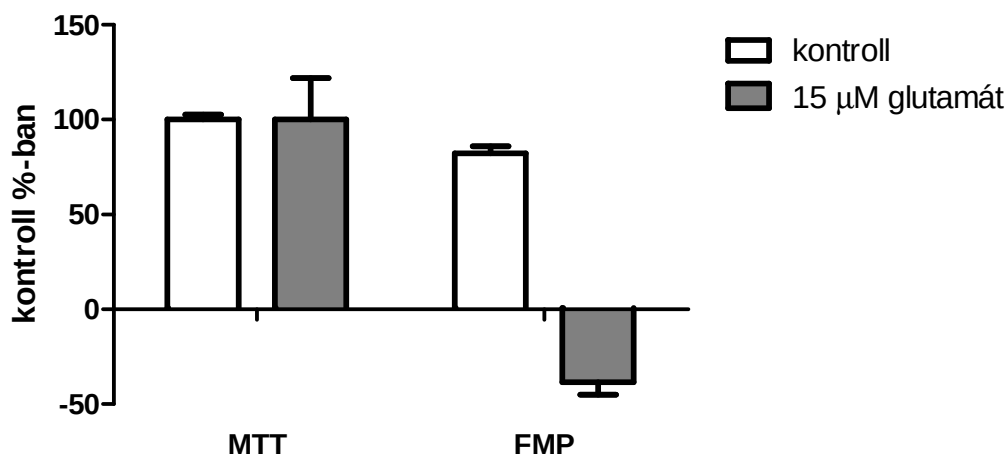
A glutamát toxicitás eddigi eredményeit morfológiai vizsgálatokkal is alá kívántam támasztani (13. ábra).



13.ábra Morfológiai vizsgálatok (60x) a glutamát kezelés hatásáról; A kontroll, B 10 μ M, C 100 μ M és D 500 μ M (méret 1 μ M)

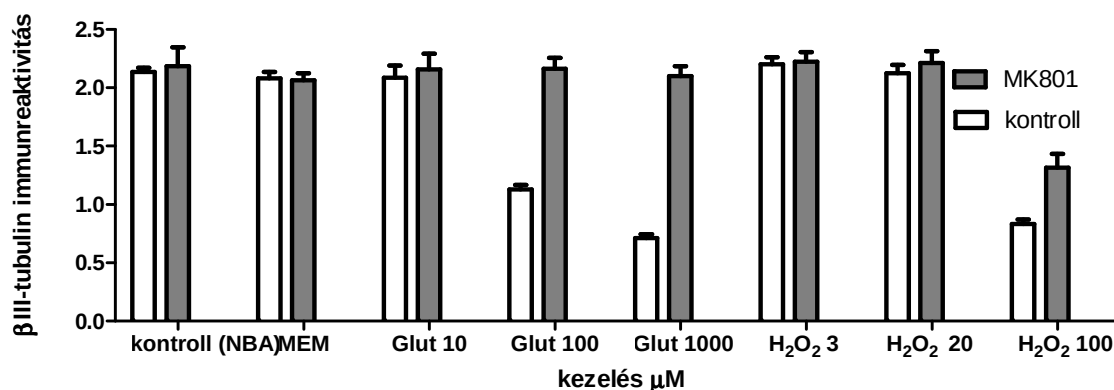
A mikroszkópos felvételekből látszik, hogy a kontrollhoz képest 10 μ M glutamát koncentrációjú mintában már enyhe morfológiai elváltozások történtek, ugyan akkor a 100 és 500 μ M-os glutamát koncentráció következtében elpusztultak a neuronok. Az asztroglia sejtek ebben a kísérletben is sértetlenek maradtak.

Megvizsgáltam a glutamát hatásának mérési határait az FMP módszerrel is a korábban legérzékenyebb MTT módszerrel összehasonlítva. A párhuzamos tenyészeteken végzett kísérletek eredményeit a 14. ábra mutatja, ahol a 15 μ M glutamát hatását életképesség méréssel nem, a neuron aktivitás FMP módszerrel történő vizsgálatával egyértelműen ki tudtam mutatni.



14. ábra Kis koncentrációjú (15 μ M) glutamát kezelés hatásának életképesség (MTT) neuron aktivitás (FMP) mérésével a kontroll tenyészetek százalékában (n=4).

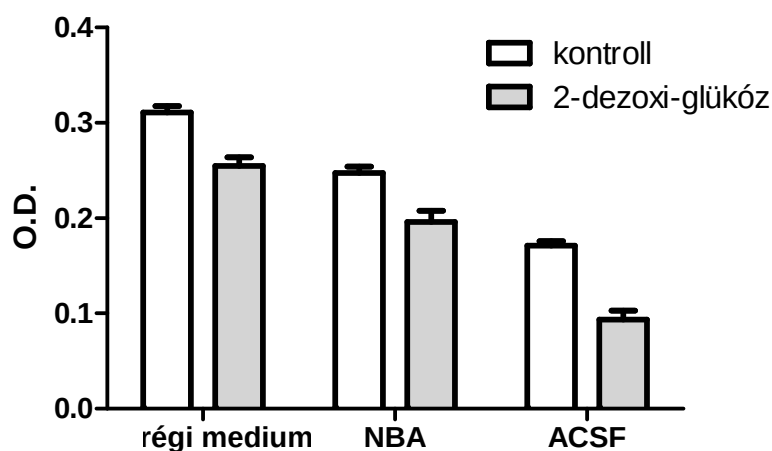
A következő kísérletben az excitotoxicitás és a szabad $O^{\bullet}$ gyök közötti esetleges kapcsolatot vizsgáltam. A tenyészeteket MEM tápfolyadékban kezeltem glutamát és H_2O_2 koncentráció sorral MK-801 (10 μ M) NMDA receptor antagonistá mellett és hiányában. A kezelések hatását a két nap után immunfluoreszcens mérésével vizsgáltuk (15. ábra). A MK-801 a glutamát idegsejtekre gyakorolt sejtpusztító hatását teljes egészében kivédte, ezáltal egyértelmű, hogy a toxicitás a glutamát NMDA típusú receptorának túlzott aktivitásának köszönhető. A peroxid toxicitást az NMDA receptor gátlása mérsékelte, ami arra utal, hogy a H_2O_2 kezelés neurotoxikus hatásának egy része excitotoxicitás eredetű.



