

Potenciális új terápiás célpontok preklinikai vizsgálata agyi nagyér elzáródás kísérletes modelljén

Doktori tézisek

Dr. Nardai Sándor

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



- Konzulensek: Dr. Zoltán Nagy, D.Sc. Egyetemi tanár
Dr. Skopál Judit Ph.D. Tudományos főmunkatárs
- Hivatalos bírálók: Dr. Farkas Eszter, Ph.D. Tudományos főmunkatárs
Dr. Kovács Tibor, Ph.D. Egyetemi docens
- Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Bereczki Dániel, D.Sc. Egyetemi tanár
- Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Martos János, Ph.D., Osztályvezető főorvos
Dr. Debreczeni Róbert, Ph.D., Egyetemi adjunktus

**Budapest
2016**

Bevezetés

A stroke a második leggyakoribb halálokok, és a tartós rokkantság harmadik leggyakoribb kiváltó oka világszerte. Incidenciája eltérő irányban változott az elmúlt években a magas és alacsony jövedelmű országokban, és az utóbbi csoportban a kórkép gyakoriságának egyértelmű növekedése tapasztalható.

Jelen munkánk fókuszában az agyi nagyér elzáródás által okozott infarktuszok állnak. Ezek az ischaemiás stroke-ok a koponyán belüli fő ütőerek elzáródásának következtében alakulnak ki, és kórlefolyásukat általánosságban a rossz neurológiai kimenetel és magas halálozás jellemzi. A preklinikai kutatásaink során használt tranziens a. cerebri media oclusio modell legpontosabban a nagyér elzáródást kórélettani folyamatait szimulálja, így következtéseinket elsősorban erre a jól körülhatárolható klinikai entitásra vonatkoztatjuk.

Egészen a közelmúltig a tünetek kezdetét követően 4,5 órán belül alkalmazott az intravénás alteplase jelentette az egyetlen oki terápiát akut ischaemiás stroke-ban. Ugyanakkor ennek a terápiás modalitásnak az alkalmazását számos ellenjavallat (véralvadási zavarok,

közelmúltban végzett műtét, korábbi koponyaűri vérzés) korlátozza, ráadásul az agyi főütőerek elzáródása esetén kevésbé hatékony. Az a. carotis interna elzáródásakor alig 30% az érmegnyílás aránya lízis alkalmazása mellett. Az agyi nagyér elzáródások katéter alapú, mechanikus thrombectómiával történő megnyitása hatalmas előrelépést jelent az ischaemiás stroke kezelésében. Az új terápiás útmutatások a legmagasabb szintű ajánlást fogalmazták meg a kezelés alkalmazására a közelmúltban megjelent bizonyítékok alapján. A folyamatban levő klinikai vizsgálatok tovább fogják segíteni az optimális beteg szelekciót, és így várhatóan a jövőben elkerülhetőek lesznek a feleslegesen végzett, illetve esetenként egészségkárosodást okozó beavatkozások. Ugyanakkor továbbra is hatalmas szükség van olyan kiegészítő terápiás megoldások kidolgozására, amelyek a vérzések megelőzése révén javíthatják a beavatkozások biztonságosságát, illetve alternatív megoldást kínálhatnak azon betegek számára, akiknél nem jön szóba a reperfüziós kezelés. Olyan új technikai megoldások, mint a radiális behatolás alkalmazása, illetve új terápiás célpontok felfedezése egyaránt segíthetik a kezelések hatékonyságának és biztonságának növelését.

Célkitűzések:

Zselatináz aktivitás vizsgálata subacut stroke-ban

A zselatináz aktivitással rendelkező mártix metalloprotezináz (MMP) 2 és 9 enzimek fontos szerepet játszanak az agyi infarktus vérzéses transzformációjában: vér-agy gát károsodását okozzák, és felgyorsítják az agyi sejthalált. Ráadásul ezen enzimek aktivitását növelik a trombolitiumok, így a zselatináz gátlás kézenfekvő terápiás eljárás lehetne a vérzéses szövődmények csökkentése céljából.

