

Udział niedoborów dysmutazy ponadtlenkowej w patogenezie stwardnienia zanikowego bocznego

Involvement of the supraoxide dysmutase in the pathogenesis of the atrophic lateral sclerosis (ALS)

TADEUSZ PIETRAS¹, PIOTR MAZERANT²

Z: 1. Kliniki Pneumonologii i Alergologii AM w Łodzi,
2. AM w Łodzi (student)

STRESZCZENIE. Stwardnienie zanikowe boczne (ALS) jest chorobą związaną z degeneracją neuronów ruchowych w rdzeniu kręgowym i w ośrodkowym układzie nerwowym. W 5-10% przypadków choroba ta dziedziczy się autosomalnie dominująco. Około 20% spośród chorych z rodzinną postacią stwardnienia zanikowego bocznego (FALS) posiada mutację punktową w genie kodującym cynkowo miedziową dysmutazę ponadtlenkową (CuZnSOD). W naszej pracy sugerujemy, że główną rolę w etiologii i progresji ALS odgrywają reaktywne postacie tlenu, zaś dysfunkcja CuZnSOD predystynuje do rozwoju tej choroby.

SUMMARY. Atrophic lateral sclerosis (ALS) is a disease resulting from degeneration of motor neurons in the CNS and spinal cord. In 5 to 20% of cases it is an autosomal dominating hereditary disease. About 20% of patients suffering from the familial atrophic lateral sclerosis (FALS) have a point mutation in the gene coding copper-zinc supraoxide dysmutase (CuZnSOD). The authors suggest that the major role both in the etiology and progression of the ALS falls to reactive forms of oxygen, while the CuZnSOD dysfunction is a factor predestinating to this disease development.

Słowa kluczowe: reaktywne postacie tlenu / dysmutaza ponadtlenkowa / SLA
Key words: reactive oxygen forms / supraoxide dysmutase / ALS

Reaktywne postacie tlenu (tlen singletowy O¹, anionorodnik ponadtlenkowy O₂⁻, nad-tlenek wodoru H₂O₂, rodnik hydroksylowy OH·) biorą udział w licznych reakcjach biochemicznych zachodzących w organizmie. Powstają one w wyniku działania enzymów z klasy oksydoreduktaz, w łańcuchu oddechowym, mikrosomach, peroksysomach, fagocytach, a także na skutek działania promieniowania jonizującego. Reaktywne postacie tlenu uszkadzają liczne substancje biologicznie czynne, stąd enzymatyczne i nieenzymatyczne zmiatacze wolnych rodników odgrywają kluczową rolę w zdolności komórek do życia. Zaburzenia w tych układach stają się przyczyną niekontrolowanego wytwarzania rodników tlenowych i uszkodzeń we-

wnątrkomórkowych. Reaktywne postacie tlenu uszkadzają białka, hamując ich aktywność enzymatyczną i permeazową. Reagują z kwasami nukleinowymi, upośledzając funkcjonowanie aparatu genetycznego oraz indukując mutacje. Oddziałując z wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi błon biologicznych inicjują autokatalityczny proces peroksydacji lipidów wywołujący uszkodzenia błon i kanałów jonowych. Błony biologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym (o.u.n.) zawierają szczególnie dużo nienasyconych kwasów tłuszczowych, warunkujących podstawową funkcję neuronów – przewodnictwo impulsów. Udowodniono udział reaktywnych postaci tlenu w o.u.n. w patogenezie: udarów, neuroinfekcji, nowotworów, zatruc

metalami ciężkimi, zmian popromiennych. Istnieją też poważne przesłanki, że reaktywne postacie tlenu odgrywają ważną rolę w rozwoju stwardnienia zanikowego bocznego (ALS), stwardnienia rozsianego (SM), oraz w powstawaniu zespołów ośrodkowych między innymi w przebiegu betaamyloidoz o.u.n., tj. choroby Parkinsona, choroby Alzheimerera oraz zespołu Downa [Evans 1993]. W cytoplazmie neuronów podstawowymi enzymatycznymi zmiataczami reaktywnych postaci tlenu są cynkowo-miedziowa dysmutaza nadadtlenkowa (CuZnSOD) i peroksydaza glutationowa (GSH-Px) z selenocysteiną w centrum aktywnym. CuZnSOD jest dimerycznym enzymem kodowanym przez 21 chromosom. Chroni ona struktury cytoplazmy przed anionorodnikiem nadadtlenkowym, powstałym w wyniku reakcji katalizowanych przez oksydazę ksantynową (E.C.1.2.3.2) i oksydoreduktazy mikrosomalne. Zaburzenia aktywności (zarówno zbyt mała jak i zbyt duża aktywność) tego enzymu w stosunku do ilości anionorodnika nadadtlenkowego są przyczyną uszkodzeń komórkowych powodowanych przez reaktywne postacie tlenu [Mokuno i wsp. 1996].