25. ábra MK-801 hatásának vizsgálata. Az idegsejtek számának összehasonlítása a tenyészetek β III-tubulin tartalmának immunfluoreszcens módszerrel történő mérésével (n=4)

2.3. Tápanyag megvonás

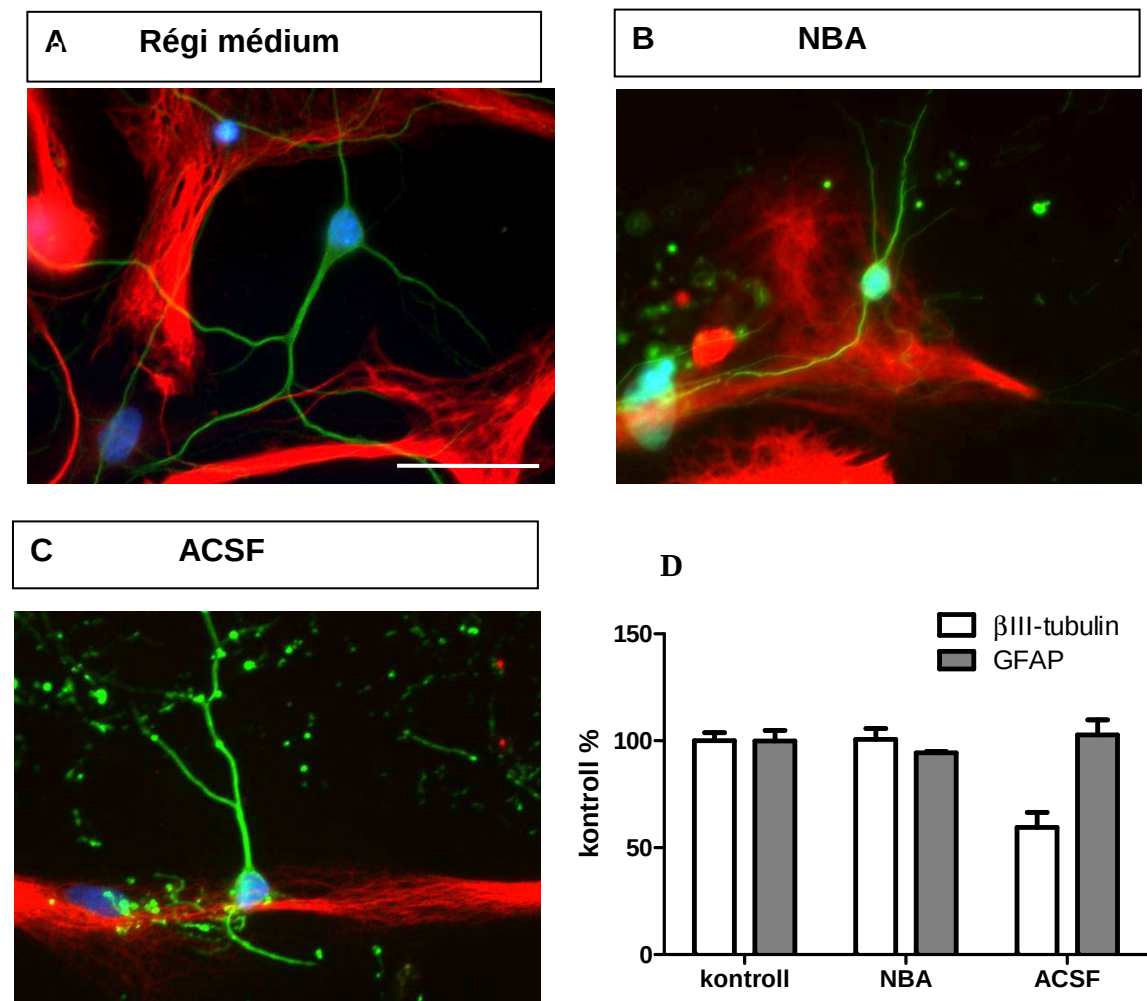
Az éheztetési stressz modellben olyan kezelést kerestünk, aminek hatását már 24 óra után ki tudunk mutatni. A tápanyag megvonásos kísérleteket nehezíti, hogy a médium csere már magában csökkentheti a tenyészetek életképességét ([68], saját nem közölt adatok), ezért kontrollnak a régi médiumot adtuk vissza tenyészetekre. A kísérletekben a b27 adalékmentes NBA-t a növekedési faktorok megvonásának szimulálására, és a csak szükséges ionokat tartalmazó ACSF-et, a teljes tápanyaghiányos állapot modellezésére használtam. A tápcsere hatásának kikerülése érdekében az anyagcserezavar modellezésére 2-dezoxiglükózt (2-DG) alkalmaztam, amely reagensként hozzá adható a tenyésztő médiumhoz és a glükóz anyagcsere útvonalakban kompetitíven gátolja a glükóz hasznosítását (16. ábra). 20 óra éheztetés után szignifikáns MTT csökkenést tapasztaltunk minden kezelésen, amit a DG kezelés tovább csökkentett, ennek aránya a cukormentes ACSF-ben volt - a vártak megfelelően - a legnagyobb.



