

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai kar

Biológia Doktori Iskola

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Kinurénsav-analógok *in vitro* elektrofiziológiai vizsgálata az ischaemiás stroke szempontjából

PhD értekezés

Huszár Lászlóné Fehér Evelin

Témavezető: Dr. Farkas Tamás

egyetemi docens

2022

Szeged

Tartalomjegyzék

I. Rövidítések jegyzéke	4
II. Bevezetés	6
1. A stroke-ról általában	6
2. A stroke neurobiológiai szempontból	10
3. Hippocampus	16
4. Vér-agy gát	19
5. Triptofán metabolizmus útvonalai.....	22
6. A kinurénsav (KYNA) és analógjai.....	24
7. Kitekintés.....	27
III. Célkitűzések	29
IV. Anyagok és módszerek	31
8. Kísérleti állatok	31
9. Túlélő agyszelet preparátum készítése	31
10. Serkentő mezőpotenciálok regisztrálása	32
11. <i>In vitro</i> hatásvizsgálat	33
12. <i>In vitro</i> oxigén-glükóz depriváció.....	33
13. Intravénás injekció	34
14. Occipitalis punctio	35
15. Vérmintavétel és perfúzió	36
16. Szuperfúziós mérések.....	36
17. Statisztikai elemzés	37
V. Eredmények	37
18. <i>In vitro</i> mérési eredmények fiziológias körülmények között.....	37
19. <i>In vitro</i> mérési eredmények OGD során.....	42
20. Szuperfúziós vizsgálat.....	45

21. Korai tömegspektrometriás eredmények	46
VI. Diskusszió	48
VII. Köszönetnyilvánítás	54
VIII. Irodalomjegyzék.....	55
IX. Összefoglaló	66
X. Summary	69

I. Rövidítések jegyzéke

3-HAA	3-hidroxi-antranilsav	IL-6	interleukin-6
3-HAO	3-hidroxi-antranilsav-hidroxiláz	KAT	kinurenin-aminotranszferáz
3-HK	3-hidroxi-L-kinurenin	KLH	klorál-hidrát
AA	antranilsav	KMO	kinurenin-monooxygenáz
ACMSD	2-amino-3-karboximukonát-6-szemialdehid-dekarbixiláz	KYNA	kinurénsav
aCSF	mesterséges agy-gerincfolyadék	L-KYN	L-kinurenin
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxalon-propionsav	MMP	mátrix-metalloproteináz
AMSH	2-aminomukonát-szemialdhid-dehidroxiláz	NADH ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid
ATP	adenozin-trifoszfát	NMDA	N-metil-D-aszpartát
CA1	Ammon-szarv 1-es régió	PG (E ₁ , E ₂ , G ₂ , H ₂)	prostaglandin (E ₁ , E ₂ , G ₂ , H ₂)
CA3	Ammon-szarv 3-as régió	PGI ₂	prosztaciklin
CNS	központi idegrendszer	PMCA	plazmamembrán-típusú Ca ²⁺ -ATP-áz
COX-2	ciklooxygenáz-2	PP	perforáns pálya
EDTA	etilén-diamin-tetra-ecetsav	QPRT	kvinolinsav-foszforibozil-transzferáz
FADH ⁺	flavin-adenin-dinukleotid	ROS	reaktív oxigéngyök
fEPSP	serkentő posztzinaptikus mezőpotenciál	SLC	szolúbilis karrier
GABA	gamma-amino-vajsav	SOD (1-3)	szuperoxid-dizmutáz (1-3)
GD	gyrus dentatus	TDO	triptofán-2,3-dioxygenáz
GLUT1	1-es típusú glükóz transzporter	TJ	tight junction
GPR35	G _i -fehérje kapcsolt receptor 35	TNF	tumor nekrosis faktor
HIF-1	hypoxia indukált faktor 1	TXA	tromboxánA ₂

IDO	indolamin-2,3-dioxigenáz	VE	vaszkuláris endotheliális
IL-1 β	interleukin-1 β	α 7-nAChR	α 7-nikotinos acetilkolin receptor
GABA	γ -amino-vajsav	MCAo	middle cerebral artery occlusion

II. Bevezetés

1. *A stroke-ról általában*

A stroke igen előkelő helyen szerepel a mortalitási és morbiditási listákon; 2017-ben még a harmadik, manapság már a második helyen találjuk a WHO (World Health Organization – Egészségügyi Világszervezet) halált okozó betegségek listáján¹. Mind az alacsonyabb mind a magasabb bevételű országokban egyaránt jelentős szerepe van. A stroke nemtől, kortól és etnikai hovatartozástól függetlenül komoly globális egészségügyi probléma. Amellett, hogy nagy terhet ró az országok egészségügyi rendszerére, a társadalomra és a gazdaságra nehezedő terhek is igen nagyok, hiszen világszerte a leggyakoribb olyan betegség, amely akár ellehetetlenítheti az önellátást². Az akut szakasz lezajlását követően a betegek mintegy 30%-ának életét maradványtünetek kísérik³, amelyek között bénulás (egyvégtagi, féloldali vagy akár teljes testre kiterjedő), nyelvi nehézségek (beszédértés, szótalálás, artikuláció), motorosfunkció-csökkenés (finommotoros elégtelenség, tremor, izomerő-csökkenés), vagy mentálhigiénés probléma (depresszió, viselkedésváltozás) is szerepelhet⁴. Az érintettek leginkább az idősebb korosztályból kerülnek ki, de sajnos nagyon sok — a betegek mintegy 25%-a 65 év alatti — a fiatal is. Rendkívül fontos felhívni az emberek figyelmét a stroke tüneteire, mert ellátásában az idő kulcsfontosságú. Minél hamarabb részesül az érintett személy az elérhető terápiák egyikében, annál nagyobb az esély, hogy pozitív kimenetelű legyen a kezelés. Az első óra — az úgynevezett „arany óra” — a legfontosabb⁵.

Magyarország 4 településén található stroke centrum: Pécs, Budapesten, Debrecenben és Szegeden. Az akut stroke vagy más néven heveny agyi katasztrófák összességének körülbelül 15-20 %-a vérzéses kórereditű⁶ (subarachnoideális vagy intracerebrális vérzés⁷), míg 80-85%-a ischaemiás eredetű⁶ (hemodinamikai mechanizmussal kialakuló stroke, kis- vagy nagyartériás trombózis, agyi embolizáció⁸). Mindehhez hozzátartozik, hogy a vérzéses agyi érkatasztrófák száma az elmúlt 2 évtizedben 47 %-kal megnőtt. A stroke ezen esetében igen magas, az első hónapban 40 %, az első évben akár 54 % is lehet a mortalitási arány.

Sajnos napjainkban még kevés intervenciós lehetőség áll rendelkezésre, ezért a hangsúly a betegek szoros felügyeletén, és a megfelelő betegségek követésén van⁸.

Két kritikus időszakot különböztetünk meg a stroke ellátásában. Az **első** a kialakulás és a centrumba való bekerülés között eltelt idő (stroke-to-door), amely nagy mértékben alapszik a betegen, a beteg mellett élő családtagokon, akár idegen járókelőkön, a mentőszállítás minőségén és a diszpécser munkáján. Kiemelkedően fontos a különböző rétegek szervezett oktatása, ilyen a mentésirányítás, az ügyeleti ellátás, a háziorvosi ellátás, valamint elengedhetetlen a lakosság széleskörű tájékoztatása⁹. A **második** kritikus időszak a beteg kórházba való érkezésétől a beavatkozás megkezdéséig tart. Ez az időtartam már leginkább az egészségügyi dolgozókon, és a kórházi protokollban leírtakon alapszik (door-to-needle)¹⁰. Bármely ponton való késlekedés a stroke kimenetelét jelentősen ronthatja⁷.

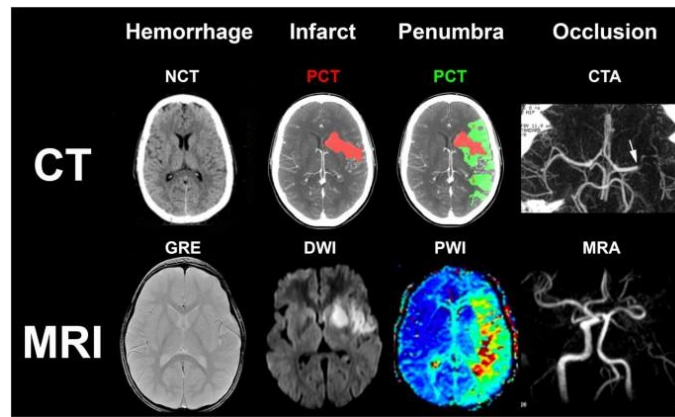
Figyelemfelkeltő jelnek, úgynevezett vörös zászlónak kell lennie, ha a társaságunkban lévő személynél a következő tünetek közül legalább kettővel szembesülünk: az egyik szájzug lebiggyed, nehézkes a szavak formálása, beszéde elmosódó, egyik karját nem tudja a másikkal szinkronban egyforma magasba emelni, vagy kidugott nyelvének hegye nem lefelé, hanem valamelyik oldalra mutat. A tünetek között szerepelhet az arc, a kéz vagy a láb zsibbadása, hirtelen fellépő:

- szédülés,
- nagyon erős tarkótáji fájdalom,
- elhomályosuló látás^{5,11}.