NIEDOBORY DYSMUTAZY PONADTLENKOWEJ A STWARDNIENIE ZANIKOWE BOCZNE

Na związek pomiędzy występowaniem rodzinnego stwardnienia zanikowego bocznego (FALS) a chromosomem 21 (21q22.1)

zwrócono uwagę w roku 1991 analizując drzewa genealogiczne rodzin dotkniętych chorobą [Abe i wsp. 1996]. W dwa lata później stwierdzono, że na 13 analizowanych rodowodów rodzin z FALS u 11 znaleziono mutacje w drugim i czwartym egzonie genu dla CuZnSOD. Na podstawie licznych badań udowodniono, że 20% przypadków FALS związane jest z mutacjami w genie kodującym CuZnSOD [Orrell i wsp. 1996]. Nie znaleziono u pacjentów z rodzinnie występującym stwardnieniem zanikowym bocznym mutacji w genach kodujących inne enzymy zmiatające reaktywne postacie tlenu – katalazie i manganowej dysmutazie nadadtlenkowej [Parboosing i wsp. 1995]. W jednej z prac zwrócono uwagę na niektóre przypadki ALS, w których dochodzi do zwiększonej ekspresji genu zlokalizowanego na drugim chromosomie (2q33), kodującego oksydazę aldehydową, enzym generujący O_2^- . Białko tej oksydazy wykazuje podobieństwo strukturalne i katalityczne do oksydazy ksantynowej. Opisano wiele różnych mutacji w egzonach genu kodującego CuZnSOD. Niektóre z nich przedstawiono w tabl. 1.

W pracach tych zwraca się uwagę, że mutacje te związane są z obniżeniem aktywności CuZnSOD w tkankach, jak również na mniejsze powinowactwo wyizolowanego enzymu do substratu, nadmierną wrażliwość na nadtlenek wodoru i obniżoną termostabilność enzymu [Robberecht i wsp. 1994]. Ikeda i wsp. (1995) analizował dokładnie rodzinę z mutacją w pozycji 104

Tablica 1. Niektóre mutacje w CuZnSOD opisane dla występującego rodzinnie stwardnienia zanikowego bocznego

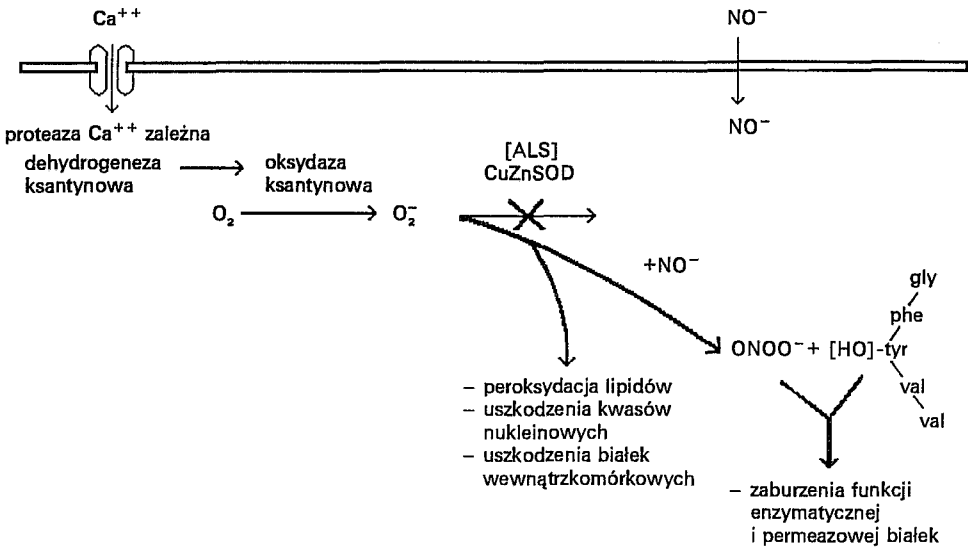
Kolejny aminokwas	Mutacja	Źródło literaturowe
38	leucyna → walina	Robberecht i wsp. 1994
46	histydyna → arginina	Abe i wsp. 1996
84	leucyna → walina	Abe i wsp. 1996
100	glicyna → kwas glutaminowy	Winterbourn i wsp. 1995
101	kwas asparaginowy → asparagina	Orrell i wsp. 1995
104	izoleucyna → fenyloalanina	Abe i wsp. 1996, Ikeda i wsp. 1995
113	izoleucyna → treonina	Orrell i wsp. 1996
148	walina → izoleucyna	Abe i wsp. 1996