16. ábra Különböző médiumok hatása az idegsejt-tenyészetek életképességére (MTT). (n=4, $p < 0,05$)

Az eddig bemutatott stressz modellekhez hasonlóan tápanyagmegvonások sejt specifikus hatását is vizsgáltuk immuncitokémiai módszerekkel (17. ábra). A fluoreszcens mikroszkópos fényképek alapján jól látható a kontroll ép neuronjaihoz képest a NBA kezelés következtében csak nagyon enyhe elváltozásokat észleltem, az ACSF esetében viszont markáns neuron pusztulás látható, az asztroglia sejteken jelentős sérüléseket nem tudtam megfigyelni. Az immunfluoreszcens mérések is azt igazolták, hogy a tenyészetek

asztroglia sejtjei rövid távú (2 nap) éheztetés során nem sérülnek, a sejtkárosító hatás specifikusan az idegsejteket érintette (17/D).



17. ábra Immuncitokémiai vizsgálatok eltérő médiumokban tartott tenyészeteken. Morfológiai felvételek (60x); (A) kontroll, (B) NBA és (C) ACSF kezelés és immunfluoreszcens mérés (D) (méret 1 μ M)

VI. Diszkusszió

Az eredmények tükrében kijelenthető, hogy sikerült az elsődleges célként kitűzött három féle neurotoxicitási stressz esszé beállítása és optimalizálása az EGIS Preklinikai Molekuláris Farmakológiai Laboratóriumában.

Első lépésben a laboratóriumban rendelkezésre álló metodikai módszereket kellett integrálni és optimalizálni az in vitro tenyészetek vizsgálatához. Sikeresen beállítottuk az életképesség mérést és a tenyészetek ideg és asztroglia-sejt arányának meghatározására alkalmas immunfluoreszcens mérést.

Az MTT az előkísérletek alapján megfelelően érzékeny a metabolikus aktivitás változásaira, valamint jól korrelál a sejtszámmal (DAPI) is. A technika alkalmas a sejtvesztés nélküli, csak életképesség csökkenéssel járó neurodegeneratív folyamatok kvantitatív detektálására. Az immuncitokémiai módszerek alkalmasnak bizonyultak a tenyészet állapotának, azaz összetételének mennyiségi (immunfluoreszcens) és minőségi (mikroszkópos analízis) vizsgálatára egyaránt.

A stressz esszék vonatkozásában a rövid túlélést követő vizsgálatokban az életképesség mérésen alapuló MTT alkalmasabb. A hosszabb túlélésű kísérletekben, a sejtvesztéssel is járó degeneratív folyamatok már immuncitokémiai módszerekkel is detektálhatóak., valamint az egyes sejt típusokat felépítő szerkezeti molekulák csökkenését, mint axonrövidülés, nyúlvány degradálódás, asztroglia szétterülés és még számos egyéb jelenség is kvantitatívan mérhető.

Az FMP technika a Molekuláris Farmakológiai laboratóriumban eredetileg receptor fehérjét expresszáltatott HEK-293 sejtvonalak membránpotenciál-változásainak mérésére volt optimalizálva, ezért a módszert az in vitro idegsejtek kultúrákra kellett átültetni. A primer tenyészetek neurális aktivitására az AMPA receptor indukálta membránpotenciál-változást választottuk, mivel azok már a fejlődés korai szakaszában megjelennek [69], ami esetünkben a tenyészet vizsgálati idejét, 7-10 napos kort jelent. A méréseim során sikerült AMPA koncentrációsornak megfelelő növekvő receptor válaszokat detektálni, valamint az aktivitást megszüntetni GYKI 52466 AMPA antagonistá segítségével. A technika neuron specifikitását ugyancsak sikerült igazolni a kizárólag asztroglia sejteket tartalmazó tenyészetek vizsgálatával, amelyek nem vagy csak igen enyhe neurális aktivitást produkáltak. Összegezve kijelenthető, hogy az FMP mérés alkalmas a részletes, érzékeny,

neuronaktivitást érintő neurodegeneráció vizsgálatára. Az FMP módszer szórása jóval nagyobb, az eddig taglalt módszerekhez képest, ami a neuronaktivitási folyamatok meglehetősen komplexitására vezethető vissza.

A stressz esszék beállítása során a cél egy részlegesen toxikus koncentráció tartomány meghatározása volt, ahol a neuroprotektív tulajdonsággal rendelkező vegyületek képesek lehetnek visszafordítani a neurodegeneratív folyamatokat és helyreállítani a sejt normális működését.

Az alkalmazott stressz esszék során általában az irodalomban megtalálható paramétereket találtam alkalmasnak, ugyanakkor több olyan módszertani változtatást alkalmaztam, amik az esszék hatékonyságát és/ vagy reprodukálhatóságát növelte.

