

37. OTDK Biológia Szekció

Eltérő progressziójú ALS-es egérmodellek alkotása és karakterizálása betegek vérszérumának felhasználásával

Szerző: **Kádár Zalán**

Biológia szakos hallgató, III. évfolyam

Témavezetők: **Prof. Dr. Nógrádi Antal, M.D., Ph.D., D.Sc.**

tanszékvezető egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem; Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar; Anatómiai, Szövet-
és Fejlődéstani Intézet

Dr. Nógrádi Bernát, M.D., Ph.D.

klinikai rezidens

Szegedi Tudományegyetem; Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Neurológiai Klinika

Belső Konzulens: **Dr. Farkas Tamás, Ph.D.**

egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem; Természettudományi és Informatikai Kar; Élettani, Szervezettani
és Idegtudományi Tanszék

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Szeged

2024

Rövidítésjegyzék

ALS: amiotrófiás laterálszklerózis

ALSFRS-R: *revised ALS functional rating scale*

AMN: alsó motoneuron

BSA: marha szérum albumin, *bovine serum albumin*

BTX: alfa-bungarotoxin

C9orf72: 9-es kromoszóma 72-es nyitott leolvasási keret, *chromose 9 open reading frame 72*

EAAT2: *excitatory amino acid transporter 2*

FALS: familiáris ALS

FMN: felső motoneuron

FUS: *fused in sarcoma*

GY-ALS: gyors progressziójú ALS

IgG: immunoglobulin G

IZ: innervációs zóna

IZK: innervációs zónán kívül

L-ALS: lassú progressziójú ALS

n.sz.: nem szignifikáns

NMJ: neuromuszkuláris junkció

PBS: foszfát pufferelt sóoldat, *phosphate buffer saline*

PFA: paraformaldehid

ROS: reaktív oxigéngyökök, *reactive oxygen species*

SALS: sporadikus ALS

SOD1: Cu-Zn szuperoxid dizmutáz 1

SOL: *m. soleus*

TA: *m. tibialis anterior*

TARDP: TAR DNA-kötő fehérje, *TAR DNA-binding protein*

TDP-43: TAR DNA-kötő fehérje 43, *TAR DNA-binding protein 43*

TPBS: PBS Triton X-szel

Tartalom

1. Bevezető	4
1.1. Az amiotrófiás laterálszklerózis áttekintése	4
1.2. Az ALS csoportosítása és genetikai háttere	4
1.3. Az ALS patomechanizmusának áttekintése	6
1.3.1. Mitokondriális diszfunkció és oxidatív stressz	6
1.3.2. Glutamát excitotoxicitás és asztrogliá diszfunkció	7
1.3.3. Fehérje aggregáció	7
1.3.4. Neuroinflammációs folyamatok szerepe ALS-ben	8
1.3.5. Szisztémás immunfolyamatok ALS-ben	9
1.4. Terápiás lehetőségek áttekintése	9
1.5. Kísérleti modellek az ALS kutatásában	10
2. Célkitűzés	12
3. Anyagok és módszerek	12
3.1. Etikai engedélyek	12
3.2. ALS-es betegek és szérumminták áttekintése	12
3.3. Kísérleti állatok és a passzív szérum transzfer	14
3.4. Immunhisztokémiai festések	15
3.5. NMJ analízis	16
3.6. Motoneuron és leukocita sejtszám meghatározása	18
3.7. Statisztikai analízis	18
4. Eredmények	18
4.1. Motoneuron túlélés és TDP-43 patológia a gerincvelőben	18
4.2. Passzív szérum transzfer-indukálta NMJ denerváció a TA és SOL izmokban	19
4.3. Szérumtranszfer-indukálta NMJ patológia finom morfometriai analízise	21
4.4. Leukocita infiltráció a TA és SOL izmokban	23
5. Diskusszió	25
6. Konklúzió	27
7. Köszönetnyilvánítás	28
8. Irodalomjegyzék	29
9. Tételes hozzájárulási nyilatkozat	36
10. Mellékletek	38

1. Bevezető

1.1. Az amiotrófiás laterálszklerózis áttekintése

Az amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) a kortikális Betz-féle idegsejteket és a gerincvelői motoneuronokat érintő progresszív, halálos kimenetelű neurodegeneratív betegség. A beteg tüneteit a fokozódó izomgyengeség jellemzi: az első panaszok között gyakran ügyetlenség, bukácsolás szerepel, majd a betegség előrehaladásával a gyengeség folyamatosan súlyosbodik, és a legtöbb esetben jelentős mértékben korlátozza a beteget mozgásában és mindennapi teendőinek ellátásában. Az ALS-es betegek egy csoportjában jellemző a verbális kommunikáció megváltozása, a beszéd érthetőségének és artikulációjának a csökkenése is. Az első tünetek megjelenésétől számított 2-5 éven belül, a légzőizmok gyengesége miatt kialakuló légzési elégtelenség miatt következik be a halál (Masrori és Van Damme, 2020).

A neurológiai betegségek közül az ALS viszonylag ritka betegségnek számít (Huang és mtsai., 2023), azonban, ha pusztán a motoneuron megbetegedésekre szűkítjük a kört, ezen csoportban a leggyakoribb betegségként szerepel (Riancho és mtsai., 2019). Továbbá, az előrejelzések alapján a jövőben számottevő ugrás lesz megfigyelhető a betegség prevalenciájában: Tryanor és munkatársainak közleménye alapján 2040-re az ALS-es betegek száma 69%-kal fog emelkedni (Arthur és mtsai., 2016). A betegség incidenciája 100 000 emberből 2 főre, míg prevalenciája 100 000 emberből 6-9 főre tehető, az élettartam prevalenciája pedig 1/350 (Mead és mtsai., 2023). A betegség leggyakrabban 58 és 65 éves kor között jelentkezik, valamint nemi dimorfizmust mutat, a betegek megközelítőleg 40%-a nő és 60%-a férfi (Ingre és mtsai., 2015). Ennek egyik feltételezett oka a női nemi hormon – az ösztrogén – neuroprotektív hatása lehet (Raymond és mtsai., 2021).

1.2. Az ALS csoportosítása és genetikai háttere

A betegség klinikai szempontból jelentős heterogenitást mutat, ezért számos csoportosítási módszert alkalmaznak. Ezek egyike a betegség családi öröklésmenetének felmérése, mely alapján két csoportba sorolhatjuk az érintetteket. Az egyik csoport a familiáris (FALS) csoport, melybe azon betegek tartoznak, akiknek a családjukban már előfordult a betegség, illetve a sporadikus csoport (SALS), mely esetben családi öröklődésmenet nem ismert. Az esetek megközelítőleg 10%-a familiáris, míg a maradék körülbelül 90%-a sporadikus (Amin és mtsai., 2020). Az FALS csoportnál minden esetben genetikai elváltozást sejtünk a háttérben, ám a pontos mutáció csak az FALS betegek 60-70%-ban mutatható ki, az SALS csoport esetében ez körülbelül 10% (Mejzini és mtsai., 2019). Az ALS kialakulásával kapcsolatba hozható gének

száma jelenleg 40 felett van és folyamatosan növekszik (Mejzini és mtsai., 2019), azonban ezen mutációk közül a legtöbb csupán az esetek igen kis százalékában van jelen. A legismertebb és legnagyobb százalékban előforduló génmutációk a *SOD1* (Cu-Zn szuperoxid dizmutáz),

C9orf72 (9-es kromoszóma 72-es nyitott leolvasási keret), *TARDBP* (TAR DNS-kötő fehérje 43, TDP-43) és *FUS* (*Fused in Sarcoma*) géneket érintik. A heterogenitást tovább növeli, hogy a génmutációk egymáshoz viszonyított aránya földrajzi területenként eltér. Európában a leggyakoribb ismert génmutáció a *C9orf72* (az összes mutációval azonosított beteg 33,7%-a) gént érinti, majd ezt követi a *SOD1* (14,8%), *TDP-43* (4,2%) és végül a *FUS* (2,8%). Ezzel szemben Ázsiában a leggyakoribb a *SOD1* (30%) mutációja, majd ezt követi a *FUS* (6,4%), *C9orf72* (2,3%) és *TDP-43* (1,5%). Ez az egymáshoz viszonyított arány az ismert genetikai eredetű sporadikus eseteknél is hasonló képen oszlik el (Zou és mtsai., 2017; Mejzini és mtsai., 2019).

Egy másik – főleg klinikusok által használt – csoportosítási lehetőség a klinikai tünetek és azok megjelenésén alapul. A spinális vagy „klasszikus” ALS esetén a betegnél a tünetek elsőként a végtagokon jelentkeznek, fájdalom nélküli izomgyengeség formájában. Ezzel szemben a ritkább, bulbáris kórforma esetén a klinikai képet az agyidegek károsodása okozta panaszok uralják. Az ALS-es esetek körülbelül 30%-a bulbáris kezdetű (Stegmann és mtsai., 2020), azonban minél idősebb korban jelenik meg a betegség, annál nagyobb a valószínűsége, hogy a betegség bulbáris dominanciát fog mutatni (Forbes és mtsai., 2004). Legtöbb esetben a bulbáris ALS-el diagnosztizált betegek kevesebb, mint 2 évig élnek a tünetek kezdetétől számítva (Stegmann és mtsai., 2020), így meglehetősen agresszív kórformáról beszélünk. Az ebbe a csoportba tartozó betegeknél a leggyakrabban megfigyelhető tünetek a beszédmozgások kivitelezésének nehézsége, az artikuláció romlása, nyelési zavarok, a nyelv rendellenes, kényszeres mozgása (Swinnen és Robberecht, 2014).

Klinikailag a spinális és bulbáris ALS megkülönböztetésén túl a „felső motoneuronális” (FMN) és az „alsó motoneuronális” (AMN) tüneteket is szétválasztjuk. Az FMN tünetek – melyek a motoros kortextben található Betz-féle óriás pyramis sejtek sérülésére utalnak – jellemzően a hiperreflexia, az izomtónus kóros fokozódása (spaszticitás) és kóros reflexek (pl. Babinski reflex) megjelenése. Ezzel szemben az AMN tünetek – melyek a gerincvelői mozgató idegsejt károsodására utalnak – az izomsorvadást, a hiporeflexiát és az izom fasciculatiót foglalják magukba (Swinnen és Robberecht, 2014). Fontos, hogy mind a spinális, mind a bulbáris fenotípus esetén klinikailag AMN és FMN érintettséget is észlelünk, azonban egymáshoz

viszonyított arányuk, dominanciájuk eltérő lehet. Ez alapján egyes betegeket AMN-domináns, illetve FMN-domináns csoportokba sorolhatunk. Amennyiben csak AMN, vagy FMN tüneteket látunk kizárólagosan, úgy nagy valószínűséggel más motoneuron betegséggel állunk szemben (Swinnen és Robberecht, 2014).

Hagyományosan a fentebb említett csoportosítási módszereket alkalmazták az ALS-es betegek vizsgálatakor, ám az elmúlt időszakban egy új megközelítés került előtérbe, ami a betegek tüneteinek előrehaladását, illetve annak ütemét veszi alapul. Egyes betegeknél a betegség gyorsabb lefolyású, míg másoknál lassabb, ezért klinikai és tudományos szempontból is fontos lehet, hogy a két csoportot elkülönítsük egymástól. A legfrissebb irányelvek alapján az ALS-es betegek bevonásával történő klinikai vizsgálatoknál a betegek progresszió szerint alcsoportokba sorolása javasolt (Van Den Berg és mtsai., 2019). A betegség progressziójának üteme ráadásul korrelációt mutat más faktorokkal is, mint például a fiatal kor, FMN-domináns tünettan és spinális ALS fenotípus jellemzően a lassú progressziójú ALS-hez kötődik, míg a bulbáris ALS fenotípus gyors progressziót eredményez (Witzel és mtsai., 2022). Arról azonban, hogy a klinikailag észlelt progresszió üteme hogyan függ össze a betegség kialakulásában szerepet játszó patomechanikai folyamatokkal, korlátozott ismeretekkel rendelkezünk. A progresszió és a patomechanizmus kapcsolatrendszerének pontosabb megértése jelentős előrelépést hozhat a betegség és a terápiás lehetőségek feltérképezésében is.

1.3. Az ALS patomechanizmusának áttekintése

Az ALS-ben számos patofiziológiai tényező jelenlétét mutatták ki az elmúlt évtizedek során, melyek szerepe a betegségben eltérő mértékűnek bizonyult. Ezek közül több degeneratív folyamat is összefügghet egymással, így azok egy komplex degeneratív kaszkádot indukálva vezetnek a motoneuronok pusztulásához (Mead és mtsai., 2023). Ebből a heterogenitásból fakadóan az ok-okozati összefüggések nehezen állapíthatóak meg és tovább nehezíti a vizsgálatokat, hogy a betegség előrehaladásával párhuzamosan egyes patofiziológiai elemek jellege is változhat (Ehrhart és mtsai., 2015). A következő bekezdésekben részletesebben áttekintjük azokat a folyamatokat, melyek jelen tudásunk szerint jelentős mértékben hozzájárulnak az ALS-ben megfigyelhető motoneuron degenerációhoz.

1.3.1. Mitokondriális diszfunkció és oxidatív stressz

A mitokondrium az energiatermelés központi organeluma, ezen felül fontos funkciót tölt be a kalcium homeosztázisban, sejtlélegzésben, reaktív oxigéngyökök (*reactive oxygen species*; ROS)

képzésében és az apoptózisban is. Mindezen fontos funkciók miatt sérülése és funkciójának elvesztése hozzájárul a mozgató idegsejtek károsodásához ALS-ben (Zhao és mtsai., 2022). A mitokondriumok károsodása során jellegzetes strukturális változásokat észlelünk: a mitokondrium felpuffad és a rendezett *crista* szerkezete pedig integritását veszti (Boillée és mtsai., 2006). Az organelum diszfunkciója jól vizsgálható a SOD1 egérmodellben, ami az ALS-ben elsőként azonosított génmutáción alapul (Bonafede és Mariotti, 2017; Rosen és mtsai., 1993). A SOD1 mutáció hatására eltérések következnek be az ATP és ROS termelésében, az energia és kalcium homeosztázis felborul és a mitokondrium által betöltött egyéb funkciók károsodását is megfigyelték. Ezen túlmenően reaktív oxigéngyökök felszabadulása miatt oxidatív stressz is megfigyelhető, mely egy önálló patofiziológiai tényező. Oxidatív stresszről akkor beszélhetünk, ha a ROS mennyisége meghaladja az azt eltávolítani képes sejtek teljesítményét. Az így felgyülemelő ROS károsítja a sejt szerkezetét, illetve a fehérjéket, DNS-t és RNS-t is. A mitokondriumok axonális transzportja is károsodik a mutáció hatására, így pedig nehezebben tudnak eljutni az energiát nagyobb mennyiségben felhasználó területekre, például a terminális szinapszisokhoz.