z zamianą izoleucyny na fenyloalaninę wskazując na określone cechy kliniczne tej mutacji jak i na konserwatywność pozycji 104 w cząsteczce CuZnSOD u różnych gatunków grzybów, roślin i zwierząt. Wbrew oczekiwaniom, nie znaleziono dotychczas mutacji w genie CuZnSOD w przypadkach sporadycznego stwardnienia zanikowego bocznego (SALS). Aktywność CuZnSOD mierzona w erytrocytach u chorych dotkniętych SALS była taka sama jak u ludzi zdrowych lub większa. Udowodniono jednak, że u chorych ze zwiększoną aktywnością CuZnSOD przebieg choroby jest bardziej łagodny. Wskazuje to na ochronną rolę CuZnSOD w progresji ALS, jak i na udział reaktywnych postaci tlenu w jego patogenezie.

PRÓBY WYJAŚNIENIA WPŁYWU NIEDOBORÓW DYSMUTAZY PONADTLENKOWEJ NA ROZWÓJ STWARDNIENIA BOCZNEGO ZANIKOWEGO

Nie istnieje żadna w pełni udowodniona teoria wiążąca niedobór CuZnSOD z rozwojem ALS. Szczególnie interesujący jest fakt, że niedobór tak ważnego dla wszystkich komórek organizmu aerobowego enzymu, dotyka klinicznie tylko części ruchowej o.u.n. Opracowano model doświadczalny ALS tworząc myszy transgeniczne ze zwiększoną ekspresją zmutowanych ludzkich wariantów CuZnSOD [Mourelatos i wsp. 1996]. U zwierząt tych dochodzi do zwyrodnienia komórek neuronów ruchowych. W cytoplazmie obserwuje się zmiany degeneracyjne z charakterystycznym wodniczkowym uszkodzeniem mitochondriów i aparatu Golgiego. W innych pracach zwrócono uwagę na fakt, że w SALS aktywność CuZnSOD w tkankach jest na poziomie aktywności mierzonej u osobników zdrowych [Puymirat i wsp. 1994]. Natomiast w przypadkach innych jednostek chorobowych z towarzyszącymi zmianami w mięśniach (dystrofia mięśniowa, *dermatomyositis/polimyositis*) aktywność CuZnSOD jest znacz-