A reaktív oxigén gyök toxicitási esszén a kísérletek során sikerült az ideális hidrogén-peroxid koncentrációkat kiválasztani, amelyek sejtszámban nem okoznak csökkenést, de életképességben igen. A kezelés hatásossága nagyban múlik a médium antioxidáns tartalmán. Megvizsgáltam ebből a szempontból, mind a tenyésztési NBA médiumot mind a MEM-et. A NBA médiumban nagyobb H_2O_2 koncentrációkat kell alkalmaznia megfelelő hatás érdekében, viszont így nem szükséges lecserélni a tenyészetek médiumát, ami stressz hatást jelent a kortikális kultúrák számára [68].

Az egyes sejt típusokra gyakorolt ROS toxicitás mértékét megvizsgálva, az asztroglia sejtek nagyságrenddel nagyobb ROS koncentrációnak is képes ellenállni, mint a neuron.

Azt is sikerült bebizonyítani, hogy az esetleges asztroglia szennyezés ellenállóbbá teszi a tenyészeteket az ROS kezeléssel szemben, köszönhetően nagyobb anyagcsere kapacitásának, így az megvédi az érzékenyebb neuronokat az oxidatív stresszel szemben. Ezért a tenyészetek sejtösszetételének ellenőrzése nagyon fontos szereppel bír a megfelelő kezelés kiválasztására.

Arra is fény derült, hogy az MTT mérés során, egyes H_2O_2 koncentrációk esetében életképességben még nem tapasztalható különbség, ugyanakkor neuronaktivitásban (FMP) már markáns eltérés tapasztalható. Ezért a neuron működés zavarát okozó enyhébb oxidatív toxicitások detektálásakor alkalmazható az érzékenyebb FMP technika.

A glutamát toxicitási kísérletek beállítása során, meghatároztam a megfelelő glutamát koncentrációkat, amelyek életképességben csökkenést okoznak és ahol az esetleges neuroprotektív hatóanyagok gátolhatják az excitotoxikus folyamatokat. Immuncitokémiai vizsgálatokkal igazoltam, hogy, a glutamát kezelés csak a neuronokra ártalmas az asztroglia sejtek a legmagasabb glutamát kezelés során sem sérültek. Az excitotoxicitás okozta idegsejtpusztulás MK-801 NMDA antagonistákkal kivéhető volt, ami az extraszinaptikus

NMDA receptor közvetítette hatást igazolta. Az FMP méréseim bebizonyították, hogy a ROS toxicitáshoz hasonlóan életképességben (MTT) változást nem okozó glutamát koncentráció neuronaktivitásban már markáns csökkenést eredményez.

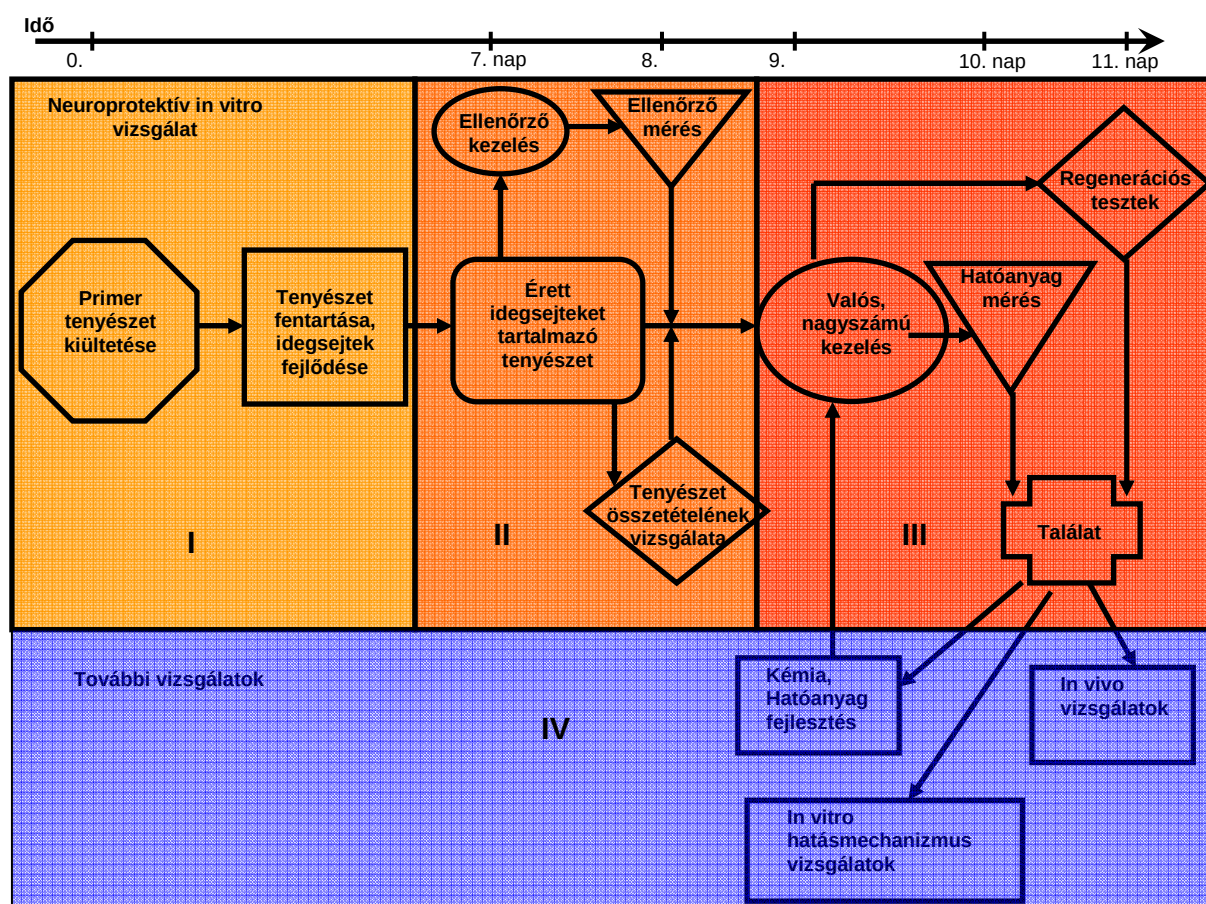
Az éheztetési kísérletekben sikeresen különítettem el a tápanyagmegvonás növekedési faktor okozta életképesség csökkenést. A rövid távú éheztetési vizsgálatok során az asztroglia sejtek nem sérültek, azaz a tapasztalt változások az idegsejtek sérüléséből eredeztethetőek. A tápmegvonásos kísérletekben Hogins és munkatársainak eredményével hasonlóan azt tapasztaltam, hogy a friss NBA/B27 médium rövidtávon csökkenti az idegsejtek életképességét [68]. A tápanyagmegvonás hatékonyságának kiértékelésében az új médium okozta hatásokat a régi médium kontrollként használatával sikerült kivédeni. Az eredeti médium glükózt és glutamaxot tartalmazó, de a különféle a jelátviteli útvonalak megfelelő állapotának fenntartásáért felelős szabályozó molekulákat nem tartalmazó médiumra (NBA B27 nélkül) cserélésével kismértékű életképesség vesztesét tudtam előidézni. A túlélést elősegítő faktorokat nélkülöző médiumhoz 2-dezoxi-glükóz (2-DG) hozzáadásával tovább tudtuk fokozni az életképesség csökkenést, ami így megközelítette a teljes tápanyagmegvonás (ACSF) okozta változás szintjét, így elkülöníthető a tápanyag megvonás és egyéb szabályozó molekulák hiánya okozta hatás.