1.3.2. Glutamát excitotoxicitás és asztroglia diszfunkció

A glutamát a központi idegrendszer elsődleges serkentő neurotranszmittere, mely a preszinaptikus neuronból a szinaptikus résbe ürül, ahol posztszinaptikus receptorokat aktivál. A normális neuronális tüzelési mintázat és szinapszisműködés fenntartásának feltétele, hogy a felszabaduló glutamát kiürüljön a szinaptikus résből. Ezt a folyamatot főként az asztroglia végzi a serkentő aminosav transzporter 2 (*excitatory amino acid transporter 2*; EAAT2), melynek szintjében csökkenést észleltek különböző ALS-es modellekben (Rosenblum & Trotti, 2017). Az EAAT2 túltermeltetése kísérleti állatokban késleltette a motoneuronok degenerációját és ennek révén a betegség kialakulását is, de az élettartamot nem növelte meg. Ez alapján az feltételezhető, hogy az EAAT2 receptorok számának csökkenése hozzájárul az ALS-ben látott motoneuron degenerációhoz, azonban nem ez vezet elsődlegesen a mozgató idegsejtek pusztulásához (Guo és mtsai., 2003; King és mtsai., 2016).

1.3.3. Fehérje aggregáció

A neurodegeneratív betegségek közös patológiai jellemzője a kóros fehérje aggregátumok felgyülemelése az idegsejtekben, mely folyamat az ALS esetében is megfigyelhető (Blokhuys és mtsai., 2013). Bár több fehérje kóros aggregációját is igazolták ALS-ben, a leggyakrabban előforduló és leginkább ALS-specifikusnak tartott fehérje a TDP-43 (TAR DNS-kötő fehérje

43). A TDP-43 egy DNS és RNS kötő molekula, amelynek elsősorban a nukleáris RNS metabolizmusban és génexpresszió szabályozásában van szerepe (Prasad és mtsai., 2019). Fiziológiai esetben a fehérje a sejtmagban található, azonban patológiai elváltozás esetén a citoplazmába transzlokálódik, mellyel párhuzamosan sejtmagi expressziója csökken. Az ALS-ben citoplazmikus TDP-43 aggregátumok találhatók a gerincvelői motoneuronokban, a kortex egyes területein és gliasejtekben egyaránt, mind a sporadikus, mind a familiáris betegekben. A TDP-43 akkumulációja az ALS-es betegek közel 95%-ban megfigyelhető, de érdekes módon a SOD1 mutációval rendelkező betegeknél nem jelentkezik. A TDP-43-at kódoló *TARDBP* gén mutációja a FALS és SALS esetek 1-2%-ban megfigyelhető és a neurodegeneratív betegségek közül csak az ALS-ben és a frontotemporális demenciában van kóroki szerepe a mutációnak. Egérmodellekben a TDP-43 túlermelítése motoneuron pusztulást és következményes izomerő csökkenést indukál. Mindezen ismeretek mellett további patológiai szerepe és jelentősége egyelőre nem tisztázott (Blokhuys és mtsai., 2013).

A TDP-43 fehérjén túlmenően a FUS és a C9orf72 fehérjék aggregációjának tulajdonítanak jelentőséget ALS-ben. A FUS egy sejtmagi RNS kötő fehérje, melynek aggregátumait több neurodegeneratív betegségnél is megfigyelték már, így nem tekintjük ALS-specifikus markernek (Blokhuys és mtsai., 2013). A *C9orf72*-es génen megjelenő hexanukleotid ismétlődés bővülése a leggyakrabban előforduló mutáció az ALS-es betegek körében. A mutáció miatt felszaporodó dipeptidek akár kis mennyiségben is károsak lehetnek az idegsejtekre (Malik & Wiedau, 2020). Újabb kutatások azt is kimutatták, hogy kapcsolat lehet a *C9orf72* dipeptid ismétlődései és a TDP-43 aggregálódása között, azáltal, hogy az ismétlődésekről átíródó fehérjék előmozdítják az aggregációt (Cook és mtsai., 2020).

1.3.4. Neuroinflammációs folyamatok szerepe ALS-ben

Az ALS-ben az immunfolyamatok és azokhoz kapcsolódó eltérések lokalizáció alapján két részre bonthatóak: a központi idegrendszerre lokalizálódó folyamatok esetében összefoglaló néven neuroinflammációról beszélünk, azonban ezen túlmenően, szisztémásan megjelenő immunfolyamatok is ismertek. A neuroinflammációs reakció részeként megfigyelhető a mikroglia sejtek és asztrociták aktivációja, immunsejtek infiltrációja, valamint gyulladásos citokinek túlermelése (Liu & Wang, 2017).

A mikroglia sejtek a központi idegrendszer rezidens immunsejtjei. A legtöbb idegrendszeri sejttel ellentétben rendkívül mobilisek, így a stressz jelzésre gyorsan és lokálisan tudnak reagálni (Carata és mtsai., 2023). A neurodegeneratív betegség során képződő neuronális

fehérje aggregátumok több párhuzamos receptor-mediált útvonalon keresztül mikroglia aktivációt képesek indukálni, melyet ALS-ben is igazoltak (Liu & Wang, 2017). A gyulladásos folyamatokban intenzíven résztvevő mikroglia sejteket a klasszikus felfogás szerint az ún. M1-es „citotoxikus” és M2-es „anti-inflammatorikus” fenotípusba sorolják. A „citotoxikus” fenotípus reaktív oxigéngyököket, illetve különböző gyulladásos citokineket bocsájt ki, hozzájárulva a sejtek pusztulásához. Az „anti-inflammatorikus” fenotípus ezzel szemben a gyulladásos folyamat kontrollálásával és neurotrofikus faktorok szekréciójával igyekszik támogatni az idegsejtek túlélését (Bonafede & Mariotti, 2017). Megjegyzendő, hogy a jelenlegi nézőpont szerint a mikroglia sejtek egy ennél sokkal komplexebb rendszerben működnek (Paolicelli és mtsai., 2022), így ezen két véglet között akár számos más mikroglia fenotípus is lehet, amely másképp befolyásolja a patológiát.

1.3.5. Szisztémás immunfolyamatok ALS-ben

A gyulladásos folyamatok diszregulációjának részeként szisztémás eltéréseket is dokumentáltak, melyeknek alapvetően három párhuzamos jellemzője van: autoimmunitás, egyes gyulladásos folyamatok túlzott mértékű aktivációja (hyperinflammáció) és sérült immunválasz. Ezen – látszólag ellentétes – folyamatok összetett képet mutatnak, melyet az ALS-es betegekben látott heterogenitás csak tovább fokoz. Az ismert, szisztémás immunfolyamatok közé sorolható a neutrofil granulociták számának emelkedése (Murdock és mtsai., 2017), egyes pro-inflammatorikus citokinek szintjének növekedése (Olesen és mtsai., 2020; Tortelli és mtsai., 2020), illetve a regulátoros T-sejtek számának csökkenése (Mantovani és mtsai., 2009) és ezen sejtek diszfunkciója (Beers és mtsai., 2017). Ezen felül az ALS-es betegek vérében kimutatható motoneuron-ellenes antitestek jelenléte is (Wang és mtsai., 2021).

1.4. Terápiás lehetőségek áttekintése

Ahogy azt a patomechanizmus áttekintése is mutatja, az ALS-ben számos, párhuzamosan futó degeneratív folyamat van jelen, melyek egyértelmű ok-okozati rendszere nem ismert. Ez alapvetően meghatározza a kezelési lehetőségeket is, melyeknél a számos potenciális terápiás támadáspont ellenére kevés klinikailag is hatékony gyógyszerrel rendelkezünk. Az ALS nem gyógyítható betegség és a jelenleg alkalmazott kezelések is pusztán néhány hónappal nyújtják meg a várható élettartamot (Tzeplaeff és mtsai., 2023).

A legelső ALS kezelésére alkalmazott gyógyszer a riluzole volt, mely a glutamát excitotoxicitás mérséklésén keresztül fejt ki neuroprotektív hatását (Fang és mtsai., 2018). Hatásmechanizmusa során gátolja a feszültségfüggő nátriumcsatornák működését a preszinaptikus neuronon, mely folyamat csökkenti a szinaptikus résbe kijuttatott glutamát mennyiségét (Mead és mtsai., 2023). A nátriumcsatornákon túl a gyógyszer képes más ioncsatornákhöz is kötődni (bár változó affinitással), így hatásmechanizmus szempontjából feltehetően több degeneratív folyamatot is képes kedvezően befolyásolni (Doble, 1996). Az elmúlt két évtizedben számos klinikai vizsgálat zajlott különböző terápiás hatóanyagok tesztelése céljából, melyek rendre sikertelenül zárultak (Petrov és mtsai., 2017). Jelenleg az egyik legígéretesebb gyógyszerjelölt molekula a tofersen, egy antiszensz oligonukleotid, mely a SOD1 mRNS-re specifikus. A mutáns SOD1 génről képződő mRNS-hez kötődve annak RNáz H-dependens lebontását iniciálja, így csökkentve a mutáns fehérjének képződését. A gyógyszer jellegéből következik, hogy csupán a SOD1 mutációval rendelkező betegeknek alkalmazható, így a teljes ALS-es betegpopuláció kb. 2-3%-nál nyújt új terápiás lehetőséget. A gyógyszer a *phase 3* kísérletek során is sikeresen csökkentette a SOD1 fehérje mennyiségét a páciensekben, azonban klinikailag nem egyértelmű, hogy milyen mértékben képes lassítani a betegség előrehaladásának ütemét (Miller és mtsai., 2022).

Láthatjuk, hogy a jelenleg alkalmazott terápiák csupán korlátozott mértékben képesek növelni betegek túlélését és számos új gyógyszerjelölt molekula klinikai vizsgálata sikertelenül zárult. A legtöbb gyógyszerjelölt molekula ezen felül csak egy-egy patomechanizmust céloz, míg az ALS-es betegeknek rendkívül összetett kapcsolatrendszerrel mutatnak ezek a folyamatok. Ahhoz, hogy új, átfogóbb és hatékonyabb kezeléseket tudjunk azonosítani, arra van szükség, hogy minél jobb, a betegség heterogenitását minél inkább tükröző modelleket alkossunk.

1.5. Kísérleti modellek az ALS kutatásában

Az ALS kutatásban a leggyakrabban használt modellrendszer transzgenikus rágcslómodelleken alapul, ezeken felül még számos egyéb in vivo (pl. *ecetmuslica*) és in vitro modellt alkalmaznak (Bonifacino és mtsai., 2021). A rágcsló modellek előnye, hogy a legtöbb modellszervezethez viszonyítva hosszú életidejük van, valamint genomjuk teljesen mértékben szekvenált és ismert, illetve a humán genommal jelentős homológiát mutatnak. Az ALS kutatásban jelentős előrelépést hozott az első transzgenikus egérmodell megalkotása, melyben a SOD1 fehérje 93. pozícióban egy glicin alaninra (G93A) cserélésével hoztak létre pontmutációt. A SOD1^{G93A} egérmodell a mai napig a legmeghatározóbb és leggyakrabban

használt modellrendszer, azonban az elmúlt három évtized alatt számos kérdés merült fel a modell pontosságával és a patomechanizmus komponenseivel kapcsolatban. Az egyik ilyen tényező, hogy spontán és progresszíven vesznek el a mutáció másolatai a 21-es kromoszómáról és ez befolyásolhatja a betegség súlyosságát. Továbbá megfigyelték, hogy a választott törzs származási háttere is befolyásolhatja az észlelt fenotípust (Bonifacino és mtsai., 2021).

Az ALS genetikai hátterének feltérképezésével az elmúlt években újabb transzgenikus egérmodelleket hoztak létre, melyek a TDP-43, FUS és C9orf72 mutációkon alapulnak. Bár jelentős erőfeszítések vannak az ezen mutációkra alapuló további modellek megalkotására, a jelenleg elérhető TDP-43, FUS és C9orf72 modelleknek különböző hátrányai és hiányosságai korlátozzák hasznosíthatóságukat. Ezek közé tartoznak a nem-motoros tünetek túlsúlya, a motoros tünetek hiánya, a fenotípus jelentős variabilitása és az ALS-specifikus neuropathológiai folyamatok hiánya. A transzgenikus egérmodellek egyéni hiányosságain felül közös hátrányuk, hogy csak egy-egy mutációt hivatottak modellezni, így csupán a betegpopuláció kis hányadát reprezentálják (Bonifacino és mtsai., 2021; Morrice és mtsai., 2018).

Erre alapozva, alternatív megközelítésként alkották meg a passzív transzfer modellt, ami a betegekől származó biológiai minta egérbe injektálásán alapul. Korábban bizonyították, hogy ALS-es betegek véréből izolált immunoglobulin G (IgG) intraperitoneális injektálásával indukálható az ALS-es tüneteket visszaadó motoneuron patológia egérben (Engelhardt és mtsai., 1995). Későbbi kísérletek során már a betegek teljes vérszérumát injektálták, hogy egy komplexebb biológiai reakciót váltsanak ki, mely még jobban tükrözi a betegekben lezajló folyamatokat (Polgár és mtsai., 2021). A módszer egyik feltételezett működési elve, hogy az akkumulálódó IgG motoneuron-specifikus epitópokhoz kötődik, károsítva egyes organellumokat, így akadályozva normál sejtműködést, mely sejthalálhoz vezethet. Bár a passzív szérum transzfer pontos hatásmechanizmusa nem tisztázott, valószínű, hogy elsősorban pro-inflammatorikus folyamatok indukálják a motoneuron sérülést (Obál és mtsai., 2016). Mivel a passzív szérum transzfer során a mutációktól független módon, akár beteg-specifikusan tudunk egerekben motoneuron betegséget előidézni, így lehetőségünk van átfogóbb, vagy akár célzott betegpopuláció vizsgálatára is.

2. Célkitűzés

Az ALS egy rendkívül heterogén betegség, komplex patomechanikai komponensekkel és kapcsolatrendszerrel. Ahhoz, hogy hatékonyabb kezeléseket tudjunk fejleszteni, elengedhetetlen a betegséget okozó patológias folyamatok pontosabb megértése. A jelenleg alkalmazott transzgenikus állatmodellek csupán a betegek kis hányadát reprezentálják, így kiemelt jelentősége van olyan új állatmodellek megalkotásának, melyek a betegek nagyobb hányadát reprezentálják. Ennek egyik lehetséges módja a passzív szérumsztransfer modell, melynek során ALS-el diagnosztizált betegek vérszérumát injektáljuk egérbe, motoneuron-specifikus károsodást indukálva. Kísérleteink során arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a passzív szérumsztransfer segítségével létre tudunk-e hozni két különböző (lassú és gyors) progressziójú ALS-es egérmodellt. Ehhez az ALS-es betegeket klinikai paraméterek alapján lassú és gyors progressziójú csoportba soroltuk, majd az egereket ez alapján, csoport-specifikusan kezeltük a betegek vérszérumával 4 héten keresztül. Az egerekben indukált patológiai eltérések karakterizálására immunjelöléses eljárást végeztünk izomszövetből és gerincvelői mintából.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Etikai engedélyek

A betegektől történő vérminta gyűjtés és tárolás az SZTE SZAKK Intézményi Kutatásetikai Bizottságának engedélyével történt (engedélyszám: #2557/2009), önkéntes jelleggel, anonim módon, előzetes tájékoztatást és írásos beleegyezést követően. Az összes állatkísérlet az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács engedélyével került elvégzésre a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban (engedélyszám: XVI./2733/2022), mely összhangban van a magyar (XXVIII., IV. bekezdés, 31. paragrafus) és a nemzetközi (EEC Tanács 86/609, OJ L 358, 1987) állatvédelmi törvényekkel és szabályokkal. Minden kísérletnél törekedtünk az állatok szenvedésének minimalizálására.