Szemben az akut agyi infarktusból tapasztalt káros hatásukkal, a zselatináz enzimek az ischaemiás stroke későbbi fázisában elősegíthetik a regenerációt. A zselatináz aktivitás farmakológiai gátlása az agyi infarktust követő 7. napon jelentősen növelte a károsodott terület kiterjedését és rontotta a funkcionális regenerációt.

Jelen vizsgálatunk célja a stroke subacut fázisában alkalmazott zselatináz enzimgátlás során tapasztalt csökkent regenerációs készség molekuláris-biológiai hátterének felderítése.

Selegiline hatásának vizsgálata stroke-ban

A Selegiline-t széles körben alkalmazzák a Parkinson kór kezelésére. Hatékonysága a monoamin oxidáz B (MAO-B) enzim gátlásán, valamint anti-apoptotikus hatásán alapul, melynek hátterében a mitokondrium membrán stabilizálása és a reaktív szabadgyökök közömbösítése állhat.

Kutatócsoportunk vizsgálatai alapján a selegiline csökkentette az infarktus kiterjedését permanens a. cerebri media elzáródás kisállat modelljén. Egy kis betegszámú, randomizált, kettős vak klinikai tanulmány szintén vizsgálta a szer hatékonyságát. Bár szignifikáns javulást észleltek a fizioterápiával kombinált selegiline kezelésben részesülő betegeknél, ennek a hatásnak a molekuláris mechanizmusa a mai napig nem ismert.

A selegiline agyi ischaemiában kifejtett hatásának megértése céljából megvizsgáltuk, hogy milyen génexpressziós változásokat idéz elő szer az infarktust övező agyszövetben.

Módszerek

Tranziens a. cerebri media oclusio modell (tMCAO)

A kísérleteink során az agyi thrombectomia szimulálására használt kisállat modellt már évtizedek óta használták az ischaemiás stroke folyamán bekövetkező kórélettani változások modellezésére. Fontos megjegyezni ugyanakkor, hogy a fonal eltávolítása során fellépő hirtelen keringés megindulás sokkal jobban utánozza a thrombectomia során fellépő haemodinamikai változásokat, mint a trombolízis során fokozatosan kialakuló reperfüziót.

A jobb a. cerebri media elzárását az azonos oldali a. carotis externa kipreparált csonkján keresztül bevezetett, majd az a. carotis internán keresztül a koponyaúrben a média eredésébe juttatott, 25 mm hosszú, 5 mm hosszú szilikon fejjel ellátott, 4.0-ás nejlon fonallal értük el.

Az agyi ischaemia igazolása céljából az a. cerebri media ellátási területén transcranialis lézer doppler technikával mértük az agyi véráramlást. A fonal pozícióját az alapvonalhoz viszonyított, legalább 40%-os véráramlás csökkenés esetén tartottuk elfogadhatónak. 60 perc után az állatokat újra elaltattuk és a fonalat eltávolítottuk.

Farmakológiai kezelések

A selegiline kezelést 48 órával a 60 perces a cerebri media elzáródás után kezdtük. A kezelt állatok 7 napon át (n=6-6) 0.9%-os fiziológiás sóban oldott selegiline-t kaptak (0.2 mg/kg/nap), amelynek egyenletes felszívódását intra-peritoneálisan elhelyezett ozmotikus minipumpák segítségével biztosítottuk.

A másik kísérletsorozatban intracranialis gyógyszer adagolás mellett döntöttünk, ugyanis terápiás szintű agyi zselatináz enzim gátlás a kereskedelemben elérhető részleges szelektivitású hatóanyagok alkalmazása mellett csak extrém dózisok szisztémás adása esetén lett volna elérhető.

7 nappal a tMCAO után, altatásban, 20 perc alatt 20 µl FN-439 metalloproteináz inhibitor (0.59 mg/kg, 720 mM fiziológiás sóban) vagy fiziológiás só-t jutattunk a kísérleti állatok jobb laterális agykamrájába egy korábban kalibrált stereotaxiás befecskendezővel. A zselatináz gátlás hatékonyságát in-situ zimgoráfiával igazoltuk.

Valamennyi állatkísérletet a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével végeztünk el.