Az egyes neurotoxicitási esszék beállítását követően, egy komplex neuroprotektív gyógyszerhatóanyag-jelölt molekula szűrési metodikai lépéssorozat megtervezését tűztem ki célul. Az összetett eljárás folyamat ábráját az 18. ábra mutatja be.

A folyamat kiindulópontjában primer tenyésztés kiültetése áll. Itt a leglényegesebb elem az állat kora (posztnatális vagy embrionális) és az ebből fakadó tenyészet összetétel különbség, illetve a sejtmennyiség. A posztnatális neurális kultúra ugyanis sokkal több gliasejtet tartalmazhat, ami mint azt korábbiakban kifejtettem nagyban befolyásolhatja a toxicitás hatásosságát. Az embrionális primer tenyészet másik előnye pedig a nagyobb mennyiségű neuron kinyerése. A tenyészet fenntartása során is fontos a mérések szempontjából ideális neuron-glia arány megtartása, ez legfőképpen a megfelelő idejű CAR kezeléssel érhető el, illetve a tenyésztő médium szérum tartalmának változtatásával. A fenti problémák ugyan kulcsszerepet töltenek be az idegi in vitro rendszerek felállításában, de jelen dolgozatomban ezeket a kérdéseket nem tárgyalom, a tenyészetek elkészítésében kollégáim által már korábban beállított sejtenyésztési eljárásokat alkalmaztam (18. ábra I.).

A sejtvonalakhoz képest az elsődleges tenyészetek esetében, a különböző kiültetések között, a következetesen alkalmazott tenyésztési protokoll ellenére, jelentős különbségek lehetnek. Különbség lehet a tenyészetek sejttözetételében, ami, mint azt kimutattuk a

tesztek többségében jelentősen befolyásolja a vizsgálat eredményét. A vizsgálatok megkezdése és a hatásos kezelési koncentrációk beállítása érdekében szükségesek az immuncitokémiai sejtösszetétel ellenőrzés. Az idegsejtek a tenyésztés második hetében jutnak a differenciáció olyan szakaszába, amikor már alkalmasak a neurotoxicitási kísérletek elvégzésére, de a sejtek érési folyamatai az egyes kiültetések között eltérhet, ezért a tenyészetek érzékenysége is változhat. A tenyészetek öregedése okozta eltérések kiküszöböléséért az immuncitokémiai vizsgálatokkal párhuzamosan egy ellenőrző toxicitási teszt (ahol tágabb koncentráció tartományban keressük a megfelelő életképesség csökkenést (MTT)) elvégzése is szükséges. A glutamát érzékenység ellenőrizhető a 10-20-30-50-75-100-500 μM hozzáadott glutamát, a peroxid 10-20-50-100-150-200-500 μM H_2O_2 hozzáadásával. Így rövid idő alatt, kisszámú tenyészet alkalmazásával pontos képet kapunk az aktuálisan alkalmazott tenyészetek érzékenységéről (18. ábra II.). Az optimális hatást produkáló stressz mértékét a nagy mintaelemszámú vizsgálatokkor már csak kisszámú (2-3) toxikus reagens koncentrációval lehet elérni, így több hatóanyagjelölt vegyületek tesztelését tudjuk párhuzamosan elvégezni.