3.2. ALS-es betegek és szérumszminták áttekintése

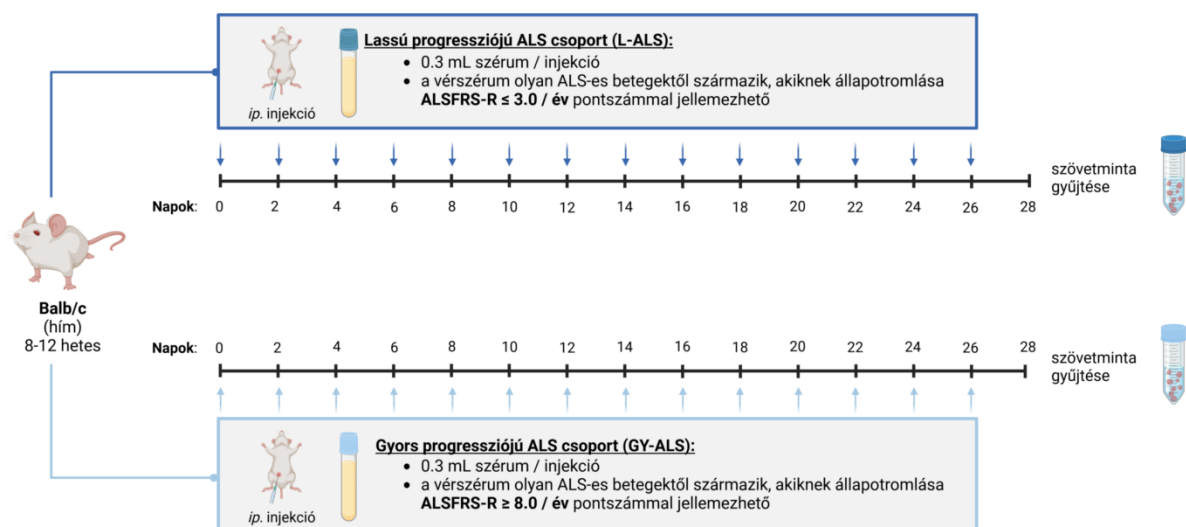
Kísérleteinket 15 ALS-el diagnosztizált beteg bevonásával végeztük. A betegektől történő vérszérumsz mintavétel és ezen minták tárolása a Szegedi Tudományegyetem, Neurológiai Klinikáján történt. A vizsgálatba bevont betegek kiválasztása az „El Escorial revised” kritériumrendszer alapján történt. A betegek mindegyike megfelelt ezen kritériumrendszer „probable” és „definite” kritériumának, azaz minden esetben klinikailag alsó és felső

motoneuron károsodásra utaló tünetekkel rendelkeztek, melyek közül az alsó motoneuron tünetek legalább két régióban jelentkeztek (Brooks és mtsai., 2000). Tekintettel a kísérlet jellegére, kizáró feltétel volt, hogyha a betegeknek autoimmun társbetegsége volt. Kísérleti munkatervünk alapvető eleme volt a betegek csoportosítása olyan klinika paraméterek alapján, melyből a betegség előrehaladásának ütemére tudtunk következtetni. A lassú (L-ALS) és gyors (GY-ALS) betegségprogressziójú fenotípusok megkülönböztetésére jelenleg nem létezik hivatalos kritériumrendszer, azonban a szakirodalomban alkalmazott „*Revised ALS Functional Rating Scale*” (ALSFRS-R) egy pontos módja annak, hogy a betegek motoros funkcióját és a hétköznapi feladatok ellátásában való korlátozottságát egy adott időpillanatban felmérjük. Az ALSFRS-R pontszám többszöri meghatározása esetén fel tudjuk mérni annak romlásának ütemét, ami összefüggést mutat a betegség progressziójával és a túlélés időtartamával (Kollewe és mtsai., 2008). Ennek alapfeltétele, hogy ismerjük a páciensek teljes kórelőzményét, továbbá fontos volt, hogy a kutatásba választott egyének rendszeresen eljárjanak az ellenőrzésekre, hogy a betegség előrehaladása pontosan nyomon követhető legyen. Az ALSFRS-R rátát a következő egyenlettel adjuk meg: $(\text{ALSFRS-R pont az első tünetek megjelenésekor} - \text{ALSFRS-R pont a legutóbbi megjelenés alkalmával}) / \text{az első tünetek és legutóbbi látogatás közt eltelt idő} * 12$ (hónapok száma). Mandrioli és munkatársai által végzett epidemiológiai vizsgálatban azt találták, hogy az ALSFRS-R átlagosan 7,2 ponttal csökkent a tünetek megjelenésétől számított első évben, míg a második évtől átlagosan 4,08 ponttal csökkent évente (Mandrioli és mtsai., 2015). Erre alapozva határoztuk meg a gyors és lassú progressziójú csoportok elválasztására szolgáló kritériumainkat, melyek a következőképpen alakultak: azokat a betegeket, akiknél az ALSFRS-R pontszám csökkenésének üteme nagyobb volt, mint 8 pont/év, a GY-ALS csoportba, míg azokat a pácienseket, akiknél kisebb volt a romlás üteme, mint 3 pont/év, az L-ALS csoportba soroltuk. Az átlagos ALSFRS-R $12,51 \pm 3,38$ pont/év (átlag $\pm$ s.d.; minimum: 8,72, maximum: 19,33) volt a GY-ALS csoportnál és $1,49 \pm 0,66$ pont/év (átlag $\pm$ s.d.; minimum: 0,55, maximum: 2,7) az L-ALS csoport esetén. A betegség fennállásának időtartama, az első tünetek megjelenésétől számítva a kutatás kezdetekor $1,78 \pm 0,31$ év (átlag $\pm$ s.d.; minimum: 1,25, maximum: 2,16) volt a GY-ALS csoportnál és $12,38 \pm 4,71$ év (átlag $\pm$ s.d.; minimum: 6,5, maximum: 19) az L-ALS csoport esetén. A kor és nemek eloszlása egyenletes volt a két csoport között: az átlagéletkor az ALS diagnosztizálásának időpontjában $60,75 \pm 10,02$ év (átlag $\pm$ s.d.; minimum: 45, maximum: 72) volt a gyors progressziójú és $58,71 \pm 9,77$ év (átlag $\pm$ s.d.; minimum: 47, maximum: 73) a lassú progressziójú csoport esetén. A nemek megoszlása 1:1,66 (férfi/nő) a GY-ALS csoportnál és 1:1,33 (férfi/nő) az L-ALS csoportnál.

Mintavételt követően a vérmintákat centrifugáltuk és a szérumokat -80 °C-on tároltuk a felhasználásig.

3.3. Kísérleti állatok és a passzív szérum transzfer

Az állatkísérletekhez 8-12 hetes Balb/c egereket használtunk, melyek átlag testtömege 22 ± 3 gramm volt. Az egerek a HUN-REN Szegedi Biológiai Központban voltak gondozva és kezelve. Az állatok maximum 5-ös csoportokban, műanyag ketrecekben kerültek elhelyezésre, semleges hőmérsékleti tartományban (21 ± 3 °C), 12 órás fény/sötét ciklusban, állandó hozzáféréssel ivóvízhez és rágcsáló eledelhez. Összesen 20 egeret használtunk a kísérlethez: 4 az intakt csoportban, 6 az L-ALS és 10 a GY-ALS csoportban. A kísérleti elrendezés alapján mind a gyors, mind a lassú progressziójú csoport 0,3 ml ALS szérumot kapott intraperitoneális injekció formájában minden második napon, négy héten keresztül (azaz összesen 14 alkalommal állatonként). Az alkalmazott szérum mennyiség és időtartam meghatározásának tekintetében a korábban közölt eredményeinket vettük alapul (Obál és mtsai., 2019) (1. ábra). A két ALS-es csoportban a kísérleti egerek csak a csoportnak megfelelő páciensektől kaptak szérumot, azaz csak L-ALS, vagy csak GY-ALS betegektől. Egy oltási alkalommal egy állat egy adott betegtől kapott szérumot, de a teljes kezelési intervallum során minden állat több ALS-es betegtől is kapott szérumot, így egyenletesebb biológiai hatást érhattünk el a kezelés alatt. A kísérletet megelőzően több alkalommal is igazoltuk, hogy az egészséges egyénektől származó szérum intraperitoneális injektálása sem hosszú (Obál és mtsai., 2019), sem rövid távon (Polgár és mtsai., 2021) nem befolyásolja a gerincvelői motoneuronok túlélését (Polgár és mtsai., 2021), az NMJ-k ultrastruktúráját (Meszlényi és mtsai., 2020), a mikroglia aktivációt a gerincvelőben (Obál és mtsai., 2019) vagy az állatok izomerejét (Obál és mtsai., 2019). Ezen megfigyelések mentén kísérleti elrendezésünkben nem használtunk egészséges betegektől származó vérszérummal kezelt csoportot, állatjóléti és etikai megfontolásokra alapozva. Az abszolút kontroll (intakt) csoport kezelésben nem részesült. A négy hetes kezelés végén, a 28. napon az állatokat feláldoztuk és transzkardiális perfúziót végeztünk (1. ábra). Ezt 10 mM-os, 7,4-es pH értékű foszfát pufferelt sóoldattal (PBS) kezdtük, melyet 4% -os paraformaldehiddel (PFA, Kat.szám: 818715, Merck-Sigma, St. Louis, MN, USA) történő fixálás követett.



1. ábra. A passzív szérum transzfer kezelés folyamata L-ALS és GY-ALS csoportok esetén.

3.4. Immunhisztokémiai festések

A perfúziót követően a gerincvelőt, soleus (SOL) és tibialis anterior (TA) izmokat eltávolítottuk, majd 4% PFA-ban fixáltuk egy éjszakán át, 4 °C-on. Másnap a mintákat 10 mM-os PBS-ben feloldott, 30%-os szacharózoldatba (Kat.szám: 02200-203-190, Molar Chemicals, Halásztelek, Magyarország) helyeztük legalább egy napra 4°C-on. Ezt követően az izommintákat beágyaztuk és fagyasztva metsző készülékkel (Reichert-Jung, Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) 30 mikrométeres metszeteket készítettünk. A készített metszeteket felhasználásig 0,05%-os (Kat.szám: S2002, Meck-Sigma) nátrium-azidot tartalmazó 10mM-os PBS oldatban tároltuk. Az ugyanezen módszerrel metszett gerincvelő mintákat üveg tárgylemezre helyeztük és azokat -20 °C-on tároltuk felhasználásig. A festési eljárás során elsőként 3 körben mostuk 10mM-os PBS-ben a mintákat, majd 10 mM-os PBS-ben oldott 3%-os marha szérum albuminból (BSA, Kat.szám:97061422, VWR International, Radnor, PA, USA) és 0,2%-os Triton X-100-ból (Kat.szám: T9284, Merck-Sigma) (TPBS) álló blokkoló oldatban 1 órát álltak a minták a nonspecifikus kötőhelyek gátlása és permeabilizálás céljából. Ezt követően az 1. táblázatban látható primer antitestet az előzőekben leírt blokkoló oldattal előkészítettük és a mintákat egy éjszakán át, 60-as percenkénti fordulatszámon körkörös rázaton, 4°C-on inkubáltuk. Az immunhisztokémia második napján ismételtén három körben mostuk a mintákat 10 mM PBS-ben, melyet egy órán át tartó szobahőmérsékleten történő inkubáció követett az 1. táblázatnak megfelelő másodlagos antitesttel, amelyet az előzőekben leírt blokkoló oldatban oldottunk fel. Az inkubációs idő leteltével két körben mostuk a mintákat 10 mM PBS-el. Az izom minták esetén ezt követte egy 30 perces inkubáció alpha-

bungarotoxinnal (BTX, Alexa Fluor 488-konjugált, B13422, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), melyhez 1:750 arányban oldottuk be a BTX-t 10mM-os PBS-ben. Végezetül mosást követően Hoeschst 33342 (Kat.szám: B2261, Merck-Sigma) jelölést végeztünk a mintákon (1µg/ml, 10mM PBS), a sejtmag vizualizálása céljából. A mintákat tárgylemezre helyeztük, majd Fluoromount-G (Kat.szám: 0100-01, Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) fedőmédiummal fedtünk.

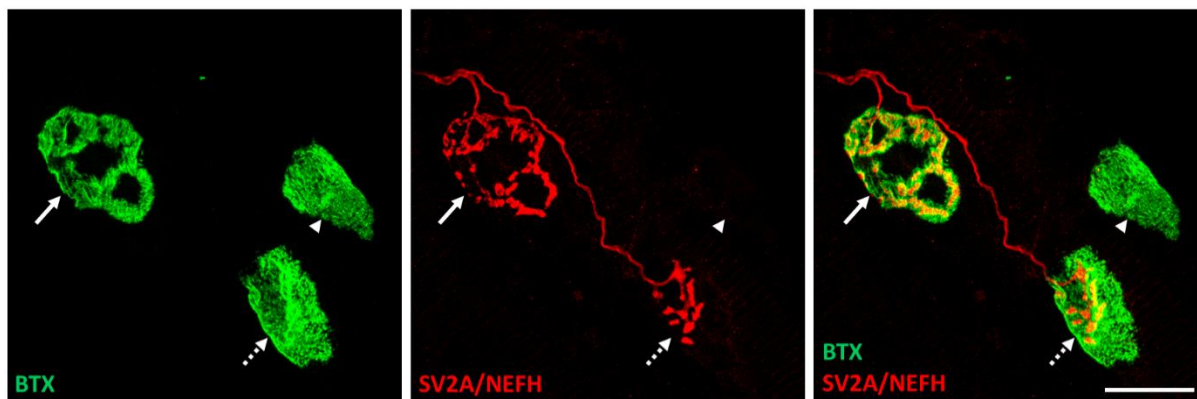
Festés típusa	Elsődleges antitest	Másodlagos antitest
CD45 (<i>cluster of differentiation 45</i>)	CD45 ellen termeltetett poliklonális kecske antitest, 1:200 (Kat.szám: AF114, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)	<i>Alexa Fluor® 594 Plus Highly Cross-Adsorbed</i> kecske ellen termeltetett szamár IgG (H + L), 1:500 (Kat.szám: A32758, Thermo Fisher Scientific)
SV2A/NEFH (<i>Synaptic vesicle glycoprotein 2A</i>)/(<i>Neurofilament, heavy polypeptide</i>)	SV2A ellen termeltetett poliklonális nyúl antitest, 1:100 (Kat.szám: HPA007863, Merck-Sigma) + neurofilamentum nehéz lánc ellen termeltetett poliklonális nyúl antitest, 1:1000 (Kat.szám: ab8135, Abcam, Cambridge, UK)	<i>Alexa Fluor® 594 Plus Highly Cross-Adsorbed</i> nyúl ellen termeltetett szamár IgG (H + L), 1:500 (Cat# A32754, Thermo Fisher Scientific)
TDP-43	TDP-43/TARDP ellen termeltetett monoklonális egér antitest 1:600 (Kat.szám: MAB7778, R&D Systems)	<i>Alexa Fluor® 594 Highly Cross-Adsorbed</i> egér ellen termeltetett szamár IgG (H + L), 1:600 (Kat.szám: A21203, Thermo Fisher Scientific)
VACHT (<i>Vesicular acetylcholine transporter</i>)	VACHT ellen termeltetett poliklonális nyúl antitest, 1:500 (Kat.szám: 139103, Synaptic Systems, Goettingen, Németország)	<i>Alexa Fluor® 488 Highly Cross-Adsorbed</i> nyúl ellen termeltetett szamár IgG (H + L), 1:600 (Cat# A21206, Thermo Fisher Scientific)

1. táblázat. Az immunhisztokémiai festéshez használt primer és szekunder antitestek összefoglalása.