Taqman® array analízis

Kilenc nappal a tMCAO után az állatokat levágtuk és az agyukat eltávolítottuk. 2 mm vastag koronális metszeteket készítettünk a natív agyból egy speciális vágóeszköz segítségével a frontális pólustól 6mm-re indulóan, majd az első metszeten (6-8mm közötti rész) Tetraphenyl-tetrazolium klorid (TTC) festést végeztünk az infarktusos terület azonosítása céljából.

Az RNS-t Trizol reagens segítségével izoláltuk, majd UV spektrofotometriával minőségellenőrzést végeztünk, és csak az 1,7-nél nagyobb 260:280 arányú minták kerültek további feldolgozásra. Az RNS expresszió vizsgálatát a cDNS-sé történt reverz-transcriptiót követően egy egyedi tervezésű, a stroke-ot követő regeneráció szempontjából kiemelt fontosságú 84 gént tartalmazó TaqMan® array segítségével végeztük el. A génexpressziós értékeket az összehasonlítás előtt egy referencia génhez (Psmc4-Rn00821605_g1) normalizáltuk.

Immunhisztokémiai vizsgálatok

A festés minőségének optimalizálása céljából végzett többszöri előkíséreltetek követően szabadon úszó agymetszetek alkalmazása mellett döntöttünk. 9 nappal a tMCAO után az állatokat mélyen elaltattuk, majd a

szívükön keresztül bevezetett kanülön át 150ml jéghideg fiziológiás sóoldattal és 300ml, 7,4-es Ph értékű foszfát pufferben oldott, 4%-os paraformaldehiddel perfundáltuk őket. Az agyakat eltávolítottuk, majd 24 óra, paraformaldehides utófixációt követően 24 órára 4%-os szaharóz oldatba helyeztük. A bregma magasságától indulóan, 40 µm-es vastagságú koronális metsztsorozatot készítettünk immunhisztokémia céljából.

A Notch1 fehérje intracelluláris doménje (NICD), és a Jagged 1 fehérje elleni antitesteket, valamint a mikroér denzitás meghatározása céljából RECA antitesteket használtunk a selegiline vizsgálat során. Az MMP inhibitoros kísérletekben pedig a Reticulon 4 receptor (Rtn4r) elleni antitesteket alkalmaztunk. A vizsgált fehérjéket kifejező sejttípusok azonosítása céljából standard sejtmarkerek segítségével kettős festéseket is végeztünk.

Western-blot vizsgálat a Rtn4r fehérjére

A Rtn4r fehérje koncentráció változásának pontosabb összehasonlítása céljából Western-blot vizsgálatot végeztünk. A reakciókat HRP-vel (Hors radish peroxidase) hívtuk elő, majd GAPDH kontrollal végzett

normalizációt követően Image lab 4.0.1. program segítségével mértük meg a fehérje koncentrációját.

Agyi ödéma mérése MRI segítségével

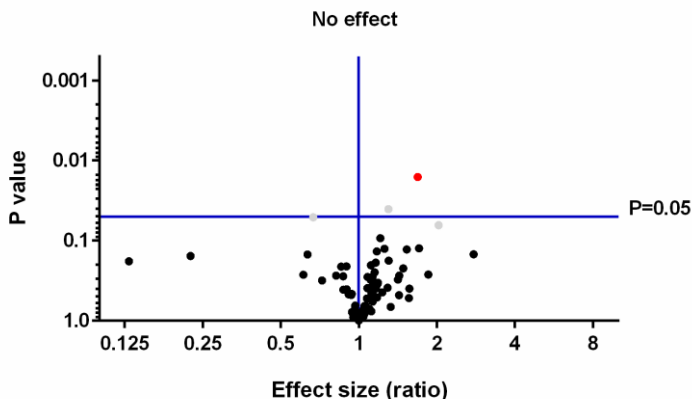
Mágneses rezonancia képalkotást (MRI) végeztünk egy 1.5 Tesla mágnes erősségű, Philips Achieva típusú klinikai berendezés és egy SENSE-Flex-M mágnesetekercs segítségével a kezeléseket követően 6 nappal. Ketamine/xilazin koktéllal történt altatást követően az állatokat háton fekvő pozícióban az MRI berendezésben helyeztük el, és T2 súlyozott, 3D VISTA szekvenciákkal ábrázoltuk az agyi ödémát. Kontrasztosítást követően a rekonstruált koronális metszeteken a frontális pólustól 7mm-re planimetria segítségével mértük meg az ödéma kiterjedését Image J program alkalmazásával.