18. ábra In vitro protokoll neuroprotektív hatóanyagok keresésére.

A sejtösszetétel és megfelelő toxikus ágens koncentrációjának tudatában megkezdődhet a nagyszámú hatóanyagjelölt molekulák vizsgálata az egy bizonyos kiválasztott toxikus koncentráció mellett (18. ábra III.). A stressz hatások vizsgálatát jelenleg rövidtávú és állandó toxicitás hatására állítottam be, amelynek mérésére az életképesség vizsgálat tűnik ideálisnak. A kisebb hatások és pontos dózis-hatás görbe feltérképezéséhez a FMP módszer lehet alkalmas. A jelenlegi esszék kis ráfordítással továbbfejleszthetők a regenerációs folyamatok vizsgálatára. A kezelést követő hosszú távú túlélés esetén az immuncitokémiai módszereken alapuló mérések lehetnek informatívak.

A gyógyszerkutatás dinamikájából fakadóan a biológiai eredmények alapján, a hatás lehetséges maximalizálása érdekében, a neuroprotektívnak talált molekula kémiászerkezetéhez hasonló új vegyületek vizsgálata és ezért szintézise javasolandó (18. ábra IV.).

Az esetleges neuroprotektív találatok további vizsgálata szerteágazó (18. ábra IV.). A lehetséges neuroprotektív hatóanyag in vivo állatkísérletekben kerül további hatásvizsgálatra. Mivel a mai gyógyszerkutatásban elengedetlen ismerni az új hatóanyagok részletes molekuláris hatásmechanizmusát, erre további in vitro molekuláris biológiai technikákkal derítenénk fényt.

Végül, de nem utolsósorban felvetődik annak a lehetősége, hogy a primer neurális tenyészetek helyettesíthetők neurális sejtvonalak alkalmazásával, anélkül hogy a modell jelentősen torzulna. Az idegsejtek létrehozására képes sejtvonalk (ak) alkalmazásával az idegsejtek mennyiségének nem szabna határt az állatokból kipreparálható sejtszám, jelentősen csökkenne mind munkabeli és mind az anyagi ráfordítás valamint tovább csökkenne a gyógyszerfejlesztésre felhasznált állatok száma.

A módszer további fejlesztésében szeretnénk a toxicitások típusainak körét bővíteni ismert neurotoxikus anyagok adásával, mint a gyulladások esetén megnövekedő interleukinek, a különböző stresszhormonok (glükokortikoszteroidok), bakteriotoxinok illetve az Alzheimer kór feltételezett kiváltójának az A β fehérjék hozzáadásával.

A jelenleg rendelkezésünkre álló tesztek igen nagy előnye, hogy párhuzamos tenyészeteken szeparált vizsgálhatóak a különféle stressz hatások. Az NMDA-receptor specifikus blokkolásával a vártan megfelelően teljes egészében gátoltuk a glutamát indukálta excitotoxicitást és részben a H₂O₂ okozta sejtpusztulást, azaz O⁻ szabadgyök okozta idegsejt-pusztulás hátterében részben az NMDA receptorok állnak. A ROS vegyületek okozta sejtpusztulás eredményeképpen a sejtek közötti térben megnövekedő

glutamát koncentráció okozhat további neuron pusztulást. A fenti eredményeim hangsúlyozzák, hogy az idegsejt degradáció hátterében szorosan összefüggő sejtpusztító mechanizmusok állnak, amelynek kapcsolatait az itt bemutatott rendszer segítségével szeretném részletesen vizsgálni.

A jövőben, elsősorban a programozott sejthalálok, úgymint az apoptózis és az autofágia megkülönböztetésére helyezem a hangsúlyt, ami igen komplikált feladat, hiszen ezek folyamatok nem csak egy tenyészetben belül, hanem az egyes sejtekben párhuzamosan és egymásba alakulva is lejátszódhatnak [59]. Valamint a különböző sejtkárosító hatások (ROS, energiahány stb.) eltérő mértékben aktiválják az egyes sejtpusztulási folyamatokat. Ehhez speciális fluoreszcensen kvantifikálható apoptózis (aktivált kaspáz 3 ellenanyag) és autofágia marker (danszilkadáverin, autofagoszóma jelölés) alkalmazását tervezem.

Az indukált degeneratív folyamatok molekuláris profiljának meghatározása segíti az esetleges neuroprotektív támadáspontok identifikálását, illetve az egyes tesztekben hatékonynak bizonyult molekulák hatásmechanizmusának megállapítását is.

VII. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszöni Dr. Herberth Balázs témavezetőmnek, hogy a Molekuláris Farmakológiai Kutatólaboratóriumban szakmai irányítása alatt készíthettem el a TDK dolgozatomat. Valamint, hogy időt és fáradságot nem sajnálva mindenben segítette munkámat.

Továbbá szeretném megköszönni Dr. Antoni Ferenc kutatási igazgatónak, hogy biztosította a lehetőséget, hogy az EGIS Gyógyszergyár Nyrt. Preklinikai Kutatási Főosztályának munkájába bekapcsolódhassak.

Köszönettel tartozom Kovács Gábornak, hogy közreműködött a neuronok preparálásában, valamint laboratóriumi kísérleteim során mindenben segítséget nyújtott.