3.5. NMJ analízis

Mivel a TA és SOL izmokban az I. típusú (lassú összehúzódású) és II. típusú (gyors összehúzódású) izomrost típusok aránya ellentétes – TA-ban jellemzően II. típusú, SOL-ban I. típusú rostok dominálnak (Larsson és Edström, 1986) –, ezért ezt a két hátulsó végtagi izmot választva lehetőségünk volt arra is, hogy összehasonlítsuk a különböző izomtípusok jelentőségét NMJ károsodás esetén. Az izommintákon α -BTX és SV2A/NEFH jelölést végeztünk, az előző bekezdésben leírt metodikával, így vizualizálva az NMJ-k preszinaptikus és posztzinaptikus struktúráit. Mintánként legalább 30 „*en face*” NMJ-t fotóztunk a VisiScope

CSU-W1 spinning disc konfokális mikroszkóppal (Visitron Systems GmbH, Pulheim, Németország), mely egy PlanApo N 60x/1,42 olaj immerziós objektívvel (1024x1024 pixel felbontás, 1 mikrométeres z-távolságokkal) volt felszerelve (Mikroszkópos Sejtanalízis Laboratórium, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Szeged, Magyarország). Az NMJ-k vizsgálatát elsőként kvalitatív analízissel kezdtünk, azt vizsgálva, hogy a preszinaptikus terminális mennyire őrzi meg integritását, milyen mértékben tölti ki a posztoszínaptikus struktúrát. Ez alapján három csoportba soroltuk az NMJ-ket: teljesen innervált, részlegesen innervált, teljesen denervált (2. ábra), Alhindi és munkatársai eredményeire alapozva (Alhindi és mtsai., 2023). Részlegesen innerváltak akkor tekinthető egy NMJ, ha az idegterminális egyértelműen hiányos (a preszinaptikus kompartment több, mint 20%-a hiányzik), de nem teljesen denervált (a preszinaptikus kompartment a posztoszínaptikus BTX jelöléssel összevetve legalább 20%-ban látható). Az NMJ analízis második lépését (kvantitatív értékelés) Minty és munkatársai NMJ-morfológiai képanalitikai protokollja (Minty és mtsai., 2020) alapján végeztük FIJI programmal (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany). A struktúrák kompaktságát a következő képlettel, százalékos formában adjuk meg: $(\text{Acetilcolin receptorok (AChR) által lefedett terület} / \text{Végtelez terület}) * 100$. A posztoszínaptikus terminális fragmentáltságát a következő képen számítjuk ki: $1 - (1 / \text{AChR klaszterek száma})$. Minél nagyobb az AChR klaszterek száma, annál nagyobb a fragmentáció értéke.



2. ábra. Az NMJ denerváció kvalitatív analízisének alapjául szolgáló stádiumok. Az ábrán α -BTX festés jelöli a posztoszínaptikus denzitást, míg SV2A/NEFH kombinált festéssel jelöltük a preszinaptikus terminálist. A folyamatos vonalú nyíl a teljesen innervált NMJ-t jelöli, a szaggatott vonalú nyíl a részlegesen innervált NMJ-t, míg a nyílhegy a teljesen denervált struktúrát. Lépték: 20 μ m.

3.6. Motoneuron és leukocita sejtszám meghatározása

A motoneuronok számának meghatározását a lumbális gerincvelő L4-L5 szegmentumok metszetein végeztük (VChT jelölés), míg a leukocita szám meghatározására a TA és SOL izmokból készült metszeteken került sor (CD45 jelölés). Ezeken felül az izommintákon α -BTX festést is alkalmaztunk, melynek segítségével az izomban az innervációs zónát is lokalizálni tudtuk. A sejtszámlálásnál minden esetben csak akkor számoltunk egy sejtet, ha annak sejtmagja teljes mértékben látható volt. A gerincvelői L4-L5 szegmentum esetében húsz egyenlő távolságban levett metszeten vizsgáltuk a motoneuronokat, melyek áttekintő képet adtak az adott gerincvelői szakaszok motoneuron számáról. Ezen metszetek esetében a festést Leica Stellaris konfokális mikroszkóppal (Leica Biosystems) rögzítettük. A CD45-jelölt izommintákról, a korábban említett VisiScope CSU-W1 spinning disc konfokális mikroszkóppal, 40-szeres nagyítású lencsével készültek képek. Izmonként 10-10 látómezőt fotóztunk az innervációs zónáról (IZ) és az innervációs zónán kívüli területről (IZK), melynek meghatározása az α -BTX jelölés alapján történt.

3.7. Statisztikai analízis

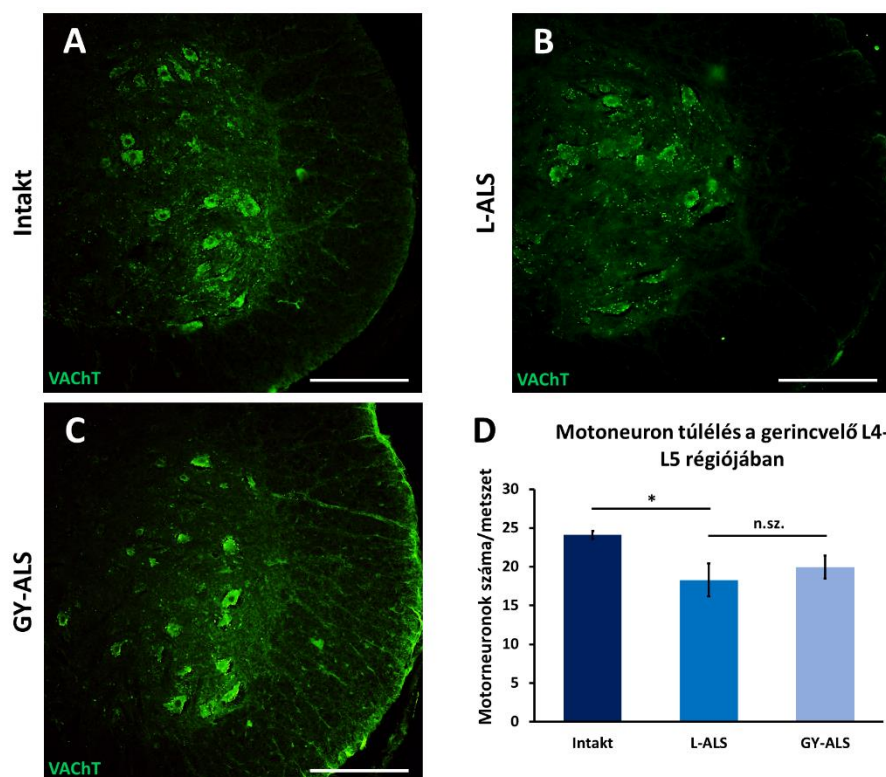
A statisztika analízis elvégzéséhez a GraphPad Prism (8.0.1.244-es verzió, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) szoftvert használtuk. Minden analízis esetén elsőként Shapiro-Wilk normalitás tesztet végeztünk, majd ezt követte a megfelelő parametrikus/nonparametrikus teszt. Az adott statisztikai teszt és n értékek minden esetben feltüntetésre kerültek az ábrafeliratokban. Az elemszámbecslést a G*Power (3.1.9.7-es verzió, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany) programmal végeztük. Minden vizsgálatot vakon végeztünk. A grafikonok és értékek minden esetben $\bar{x} \pm$ „az átlag standard hibája” formában vannak feltüntetve, kivétel, hogyha az ettől való eltérést a szövegben jeleztük.

4. Eredmények

4.1. Motoneuron túlélés és TDP-43 patológia a gerincvelőben

Az ALS-ben zajló patológiás folyamatok egyik kulcseleme a mozgató idegsejtek pusztulása, emiatt vizsgálatunkat a motoneuron degeneráció számszerűsítésével kezdtük. A szérumkezelés motoneuronszám csökkenést indukált, ami az intakt csoportban mért sejtszámhoz viszonyítva átlagosan 24,06%-os eltérést jelentett a lassú progressziójú csoportban, míg 17,16%-os csökkenést a gyors progressziójú csoport esetén (3. ábra). Az intakt csoporthoz viszonyítva csupán a lassú progressziójú csoport motoneuron vesztesége bizonyult szignifikánsnak (3. ábra

A, B, D). Mivel a gyors és lassú csoportok között nem volt szignifikáns eltérés (3. ábra D), azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a szérum-indukálta patológia súlyosságában felmerülő különbségekhez más folyamatok nagyobb mértékben járulhatnak hozzá.



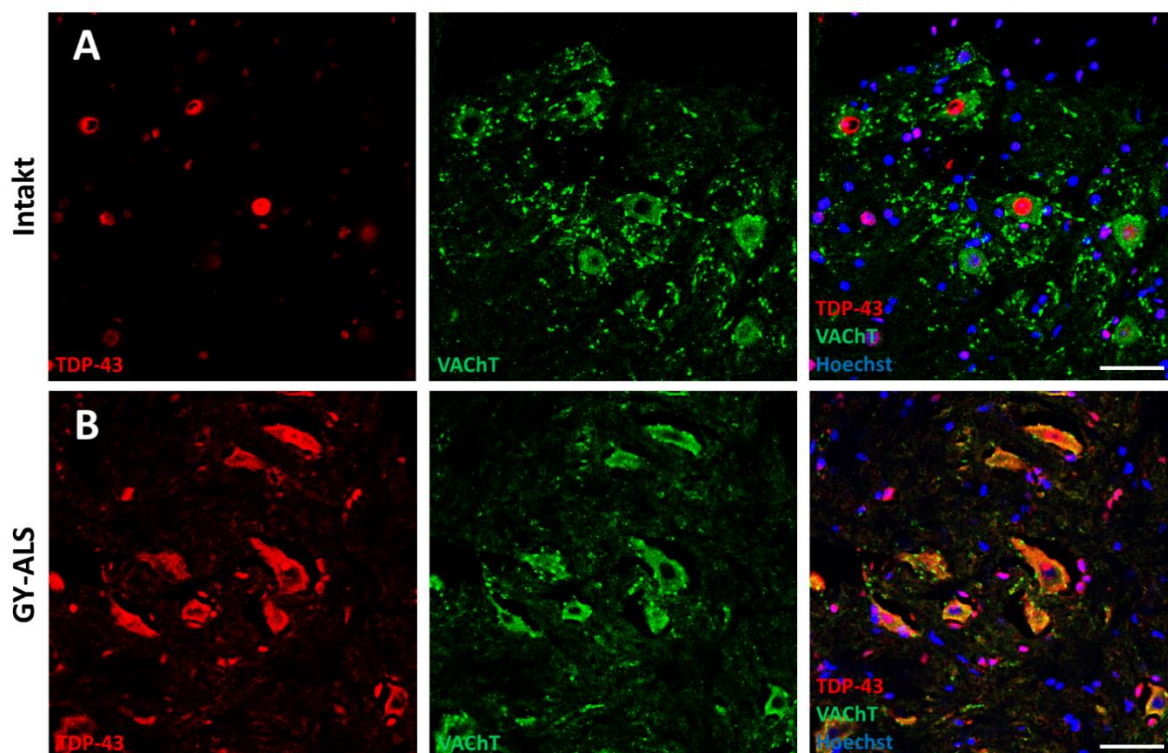
teszttel; * = intakt csoporthoz viszonyítva). Az ábrán látható diagram (D) $n=5$ állatot szemléltet az intakt és L-ALS csoportok esetén és $n=7$ egyed a GY-ALS esetében és az egy metszeten azonosítható átlagolt össz motoneuron számot mutatja. Lépték: $200\ \mu\text{m}$ (A-C).

A kvantitatív motoneuronszám vizsgálaton felül a TDP-43 eloszlását is értékeltük. Az intakt állatok gerincvelőjének ventrális szarvát vizsgálva a TDP-43 a sejtmagi lokalizációt mutatott, ahogyan az a fiziológiás esetben várható is. Ezzel szemben mind a két kezelt csoport esetén citoplazmatikus lokalizációt figyeltünk meg, amely arra utal, hogy a passzív szérumkezelés lokalizációs TDP-43 patológiát válthat ki (4. ábra). Ugyan a TDP-43 transzlokálizációt nem számszerűsítettük, fontos megjegyezni, hogy a citoplazmatikus jelenléte csoportokon belül is nagy variabilitást mutatott.

4.2. Passzív szérum transzfer-indukálta NMJ denerváció a TA és SOL izmokban

Mivel a motoneuron szám tekintetében nem találtunk eltérést a két ALS csoport között, ezért vizsgálataink fókuszát a motoneuron terminális elemére, az NMJ-re fordítottuk. A kvantitatív és kvalitatív NMJ vizsgálatokat konfokális mikroszkóppal végeztük, a négy hetes passzív

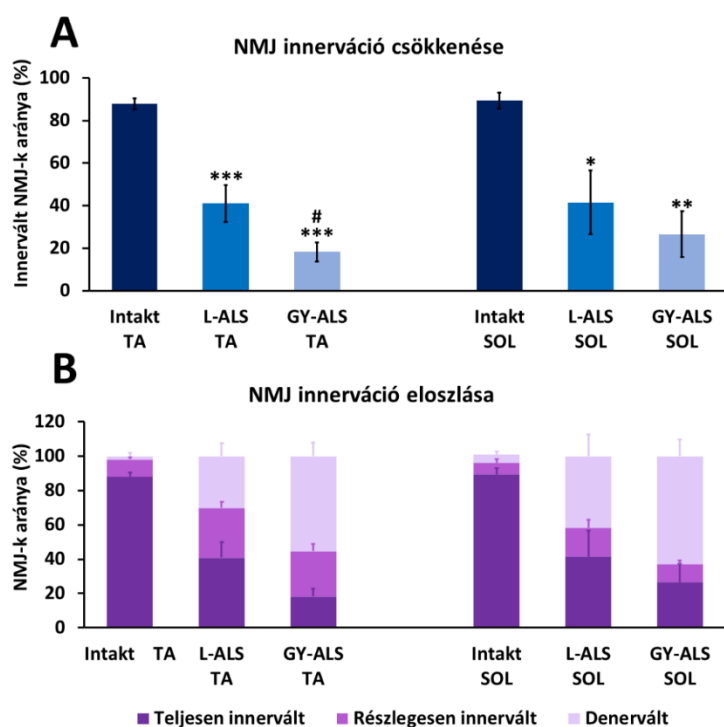
szérumtranszfer kezelést követően a TA és SOL izmokban. Analízisünket a kvalitatív NMJ vizsgálattal kezdtük, ami áttekintést nyújtott a denerváció mértékének értékeléséhez.