nie podwyższona [Mourelatos i wsp. 1996, Ihara i wsp. 1995]. Dodatkowo w badaniach prowadzonych na osobnikach FALS ze zmutowanym genem dla CuZnSOD wykazano, że ilość enzymu o nieprawidłowej aktywności jest równoważna ilości prawidłowego enzymu u osób zdrowych. Powyższe fakty wskazują, że wady dotyczącej CuZnSOD należałoby raczej poszukiwać w układzie regulującym jej poziom we wnętrzu komórki, związanym z białkami Fos i Jun oraz z miejscami na DNA jak AP1 (*activator protein*) czy CRE (*cyclic responsive elements*). Zaburzenia funkcji regulacyjnych CuZnSOD powodowałyby w przypadku zapoczątkowania niszczenia komórek w pewnym okresie życia, nieuchronną śmierć tych komórek, ze względu na brak mechanizmów ochronnych w przebiegu narażenia na podwyższone stężenia reaktywnych postaci tlenu [Ihara i wsp. 1995]. Takim czynnikiem mogłaby być np. niegroźna dla innych organizmów infekcja czynnikiem zakaźnym z powinowactwem neurotropowym do rogów przednich rdzenia kręgowego. Dalszy rozwój tego schorzenia może być związany z reakcją anionorodnika ponadtlenkowego z rodnikiem tlenu azotu NO \cdot (powszechnym przekaźnikiem nerwowym występującym m.in. w receptorach N-metylo-D-asparaginianowych) z wytworzeniem peroksynitratu, który w przypadku braku odpowiedniej ilości CuZnSOD reaguje z resztkami tyrozynowymi białek i powoduje degenerację neuronów [Ihara i wsp. 1995]. Drugą równoważną drogą wytwarzania reaktywnych postaci tlenu w komórkach jest aktywacja metabolizmu wewnątrzkomórkowego i proteaz komórkowych. W wyniku otwarcia zależnego od potencjału kanału wapniowego następuje napływ wapnia do komórki i aktywacja zależnych od wapnia proteaz (np. kalpaina). Ciężkie proteolityczne dehydrogenazy ksantynowej wywołuje zmianę aktywności enzymu na aktywność oksydazy ksantynowej wytwarzającej O $_2^-$. Przy zmniejszonej aktywności CuZnSOD, O $_2^-$ niszczy makrocząsteczki



Rysunek 1. Mechanizm uszkodzenia neuronów ruchowych w przebiegu stwardnienia zanikowego bocznego

komórki na drodze reakcji wolnorodnikowych [McNamara i Fridovich 1993].

W przypadku obecności odpowiedniej aktywności CuZnSOD anionorodnik nadtlenkowy dysmutuje do nadtlenu wodoru, który pod wpływem GSH-Px i katalazy natychmiast ulega unieczynnieniu. Większość autorów prezentujących prace dotyczące związku między niedoborem CuZnSOD, a ALS uważa jednak, że sam tylko niedobór aktywności CuZnSOD nie może być odpowiedzialny za tak wysoką selektywność uszkodzanych komórek [Ikeda i wsp. 1995, Abe i wsp. 1996]. Dlatego wydaje się słusznym, że niedobór CuZnSOD jest raczej elementem predystynującym, zaś do rozwoju ALS konieczny jest jakiś dodatkowy, jeszcze nie poznany czynnik [Mokuno i wsp. 1996].

o zwiększonej ekspresji zmutowanej ludzkiej CuZnSOD i uzyskując spowolnienie rozwoju choroby [Mourelatos i wsp. 1996]. Zwrócono również uwagę na antyoksydacyjne działanie melatoniny, której niedobór w starszym wieku może być przyczyną nadmiernego narażenia komórek na prooksydacyjne właściwości reaktywnych postaci tlenu [Pierrefiche i Laborit 1995, Reiter 1995]. Nadzieje wiąże się także z hydrofilowymi zmiataczami reaktywnych postaci tlenu, takimi jak N-acetylocysteina, która zwiększa wewnątrzkomórkowe stężenie glutationu, oraz L-deprenyl – inhibitor monoaminoooksydazy-B, który zwiększa aktywność CuZnSOD w o.u.n. u szczurów [Kitani i wsp. 1992]. Leki te wymagają jednak jeszcze wielu badań przedklinicznych i klinicznych.

MOŻLIWOŚCI TERAPII STWARDNIENIA ZANIKOWEGO BOCZNEGO

Nie istnieją żadne metody leczenia tej ciężkiej choroby. Niemniej na podstawie przesłanek patogenetycznych podjęto pewne próby terapii u zwierząt doświadczalnych, wstrzykując dootrzewnowo modyfikowaną dysmutazę nadtlenkową transgenicznym myszom

PIŚMIENNICTWO

1. Abe K., Aoki M., Ikeda M., Watanabe M., Hirai S., Itoyama Y.: Clinical characteristic of familial amyotrophic lateral sclerosis with Cu/Zn superoxide dismutase gene mutations. *J. Neurol. Sci.* 1996, 136, 108–116.
2. Andersen P.M., Nilsson P., Ala-Hurula V., Keranen M.L., Tarvainen I., Haltia T.,