Szeretnék köszönetet mondani továbbá Kalmár Csillának és Hugyecz Angélának, hogy segítettek kísérletes munkáimat, valamint hálás vagyok az EGIS Preklinikai Kutatási Főosztály összes munkatársának, hogy munkám során bármikor fordulhattam hozzájuk tanácsért és segítségért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak, hogy megteremtették a hátteret, ahhoz hogy elkészíthessen TDK dolgozatomat.

VIII. Irodalomjegyzék

1. Siegel, G.J., *Basic neurochemistry : molecular, cellular, and medical aspects*. 7th ed. 2006, Amsterdam ; Boston: Elsevier. xxiv, 992 p.
2. Brookmeyer, R., et al., *Forecasting the global burden of Alzheimer's disease*. *Alzheimers Dement*, 2007. **3**(3): p. 186-91.
3. Berchtold, N.C. and C.W. Cotman, *Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s*. *Neurobiol Aging*, 1998. **19**(3): p. 173-89.
4. Waldemar, G., et al., *Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline*. *Eur J Neurol*, 2007. **14**(1): p. e1-26.
5. Davies, P., *Challenging the cholinergic hypothesis in Alzheimer disease*. *JAMA*, 1999. **281**(15): p. 1433-4.
6. Raschetti, R., et al., *Cholinesterase inhibitors in mild cognitive impairment: a systematic review of randomised trials*. *PLoS Med*, 2007. **4**(11): p. e338.
7. Hardy, J. and D. Allsop, *Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease*. *Trends Pharmacol Sci*, 1991. **12**(10): p. 383-8.
8. Nikolaev, A., et al., *APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases*. *Nature*, 2009. **457**(7232): p. 981-9.
9. Schmitz, C., et al., *Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(4): p. 1495-502.
10. Goedert, M., M.G. Spillantini, and R.A. Crowther, *Tau proteins and neurofibrillary degeneration*. *Brain Pathol*, 1991. **1**(4): p. 279-86.
11. Bartzokis, G., P.H. Lu, and J. Mintz, *Quantifying age-related myelin breakdown with MRI: novel therapeutic targets for preventing cognitive decline and Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis*, 2004. **6**(6 Suppl): p. S53-9.
12. Giacobini, E., *New trends in cholinergic therapy for Alzheimer disease: nicotinic agonists or cholinesterase inhibitors?* *Prog Brain Res*, 1996. **109**: p. 311-23.
13. Riordan, K.C., et al., *Effectiveness of adding memantine to an Alzheimer dementia treatment regimen which already includes stable donepezil therapy: a critically appraised topic*. *Neurologist*, 2011. **17**(2): p. 121-3.
14. Lipton, S.A., *Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(2): p. 160-70.
15. Herrmann, N., A. Li, and K. Lancot, *Memantine in dementia: a review of the current evidence*. *Expert Opin Pharmacother*, 2011. **12**(5): p. 787-800.
16. Samii, A., J.G. Nutt, and B.R. Ransom, *Parkinson's disease*. *Lancet*, 2004. **363**(9423): p. 1783-93.
17. Xia, Y., et al., *Characterization of the human alpha-synuclein gene: Genomic structure, transcription start site, promoter region and polymorphisms*. *J Alzheimers Dis*, 2001. **3**(5): p. 485-494.
18. Rao, S.S., L.A. Hofmann, and A. Shakil, *Parkinson's disease: diagnosis and treatment*. *Am Fam Physician*, 2006. **74**(12): p. 2046-54.
19. Bronstein, J.M., et al., *Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues*. *Arch Neurol*, 2011. **68**(2): p. 165.
20. Dougherty, D. and S.L. Rauch, *Neuroimaging and neurobiological models of depression*. *Harv Rev Psychiatry*, 1997. **5**(3): p. 138-59.
21. Parashos, I.A., et al., *Magnetic-resonance morphometry in patients with major depression*. *Psychiatry Res*, 1998. **84**(1): p. 7-15.

22. Nutt, D.J., *Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder*. J Clin Psychiatry, 2008. **69 Suppl E1**: p. 4-7.
23. Catena-Dell'Oso, M., et al., *Inflammatory and neurodegenerative pathways in depression: a new avenue for antidepressant development?* Curr Med Chem, 2011. **18**(2): p. 245-55.
24. Delgado, P.L., *Depression: the case for a monoamine deficiency*. J Clin Psychiatry, 2000. **61 Suppl 6**: p. 7-11.
25. *Brain Basics: Preventing Stroke*, N.I.o.N.d.a. Stroke, Editor. 2011.
26. Marler, J.R., et al., *Early stroke treatment associated with better outcome: the NINDS rt-PA stroke study*. Neurology, 2000. **55**(11): p. 1649-55.
27. Hinkle, J.L. and L. Bowman, *Neuroprotection for ischemic stroke*. J Neurosci Nurs, 2003. **35**(2): p. 114-8.
28. Bossy-Wetzel, E., R. Schwarzenbacher, and S.A. Lipton, *Molecular pathways to neurodegeneration*. Nat Med, 2004. **10 Suppl**: p. S2-9.
29. Qin, L., et al., *Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration*. Glia, 2007. **55**(5): p. 453-62.
30. Sorrells, S.F., et al., *The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation*. Neuron, 2009. **64**(1): p. 33-9.
31. Zecca, L., et al., *The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease*. FEBS Lett, 2002. **510**(3): p. 216-20.
32. Glass, C.K., et al., *Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration*. Cell, 2010. **140**(6): p. 918-34.
33. Devasagayam, T.P., et al., *Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects*. J Assoc Physicians India, 2004. **52**: p. 794-804.
34. Emerit, J. and A.M. Michelson, *[Free radicals in medicine and biology]*. Sem Hop, 1982. **58**(45): p. 2670-5.
35. Jacob, R.A. and B.J. Burri, *Oxidative damage and defense*. Am J Clin Nutr, 1996. **63**(6): p. 985S-990S.
36. Andersen, J.K., *Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?* Nat Med, 2004. **10 Suppl**: p. S18-25.
37. Tompkins, A.J., et al., *Mitochondrial dysfunction in cardiac ischemia-reperfusion injury: ROS from complex I, without inhibition*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(2): p. 223-31.
38. Ames, B.N., M.K. Shigenaga, and T.M. Hagen, *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 7915-22.
39. Clements, J.D., et al., *The time course of glutamate in the synaptic cleft*. Science, 1992. **258**(5087): p. 1498-501.
40. Harkany, T., et al., *Neuroprotective approaches in experimental models of beta-amyloid neurotoxicity: relevance to Alzheimer's disease*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 1999. **23**(6): p. 963-1008.
41. Couratier, P., et al., *Modifications of neuronal phosphorylated tau immunoreactivity induced by NMDA toxicity*. Mol Chem Neuropathol, 1996. **27**(3): p. 259-73.
42. Paul, I.A. and P. Skolnick, *Glutamate and depression: clinical and preclinical studies*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1003**: p. 250-72.
43. Kaufer, D., et al., *Restructuring the neuronal stress response with anti-glucocorticoid gene delivery*. Nat Neurosci, 2004. **7**(9): p. 947-53.