4. ábra. TDP-43 lokalizációja az intakt és GY-ALS csoportokban. (A, B) TDP-43 jelölés az intakt (A) és a GY-ALS (B) csoportokban, a gerincvelő ventrális szarvában található mozgató idegsejtekben (VAcHT jelölés). Az intakt csoport esetén a TDP-43 jel a motoneuronok sejtmagjába lokalizálódik, míg a GY-ALS csoport esetén kolokalizációt mutat a VAcHT jellel, mely a citoplazmatikus jelenlétére utal. Ehhez hasonló elváltozás volt megfigyelhető az L-ALS csoport esetén is. A TDP-43 transzlokálizációja heterogén jelleggel volt megfigyelhető. Lépték: 50 μ m (A, B).

Az L-ALS csoport esetén mind a két izomban a posztzinaptikus kompartment megtartott struktúrát mutatott, míg a preszinaptikus terminálisok esetén mérsékelt degeneratív elváltozásokat észleltünk (1. melléklet). A teljes mértékű innervációt mutató „intakt” NMJ-k mennyisége az L-ALS csoportban a két izom esetén azonos volt (5. ábra A panel; L-ALS TA: $40,95 \pm 8,8\%$, L-ALS SOL: $41,5 \pm 15,08\%$), az intakt egerekhez viszonyítva azonban jelentős csökkenést figyeltünk meg (5. ábra A panel; intakt TA: $87,85 \pm 2,59\%$, intakt SOL: $89,26 \pm 3,71\%$). Az intakt csoport esetén is észleltünk részlegesen innervált NMJ-ket (relatív kis arányban), ez a jelenség a motoros véglemezek megújulásából adódik és korábbi kutatások eredményeivel is egybees (Alhindi és mtsai., 2023). Az L-ALS csoport esetében a részlegesen innervált NMJ-k mennyisége $28,82\% \pm 3,49\%$ volt a TA-ban és $16,62 \pm 4,57\%$ a SOL-ban, míg ugyan ennél a csoportnál $30,24 \pm 7,29\%$ a teljesen denervált NMJ-k mennyisége a TA-ban és $41,87 \pm 12,5\%$ a SOL-ban (5. ábra B panel).

A GY-ALS csoport esetén is jól azonosítható volt a posztszinaptikus denzitás, de fragmentáltabb volt a megjelenése (1. melléklet) az intakt állatoknál látott NMJ-hez viszonyítva (1. melléklet). A GY-ALS csoportban a preszinaptikus terminális degenerációja még súlyosabb mértékű volt, mint ami az L-ALS csoport esetén volt megfigyelhető. A terminális idegrostok sok esetben széteső struktúrát mutattak, vagy teljesen hiányoztak, míg a posztszinaptikus terminálisok sok esetben teljesen üresek voltak (1. melléklet). A GY-ALS csoportnál a teljesen innervált NMJ-k aránya $18,24 \pm 4,53\%$ (TA) és $26,49 \pm 10,77\%$ (SOL) volt. Ez mindkét izom esetében szignifikáns csökkenésnek bizonyult az intakt csoporthoz viszonyítva és ezen felül az L-ALS csoporthoz képest is szignifikáns volt a csökkenés mértéke a TA izomban (5. ábra A panel). Ez a tendencia a SOL izomra is jellemző volt, azonban itt nem érte el a szignifikancia szintjét. A részleges innerváció $26,41 \pm 4,26\%$ volt a TA izomban és $10,54 \pm 2,23\%$ a SOL-ban, míg a teljesen denervált NMJ-k mennyisége rendkívül magas értékeket mutatott ezekben az izmokban: $55,34 \pm 7,83\%$ (TA), $62,95 \pm 9,57\%$ (SOL) (5. ábra B panel).



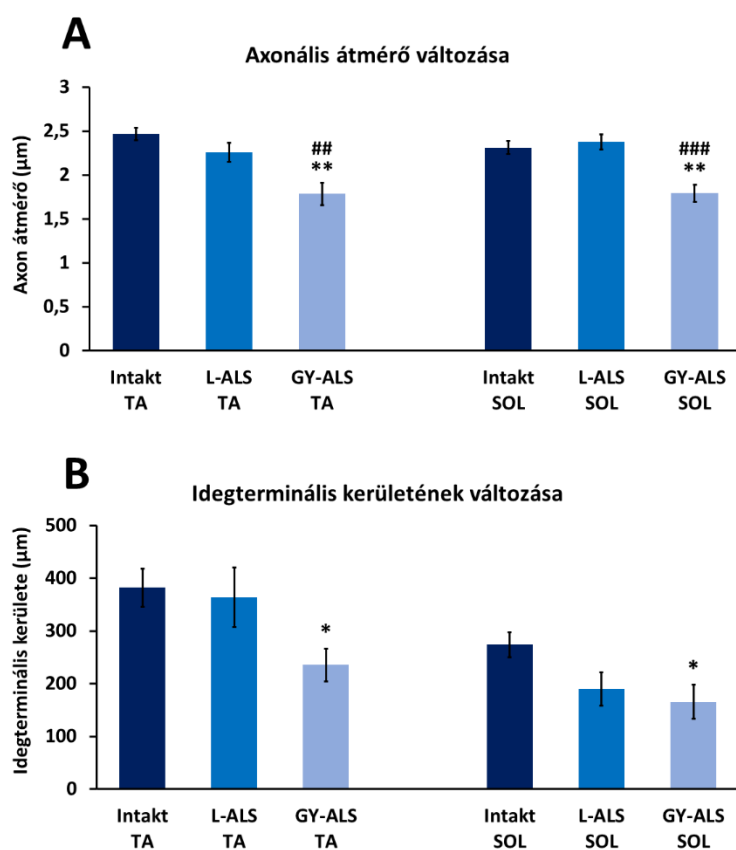
5. ábra. NMJ-k innervációjának változása az egyes kísérleti csoportok között. (A) A diagrammon a teljesen innervált NMJ-k mennyiségének megoszlása látható a TA és SOL izmokban, a különböző csoportok között, kvalitatív mérési eljárással vizsgálva. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (TA izmok esetén: Kruskal-Wallis ANOVA korrekció nélküli Dunn-féle post-hoc teszttel; SOL izmok esetén: Parametrikus egyszempontos ANOVA a Fisher-féle LSD post-hoc teszt; * = intakt csoporthoz viszonyítva; # = L-ALS csoporthoz viszonyítva). (B) A teljesen innervált, a részlegesen innervált és

denervált NMJ-k eloszlása csoportonként, a két vizsgált izomban. (A, B) A diagramok $n=4$ állatot jelölnek az intakt csoport esetén és $n=5$ állatot a GY-ALS és L-ALS csoportok esetén.

4.3. Szérumtranszfer-indukálta NMJ patológia finom morfometriai analízise

A kvalitatív NMJ analízis alapján látott patológia pontosabb vizsgálata céljából kvantitatív NMJ értékelést végeztünk, ami részletesebb betekintést nyújtott a véglemezt érintő subkompartmentális degeneratív folyamatokba. A preszinaptikus terminálisba torkolló

axonszakasz átmérője szignifikáns csökkenést mutatott a GY-ALS csoportnál, mind az intakt csoporthoz, mind az L-ALS csoporthoz viszonyítva (6. ábra A panel; intakt TA: $2,46 \pm 0,07 \mu\text{m}$; L-ALS TA: $2,25 \pm 0,01 \mu\text{m}$; GY-ALS TA: $1,78 \pm 0,12 \mu\text{m}$; intakt SOL: $2,31 \pm 0,07 \mu\text{m}$; L-ALS SOL: $2,37 \pm 0,08 \mu\text{m}$; GY-ALS SOL: $1,79 \pm 0,09 \mu\text{m}$). Az ideg terminális területének változása hasonló folyamatokat mutatott, a GY-ALS csoportnál szignifikáns csökkenést figyelhetünk meg mind a két vizsgált izom esetén az intakt csoporthoz viszonyítva, míg az L-ALS csoportnál nem volt változás (6. ábra B panel; intakt TA: $382,22 \pm 36,39 \mu\text{m}$; L-ALS TA: $364,24 \pm 56,81 \mu\text{m}$; GY-ALS TA: $235,37 \pm 31,36 \mu\text{m}$; intakt SOL: $274,05 \pm 23,5 \mu\text{m}$; L-ALS SOL: $189,86 \pm 31,21 \mu\text{m}$; GY-ALS SOL: $165,67 \pm 31,89 \mu\text{m}$).

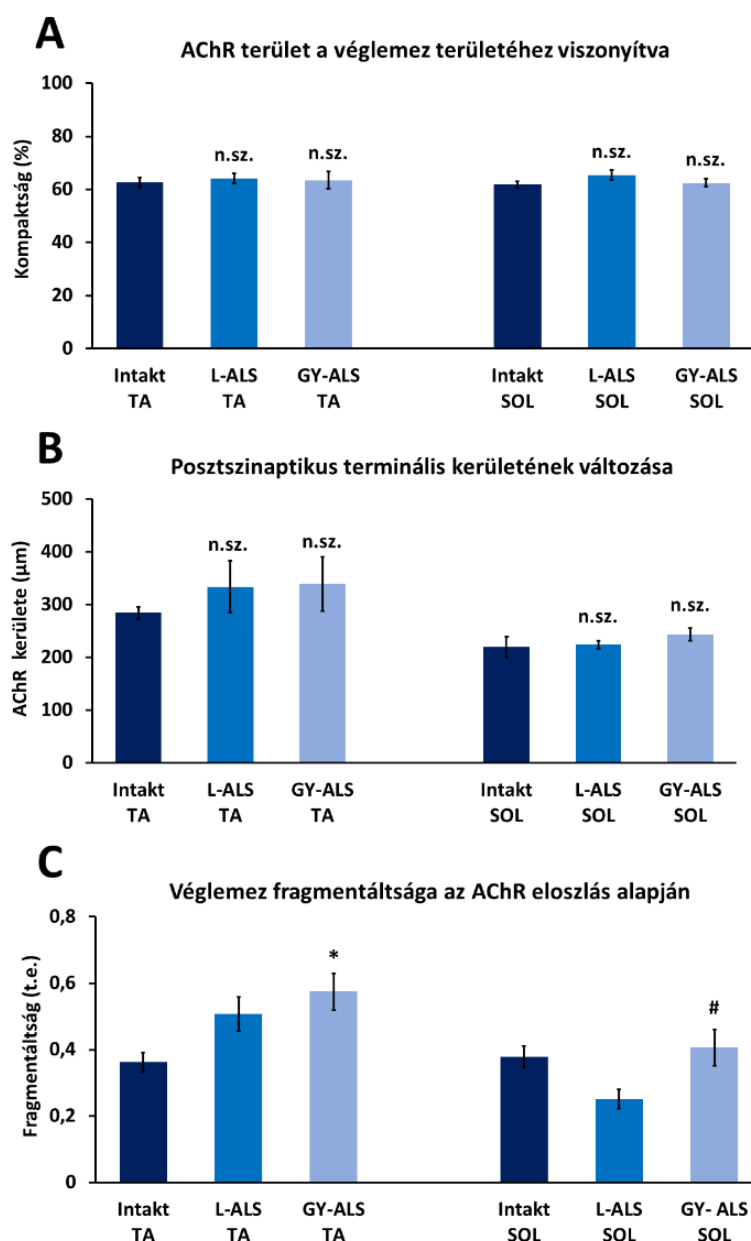


6. ábra. Preszinaptikus morfológiai paraméterek változása. (A, B) Az NMJ-k preszinaptikus paramétereinek kvantitatív analízise. (A) Axon terminális szegmens átmérőjének változása. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Parametrikus egyszempontos ANOVA Fisher-féle LSD post-hoc teszttel; * = intakt csoporthoz viszonyítva; # = L-ALS csoporthoz viszonyítva). (B) Preszinaptikus terminális területének elváltozásai. * $p < 0,05$ (Parametrikus egyszempontos ANOVA Fisher-féle LSD post-hoc teszttel; * = intakt csoporthoz viszonyítva).

(A,B) A diagramok $n=4$ állatot jelölnek az intakt csoport esetén és $n=5$ állatot a GY-ALS és L-ALS csoportok esetén.

A posztzinaptikus paraméterek tekintetében nem észleltünk különbséget a posztzinaptikus kompartment területét, sem pedig a kompaktságát illetően (7. ábra A, B). Az egyetlen érintett posztzinaptikus paraméter a fragmentáltság mértéke volt, amely a GY-ALS csoportnál a TA izomban szignifikánsan magasabb volt, mint az intakt csoportban (7. ábra C panel; intakt TA: $0,362 \pm 0,029$; L-ALS TA: $0,507 \pm 0,051$; GY-ALS TA: $0,574 \pm 0,056$). Ezen felül a SOL izom esetében nagyobb fokú fragmentációt észleltünk a GY-ALS csoportnál, mint az L-ALS

csoportnál (7. ábra A panel; intakt SOL: $0,379 \pm 0,032$; L-ALS SOL: $0,251 \pm 0,028$; GY-ALS SOL: $0,405 \pm 0,054$). A növekvő fragmentációs érték azt jelzi, hogy az acetilkolin receptorok több klaszterbe rendeződnek. Ez egybecseng az 1. mellékleten látható, a posztzinaptikus morfológiát illető megfigyelésünkkel. Az eredmények alapján a két ALS csoport között is jelentős eltérések figyelhetők meg, tekintettel arra, hogy a gyors progressziójú csoportban lévő állatok esetében súlyosabb preszinaptikus patológiát észleltünk.