1. ábra. A stroke jellemző tünetei
(https://euroastra.blog.hu/2019/01/30/arc_kar_beszed_ido_ismerd_fel_a_stroke-ot)

A segélynyújtó központ értesítése során a mentésirányítás felismeri az elmondott panaszok alapján a stroke gyanúját, amelynek során mérlegelni kell az életveszély lehetőségét, és azonnal mentőgépkocsit kell indítani a beteghez. Fontos, hogy a mentés során a gépkocsit olyan osztályra irányítsák, amely trombolízisre alkalmas, és az ott dolgozó neurológus értesüljön a beteg észlelhető neurológiai tüneteiről, tudatállapotának minőségéről és a beteg azonosítóadatairól. A kórházba érve rövidített úton készül képalkotó vizsgálat, amely lehet natív komputertomográfia (CT - computer tomography), kontrasztanyagot tartalmazó komputertomográfia, mágnesesrezonancia-képalkotás (MRI - magnetic resonance imaging), felszereltebb centrum esetében pozitron emissziós CT (PET - CT - positron emission tomography CT). Az agyi erek állapotáról ad információt az angiográfiás CT vagy az angiográfiás MRI vizsgálat (CTA - computed tomography angiography vagy MRA - magnetic resonance angiography)^{7,10}.



2. ábra. Lehetséges képalkotó vizsgálatok összehasonlító ábrája stroke esetén (Shams et al., 2020)

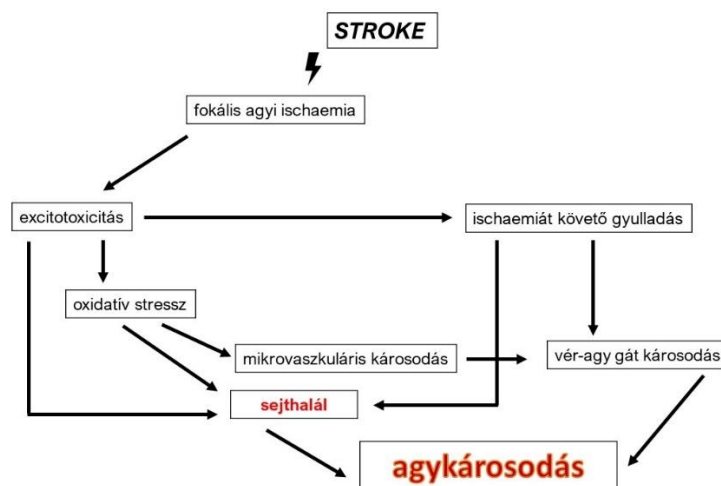
Ha a képalkotó eljárás és egyéb vizsgálatok során (labor vizsgálat) nem derül fény kontraindikációra, megkezdhető az intravénás rekombináns szöveti plazminogén aktivátor kezelés (rtPA – recombinant tissue plasminogen activator) — az ún. trombolízis —, amely napjainkban az egyetlen elérhető noninvazív kezelési eljárás ischaemiás stroke esetében. A trombolízis feltétele ezen felül, hogy időablakon belül érkezzen a páciens a betegellátó intézménybe, amely időablak a stroke kezdetétől számított 3-4,5 óra¹². Jóllehet a modern képalkotó eljárások támogatása mellett akár 6 óra, extrém esetben 12 óra elteltével (kiterjesztett időablak) is végrehajtható az eljárás; azonban a legjobb, ha az első 60 percben, az ún. „aranyórában” megtörténik a kezelés. Amennyiben a vizsgálati eredmények indokolják — a lízist követően vagy a lízist kihagyva — azonnal műtéti eljárásra kerülhet sor (thrombectomy), amely során mechanikusan próbálják megszüntetni az érelzáródást. A rekanalizációt — vagyis a véráramlás visszaállítását — követően gyakran azonnal enyhülnek a tünetek, vagy akár meg is szűnhetnek, azonban súlyos esetben stagnálhatnak, vagy rosszabbodhatnak is⁷.

A betegek általában 72 órára maradnak megfigyelésre a stroke osztályokon. A súlyosabb károsodásokkal küzdő páciensek rehabilitációs osztályokra kerülhetnek, ahol segítséget kapnak a mindennapi tevékenységekben, és a rehabilitációs eljárások során részben vagy akár teljesen visszanyerhetik az elvesztett funkciókat.

2. A stroke neurobiológiai szempontból

Az idegsejtek életben maradásához és alapvető működéséhez glükózra és oxigénre van szükség. Az emberi test teljes tömegének csak 2%-át teszi ki az agy, mégis glükózigénye a teljes glükóz fogyasztás 50%-a ($27 \mu\text{g} / \text{perc} / 100 \text{ g}$), és oxigén felhasználása a teljes oxigénfogyasztás 20%-a ($3 \text{ ml} / \text{perc} / 100 \text{ g}$)¹³. A normál idegi működés feltétele a percenként 550-600 ml-es vérellátás, amely csökkenése szinte azonnal funkcionális rendellenességet okoz, mivel a neuronok nem képeznek energia tartalékot¹⁴.

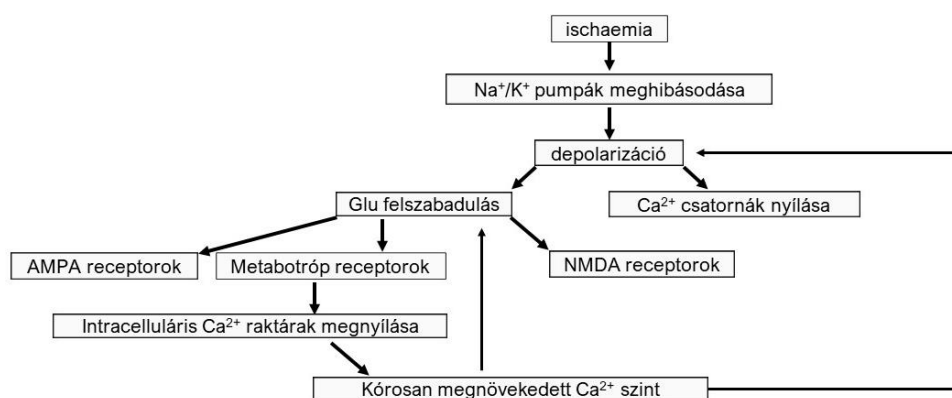
Az ischaemiás kaszkád (2. ábra) egy összetett, sejt- és molekuláris szinten zajló folyamatot takar, amely során először energiahány lép fel, aminek nyomán kialakul az excitotoxicitás (3. ábra) jelensége⁶.



3. ábra. Az ischaemiás kaszkád (saját ábra)

Aktiválódnak továbbá a mikroglia és a komplementrendszer, szöveti gyulladás lép fel, ami immunreakciót vált ki. Amennyiben sikerül a megfelelő véráramlást visszaállítani másodlagos — úgynevezett reperfúziós — károsodás jöhet létre³. A rekanalizáció reaktív oxigén gyökök (ROS - reactive oxygen species) felszabadulását eredményezi, amelyek felhalmozódása tovább károsítja a vér-agy gátat, felerősíti a

gyulladást és az immunválaszt, ami neuronális sejthalálhoz vezet. Összességében a rekanalizáció kezdetben súlyosbíthatja az agykárosodást³.