Statisztikai próbák

Normalizált c-DNS expressziós értékeket és normalizált fehérje szinteket használtunk a vizsgálatokhoz. Míg az előzetes kalkulációk során T tesztet alkalmaztunk, a megerősítő számolások során Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW) tesztet alkalmaztunk Graphpad Prism 6 program segítségével.

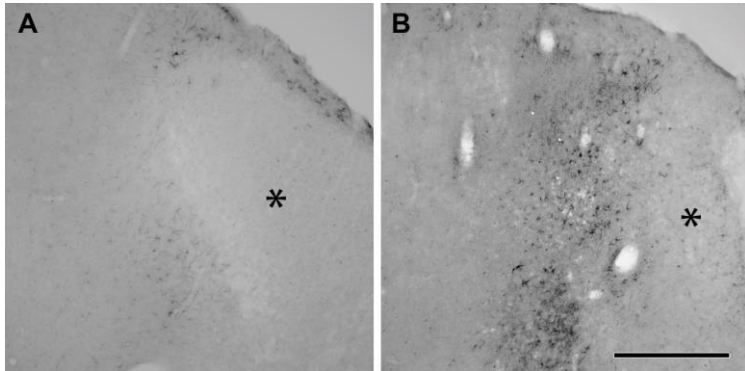
Eredmények

RNS expressziós változások a peri-infarktusos kéregben subcut zselatináz enzim gátlást követően



1. Ábra A fokális ischaemia szubakut fázisában végzett zselatináz enzim gátlás által előidézett RNS expressziós változások grafikus ábrázolása. A “p értékeket” t teszt segítségével számoltuk ki. Az eredmények klasszikus vulkán mintázatú elrendeződést mutatnak egy gén (RNT4r/piros pont) egyértelmű indukciójával és további három határérték változásával (Dcc, C-Jun, Ngf/ szürk pontok). 80 gén expressziója nem változott érdemben. Az array kísérlet eredményei alapján a Rtn4r fehérje peri-infarktusos kéregben történő kifejeződésének további vizsgálata mellett döntöttünk.

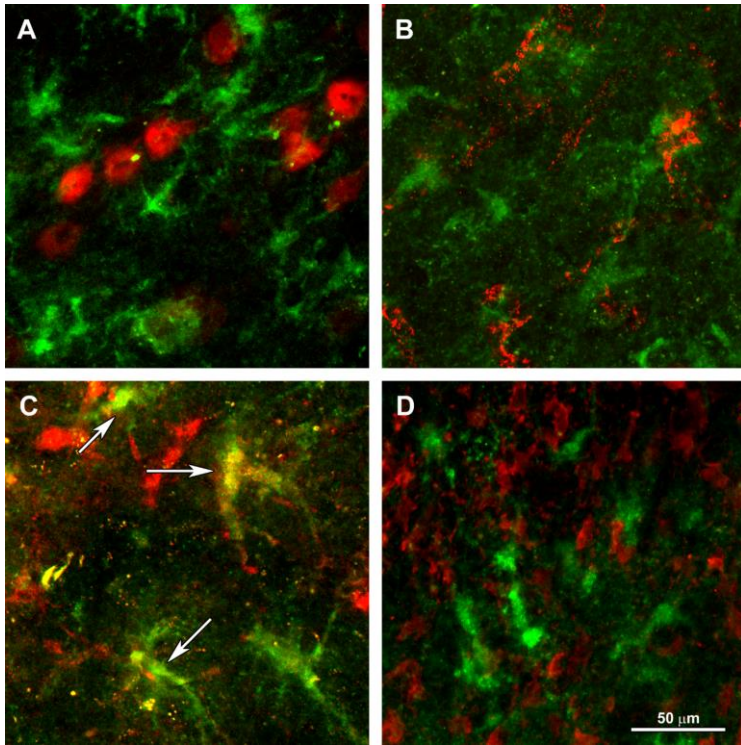
Emelkedett Rtn4r fehérje koncentráció igazolása immunfestés és Western-blot segítségével