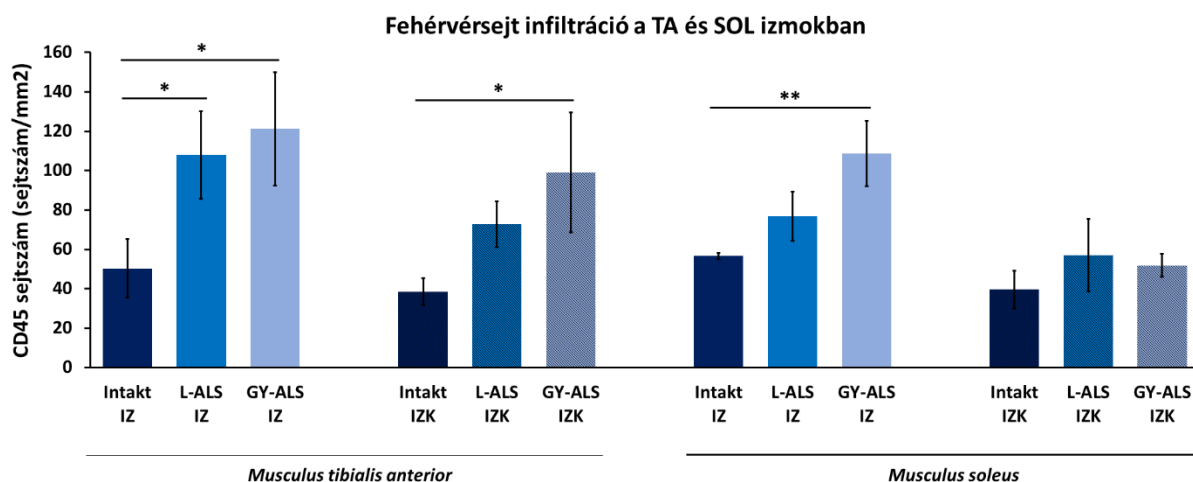


7. ábra. Posztzinaptikus morfolometriai paraméterek alakulása a különböző izmokban és kezelési csoportok között. (A-C) A diagrammok az NMJ-k kvantitatív mérésének posztzinaptikus paramétereire vonatkozó értékeit tartalmazzák. (A, B) A diagrammok az NMJ-k acetilkolin receptorainak területét (A), illetve a posztzinaptikus terminális kerületének változását (B) szemléltetik. n.sz. = nem szignifikáns (Parametrikus egyszempontos ANOVA a Fisher-féle LSD post-hoc teszttel; az intakt csoporthoz viszonyítva). (C) A véglemez fragmentáltsága, az AChR klaszterek száma alapján. * $p < 0,05$ (Parametrikus egyszempontos ANOVA a Fisher-féle LSD post-hoc teszttel; * = az intakt csoporthoz viszonyítva; # = L-ALS csoporthoz viszonyítva). (A-C) A diagrammok $n=4$ állatot jelölnek az intakt csoport esetén és $n=5$ állatot a GY-ALS és L-ALS csoportok esetén.

4.4. Leukocita infiltráció a TA és SOL izmokban

Tekintve, hogy a degeneratív folyamatok elsősorban az NMJ-t érintették, így azt feltételeztük, hogy a szérum transzfer-indukálta gyulladásos folyamatok tekintetében is eltéréseket

észlelhetünk. Az immunfolyamatok mértékének meghatározása céljából a CD45-pozitív fehérvérsejtek számát vizsgáltuk meg a TA és SOL izmokban, az innervációs zónában és azon kívül. Az intakt TA izomban, fiziológias körülmények között észlelt, viszonylag alacsony számú immunsejthez viszonyítva (2. melléklet A, D panel), a passzív transzfer hatására mind a két ALS csoport TA izmaiban megnőtt a limfocita infiltráció mértéke az innervációs zónák területén (2. melléklet B, C panel; 8. ábra; intakt TA: $50,27 \pm 14,81$ sejt/mm²; L-ALS TA: $107,86 \pm 22,36$ sejt/mm²; GY-ALS TA: $121,18 \pm 28,71$ sejt/mm²). Az innervációs zónán kívül csak a gyors progressziójú csoport CD45 sejtszámában figyelhetünk meg szignifikáns növekedést (2. melléklet E, F panel; 8. ábra; intakt TA: $38,55 \pm 6,68$ sejt/mm², L-ALS TA: $72,73 \pm 11,62$ sejt/mm², GY-ALS TA: $99,06 \pm 30,45$ sejt/mm²). A SOL izmok esetén más tendenciát figyeltünk meg, az innervációs zónán belül egyedül a gyors progressziójú csoport mutatott szignifikáns sejtszámbeli növekedést (8. ábra; intakt SOL: $56,58 \pm 1,48$ sejt/mm²; L-ALS SOL: $76,78 \pm 12,44$ sejt/mm²; GY-ALS SOL: $108,66 \pm 16,63$ sejt/mm²), míg az innervációs zónán kívül egyik csoport esetében sem észleltünk leukocita infiltrációt (8. ábra; intakt SOL: $39,50 \pm 9,53$ sejt/mm², L-ALS SOL: $56,90 \pm 18,48$ sejt/mm²; GY-ALS SOL: $51,85 \pm 5,73$ sejt/mm²).



8. ábra. A fehérvérsejt infiltráció mértékének változása az L-ALS és GY-ALS csoportokban, a különböző izmok innervációs zónáin belül és kívül. A CD45-pozitív sejtszám számszerűsítése a TA és SOL izmokban a passzív szérum transzfer kezelés végeztével. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (TA izmok esetén: Kruskal-Wallis ANOVA korrekció nélküli Dunn-féle post-hoc teszttel; SOL izmok esetén: Parametrikus egyszempontos ANOVA a Fisher-féle LSD post-hoc teszttel; * = intakt csoporthoz viszonyítva; # = L-ALS csoporthoz viszonyítva). $n = 4$ állat/csoport. IZ: innervációs zóna; IZK: innervációs zónán kívül.

5. Diskusszió

Az emberi szervezethez és a klinikai megfigyelésekhez minél közelebb álló modellek megalkotása fontos ahhoz, hogy a betegségek működését jobban megértsük és hatékony módon tudjunk terápiás lehetőségeket azonosítani. Jelenleg az ALS kutatásban a leggyakrabban alkalmazott transzgenikus modellek csupán a betegek kis hányadát reprezentálják, ezért új modellek alkotása kiemelt fontosságú. Jelen kísérletünkben két különböző súlyosságú motoneuron degenerációt mutató egérmodellt alkottunk meg, klinikailag gyors és lassú progressziójú ALS-es betegek vérszérumának egérbe történő injektálásával.

A gerincvelő lumbális régiójában megfigyelt motoneuronszám csökkenés csupán a lassú progressziójú csoport esetén bizonyult szignifikáns mértékűnek, az intakt csoport értékeihez viszonyítva. A két ALS-es csoport között nem láthatunk szignifikáns változást, mely eredmény azt sugallja, hogy a két csoport között centrális patológiai komponens tekintetében nincs érdemi különbség. A motoneuron számon túl megvizsgáltuk a TDP-43 lokalizációját is a gerincvelő ventrális szarvában, mivel a TDP-43 patológia az egyik legismertebb jellemző az ALS-ben (Jo és mtsai., 2020). Az intakt csoport esetén a fiziológiás sejtmagi lokalizáció volt megfigyelhető, ezzel szemben mind a két ALS-es csoport esetén jelen volt a TDP-43 citoplazmatikus transzlokalizációja. Ez előjele lehet egy kibontakozóban lévő komolyabb patofiziológiai folyamatnak, tekintettel a TDP-43 transzlokalizáció gyulladásban (Jo és mtsai., 2020) betöltött szerepére.

Mivel a mozgató idegsejtek számában nem észleltünk érdemi különbséget a két ALS-es csoport között, így a motoros egység perifériás eleme, az NMJ is vizsgálatra került. ALS-es betegekben az NMJ-k denervációja a kibontakozó patológia egy központi és meghatározó eleme, hiszen ez vezet közvetlenül a betegek által észlelt izomerő csökkenéséhez (Cappello és Francolini, 2017). A kvalitatív vizsgálatok alapján a véglemez mind a két ALS-es csoportban és mind a két vizsgált izomban számottevő denervációt mutatott az intakt csoporthoz viszonyítva. A denerváció mértéke a GY-ALS csoport TA izmában súlyosabb volt az L-ALS csoporthoz képest is, így alátámasztja a két csoport különböző mértékű patológiás érintettségét.

A csoportok között észlelt különbség miatt, az NMJ-k részletesebb, kvantitatív paramétereken alapuló vizsgálatát is elvégeztük. Ennek során az axonális átmérőt, idegterminális kerületét, AChR eloszlást a véglemezen, posztzinaptikus denzitás kerületét és a véglemez fragmentáltságát számszerűsítettük. A preszinaptikus paraméterek, azaz az axonok átmérőjének csökkenése és az ideg terminális kerületének csökkenése csak a GY-ALS csoportnál mutatott

szignifikáns eredményeket a két izomban, az intakt csoporthoz viszonyítva. Az axonális átmérő változása ezen felül az L-ALS csoporthoz viszonyítva is szignifikáns mértékben csökkent. Ez az eredmény az ideg terminálisok sorvadására utalhat a gyors progressziójú csoportnál, mely még inkább alátámasztja a két fenotípus közti patofiziológiai különbségeket. A posztszinaptikus paraméterek közül csak a fragmentáltság tekintetében észleltünk szignifikáns eltérést és azon belül is csak a GY-ALS csoportnál volt megfigyelhető a fragmentáció mérsékelt növekedése. Tekintve a passzív szérumsztransfer hosszát (4 hét), elképzelhető, hogy a krónikus denerváció következtében kialakuló posztszinaptikus változásokat észleltük, azonban az is lehetséges, hogy valamely szérumsztransfer komponens közvetlen hatása állhat a posztszinaptikus struktúra megsemmisítéséhez. A posztszinaptikus struktúra fragmentációja kissé megosztó szerepet tölt be az ALS kutatásban, mivel a korai kísérletekben ezt a jelenséget nem figyelték meg (Bjornskov és mtsai., 1982), azonban újabban több SOD1G93A egéren végzett kutatás is megerősítette a fragmentáció jelenlétét a betegség progressziója során még, ha sok esetben pusztán csak mérsékelt mértékben fordul is csak elő (Tremblay és mtsai., 2017; McIntosh és mtsai., 2023).

Tekintve, hogy a passzív szérumsztransfer követően elsősorban az NMJ struktúráját érintő változásokat észleltünk, így a CD45+ fehérvérsejt infiltráció számszerűsítésével vizsgáltuk meg az izomban zajló gyulladásos folyamatok mértékét. A TA izomban, az innervációs zóna területén mind a két ALS-es csoport esetében szignifikánsan fehérvérsejt szám emelkedést észleltünk, ezzel szemben az innervációs zónán kívül csak a GY-ALS csoport mutatott szignifikáns növekedést. A SOL izomban más tendenciát figyeltünk meg, itt ugyanis csak az innervációs zónán belül észleltünk fehérvérsejt szám emelkedést, ezt is csupán a GY-ALS csoportnál. Ezen adatok támogatják azt a hipotézist, hogy elsődlegesen az NMJ-k környékére lokalizálódik a passzív szérumsztransfer által kiváltott immunválasz. Hasonló, az izomban észlelt immunsejt infiltrációt korábban már megfigyeltek SOD1G93A patkányokban (Van Dyke és mtsai., 2016; Trias és mtsai., 2018) és betegekből származó izommintán is (Trias és mtsai., 2018). Az említett kutatásokban a SOD1G93A patkányok izmaiban neutrofil granulocita és makrofág infiltrációt figyeltek meg, míg humán combizom mintán a hízósejtek infiltrációját észlelték (Van Dyke és mtsai., 2016; Trias és mtsai., 2018).

Eredményeink alapján elmondható, hogy a passzív szérumsztransfer modell mind a központi idegrendszerben, mind a periférián az ALS-re jellemző eltéréseket váltott ki. Ezeknek az elváltozásoknak mértéke azonban gradiens-szerűen jelentkezik: a gerincvelőben látott mérsékelt fokú motoneuronszám csökkenéssel szemben súlyos fokú NMJ denervációt észleltünk. A patológiai folyamatok lokalizációjából és súlyosságának viszonyaiból jól látszik,

hogy a passzív szérumsztransfer indukálta degeneráció elsősorban a mozgató idegsejtek terminális struktúráit, azaz a véglemezt érintik. Ez a mechanizmus az ún. „dying back” folyamatra utal, és a korábbi kutatások eredményeivel is mutat hasonlóságot (Tian és mtsai., 2016; Genin és mtsai., 2019). Ebből eredően a legjelentősebb különbség a lassú és gyors progressziójú csoport között a motoros véglemez morfológiájában rejlik. Ezért eredményeink alapján az NMJ-k morfológiai elemzése lehet az elsődleges szempont, amennyiben a betegség patológiájában fellépő elváltozásokat mérjük föl, vagy terápiás eljárások hatékonyságát teszteljük ezen betegségmodellen.

Bár vizsgálatunkban számszerűsítettük a legmeghatározóbb morfológiai paramétereket a motoros egységre vonatkozóan (motoneuronszám, NMJ innerváció), betegségmodellünk pontosabb karakterizálása szempontjából elengedhetetlen a jövőben funkcionális lokomotoros és izomerő vizsgálatok elvégzése is. Ezek elsősorban azt hivatottak igazolni, hogy az általunk észlelt morfológiai elváltozásokat funkcionális eltérések is kísérik, valamint további összehasonlítási alapot adhat a gyors és lassú progressziójú csoportok tekintetében is.

6. Konklúzió

Eredményeink alapján a passzív szérumsztransfer módszer alkalmas két különböző morfológiai fenotípust mutató ALS-es egérmodell létrehozására, betegekből származó vérszérumsz injektálásával. Ezen egérmodellekben a gyors és lassú progressziójú csoportok patomechanikai jellemzőiknek súlyossága eltérő, így valósághűen tudták modellezni a betegeknél látott klinikai heterogenitást. Megfigyeltük, hogy az NMJ morfológiát érintik a legerőteljesebb változások és a gyors progressziójú csoportnál súlyos mértékű denerváció van jelen, míg a gerincvelői motoneuronszám tekintetében nem volt különbség a két ALS-es csoport között. Ezek az eredmények a „dying back” hipotézist erősítik, továbbá jó indikátorként szolgálnak későbbi kutatásokban a lassú és gyors progressziójú csoportok közti különbségek vizsgálatára. Az így alkotott modellek új lehetőségeket tárnak fel az ALS-ben zajló immunfolyamatok vizsgálatára, valamint a terápiás eljárások kifejlesztését célzó kutatásokban.

7. Köszönetnyilvánítás

Első sorban szeretném megköszönni **Prof. Dr. Nógrádi Antalnak**, hogy lehetővé tette a projekthez szükséges munkafolyamatok elvégzését az általa vezetett Neuroregenerációs Laboratóriumban, továbbá, hogy témavezetésével és tanácsaival hozzájárult a szakdolgozatom színvonalának emeléséhez.

Köszönöm továbbá **Prof. Dr. Siklós Lászlónak**, hogy a Szegedi Biológiai Kutatóintézetben végzett munkafolyamatokhoz az általa vezetett Neuronális Plaszticitás Kutatócsoportban helyet és támogatást biztosított számunkra.

Köszönettel tartozom **Dr. Nógrádi Bernátnak**, aki lehetőséget nyújtott, hogy az általa vezetett projekthez csatlakozzak, az ehhez szükséges háttérrel és gyakorlati tudással ellátott és munkavégzésem során segítségemre volt. Továbbá köszönöm, hogy dolgozatom lektorálásában egész idő alatt aktívan részt vett.

Köszönöm a Neuroregenerációs Laboratórium munkatársainak, külön kiemelve **Dr. Bellák Tamásnak** és **Kristóf Rebekának**, hogy dolgozatom alapját képző munkafolyamatok elvégzésében segítségemre voltak.

Köszönöm **Dr. Farkas Tamásnak**, hogy a belső konzulensi tisztségével biztosította munkám megfelelő minőségét a Szegedi Tudományegyetem felé.