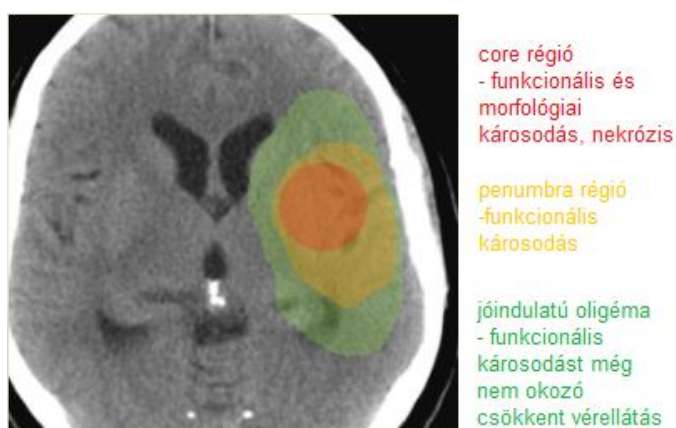
4. ábra. Az excitotoxicitás (saját ábra)

A mitokondriumok belső membránján végbemenő terminális oxidáció és oxidatív foszforiláció során energia – adenosin-trifoszfát (ATP – adenosine-triphosphate) – termelődik, amely a glikolízisből, és a Szent-Györgyi–Krebs-ciklusból redukált állapotban kikerülő elektronkarrierek (NADH – nikotinamid-adenin-dinukleotid és FADH – flavin-adenin-dinukleotid) oxidálódásának, valamint a légzési oxigén vízzé alakításának köszönhető¹⁵. Oxigénhiány esetén az ATP termelődés nem megy végbe, így sérül az ATP-függő ionpumpák működése, amelynek következtében az intracelluláris kalcium-ion (Ca^{2+}) szint kórosan megemelkedik. A nyugalmi membránpotenciál fenntartásáért a $3\text{Na}^+-2\text{K}^+$ pumpa felelős, amely koncentrációgradiens ellenében juttatja a Na^+ -ionokat az extracelluláris térbe a sejt belsejéből, valamint a K^+ -ionokat az intracelluláris térbe a sejt külső környezetéből. Azonban az egyensúly felborulása esetén a membrán depolarizálódik, megnyílnak a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák, ami Ca^{2+} -ion beáramlást eredményez az intracelluláris térbe¹⁶.

Az idegsejt megfelelő működéséhez 10–100 nM-os intracelluláris Ca^{2+} -szintet kell fenntartani. Ebben közreműködik a neuronok sejtmembránjában található plazmamembrán-típusú Ca^{2+} -ATP-áz (PMCA – plasma membrane Ca^{2+} ATPase) is, amely feladata fenntartani koncentrációgradiens ellenében a Ca^{2+} egyensúlyt. A pumpák funkcionális sérülésének következtében az intracelluláris Ca^{2+} mennyisége

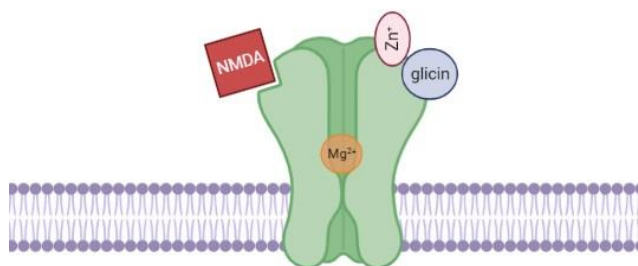
elérheti az 50–100 μM -os koncentrációt is¹⁷. Ez a rendkívül magas Ca^{2+} -szint túlzott glutamát felszabadulást eredményez, amely glutamát szubsztátja az N-metil-D-aszpartát (NMDA) és az α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxalon-propionsav (AMPA) receptoroknak, amelyek megnyílásuk után szintén Ca^{2+} -ion számára válnak átjárhatóvá. Végül a depolarizáció hatására az endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} raktárai is megnyílnak, így ún. Ca^{2+} 'overload' alakul ki¹⁸.

A központi idegrendszer (CNS - central nervous system) legfontosabb serkentő neurotranszmittere a glutamát, amelynek legnagyobb része fiziológiás körülmények között az idegsejtvégződések vezikulumaiban található. Erre abból következtethetünk, hogy mennyisége az agyszövetben hozzávetőleg 10 mM, azonban az extracelluláris térben ebből a mennyiségből csak $\sim 0,6 \mu\text{M}$ található meg. Kísérletek során azt találták, hogy hippocampális piramissejt- vagy más idegsejtenyészet esetén már 2-5 μM koncentrációban toxikus a fent említett neurotranszmitter¹⁹. Így beláthatjuk, hogy a glutamát kontrollálatlan felszabadulása, a szabályozatlan glutamát visszavétel, és a sejtbe beáramló nagy mennyiségű Ca^{2+} a sejtek funkcionális- majd fizikai sérüléséhez vezet, ami apoptózist indukál. Az idő előrehaladtával az apoptotizáló sejtek tömege nekrotikus szövetet eredményez²⁰. Ez a nekrotikus szövet lesz az ischaemia 'core' régiója, amelyet a penumbra vesz körül (5. ábra), ahol a sejtek még csak funkcionális sérülést szenvednek el. A véráram helyreállításával ezen sejtek nagyobb része még menthető²¹.



5. ábra. A core és a penumbra régió (<https://www.stroke-manual.com/ischemic-penumbra/> - nyomán átalakított kép)

Az NMDA receptorok (6. ábra) különleges helyet töltenek be idegrendszerünk működésében. Nevüket nagy affinitással kötődő ligandjukról, az NMDA-ról kapták, amely egy mesterségesen előállított aminosavszármazék. A receptor különlegessége nem csak abban rejlik, hogy több pozitív töltésű ion számára is átjárható (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , K^+), hanem abban is, hogy ligand- és feszültségfüggő módon működik, továbbá megnyílásához nem csak egy, hanem két ligand is szükséges; a glutamát és a glicin. A sejtmembrán megfelelő mértékű depolarizációjáig Mg^{2+} zárja el a csatornát. Ezen csatornák ideális működésének nagy szerepe van az idegi plaszticitásban, a tanulásban, a memória kialakulásában és az endogén neuroprotekcióban. Az NR1, NR2 és NR3 alegységekből felépülő heterotetramer receptor, illetve mind a három típusú alegységnek több izoformája létezik. A csatornán keresztül folyó Ca^{2+} áram nagyságát az adott receptort felépítő alegységek izoformáinak kombinációja, és a lokális membránpotenciál-változás határozza meg²².



6. ábra. Az NMDA receptor (saját készítésű ábra)

Az ischaemiás károsodás első pár percében zajlik a glutamát és Ca^{2+} -szint drasztikus megemelkedése, valamint ezzel egyidőben a reaktív oxigén gyökök mennyisége is megnő az érintett agyi területen. Utóbbiak fiziológiás körülmények között az oxigén metabolizmus termékei – amelyek jelenléte természetes a CNS-ben – közé tartoznak például az oxigén ionok, a szabadgyökök és a peroxidok szerves és szervetlen formái. Annak ellenére, hogy számos biológiai folyamatban (sejtszignalizáció, mitogenezis indukálása, immunvédekezés, sejttöregedés, apoptózis, mérgeanyagok lebontása) fontos szerepet játszanak, ezen gyökök túlzott akkumulációja károsítja a sejtek morfológiáját és funkcióját egyaránt²³. A legjelentősebb oxigén gyök a szuperoxid-ion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), amely könnyen képez hidrogén-

peroxidot, ezt a folyamatot pedig a szuperoxid-dizmutázok (SOD – superoxid dismutase) katalizálják a szervezetben. Három szuperoxid-dizmutáz különböztetünk meg, amelyek közül kettő felépítésében (SOD1 és SOD3) a réz és a cink ionok vesznek részt, míg a harmadik (SOD2) mangán-függő dizmutáz. A SOD1 és SOD2 nagyobb mennyiségben található meg az agyszövetben, mint a SOD3²⁴. Feladatuk a szabadgyök-detoxifikáció, vagyis reaktív oxigén ionból hidrogén-peroxid és oxigén molekula létrehozása. Az idegrendszer esetében fokozhatják vagy gátolhatják is a szinaptikus transzmissziót; a hippocampus esetében a ROS elősegíti a protein-kináz C-függő serkentő posztzinaptikus potenciálok növekedését, valamint a H₂O₂ (hidrogén-peroxid) képes gátolni a dopamin felszabadulást²⁵. Ischaemia esetén a ROS annyira felhalmozódik, hogy azt az antioxidáns hatás már nem képes ellensúlyozni²⁶. Tehát az ischaemia során bekövetkező szövetkárosodáshoz és sejthalálhoz vezető mechanizmusok nagy részét a toxikus mértékben felhalmozódott ROS okozza²⁷. Ezek közé a folyamatok közé tartozik a lipid peroxidáció, a fehérje denaturáció, a különböző enzimek működésének gátlása, a nukleinsav és DNS károsodás, a Ca²⁺ intracelluláris raktárakból való felszabadulása, a citoskeleton károsodása és a kemotaxis²⁶. A reaktív oxigén gyökök hatással vannak a központi idegrendszer vaszkulaturájára is, ugyanis az O²⁻, a H₂O₂, valamint az ONOO⁻ (peroxinitrit) már nagyon alacsony koncentrációban kifejtik vazodilatátor hatásukat, növelik a trombocita aggregáció lehetőségét, az endothélsejtek átjárhatóságát, az egyéb értágítókra való reaktivitás csökkenését okozzák és károsítják az endothélsejtek membránját. Ha a SOD megfelelően képes működni, akkor a szuperoxid-ion és a H₂O₂ aránya jól megtartott, így az erek is megfelelő tónusos állapotban lesznek. Azonban, ha ez az egyensúly felborul, mert a SOD nem képes elvégezni feladatát, a felhalmozódott O²⁻ miatt a vazodilatátor hatás kerül túlsúlyba²⁵.