- Nilsson L., Binzer M., Forsgren L., Marklund S.L.: Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn - superoxide dismutase. *Nat-Genet.* 1995, 10, 61-66.
3. Banci L., Carloni P., Orioli P.L.: Molecular dynamics studies on mutants of Cu/Zn superoxide dismutase: The functional role of charged residues in the electrostatic loop VII. *Proteins.* 1994, 18, 216-230.
 4. Coyle J.T.: Puttfarcken P., Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 1993, 262, 689-695.
 5. Durham H.D., O'Brien C., Nalbantoglu J., Figlewicz D.A.: Use of tissue culture models to study environmental-genetic interactions relevant to neurodegenerative diseases. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1995, 22, 366-367.
 6. Evans P.H.: Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br. Med. Bull.* 1993, 49, 577-587.
 7. Ihara Y., Mori A., Hayabara T., Kawai M., Namba R., Nobukuni K., Sato K., Kibata M.: Superoxide dismutase and free radicals in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: relationship to clinical data. *J. Neurol. Sci.* 1995, 134, 51-56.
 8. Ikeda M., Abe K., Aoki M., Sahara M., Watanabe M., Shoji M., St. George-Hyslop P.H., Hirai S., Itoyama Y.: Variable clinical symptoms in familial amyotrophic lateral sclerosis with a novel point mutation in the Cu/Zn superoxide dismutase gene. *Neurology* 1995, 45, 2038-2042.
 9. Kitani K., Kanai S., Sato Y., Ohta M., Ivy G.O., Carrillo M.C.: Chronic treatment of (-) Deprenyl prolongs the life span of male fischer 344 rats. Further evidence. *Life Sci.* 1992, 52, 281-288.
 10. Mokuno K., Kiyosawa K., Honda H., Hirose Y., Murayama T., Yoneyama S., Kato K.: Elevated serum levels of manganese superoxide dismutase in polymyositis and dermatomyositis. *Neurology* 1996, 46, 1445-1447.
 11. Mourelatos Z., Gonatas N.K., Stieber A., Gurney M.E., Dal-Canto M.C.: The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu/Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 5472-5477.
 12. McNamara J.O., Fridovich I.: Did radicals strike Lou Gehring? *Nature* 1993, 362, 20-21.
 13. Orrell R.W., Habgood J., Rudge P., Lane R.J., De Bellerocche J.S.: Difficulties in distinguishing sporadic from familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 1996, 39, 810-812.
 14. Orrell R.W., King A.W., Hilton D.A., Campbell M.J., Lane R.J., De Bellerocche J.S.: Familial amyotrophic lateral sclerosis with a point mutation of SOD-1: intrafamilial heterogeneity of disease duration associated with neurofibrillary tangles. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1995, 59, 266-270.
 15. Parboosing J.S., Rouleau G.A., Meninger V., McKenna-Yasek D., Brown R.H. jr, Figlewicz D.A.: Absence of mutations in the Mn superoxide dismutase or catalase genes in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul. Disord.* 1995, 5, 7-10.
 16. Pierrefiche G., Laborit H.: Oxygen free radicals, melatonin and aging. *Exp. Gerontol.* 1995, 30, 213-227.
 17. Puymirat J., Cossette L., Gosselin F., Bouchard J.-P.: Red blood cell Cu/Zn superoxide dismutase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 1994, 127, 121-123.
 18. Reiter R.J.: Oxidative processes and anti-oxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 1995, 9, 526-533.
 19. Robberecht W., Sapp P., Viaene M.K., Rosen D., McKenna-Yasek D., Haines J., Horvitz R., Theys P., Brown R. jr: Cu/Zn superoxide dismutase activity in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 1994, 62, 384-387.
 20. Uchino M., Ando Y., Tanaka Y., Nakamura T., Uyama E., Mita S., Murakami T., Ando M.: Decrease in Cu/Zn - and Mn-superoxide dismutase activities in brain and spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 1994, 127, 61-67.
 21. Winterbourn C.C., Domigan N.M., Broom J.K.: Decreased thermal stability of red blood cell glu100gly superoxide dismutase from a family with amyotrophic lateral sclerosis. *FEBS Lett.* 1995, 368, 449-451.