8. Irodalomjegyzék

- Alhindi, A., Shand, M., Smith, H. L., Leite, A. S., Huang, Y. T., van der Hoorn, D., Ridgway, Z., Faller, K. M. E., Jones, R. A., Gillingwater, T. H., & Chaytow, H. (2023). Neuromuscular junction denervation and terminal Schwann cell loss in the hTDP-43 overexpression mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 49(4). <https://doi.org/10.1111/nan.12925>
- Amin, A., Perera, N. D., Beart, P. M., Turner, B. J., & Shabanpoor, F. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis and autophagy: Dysfunction and therapeutic targeting. In *Cells* (Köt. 9, Szám 11, o. 1–30). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells9112413>
- Arthur, K. C., Calvo, A., Price, T. R., Geiger, J. T., Chiò, A., & Traynor, B. J. (2016). Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12408>
- Beers, D. R., Zhao, W., Wang, J., Zhang, X., Wen, S., Neal, D., Thonhoff, J. R., Alsuliman, A. S., Shpall, E. J., Rezvani, K., & Appel, S. H. (2017). ALS patients' regulatory T lymphocytes are dysfunctional, and correlate with disease progression rate and severity. *JCI Insight*, 2(5). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89530>
- Bjornskov, E. K., Norris, F. H., & Mower-Kuby, J. (1982). *Quantitative Axon Terminal and End-plate Morphology in Amyotrophic Lateral Sclerosis*. <http://archneur.jamanetwork.com/>
- Blokhuis, A. M., Groen, E. J. N., Koppers, M., Van Den Berg, L. H., & Pasterkamp, R. J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. In *Acta Neuropathologica* (Köt. 125, Szám 6, o. 777–794). <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1125-6>
- Boillée, S., Vande Velde, C., & Cleveland, D. W. W. (2006). ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. In *Neuron* (Köt. 52, Szám 1, o. 39–59). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.018>
- Bonafede, R., & Mariotti, R. (2017). ALS pathogenesis and therapeutic approaches: The role of mesenchymal stem cells and extracellular vesicles. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Köt. 11). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00080>
- Bonifacino, T., Zerbo, R. A., Balbi, M., Torazza, C., Frumento, G., Fedele, E., Bonanno, G., & Milanese, M. (2021). Nearly 30 years of animal models to study amyotrophic lateral sclerosis: A historical overview and future perspectives. In *International Journal of Molecular Sciences* (Köt. 22, Szám 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222212236>
- Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M., & Munsat, T. L. (2000). El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 1(5), 293–299. <https://doi.org/10.1080/146608200300079536>
- Cappello, V., & Francolini, M. (2017). Neuromuscular junction dismantling in amyotrophic lateral sclerosis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Köt. 18, Szám 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18102092>

- Carata, E., Muci, M., Di Giulio, S., Mariano, S., & Panzarini, E. (2023). Looking to the Future of the Role of Macrophages and Extracellular Vesicles in Neuroinflammation in ALS. In *International Journal of Molecular Sciences* (Köt. 24, Szám 14). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms241411251>
- Cook, C. N., Wu, Y., Odeh, H. M., Gendron, T. F., Jansen-West, K., del Rosso, G., Yue, M., Jiang, P., Gomes, E., Tong, J., Daugherty, L. M., Avendano, N. M., Castanedes-Casey, M., Shao, W., Oskarsson, B., Tomassy, G. S., McCampbell, A., Rigo, F., Dickson, D. W., ... Petrucelli, L. (2020). C9orf72 poly(GR) aggregation induces TDP-43 proteinopathy. In *Sci. Transl. Med* (Köt. 12). <https://www.science.org>
- Doble A. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology*. 1996 Dec;47(6 Suppl 4): S233-41. doi: 10.1212/wnl.47.6_suppl_4.233s. PMID: 8959995.
- Ehrhart, J., Smith, A. J., Kuzmin-Nichols, N., Zesiewicz, T. A., Jahan, I., Shytle, R. D., Kim, S. H., Sanberg, C. D., Vu, T. H., Gooch, C. L., Sanberg, P. R., & Garbuzova-Davis, S. (2015). Humoral factors in ALS patients during disease progression. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0350-4>
- Engelhardt, J. I., Siuos, L A ~ Z L O K ~ ~ I V E S, L., Smith, R. G., & Appel, S. H. (1995). Antibodies to Calcium Channels From ALS Patients Passively Transferred to Mice Selectively Increase Intracellular Calcium and Induce Ultrastructural Changes in Motoneurons. In *SYNAPSE* (Köt. 20).
- Fang, T., Al Khleifat, A., Meurgey, J. H., Jones, A., Leigh, P. N., Bensimon, G., & Al-Chalabi, A. (2018). Stage at which riluzole treatment prolongs survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a retrospective analysis of data from a dose-ranging study. *The Lancet Neurology*, 17(5), 416–422. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30054-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30054-1)
- Forbes, R. B., Colville, S., & Swingle, R. J. (2004). The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS/MND) in people aged 80 or over. *Age and Ageing*, 33(2), 131–134. <https://doi.org/10.1093/ageing/afh013>
- Genin, E. C., Madji Hounoum, B., Bannwarth, S., Fragaki, K., Lacas-Gervais, S., Mauri-Crouzet, A., Lespinasse, F., Neveu, J., Ropert, B., Augé, G., Cochaud, C., Lefebvre-Omar, C., Bigou, S., Chiot, A., Mochel, F., Boillée, S., Lobsiger, C. S., Bohl, D., Ricci, J. E., & Paquis-Flucklinger, V. (2019). Mitochondrial defect in muscle precedes neuromuscular junction degeneration and motor neuron death in CHCHD10 S59L/+ mouse. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01988-z>
- Guo, H., Lai, L., Butchbach E.R., M. E. R., Stockinger, M. P., Shan, X., Bishop, G. A., & Lin, C. L. G. (2003). Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Human Molecular Genetics*, 12(19), 2519–2532. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg267>
- Huang, Y., Li, Y., Pan, H., & Han, L. (2023). Global, regional, and national burden of neurological disorders in 204 countries and territories worldwide. *Journal of Global Health*, 13. <https://doi.org/10.7189/JOGH.13.04160>

- Ingre, C., Roos, P. M., Piehl, F., Kamel, F., & Fang, F. (2015). Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. In *Clinical Epidemiology* (Köt. 7, o. 181–193). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S37505>
- Jo, M., Lee, S., Jeon, Y. M., Kim, S., Kwon, Y., & Kim, H. J. (2020). The role of TDP-43 propagation in neurodegenerative diseases: integrating insights from clinical and experimental studies. In *Experimental and Molecular Medicine* (Köt. 52, Szám 10, o. 1652–1662). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00513-7>
- King, A. E., Woodhouse, A., Kirkcaldie, M. T. K., & Vickers, J. C. (2016). Excitotoxicity in ALS: Overstimulation, or overreaction? In *Experimental Neurology* (Köt. 275, o. 162–171). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.09.019>
- Kollewe, K., Mauss, U., Krampfl, K., Petri, S., Dengler, R., & Mohammadi, B. (2008). ALSFRS-R score and its ratio: A useful predictor for ALS-progression. *Journal of the Neurological Sciences*, 275(1–2), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.07.016>
- Larsson, L., & Edström, L. (1986). Effects of Age on Enzyme-Histochemical Fibre Spectra and Contractile Properties of Fast-and Slow-Twitch Skeletal Muscles in the Rat. In *Journal of the Neurological Sciences* (Köt. 76).
- Liu, J., & Wang, F. (2017). Role of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: Cellular mechanisms and therapeutic implications. In *Frontiers in Immunology* (Köt. 8, Szám AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01005>
- Malik, R., & Wiedau, M. (2020). Therapeutic Approaches Targeting Protein Aggregation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Köt. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00098>
- Mandrioli, J., Biguzzi, S., Guidi, C., Sette, E., Terlizzi, E., Ravasio, A., Casmiro, M., Salvi, F., Liguori, R., Rizzi, R., Pietrini, V., Borghi, A., Rinaldi, R., Fini, N., Chierici, E., Santangelo, M., Granieri, E., Mussuto, V., De Pasqua, S., ... D'Alessandro, R. (2015). Heterogeneity in ALSFRS-R decline and survival: a population-based study in Italy. *Neurological Sciences*, 36(12), 2243–2252. <https://doi.org/10.1007/s10072-015-2343-6>
- Mantovani, S., Garbelli, S., Pasini, A., Alimonti, D., Perotti, C., Melazzini, M., Bendotti, C., & Mora, G. (2009). Immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients suggest an ongoing neuroinflammatory process. *Journal of Neuroimmunology*, 210(1–2), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.02.012>
- Masrori, P., & Van Damme, P. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. In *European Journal of Neurology* (Köt. 27, Szám 10, o. 1918–1929). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ene.14393>
- McIntosh, J., Mekrouda, I., Dashti, M., Giuraniuc, C. V., Banks, R. W., Miles, G. B., & Bewick, G. S. (2023). Development of abnormalities at the neuromuscular junction in the SOD1-G93A mouse model of ALS: dysfunction then disruption of postsynaptic structure precede overt motor symptoms. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1169075>
- Mead, R. J., Shan, N., Reiser, H. J., Marshall, F., & Shaw, P. J. (2023). Amyotrophic lateral sclerosis: a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation. In

- Nature Reviews Drug Discovery* (Köt. 22, Szám 3, o. 185–212). Nature Research.
<https://doi.org/10.1038/s41573-022-00612-2>
- Mejzini, R., Flynn, L. L., Pitout, I. L., Fletcher, S., Wilton, S. D., & Akkari, P. A. (2019). ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? In *Frontiers in Neuroscience* (Köt. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01310>
- Meszlényi, V., Patai, R., Polgár, T. F., Nógrádi, B., Körmöczy, L., Kristóf, R., Spisák, K., Tripolszki, K., Széll, M., Obál, I., Engelhardt, J. I., & Siklós, L. (2020). Passive transfer of sera from als patients with identified mutations evokes an increased synaptic vesicle number and elevation of calcium levels in motor axon terminals, similar to sera from sporadic patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–18.
<https://doi.org/10.3390/ijms21155566>
- Miller, T. M., Cudkowicz, M. E., Genge, A., Shaw, P. J., Sobue, G., Bucelli, R. C., Chiò, A., Van Damme, P., Ludolph, A. C., Glass, J. D., Andrews, J. A., Babu, S., Benatar, M., McDermott, C. J., Cochrane, T., Chary, S., Chew, S., Zhu, H., Wu, F., ... Fradette, S. (2022). Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS . *New England Journal of Medicine*, 387(12), 1099–1110. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2204705>
- Minty, G., Hoppen, A., Boehm, I., Alhindi, A., Gibb, L., Potter, E., Wagner, B. C., Miller, J., Skipworth, R. J. E., Gillingwater, T. H., & Jones, R. A. (2020). ANMJ-morph: A simple macro for rapid analysis of neuromuscular junction morphology. *Royal Society Open Science*, 7(4). <https://doi.org/10.1098/rsos.200128>
- Morrice, J. R., Gregory-Evans, C. Y., & Shaw, C. A. (2018). Animal models of amyotrophic lateral sclerosis: A comparison of model validity. In *Neural Regeneration Research* (Köt. 13, Szám 12, o. 2050–2054). Wolters Kluwer Medknow Publications.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.241445>
- Murdock, B. J., Zhou, T., Kashlan, S. R., Little, R. J., Goutman, S. A., & Feldman, E. L. (2017). Correlation of peripheral immunity with rapid Amyotrophic lateral sclerosis progression. *JAMA Neurology*, 74(12), 1446–1454.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.2255>
- Obál, I., Klausz, G., Mándi, Y., Deli, M., Siklós, L., & Engelhardt, J. I. (2016). Intraperitoneally administered IgG from patients with amyotrophic lateral sclerosis or from an immune-mediated goat model increase the levels of TNF- α , IL-6, and IL-10 in the spinal cord and serum of mice. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1).
<https://doi.org/10.1186/s12974-016-0586-7>
- Obál, I., Nógrádi, B., Meszlényi, V., Patai, R., Ricken, G., Kovacs, G. G., Tripolszki, K., Széll, M., Siklós, L., & Engelhardt, J. I. (2019). Experimental motor neuron disease induced in mice with long-term repeated intraperitoneal injections of serum from ALS patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10).
<https://doi.org/10.3390/ijms20102573>
- Olesen, M. N., Wuolikainen, A., Nilsson, A. C., Wrenfeldt, M., Forsberg, K., Madsen, J. S., Lillevang, S. T., Brandslund, I., Andersen, P. M., & Asgari, N. (2020). Inflammatory profiles relate to survival in subtypes of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*:

Neuroimmunology and NeuroInflammation, 7(3).
<https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000697>

- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Brône, B., Brown, G. C., Butovsky, O., Carson, M. J., Castellano, B., Colonna, M., & Cowley, S. A. (2022). *Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads* (Köt. 34).
- Petrov, D., Mansfield, C., Moussy, A., & Hermine, O. (2017). ALS clinical trials review: 20 years of failure. Are we any closer to registering a new treatment? In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Köt. 9, Szám MAR). Frontiers Research Foundation.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00068>
- Polgár, T. F., Meszlényi, V., Nógrádi, B., Körmöczy, L., Spisák, K., Tripolszki, K., Széll, M., Obál, I., Engelhardt, J. I., Siklós, L., & Patai, R. (2021). Passive transfer of blood sera from ALS patients with identified mutations results in elevated motoneuronal calcium level and loss of motor neurons in the spinal cord of mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18). <https://doi.org/10.3390/ijms22189994>
- Prasad, A., Bharathi, V., Sivalingam, V., Girdhar, A., & Patel, B. K. (2019). Molecular mechanisms of TDP-43 misfolding and pathology in amyotrophic lateral sclerosis. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Köt. 12). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00025>
- Raymond, J., Mehta, P., Larson, T., Pioro, E. P., & Kevin Horton, D. (2021). Reproductive History and Age of Onset for Women Diagnosed with Amyotrophic Lateral Sclerosis: Data from the National ALS Registry: 2010-2018. In *Neuroepidemiology* (Köt. 55, Szám 5, o. 416–424). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000516344>
- Riancho, J., Gonzalo, I., Ruiz-Soto, M., & Berciano, J. (2019). Why do motor neurons degenerate? Actualisation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia (English Edition)*, 34(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2015.12.019>
- Rosen, D., Siddique, T., Patterson, D. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62 (1993).
<https://doi.org/10.1038/362059a0>
- Rosenblum, L. T., & Trotti, D. (2017). EAAT2 and the molecular signature of amyotrophic lateral sclerosis. In *Advances in Neurobiology* (Köt. 16, o. 117–136). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55769-4_6
- Stegmann, G. M., Hahn, S., Liss, J., Shefner, J., Rutkove, S., Shelton, K., Duncan, C. J., & Berisha, V. (2020). Early detection and tracking of bulbar changes in ALS via frequent and remote speech analysis. *npj Digital Medicine*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s41746-020-00335-x>
- Swinnen, B., & Robberecht, W. (2014). The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. In *Nature Reviews Neurology* (Köt. 10, Szám 11, o. 661–670). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.184>
- Tian, F., Yang, W., Mordes, D. A., Wang, J. Y., Salameh, J. S., Mok, J., Chew, J., Sharma, A., Leno-Duran, E., Suzuki-Uematsu, S., Suzuki, N., Han, S. S., Lu, F. K., Ji, M., Zhang, R.,