A glutamát, a Ca²⁺ és a szabadgyökök által kiváltott károsodások az ischaemia kezdetétől számított első pár percben elindulnak, majd ezt követően pár órával a következő folyamatok is megkezdődnek: interleukin-1 β (IL-1 β) termelődés emelkedése, ciklooxygenáz-2 (COX-2) enzim működésének lehetséges gátlása, bizonyos mátrix-metalloproteinázok (MMP-k) gátlása²⁸. Az interleukin-1 β mellett az interleukin-6 (IL-6) és a tumornekrózis faktor (TNF) szintén befolyásolták a kísérletes fokális ischaemiás károsodás mértékét, valamint mennyiségük megemelkedett a

cerebrospinális folyadékban és a vérben is. A TNF-t és az IL-1 β -t a mikroglia, a makrofágok, és az infiltrálódó monocita-eredetű makrofágok termelik; míg az IL-6 a neuronokban is termelődik. Kísérletes körülmények között 40-60 szorosára nő mennyiségük a sérült területen²⁹. Az IL-1 β az ischaemiás károsodást eltolhatja negatív irányba, azonban neuroprotektív hatását is leírták, bár a teljes mechanizmus még nem teljesen tisztázott³⁰.

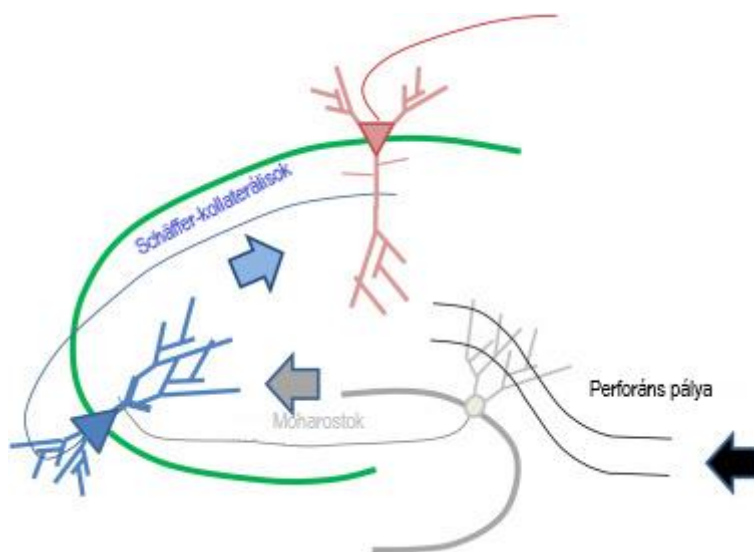
A cyclooxygenáz-2 (COX-2) a prosztaglandinok szintézisének sebességkorlátozó enzime, amelyek változatos hatással rendelkeznek. Egyrészt lehet erős vazodilatátor és vérnyomáscsökkentő hatásuk (PGE₁, PGE₂, PGI₂), de olyan vegyületek (TXA₂, PGH₂, PGG₂) is találhatóak a prosztaglandinok családjában, amelyek erős vazokonstriktor, valamint fájdalomkeltő és szövetkárosító hatással is bírnak. Képesek gyulladásos folyamatok során tágítani az arteriolákat, és más gyulladásos mediátorok hatásait elősegíteni³¹. A COX-2 ischaemiás folyamatban betöltött károsító mechanizmusa több tényezős. Egyrészt felerősíti az excitotoxicitást, valamint hozzájárul az ischaemiával együtt járó gyulladásos folyamatok erősödéséhez. A ciklooxygenáz-2 katalizálja arachidonsavból a prosztaglandinok kialakulását reaktív O²⁻ felszabadulása mellett, azonban kísérletes eredmények arra utalnak, hogy nem a reaktív oxigén ion a károsodás oka, hanem a prosztaglandinok által aktivált EP1 receptorok fokozott működése³².

A mátrix metalloproteinázok (MMP-k) az extracelluláris mátrix fehérjéinek lebontásáért felelős enzimcsalád. Humán vonatkozásban eddig 25 MMP-t azonosítottak, amelyeket szubsztrátspecifitásuk alapján a következő módon tudunk csoportosítani: kollagenázok (MMP-1, -8 és -13), zselatinázok (MP-2 és -9), stromelizinek (MMP-3, -10 és -11), matrilizinek (MP-7 és -26), metallo-elasztáz (MMP-12), enamelizin (MMP-20), endometáz (MMP-26), és epilizin (MMP-28)³³. A mátrix metalloproteinázok szerepe még nem teljesen tisztázott ischaemiás károsodás során, de nagy valószínűséggel részt vesznek a vér-agy gát integritásának felbomlásában, illetve a reperfüziós sérülés során is szerepet kap a működésük. A vér-agy gát korai károsodása az inzultust követő pár órában tapasztalható, és még visszafordítható folyamat, amely során a sejtek közötti tight junction-ök (TJ-k) felbomlanak, és ebben jelentős szerepe van az MMP-2-nek. A

késői fázis a reperfúziót követő 24-72 órában jelentkezik, ami már irreverzibilis folyamat, maradandó károsodást okoz a BBB integritásában, és az MMP-9 jelentős szerepet játszik ennek kialakulásában³⁴.

3. Hippocampus

A hippocampus formatio az archipalliumhoz, vagyis az agy ősből részéhez tartozik. Szimmetrikus képlet, amelyet a Cornu ammonisokra (kosszarv) és az őket összekötő fimbria fornixra oszthatunk. Funkcionálisan 3 fő területre bonthatjuk a hippocampust, ezek pedig a cornu ammonis 3 (CA3), a cornu ammonis 1 (CA1) és a gyrus dentatus (GD). Fő serkentő bemenetét az entorhinális kéreg — pia mater közeli — 1.-2. rétegéből kapja, ami a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek dendritjeire érkezik, ez az ún. perforáns pálya (PP). A szemcsesejtek axonjai (moharostok) a gyrus dentatust a hiluson keresztül elhagyva, az ingerületet a CA3 régió piramis sejtjeinek dendritjeire továbbítják. Ezt követően 2 irányban haladhat tovább az ingerület a CA3 régió piramissejtjeinek axonjain keresztül. Az axonok egy része elhagyja a hippocampust a fornixon át, másik részük létrehozza a Schaffer-kollaterálisokat, amelyek a CA1 régióba projiciálnak. A CA1 régió piramissejtjeinek axonjai az entorhinális kéregbe térnek vissza, de nem a felső, hanem az alsó, 5. rétegbe vetítenek. Az entorhinális kéreg →GD→CA3→CA1→entorhinális kéreg „kört” nevezzük a „három szinapszisos huroknak”³⁵.



7. ábra. A három szinapszisos hurok³⁵

A hippocampust felépítő gyrus dentatust és a cornu ammonis különböző rétegekre oszthatjuk a következők szerint.

gyrus dentatus:

stratum moleculare	dendritek rétege
stratum granulosum	szemcsesejtek rétege
hilus	axonok rétege

cornu ammonis:

stratum lacunosum moleculare	apikális dendritek rétege
stratum radiatum	apikális dendritek rétege
stratum lucidum	csak a CA3 régióban, moharostok ide érkezőnek
stratum pyramidale	piramissejtek rétege
stratum oriens	bazális dendritek rétege
stratum alveus	csak a CA1 régióban, bazális dendritek rétege

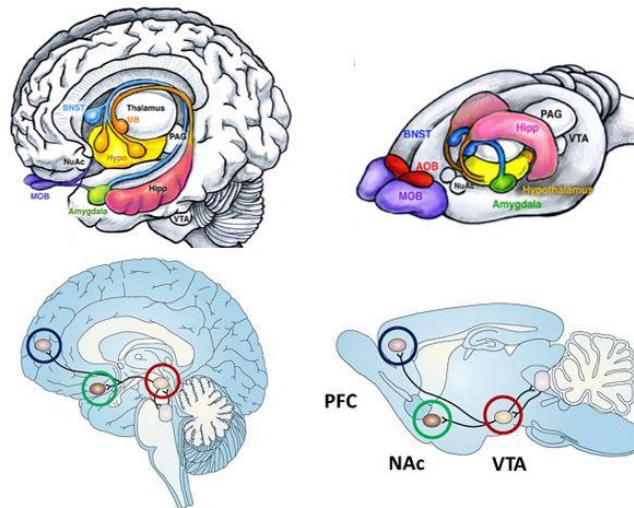
A hippocampusban 2 fő neurotranszmittert találunk, ahol a fő serkentő neurotranszmitter a glutamát, míg a fő gátló neurotranszmitter a gamma-amino-vajsav (GABA)^{36,37}.