2. Ábra Rtn4r immun-reaktivitás a peri-infarktusos agykéregben. A: Rtn4r jelintenzitás emelkedett a peri-infarktusos régióban, és megjelenése kijelöli a lézió határát. B: Rtn4r eloszlása a zselatináz gátlást követően azonos a kezeletlen MCAO állatoknál tapasztalttal, azonban a FN439 kezelés hatására a Rtn4r jelölés intenzitása megnő. A csillag jelzés (*) a léziót jelöli. Skála = 500 μ m.

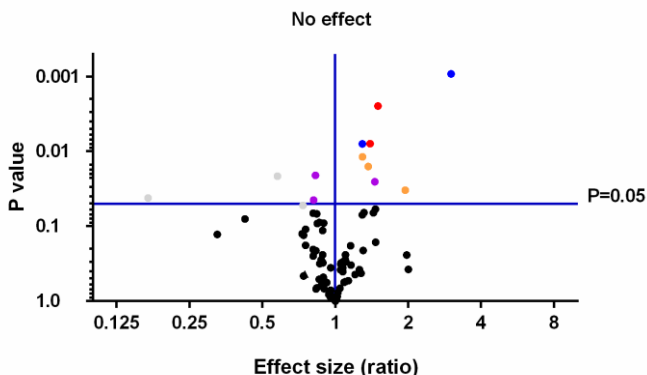
A Rtn4r fehérje szintjének pontosabb mérése céljából a natív agyminták Western-blot analízisét is elvégeztük, amely igazolta a fehérje emelkedett koncentrációját ($p=0,004$) a kezelt állatokban.

Rtn4r expresszió a peri-infarktusos kéreg astrocytáin



3. Ábra Rtn4r expresszió látható a peri-infarktusos agykéreg astrocytáin. Rtn4r mind a négy panelen zöld színben jelenik meg, míg az egyéb markerek vörös színűek. Egyértelmű kolokalizáció látható az S100 astrocyta markerrel (nyilak) (C) míg a NeuN (A), vWF (B) és Iba1 (D) markerekkel végzett festés nem mutat kolokalizációt a Rtn4r fehérjével. Skála = 50 µm.

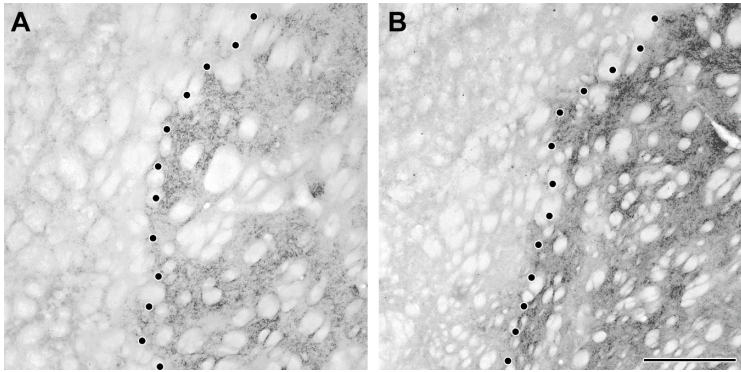
Selegiline fokozza a Notch1-Jagged1 fehérjék, több anti-apoptosis gén és glia-marker kifejeződését