- Liu, Y., Strominger, J., Shneider, N. A., Petrucelli, L., ... Eggan, K. (2016). Monitoring peripheral nerve degeneration in ALS by label-free stimulated Raman scattering imaging. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13283>
- Tortelli, R., Zecca, C., Piccininni, M., Benmahamed, S., Dell'Abate, M. T., Barulli, M. R., Capozzo, R., Battista, P., & Logroscino, G. (2020). Plasma Inflammatory Cytokines Are Elevated in ALS. *Frontiers in Neurology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.552295>
- Tremblay, E., Martineau, É., & Robitaille, R. (2017). Opposite synaptic alterations at the neuromuscular junction in an ALS mouse model: When motor units matter. *Journal of Neuroscience*, 37(37), 8901–8918. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3090-16.2017>
- Trias, E., King, P. H., Si, Y., Kwon, Y., Varela, V., Ibarburu, S., Kovacs, M., Moura, I. C., Beckman, J. S., Hermine, O., & Barbeito, L. (2018). Mast cells and neutrophils mediate peripheral motor pathway degeneration in ALS. *JCI insight*, 3(19). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123249>
- Tzeplaeff, L., Wilfling, S., Requardt, M. V., & Herdick, M. (2023). Current State and Future Directions in the Therapy of ALS. In *Cells* (Köt. 12, Szám 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells12111523>
- Van Den Berg, L. H., Sorenson, E., Gronseth, G., Macklin, E. A., Andrews, J., Baloh, R. H., Benatar, M., Berry, J. D., Chio, A., Corcia, P., Genge, A., Gubitz, A. K., Lomen-Hoerth, C., McDermott, C. J., Pioro, E. P., Rosenfeld, J., Silani, V., Turner, M. R., Weber, M., ... Mitsumoto, H. (2019). Revised Airlie House consensus guidelines for design and implementation of ALS clinical trials. *Neurology*, 92(14), E1610–E1623. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000007242>
- Van Dyke, J. M., Smit-Oistad, I. M., Macrander, C., Krakora, D., Meyer, M. G., & Suzuki, M. (2016). Macrophage-mediated inflammation and glial response in the skeletal muscle of a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Experimental Neurology*, 277, 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.01.008>
- Wang, M., Liu, Z., Du, J., Yuan, Y., Jiao, B., Zhang, X., Hou, X., Shen, L., Guo, J., Jiang, H., Xia, K., Tang, J., Zhang, R., Tang, B., & Wang, J. (2021). Evaluation of Peripheral Immune Activation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Neurology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.628710>
- Witzel, S., Wagner, M., Zhao, C., Kandler, K., Graf, E., Berutti, R., Oexle, K., Brenner, D., Winkelmann, J., & Ludolph, A. C. (2022). Fast versus slow disease progression in amyotrophic lateral sclerosis—clinical and genetic factors at the edges of the survival spectrum. *Neurobiology of Aging*, 119, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2022.07.005>
- Zhao, J., Wang, X., Huo, Z., Chen, Y., Liu, J., Zhao, Z., Meng, F., Su, Q., Bao, W., Zhang, L., Wen, S., Wang, X., Liu, H., & Zhou, S. (2022). The Impact of Mitochondrial Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis. In *Cells* (Köt. 11, Szám 13). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells11132049>
- Zou, Z. Y., Zhou, Z. R., Che, C. H., Liu, C. Y., He, R. L., & Huang, H. P. (2017). Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis.

Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 88(7), 540–549.
<https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-315018>

9. Tételes hozzájárulási nyilatkozat

A 37. OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK 2. SZÁMÚ MELLÉKLETE

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Kádár Zalán nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott „Eltérő progressziójú ALS-es egérmodellek alkotása és karakterizálása betegek vérérszámának felhasználásával” című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán* jellemezve)
Mintagyűjtése a passzív szérum transzferkezelést követően	3
Minták feldolgozása, metszése	3
Immunhisztokémiai festés	3
Konfokális mikroszkópia	3
Képanalízis	3
Adatelemzés statisztikai módszerekkel	1

Kelt: Szeged, 2024. 04. 15.

Kádár Zalán

Pályamunkát benyújtó hallgató
aláírása
Kádár Zalán

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:

Prof. Dr. Nógrádi Antal

Témavezető aláírása
Prof. Dr. Nógrádi Antal
Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet



#Magyarázat:

A munkafolyamatokban való részvétel mértékét ötfokozatú skálán kérjük értékelni. A skála egyes értékeinek jelentése:

5 – Felkészítés után a feladat teljes egészét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

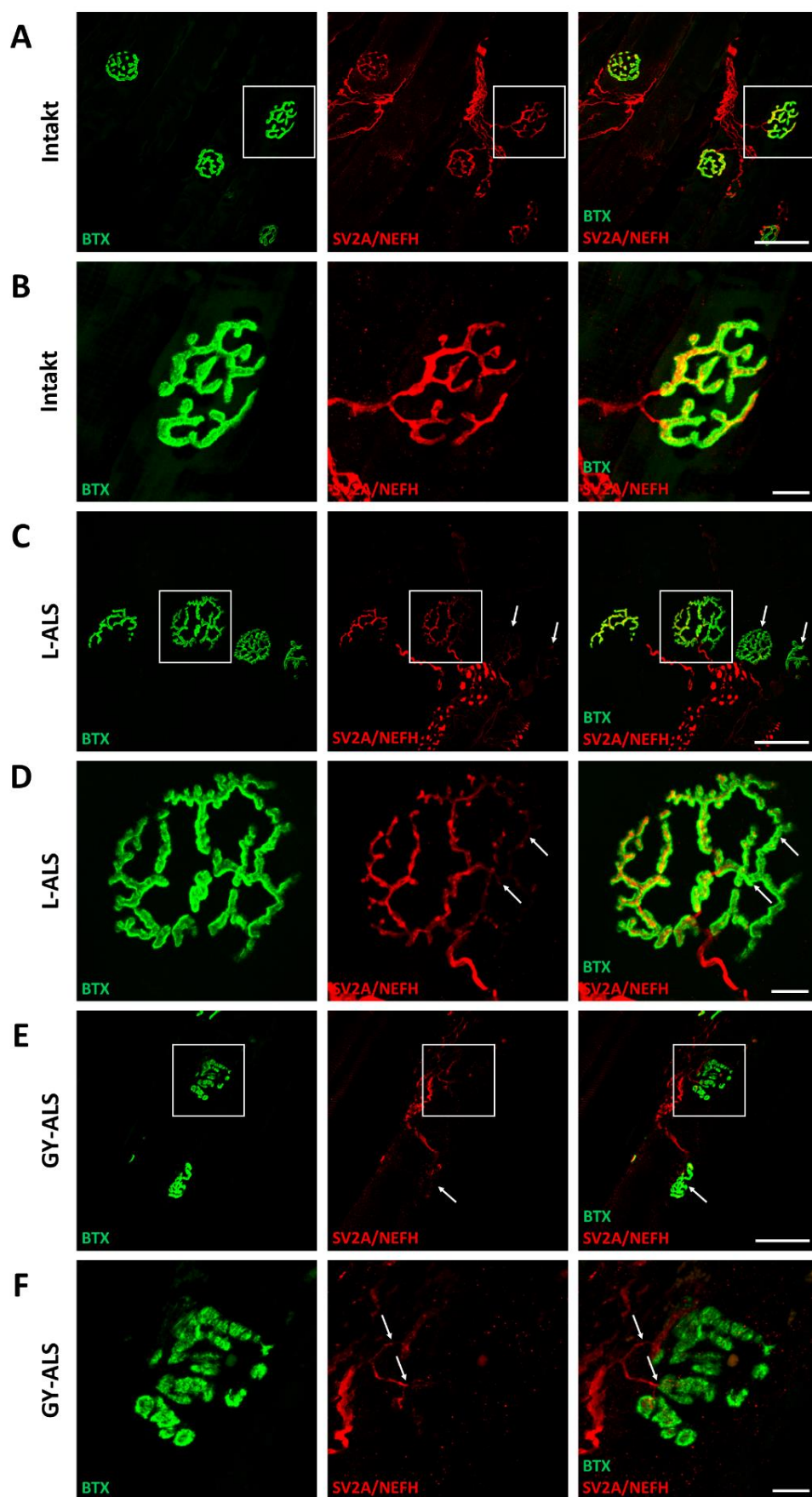
4 – Felkészítés után a feladat több mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

3 – Felkészítés után a részfeladat felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

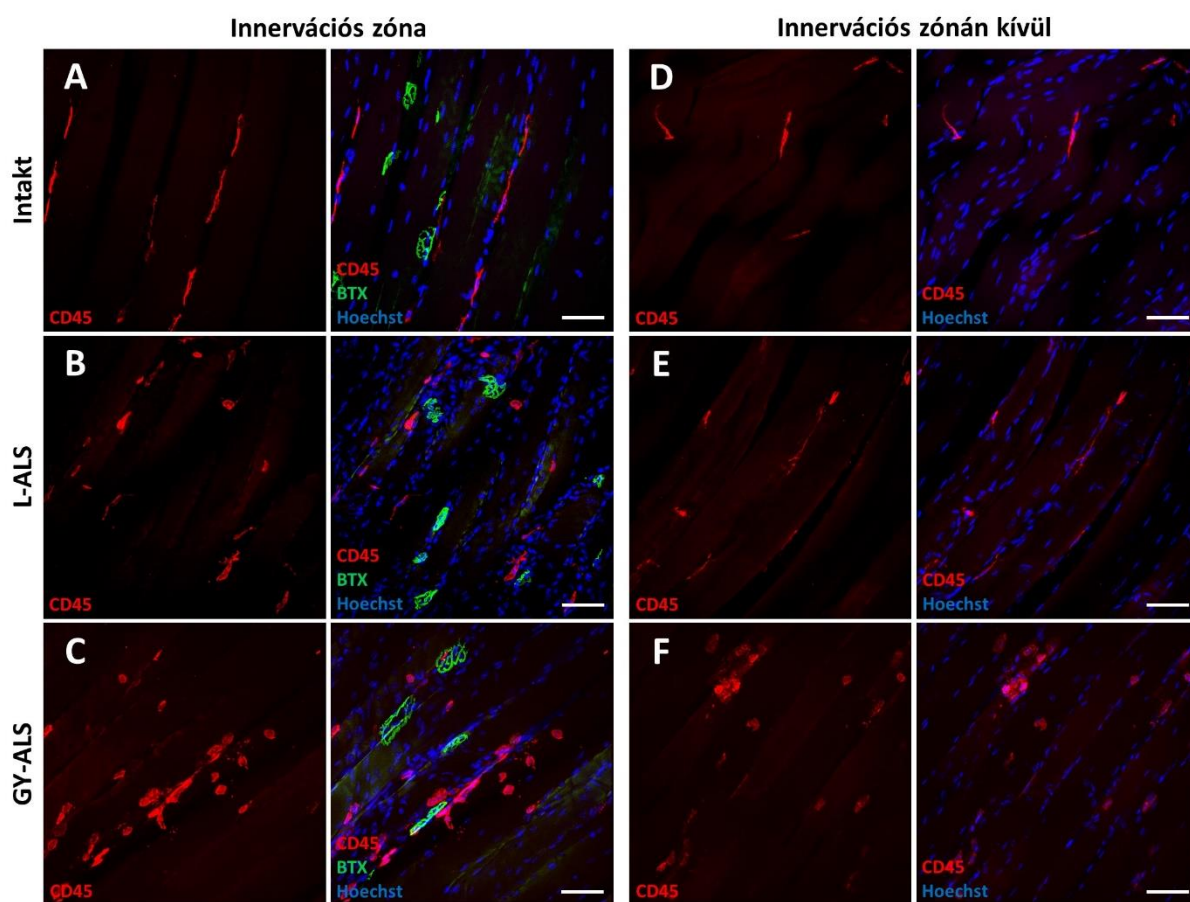
2 – Felkészítés után a részfeladat kevesebb mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

1 – A részfeladatot folyamatos segítséggel végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

10. Mellékletek



1. melléklet. NMJ innerváció változása az intakt, L-ALS és GY-ALS csoportokban. Az ábrán kis és nagy nagyítású képek láthatóak az intakt (A, B), L-ALS (C, D) és GY-ALS (E, F) csoportokban látott véglemezekről a TA izmokban. Az alfa-BTX jelölés a posztzinaptikus denzitást festi meg, míg az SV2A/NEFH kombinált festés a preszinaptikus terminálist reprezentálja. A posztzinaptikus oldalon nem látható jelentős változás, kivétel a GY-ALS csoportnál, ahol egy mérsékelt fragmentációt figyelhetünk meg (F). A preszinaptikus terminálisnál különböző denervációs mintázatokat észleltünk: L-ALS csoport esetén jelen voltak a teljesen innervált, részlegesen innervált (C) és denervált NMJ struktúrák egyaránt (C, D). (C) A nyílak a teljesen denervált NMJ-t jelölik, míg a (D) panelen láthatóak a részleges innerváció helyét mutatják. Az L-ALS csoporttal szemben a GY-ALS csoportnál majdnem az összes NMJ denerváltnak bizonyult (E, F), valamint az axonok terminális része hiányzott vagy elvékonyodott (F). Az (E) panelokon lévő nyílak a denervált véglemezt jelölik, az (F) panelon pedig a sorvadó axonális szegmenseket. A méretskála a kis nagyítású képeken (A, C, E) 50 μm -t jelöl, míg a nagyobb nagyításúakon (B, D, F) 10 μm -t.



2. melléklet. CD45-pozitív sejtszám változása az innervációs zónán belül és kívül a különböző kezelési csoportok között. Reprezentatív képek a TA izomban innervációs zónából (A-C), valamint a zónán kívülről (D-F) az intakt (A, D), L-ALS (B, E) és GY-ALS (C, F) csoportban. A fehérvérsejtek és az NMJ-k CD45 és BTX festéssel lettek jelölve. Az intakt mintán (A, D) viszonylag kevés, rendezetten elhelyezkedő immunsejt látható (A, D). Ehhez viszonyítva az L-ALS csoport esetén az innervációs zónában (B) emelkedett számú CD45-pozitív sejtszám látható, melyek az NMJ-k köré irányulnak. Az L-ALS csoportban, az innervációs zónán kívül (E) nem volt megfigyelhető változás az immunsejtek számában. A legmagasabb CD45-pozitív fehérvérsejt a GY-ALS

csoport innervációs zónájában (C) megfigyelhető, még inkább az NMJ-k köré rendeződve. Érdekes módon a GY-ALS csoportnál az innervációs zónán kívül (F) is látható fehérvérsejtszám növekedés. A méretskála minden kép esetén 50 μm -t jelöl (A-F).