A hippocampus számos neurotranszmitter által közvetített projekciót dolgoz fel. Ezen projekciók közé tartoznak a szerotonerg, dopaminerg, valamint noradrenalinhoz kötött projekciók. Ezenfelül a hippocampus a medialis septalis areából kolinerg, glutamaterg és GABAerg bemeneteket kap, amely neurotranszmitterek által közvetített hatásoknak szerepe van a hangulat

meghatározásában; károsodásuk megzavarja a hippocampális *theta* hullámok ritmusát, ami súlyos memória károsodáshoz vezet³⁸. A medialis septalis nucleus muszkarinos és nikotinos acetilkolin receptorokon keresztül közvetíti az ingerületet a hippocampus számára. A septo-hippocampális projíció aktivitásának nagy szerepe van az előbb említett *theta* ritmus előidézésében, valamint a hippocampális pacemaker funkció fenntartásában is. A muszkarinos M1 és M3 receptorokat a principális sejteken találjuk, míg az M2 és M4 receptorokat az interneuronokon. Az acetilkolin a piramissejtek tónusos aktivitását váltja ki³⁹. Az adenosin A₁ receptorán keresztül neuromodulátoros hatást képes kifejteni, míg A_{2A} receptoron kifejtett hatása az excitátoros neurotranszmitter-rendszer erősítésében jelenik meg⁴⁰.

In vitro vizsgálataink tárgya a hippocampus volt, ami a tanulás, a memória, a térbeli tájékozódás és az érzelmi viselkedés egyik fő központja az idegrendszerben, valamint a hypothalamus szabályozója⁴⁰. Neuroanatómiai felépítése és citoarchitektúrája miatt *in vitro* és *in vivo* elektrofiziológiai vizsgálatokra különösen alkalmas. Ez a jól elkülöníthető piramissejt-szóma, apikális- és bazális dendritek rétegeinek köszönhető; ellentétben a neocortex-szel, ahol az axonok, szómák és dendritek kevert rétegeit találjuk⁴¹.

A hippocampus a rágcsálóktól kezdve az evolúció során megőrizte alapvető struktúráját, azonban majmok esetében 10-szeres, míg humán esetben 100-szoros méretarány változással kell számolnunk. Emberben és majmokban ezen felül a CA1 réteg piramissejt-rétege vastagabb lett az idők folyamán (5 sejtsor vastagság a patkányok esetében, 30 sejtsor vastagság humán esetben). A kapcsolati struktúra nagyon hasonló a patkányok és az emberszabásúak esetében, mégis találunk megdöbbentő különbségeket. Ilyen pl. a gyrus dentatus comisuralis kapcsolata; ami rágcsálókban igen markáns megjelenést mutató struktúra, makákókban (*Macaca sp.*) és emberben szinte teljesen hiányzik; illetve az entorhinális kéreg komplexebb szerveződése jellemzi, amely részben a neocortex asszociációs területével való szorosabb kapcsolat miatt alakult ki⁴¹.



8. ábra. A humán és patkány limbikus rendszer összehasonlítása
(https://www.bioserendipity.com/neuron-and-glia-remodeling-contribute-to-male-behavior/rat_human_brain/)

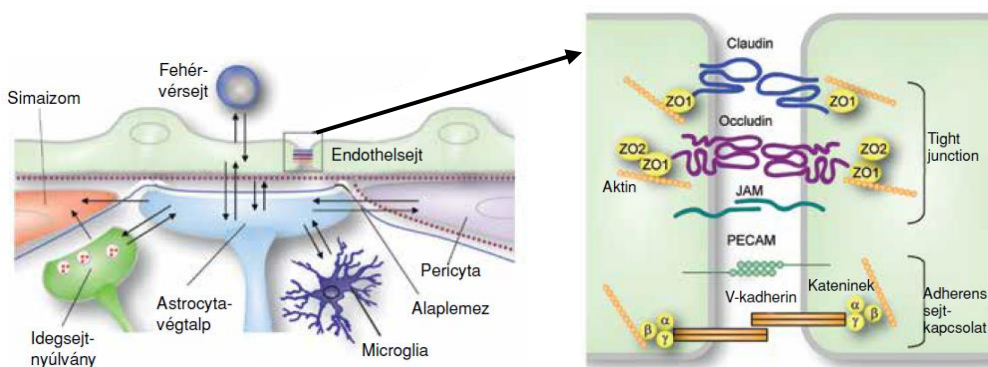
4. Vér-agy gát

A vér-agy gát felfedezése fontos mérföldköve volt az idegtudománynak. Először — 1880 körül — Paul Ehrlich figyelt fel rá, hogy a véráramba fecskendezett festék a központi idegrendszeren kívül mindent megfest. Úgy gondolta, hogy ezt a jelenséget az okozza, hogy a festék nem képes kötődni a központi idegrendszer sejtjeihez. Az 1900-as évek elején Lewandowski alkotja meg magát a fogalmat, amelyet farmakológiai kísérletekre alapoz. Goldmann az affinitás hiányának elméletét a gerincvelőbe fecskendezett festékekkel — csak a CNS festődött meg — döntötte meg⁴².

A neurovaszkuláris egység feladata a vér-agy gát (blood brain barrier - BBB) kialakítása, ezzel a központi idegrendszer működéséhez szükséges mikrokörnyezet megteremtése, és annak fenntartása. Az egységet a kapillárisok endotélsejtjei, a bazális lamina, a periciták, az asztrocita végtalpak és a neuronok nyúlványainak végződése képezik. Az egy rétegben elhelyezkedő endotélsejtekre jellemző a sejtszintű transzportért felelős karrierek polarizált expressziója, valamint az egyes sejteket összekötő szoros kapcsolatok (TJ – tight junction) jelenléte. A neurovaszkuláris egységet felépítő minden sejt részt vesz a központi idegrendszer és a periféria közötti kommunikációban, ami azt jelenti, hogy nem engedik a káros anyagok bejutását, azonban ezzel együtt a potenciálisan alkalmazható farmakonok

bejutását is gátolhatják. Előbbiek fényében a vér-agy gát nem csak kiemelkedő terápiás célpont, hanem minden, a központi idegrendszert célzó terápiának alkalmasnak kell lennie a BBB-n való átjutásra⁴³.

A vér-agy gát a szoros kapcsolatok miatt képes fizikai gátat képezni a központi idegrendszer és a periféria között. Ez a fizikai gát nem csak a hidrofil molekulák transzportját köti a transzcelluláris úthoz, hanem meghatározza az endotélsejtek apikális és bazális felszínét is. A két felszín különböző transzportexpressziós mintázattal rendelkezik a vér felé néző oldalán (luminális) és az intersticiális folyadék irányába néző oldalán (abluminális) is. A tight junctionöket kétféle fehérjecsoport alakítja ki, méghozzá a transzmembrán fehérjék (occludin, claudinok) és citoplazmatikus állvány- (scaffold) és szabályozó fehérjék (zonula occludens). Előbbiek összekapcsolják a sejteket, utóbbiak pedig a transzmembrán fehérjéket kapcsolják az aktincitoszkeletonhoz, és számos fehérje-fehérje jelátviteli út beindításáért felelősek. A szoros kapcsolatok kialakításához elengedhetetlenek az adherens kapcsolatok, amelyek közé tartozik például a vascularis endothelialis (VE) kadherin, egy Ca^{2+} által szabályozott fehérje, amely szerepet játszik a sejtek közötti adhéziós kapcsolatok kialakításában⁴³.