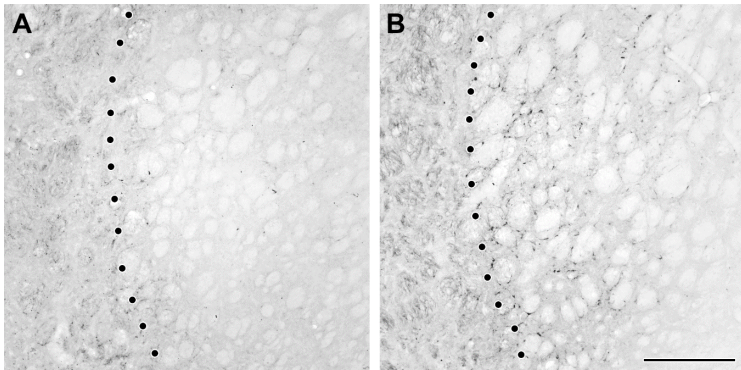
4. Ábra Selegiline kezelés által előidézett mRNS expressziós változások grafikus ábrázolása a periinfarktusos régióban. A “p értékeket” t teszt segítségével számoltuk ki. A színek négy megváltozott expressziójú géncsoport jelölnék: Notch-Jagged jelátviteli út (piros: Noth1, Jag1), glia markerek (narancs: Ptpzr1, Mag, Mog), anti-apoptotikus gének (blue:Bcl2/1, Xiap) és proapoptotikus gének (purple: Apaf 1, Diablo, Card10). Az MWW teszt alapján nem szignifikáns változásokat szürkén jelöltük (Proc, Procr, Icam).

A vizsgálat legfontosabb új adatainak a Noth1 receptor és ligandja a Jagged1 indukcióját találtuk, így ezen adatokat fehérje szinten is megvizsgáltuk.

NICD és Jagged 1 immunhisztokémia



5. Ábra NICD immun-reaktivitás a striátum peri-infarktosus régiójában. A selegiline kezelést követően az NICD jel eloszlása (B) hasonló a nem kezelt MCAO-hoz (A) de a festés intenzitása jelentősen megemelkedett.

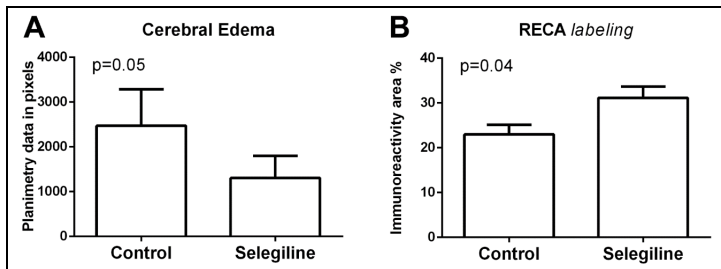


6. Ábra Jagged 1 immun-reaktivitás a peri-infarktosus striátumban. Selegiline hatására, nagyszámú, intenzíven festődő sejt jelenik meg a peri-infarktosus régióban (B). Skála = 400 um.

Az immunfestés kvantifikációja megerősítette, az NICD és Jagged 1 fehérjék emelkedett koncentrációját a selegiline-nel kezelt állatokban a kontroll MCAO állatokhoz viszonyítva.

A kettős festés megerősítette, hogy mind az NICD mind pedig a Jagged 1 elsősorban az astrocyták felszínén fejeződött ki. (Külön ábrán nem demonstráltuk.)

Microvasculáris denzitás és agyi ödéma vizsgálata az infarktusos lézió környezetében



7. Ábra Selegiline kezelés hatása a microvasculáris denzitásra és a peri-infarktusos ödéma képződésre. Az oszlopok a planimetriával mért agyi ödéma területének csökkenését mutatják a kezelt állatokban (A), míg a microvasculáris denzitást jellemző RECA immunreaktivitás emelkedett a kontrollokhoz képest. Az oszlopok az átlagot a pálcikák az átlag szórását jelölik.

Megbeszélés

A vér agy gát funkcionális integritásának javítása a microvasculáris remodeláció és a neuronális plaszticitás gátlása nélkül komoly kihívást jelent, ugyanakkor elengedhetetlen a jövő stroke terápiáinak fejlesztése során. Kísérletesen teszteltünk két gyógyszeres beavatkozást, a selegiline kezelést és zselatináz enzim subacut gátlását az agyi nagyér elzáródást követően.

A zselatináz enzim gátlása kísérletes körülmények között alkalmas volt a vérzéses transzformáció megelőzésére az agyi infarktus akut fázisában, míg a későbbi fázisban ugyanez a kezelés rontotta a neurológiai kimenetelt. A selegiline egy Parkinson kórban széles körben alkalmazott hatóanyag, amely irodalmi adatok alapján elősegítette a központi idegrendszer regenerációját agyi infarktust követően.