44. Turrin, N.P. and S. Rivest, *Tumor necrosis factor alpha but not interleukin 1 beta mediates neuroprotection in response to acute nitric oxide excitotoxicity*. J Neurosci, 2006. **26**(1): p. 143-51.
45. O'Bryant, S.E., et al., *Serum brain-derived neurotrophic factor levels are specifically associated with memory performance among Alzheimer's disease cases*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2011. **31**(1): p. 31-6.
46. Drzyzga, L.R., A. Marcinowska, and E. Obuchowicz, *Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies*. Brain Res Bull, 2009. **79**(5): p. 248-57.
47. Mattson, M.P., *Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1144**: p. 97-112.
48. Almeida, R.D., et al., *Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways*. Cell Death Differ, 2005. **12**(10): p. 1329-43.
49. Formigli, L., et al., *Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis*. J Cell Physiol, 2000. **182**(1): p. 41-9.
50. Walter, P., Lewis J., Johnson A., Raff M., *Apoptosis*, in *Molecular Biology of the Cell*. 2007, Garland science.
51. Dejean, L.M., S. Martinez-Caballero, and K.W. Kinnally, *Is MAC the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis?* Cell Death Differ, 2006. **13**(8): p. 1387-95.
52. Fesik, S.W. and Y. Shi, *Structural biology. Controlling the caspases*. Science, 2001. **294**(5546): p. 1477-8.
53. Ravagnan, L., T. Roumier, and G. Kroemer, *Mitochondria, the killer organelles and their weapons*. J Cell Physiol, 2002. **192**(2): p. 131-7.
54. Wajant, H., *The Fas signaling pathway: more than a paradigm*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1635-6.
55. Herrera, B., et al., *Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes*. FASEB J, 2001. **15**(3): p. 741-51.
56. Manev, H., et al., *Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death*. Mol Pharmacol, 1989. **36**(1): p. 106-12.
57. Levraut, J., et al., *Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(2): p. H549-58.
58. Nicotera, P., M. Leist, and L. Manzo, *Neuronal cell death: a demise with different shapes*. Trends Pharmacol Sci, 1999. **20**(2): p. 46-51.
59. Yakovlev, A.G. and A.I. Faden, *Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies*. NeuroRx, 2004. **1**(1): p. 5-16.
60. Syntichaki, P. and N. Tavernarakis, *Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos?* EMBO Rep, 2002. **3**(7): p. 604-9.
61. Eguchi, Y., S. Shimizu, and Y. Tsujimoto, *Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis*. Cancer Res, 1997. **57**(10): p. 1835-40.
62. Mizushima, N. and D.J. Klionsky, *Protein turnover via autophagy: implications for metabolism*. Annu Rev Nutr, 2007. **27**: p. 19-40.
63. Rubinsztein, D.C., et al., *Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair*. Autophagy, 2005. **1**(1): p. 11-22.
64. Larsen, K.E. and D. Sulzer, *Autophagy in neurons: a review*. Histol Histopathol, 2002. **17**(3): p. 897-908.

65. Kenessey, A., et al., *Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration*. J Neurochem, 1997. **69**(5): p. 2026-38.
66. Young, J.E., R.A. Martinez, and A.R. La Spada, *Nutrient deprivation induces neuronal autophagy and implicates reduced insulin signaling in neuroprotective autophagy activation*. J Biol Chem, 2009. **284**(4): p. 2363-73.
67. Chuang, D.M., X.M. Gao, and S.M. Paul, *N-methyl-D-aspartate exposure blocks glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells*. Mol Pharmacol, 1992. **42**(2): p. 210-6.
68. Hogins, J., et al., *Excitotoxicity triggered by neurobasal culture medium*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25633.
69. Scherer, S.E. and V. Gallo, *Expression and regulation of kainate and AMPA receptors in the rat neural tube*. J Neurosci Res, 1998. **52**(3): p. 356-68.