9. ábra. Vér-agy gát: Új eredmények és klinikai vonatkozások ⁴³

A vér-agy gáton az alábbi transzportfolyamatok zajlanak:

- iontranszport
- karrier mediált transzport
- ABC transzporterek és effluxtranszport
- peptid- és fehérje transzport

- transendotheliális transzport

Számos ion (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , H^+) aktív transzporttal jut át a vér-agy gáton, amelyek működéséhez nagy mennyiségű ATP-re van szükség, ezért az endotélsejtek igen gazdag mitokondrium készlettel rendelkeznek. Ezek közül az ioncsatornák közül az egyik legfontosabb, a már említett Na^+/K^+ ATP-áz, amelyet az endotélsejtek abluminális felszínén találunk. Számos tápanyag közvetítését a szolúbilis karrier szupercsalád (soluble carrier, SLC) biztosítja, amelyek közül az egyik leglényegesebb a GLUT1 transzporter, amelynek feladata a glükóz bejuttatása a központi idegrendszerbe⁴⁴. Kifejeződése az abluminális membránon erőteljesebb, mint a lumenális oldalon. Mivel a hypoxia által indukált faktor 1 (HIF-1 - hypoxia induced factor-1) szabályozása alatt áll, hypoxia esetén, valamint a plazma glükóz koncentrációjának csökkenése esetén kifejeződése magasabb⁴³. Glükóz hiánya esetén a monokarbonsav-transzporterek laktátot és ketontesteket juttatnak be a központi idegrendszerbe. Az ABC-transzporterek fontossága abban rejlik, hogy a központi idegrendszerből és az epitélsejt lumenéből efflux transzporttal kijuttatják a periféria irányába a lipidoldékony molekulákat, ezzel eltávolítva a káros anyagokat, a xenobiotikumokat (méreganyagokat), de gyakran a farmakonokat is a CNS-ből. A peptid- és fehérjetranszport során neuroaktív peptidek szállítása történik. Receptormediált transzcitózissal jutnak át a nagy fehérjék, mint például a transferrin és a leptin. A makromolekulák vér-agy gáton való átjuttatására szolgál a caveolákon keresztül megvalósuló transzport, amely során a plazmamembránból kialakuló lipidutajokon — ún. lipidraftokból — kialakuló vezikulákon keresztül valósul meg a peptidek egyik oldalról másikkra való átjuttatása. Transendotheliális transzporttal a véráramban keringő monociták képesek a kapilláris endotélsejteken áthaladni, amely teljesen ép vér-agy gát esetében is teljesen normális, hiszen az immunfelügyelet szempontjából fontos a központi idegrendszerben való képviselőjük. Ez az ún. diapedesis folyamata⁴⁴.

A neurovaszkuláris egységnek dinamikus része a vér-agy gát, amely reagálni képes a megváltozott tápanyagigényekre. A TJ-k szabályozása számos jelátviteli útvonalat foglal magába, így pl. a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció esetén aktiválódik a proteinkináz-C, amely foszforilálja az occludint, így tönkretéve a

szoros kapcsolatokat. Ebből az egyetlen példából is látható, hogy a BBB károsodása számos neurodegeneratív megbetegedés patofiziológiai komponense lehet, ezen betegségek közé tartozik a stroke is. A vér-agy gát károsodások esetén nem csak a szoros kapcsolatok felbomlására, hanem a karrierek mechanizmusának sérülésére, de akár az alapmembrán enzimatis felbomlására is gondolnunk kell, amelyet a már említett MMP-9 okoz⁴³.

5. *Triptofán metabolizmus útvonalai*

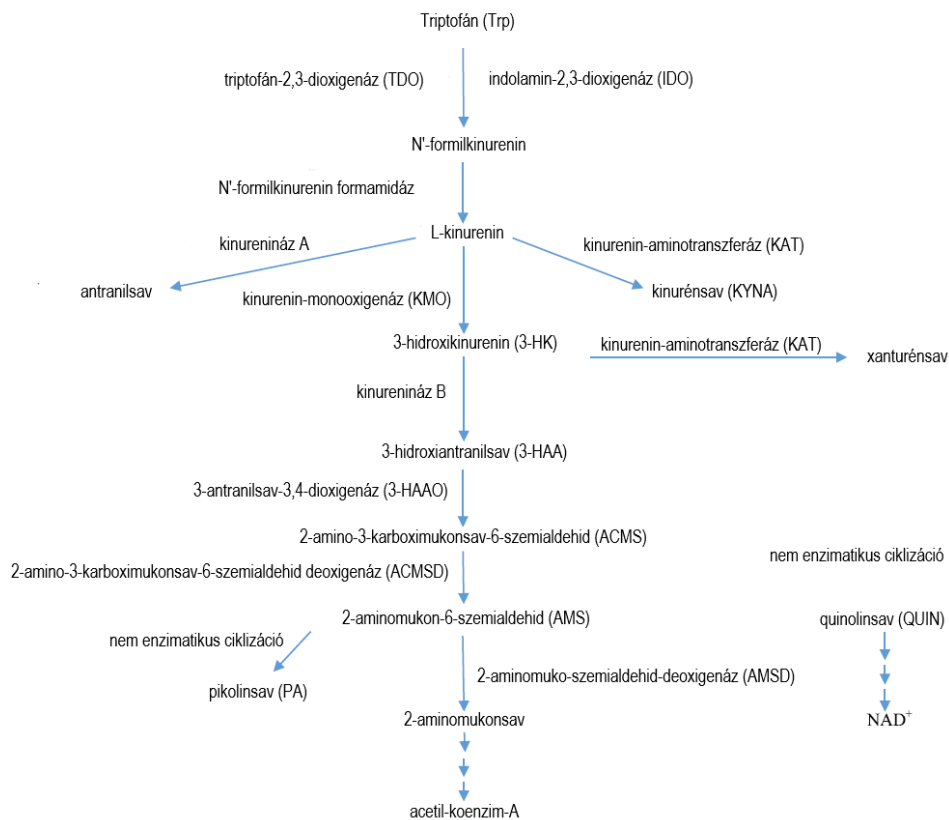
A triptofán az emberi szervezet számára nélkülözhetetlen esszenciális aminosav. A napi szükségletet — 3,6-6 mg/ttkg — fedezhetjük pl. marhahúsból, csirkemellből, vagy különböző sajtokból is. Jelenleg 4 metabolizációs útvonalat ismerünk, ahol az első három, ún. minor útvonal, mivel a triptofán ~5%-a alakul át ezen útvonalak egyikén. Tehát a 3 minor útvonal termékei:

- szerotonin és melatonin
- triptamin
- indolpiruvát-sav⁴⁵

A triptofán további 95 %-a a kinurenin útvonalon metabolizálódik, ami a triptofán metabolizmus fő útvonala⁴⁵. Az útvonal az első lépéseként a triptofán – 2,3 – dioxigenáz (TDO – a májban) vagy az indolamin – 2,3 – dioxigenáz (IDO – egyéb szövetekben) hasítja a triptofán indolgyűrűjét, és *N*-formil-L-kinurenin keletkezik. Az átalakulás irreverzibilis és a következő lépésben L-kinureninné (L-KYN) való átalakulása történik az *N*-formil-L-kinureninnek, katalizáló enzime a kinurein formamidáz. Ezzel a lépéssel az útvonal központi molekulájának szintéziséhez értünk, innen három útvonalon folytatódhat a metabolizáció: 1. kinurenin-monooxygenáz (KMO) katalizálása mellett 3-hidroxi-L-kinurenin (3-HK) keletkezik; 2. kinurenináz enzim hatására antranilsav (AA) jön létre; 3. kinurénsav (KYNA) keletkezik kinurenin-aminotranszferáz (KAT) segítségével⁴⁶.

1. A kinurenin-monooxygenáz enzim hatására 3-hidroxi-L-kinurenin keletkezik, majd ebből az intermedierből alakul ki xanturénsav a kinurenin-aminotranszferázok segítségével⁴⁶.

2. A kinurenin 3-HK-vá alakul kinurenin-monooxygenáz hatására, majd tovább alakul 3-hidroxi-antranilsavvá (3-HAA) a kinurenináz katalizálása mellett, amely a 2. elágazás antranilsavjából is létrejöhet méghozzá antranilsav-3-monooxygenáz hatására. Majd a 3-HAA-ból 3-hidroxi-antranilsav-3,4-dioxygenáz (3HAO) hatására 2-amino-3-karboximukonát-szemialdehid keletkezik. Utóbbi intermedierből spontán keletkezik kvinolinsav (QUIN), amelyből kvinolinsav-foszforibozil-transzferáz (QPRT) hatására NAD⁺ keletkezik, ami számos biológiai folyamat elektronkarrier molekulájaként funkcionál. Továbbá a 2-amino-3-karboximukonát-szemialdehidből képződhet 2-aminomukonát-szemialdehid, mégpedig a 2-amino-3-karboximukonát-6-szemialdehid-dekarbixiláz (ACMSD) enzim termékeként, amely egyik továbbalakulási útja, hogy spontán pikolinsavvá alakulhat; másik úton pedig a 2-aminomukonát-szemialdehid-dehidroxiláz (AMSDH) enzim hatására 2-aminomukonáttá alakul. Utóbbi intermedier glutarkoenzim A, majd acetoacetyl átalakuláson megy keresztül⁴⁵.
3. A kinurenin-aminotranszferázok (kynurenin-aminotransferase - KAT) segítségével — kísérleteink egyik központi molekulája — a 4-hidroxikvinolin-2-karbonsav keletkezik (kinurénsav) (kynurenic-acid – KYNA)⁴⁵.

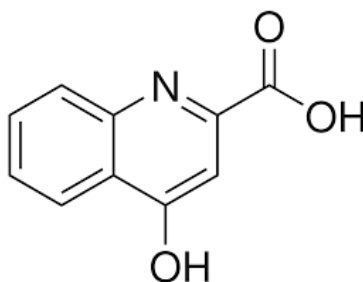


10. ábra. A triptofán metabolizmus kinurenin útvonala (Abdulla A-B Badawy nyomán módosított ábra)

Klinikai adatokon alapuló analízis során kiderült, hogy a kinurenin útvonal intermediér-koncentrációinak megváltozása előre jelezheti a beteg korai neurológiai javulását a trombolízist követően⁴⁷.