Kísérleteinkben a Reticulon 4 receptor expressziójának növekedését tapasztaltuk a peri-infarktosos agykéreg astrocyta sejtjeiben a subacut zselatináz enzim gátlást követően, míg a selegiline kezelés mellett a reaktív astrocytákon a Notch 1 receptor és ligandja a Jagged 1 expressziójának fokozódását dokumentáltuk, több anti-

apoptózis gén és astrocyta specifikus marker fokozott kifejeződése mellett.

Az eredményeink alapján mindkét gyógyszeres kezelés befolyással van a reaktív astrocyták működésére, a selegiline kezelés hatása ugyanakkor együtt járt az infarktus körüli ödéma csökkenésével, és egy nagyobb sűrűségű kapilláris hálózat kialakulásával, ami a fiziológiás vér-agy gát regenerációjára utalhat. A zselatináz enzim gátlása ezzel szemben ismerten blokkolja az ér-újdonképződést, így ez utóbbi kezelés hatására inkább alakul ki a regenerációt gátló gliaheg semmint hatékonyan funkcionáló vér-agy gát.

Eredményeink felhívják a figyelmet a neurovasculáris egység jelentőségére. A stroke kimenetelét ugyanis nem egyes kiemelt sejtcsoportok pl. neuronok izolált túlélése határozza meg önmagában, hanem a neuronokból, astrocytákból, simaizom és endothél sejtekből valamint pericitákból, bazális membránból és az extracelluláris mátrixból álló rendszer komplex működésének helyreállítása révén javítható csak a funkcionális kimenetel.

A disszertáció alapját képező közlemények

1. Nardai S, Dobolyi A , Skopal J , Lakatos K , Merkely B , Nagy Z,
Delayed Gelatinase Inhibition Induces Reticulon 4 Receptor Expression in the Peri-Infarct Cortex. ***JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY*** 75:(4) pp. 379-385. (2016) **IF:3,8**
2. Nardai S, Dobolyi A , Pal G , Skopal J , Pinter N , Lakatos K , Merkely B , Nagy Z
Selegiline promotes NOTCH-JAGGED signaling in astrocytes of the peri-infarct region and improves the functional integrity of the neurovascular unit in a rat model of focal ischemia. ***RESTORATIVE NEUROLOGY AND NEUROSCIENCE*** 33:(1) pp. 1-14. (2015) **IF:2,5**

Egyéb közlemények

3. Ruzsa Z , Nemes B , Pinter L , Berta B , Toth K , Teleki B , Nardai S, Jambrik Z , Szabo G , Kolvenbach R , Huttli K , Merkely B
A randomised comparison of transradial and transfemoral approach for carotid artery stenting: RADCAR (RADial access for CARotid artery stenting) study ***EUROINTERVENTION*** 10:(3) pp. 381-391. (2014) **IF: 3,8**

4. Ruzsa Z , Edes IF , Nardai S , Tóth K, Nemes B, Merkely B
Transradial and transulnar access for iliac artery interventions using sheathless guiding systems: a feasibility study.
CATHETERIZATION AND CARDIOVASCULAR INTERVENTIONS [Epub ahead of print] 2016. **IF:2,1**

- 5 Kolossváry M , Szilveszter B , Édes IF, Nardai S , Vörös V, Hartyánszky I, Merkely B, Voros S, Maurovich-Horvath P.
Comparison of Quantity of Coronary Atherosclerotic Plaques Detected by Computed Tomography Versus Angiography
AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY 2016 Apr 5. doi: 10.1016/j.amjcard.2016.03.031. [Epub ahead of print] **IF:3.3**

- 6 Edes IF , Ruzsa Z , Szabo G , Nardai S , Becker D , Benke K , Szilveszter B , Merkely B
Clinical predictors of mortality following rotational atherectomy and stent implantation in high-risk patients: A single center experience.
CATHETERIZATION AND CARDIOVASCULAR INTERVENTIONS 86:(4) pp. 634-641. (2015) **IF:2,1**

7. Ruzsa Z , Toth K , Jambrik Z , Kovacs N , Nardai S , Nemes B , Huttli K , Merkely B
Transradial access for renal artery intervention
INTERVENTIONAL MEDICINE AND APPLIED SCIENCE 6:(3) pp. 97-103. (2014)