6. A kinurénssav (KYNA) és analógjai

A kinurénssav poláros molekuláját Justus von Liebig fedezte fel először kutyák vizeletében, amely felfedezését 1853-ban közölte egy tudományos cikkben⁴⁸. Keletkezésének körülményei, mint a triptofán metabolizmus kinurenin útvonalának intermediérje, Ellinger fedezte fel 1904-ben⁴⁹.



11. ábra. A kinurénsav szerkezeti képlete

Az elmúlt évtizedben kutatócsoportunk intenzíven vizsgálta a KYNA analógjait, mivel a kinurénsav az eddig ismert egyetlen endogén NMDA receptor antagonist, amelynek bizonyított neuroprotektív hatása. Idegrendszeri rendellenesség esetén azonban nehéz lenne farmakonként alkalmazni, mivel a vér-agy gáton való átjutása igen korlátozott⁵⁰. Ezen megállapítást követően két irányban indult el a kutatómunka:

- az egyik ezek közül, amikor valamilyen burokkal látják el a molekulákat, és ezzel próbálják átjuttatni őket a nagyon szigorúan szabályozott vér-agy gát transzportrendszereken⁵¹;
- a másik pedig, amikor megpróbálják a molekulát olyan szubsztituensekkel ellátni, amelyek segítségével sikerül kijátszani a védelmet⁵².

Kísérleteink során arra törekedtünk, hogy a megvizsgált analógok között találjunk a kinurénsavhoz hasonlóan neuroprotektív jellegű molekulát. Különös tekintettel voltunk az ischaemiás körülmények során a hippocampális piramissejtek aktivitására kifejtett hatásokra, mivel jelenlegi kutatásaink fő profilja az agyszöveti ischaemia.

A kinurénsavnak több pozitív hatása van a szervezeten belül. Vizsgálták antiinflammatorikus, szabadgyökök káros hatásaitól védő és neuroprotektív hatásait is^{53–55}. Amikor az ischaemiás stroke-ra gondolunk, akkor a fentiek közül mind a három tulajdonságra szükség van, hiszen az ischaemia molekuláris- és sejtszinten is változásokat eredményez az agyszövetben, amely a károsodás krónikussá válása során fokozatosan halad előre.

A kinurénsav több különböző receptor működésének befolyásolására képes a CNS-ben, amelyek között ionotróp és metabotróp receptorokat is találunk⁴⁶. Az ionotróp receptorok közé tartoznak glutamáterg nem-NMDA receptorok (az AMPA receptor és a kainát receptorok), az NMDA receptorok, az $\alpha 7$ -nikotinos acetilkolin receptor ($\alpha 7$ -nAChR), valamint a GPR35 receptor, amely a metabotróp receptorok közé tartozik⁴⁶. Az NMDA receptorokat a glicin/D-szerin kötőhelyen kompetitív és nem kompetitív módon gátolja (IC_{50} 8~10 μM)^{56–60}, míg a glutamát/NMDA kötőhelyen kompetitív antagonistája a receptornak (IC_{50} 200 μM)^{57,58,61–63}. Az AMPA/kainát receptorokat kompetitíven gátolja (IC_{50} ~250 μM)^{57,58,63,64} a glutamát. Az $\alpha 7$ -nikotinos acetilkolin receptorok modulálásával kapcsolatban még nincs egyetértés a szakirodalomban sem, amely munkákat Stone 2020-as munkájában foglalta össze⁶⁵. Végül a GPR35 receptornak agonistája a KYNA (IC_{50} 10–100 μM), amely receptor saját kinurénsav kötőhellyel rendelkezik^{66,67}.

A receptorok működésének modulálásán túl a KYNA endogén koncentrációja befolyásolhatja a különböző neurotranszmitterek extracelluláris koncentrációját, ilyen neurotranszmitter többek között a glutamát, az acetilkolin, a dopamin és a γ -amino-vajsav (GABA). Szakirodalomban leírt adatok alapján a kinurénsav endogén koncentrációjának már enyhe emelkedése is csökkenti a glutamát és a dopamin⁶⁸ extracelluláris jelenlétét. A glutamát koncentrációjára gyakorolt hatását először patkány striatumban írták le⁶⁹, majd vizsgálták a prefrontális kéregben⁷⁰, végül Pocivavsek és mtsai. megállapították, hogy a kifejtett 30–40%-os gátló hatás az agy egész területén megfigyelhető⁷¹. Ezen hatások ellentétét is megfigyelték, miszerint a KYNA endogén szintjének csökkenése az említett neurotranszmitterek extracelluláris koncentrációjának emelkedését vonja maga után^{71,72}. Továbbá a GABA extracelluláris koncentrációjára gyakorolt hatást is leírtak a kinurénsavval kapcsolatban a striatumban és a prefrontális kéregben⁷³. A KYNA acetilkolin felszabadulásra gyakorolt hatását is számos kutatás vizsgálta – Stone foglalta össze 2020-ban megjelent munkájában⁶⁵ –, azonban az eredmények ellentmondásosak.

Korábban leírásra került a KYNA Janus-arcú viselkedése is, amely alapján kijelenthetjük, hogy mikromólos és nanomólos koncentrációban ellentétesen képes befolyásolni a hippocampus CA1 régiójából elvezetett fEPSP-eket. A legnagyobb

facilitáló hatást 250 nM-os koncentrációban adagolt KYNA esetén írták le, míg 32 μ M-os koncentrációban már szignifikáns gátlás detektálható⁷⁴; továbbá 200 μ M-os koncentrációban a fEPSP-k amplitúdójának 45%-os gátlására képes. A KYNA adagolásának elhagyásával az amplitúdók nagysága a kiindulási mértékre tér vissza⁷⁵. Összességében a kinurénsav és a kinurenin útvonal egyéb metabolit-koncentrációinak aránya, a szabadgyökök felszabadításán és ártalmatlanításán, valamint a különböző receptorokra gyakorolt moduláló hatásokon keresztül van hatással az idegsejtek életképességére⁷⁶.

Mióta a kinurénsavról bebizonyosodott az idegrendszerre gyakorolt számos pozitív hatása, azóta próbálnak szintetizálni hasonló hatású analógokat. Ez így van a Szegedi Tudományegyetemen is, ahol a Gyógyszerkémiai Intézet munkatársai már több, mint egy évtizede különböző szubsztituensekkel és gyűrűmódosításokkal ellátott kinurénsav-analógokat szintetizálnak⁷⁷. Ezen analógokat több szempontból, így az *in vitro* vér-agy gáton való átjutásukat is vizsgálják⁷⁸. A kinurénsav-analógjaira való kitekintésként szeretném megemlíteni az SZR72 jelű analógot, amelynek az évek során szintén számtalan pozitív hatását írták le⁷⁹⁻⁸¹, azonban ischaemiában szintén nehezen lenne alkalmazható, mert a vér-agy gáton való áthaladási képessége szintén gyenge⁵⁰.

7. Kitekintés

Ebben az alfejezetben szeretném további neurodegeneratív betegségek tükrében bemutatni a kinurénsav, és más kinurenin metabolitok egyensúlyának fontosságát, és rávilágítani arra, hogy mennyire fontos szerepet töltenek be ezen intermedierek a neurodegeneratív megbetegedésekben. Több ilyen CNS-t érintő megbetegedés okozója vagy következménye is lehet a normálistól eltérően lezajló kinurenin útvonal.

Huntington kór esetén azt találták egy 80 páciens (20 kontroll, 20 korai stádiumú beteg, 40 előre haladott állapotú beteg) bemutató klinikai studyban, hogy a 3-HK/KYNA arány megnő a már előrehaladott betegségben szenvedők szervezetében összehasonlítva a betegség korai fázisával⁸². Valamint Schwarz és

munkatársai a Huntington kórhoz nagyon hasonló állatmodellt voltak képesek létrehozni intrastitiális QUIN kezeléssel⁸³.

Parkinson kór esetén a triptofán metabolizmus kinurenin útvonala eltolódik a neurotoxikus intermedierek irányába. *Post mortem* vizsgálatokban bebizonyosodott, hogy a frontális lebenyben, a substantia nigrában és a putamenben csökkent a kinurénsav és az L-kinurenin szintje, de a triptofán/L-kinurenin és az L-kinurenin/KYNA arányok nem változtak meg. Egy nagyobb létszámú klinikai vizsgálat keretein belül kimutatták, hogy a plazma KYNA/L-kinurenin arány csökkent, a QUIN koncentrációja megemelkedett, valamint a QUIN/KYNA arány is növekedett. Ehhez hasonlóan a liquorban is alacsonyabb KYNA és magasabb QUIN szintet detektáltak, valamint megemelkedett a QUIN/pikolinsav arány⁸³.

Alzheimer betegség esetén nem annyira egyértelműek az eredmények, mint a Parkinson- vagy a Huntington-kór esetén. Míg az Alzheimer-kór egyik transzgenikus egérmodellje esetén azt találták, hogy az agyszöveti kinurénsav szint lecsökkent, humán minták esetén ez már nem volt ilyen magától értetődő⁸⁴. Egy klinikai kutatásban, amelybe 11 előrehaladott Alzheimer-kórban szenvedő beteget vontak be, és azt találták, hogy a kérgi régiókban a KYNA szint nem változott, a putamenben és a nucleus caudatusban azonban megemelkedett. Azonban 5 másik agyi régióban a KYNA szint csökkenését találták. Liquor esetében szintén nem konzekvensek az eredmények. Detektáltak magas KYNA szintet, valamint megemelkedett KYNA/triptofán arányt, más kísérletekben csökkent KYNA szintet találtak a cerebrospinális folyadék tekintetében⁸³.

III. Célkitűzések

A témakör, amely doktori dolgozatomat megalapozza, az a központi idegrendszer kinurenin útvonalának évtizedes múltra visszatekintő vizsgálata a Szegedi Tudományegyetemen. Ma már bizonyított az útvonal több intermedierének neuroprotektív hatása⁸⁵, többek között a kinurénsavé is⁸⁶. Az idegrendszerhez kapcsolódó medicinában való felhasználását a vér-agy gáton való penetrációjának nehezítettsége gátolja⁴⁶, ami magának a molekulaszervezetnek köszönhető⁵⁰. Ennek alapján az alábbi célkitűzéseket vizsgáltam:

Első célkitűzés:

Újonnan szintetizált kinurénsav-analógok *in vitro* elektrofiziológiai vizsgálata fiziológiás körülmények között. Kísérleteink első fázisában azt vizsgáltuk, hogy az adott kinurénsav-analóg milyen hatást gyakorol a kiváltott mezőpotenciálokra hippocampális túlélő agyszeletben. Ez a hatás lehetett gátló vagy facilitáló, a legfontosabb szempont az volt, hogy a kiváltott mezőpotenciálokra gyakorolt hatásuk stabil és megismételhető legyen. Vizsgált analógok: **SZR73, SZR104, SZR198, SZR105, SZR106, SZR100, SZR759**.

Második célkitűzés: ischaemiás körülmények

Azon kinurénsav-analógok vizsgálata, amelyek stabil és megismételhető hatást mutattak fiziológiás körülmények között.

Az ischaemiás körülményeket az oxigén-glükóz deprivációs modell alkalmazásával teremtettük meg *in vitro* vizsgálataink során. Ezen metodika lényege, hogy vizsgálat közben a glükózt szacharózra cseréljük az agyszelet körül áramló perfúziós folyadékban, illetve a környezetet nem oxigénes, hanem nitrogénes karbogén gázzal gazdagítjuk⁸⁷. A második fázisban azon molekulák vizsgálatát folytattuk, amelyek a fent említett hatással rendelkeztek. Az alkalmazott *in vitro* ischaemiás modellben, oxigén glükóz depriváció során arra kerestük a választ, hogy ezen analógok képesek-e a kinurénsavval egyenértékű vagy nagyobb mértékű toleranciát biztosítani OGD-vel szemben a neuronok számára. Így az analógok által biztosított OGD-tolerancia szempontjából a két legígéretesebb analóg az **SZR73** és

az **SZR104** volt, ami azért is igen érdekes, mert a kinurénsavval ellentétben nem gátló, hanem facilitáló hatást fejtettek ki a kiváltott mezőpotenciálok amplitúdóira⁷⁵.

Harmadik célkitűzés: szövetmegoszlás

A második fázis OGD-tolerancia alapján kiválasztott legígéretesebb molekuláit *in vivo* szövetmegoszlási vizsgálatnak vetjük alá. Az irodalom alapján ezen molekulák *in vitro* körülmények között legalább olyan vagy jobb vér-agy gáton való áthaladási képességgel rendelkeznek, mint a kinurénsav⁷⁸. Azonban *in vivo* szövetmegoszlásukat, ezen belül vér-agy gáton való áthaladási képességüket mi vizsgáljuk először. Így harmadik célkitűzésünk, hogy a vér-agy gáton történő penetrációt intakt szervezetben is képesek legyünk detektálni.

Negyedik célkitűzés: neurotranszmitter felszabadulás

Szintén a második fázis OGD-tolerancia alapján kiválasztott legígéretesebb molekuláit neurotranszmitter felszabadulás szempontjából is vizsgáljuk. A kinurénsav endogén koncentrációjának változása több neurotranszmitter extracelluláris térbeli koncentrációját befolyásolja. Így az *in vitro* ischaemiás körülmények között ígéretes hatást mutató analógok neurotranszmitter felszabadulásra tett hatása is fontos információ lehet. Ennek érdekében *ex vivo* szuperfúziós kísérletnek vetjük alá az analógokat, ahol szintén hippocampális túlélő agyszeleten vizsgáljuk a különböző neurotranszmitterek kiváltott aktivitás során tapasztalható felszabadulásának mértékét.

Fenti vizsgálatok eredményeire alapozva, **hosszabb távú célkitűzésünk**, egy olyan *in vivo* ischaemiás modell beállítása, amelynek során vizsgálhatjuk a korábban tesztelt kinurénsav-analógok akut ischaemiás stroke-ra gyakorolt hatását. Terveink között szerepel a középagyi artéria okklúziója során előidézett akut ischaemiás károsodás kiterjedésére tett hatásuk vizsgálata. Az ischaemiás károsodás mértékét festési eljárással számszerűsíténénk. A vizsgálatot tervezzük összekötni kognitív és motoros funkciókat vizsgáló magatartásvizsgálatokkal, valamint vér- és szövetminta elemzéssel.

IV. Anyagok és módszerek

8. *Kísérleti állatok*

In vitro kísérleteink során 190-220 gramm testtömegű, míg *in vivo* kísérleteink során 240-260 gramm testtömegű hím Wistar patkányokat használtunk fel. Az állatokat felhasználásig állatházban, szabványos műanyag ketrecben tartottuk. Az állatházban 12/12 óra világosságot/sötétséget biztosítottunk, szabad hozzáférést az ivóvízhez és az élelemhez, és standard 23 °C hőmérsékletet. Törekedtünk a minél kevesebb állat felhasználására, illetve arra, hogy a lehető legkevesebb fájdalmat okozzuk az állatok számára. Minden esetben követtük a laboratóriumi állatok felhasználására vonatkozó irányelveket (NIH Publikáció No. 85- 23), a Magyar Egészségügyi Bizottság által jóváhagyott állatgondozással kapcsolatos protokollt (1998), és az Európai Közösségek Tanácsának 1986. november 21-i rendeletét (86/609/EEC).

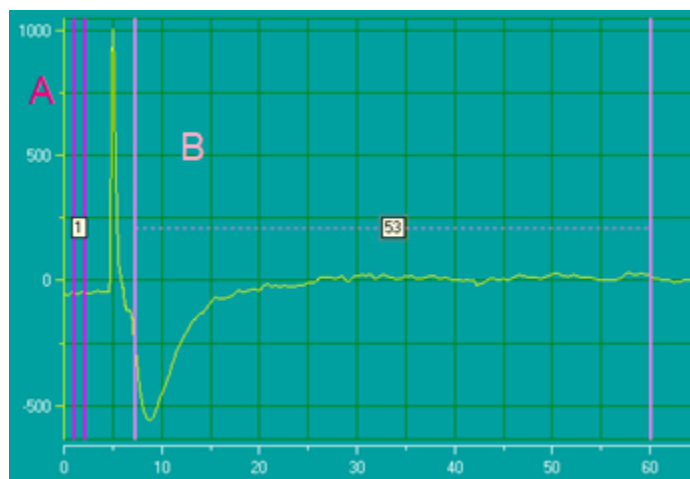
9. *Túlélő agyszelet preparátum készítése*

Az állatokat isofluránnal bódítottuk, majd dekapitáltuk. A koponyán hosszanti irányban felvagtuk a bőrt és a kötőszövetet, majd az öreglyukon keresztül egy függőleges, majd két oldalirányú körülbelül ~45°-ban döntött bemetszést ejtettünk. Ezek után a sutura sagittalis mentén egy hosszanti vágással, majd a sutura coronalis mentén az orbiták felől jobb és bal oldalon is keresztirányú bemetszéssel felnyitottuk a koponyát. Hideg — 4 °C-os — alacsony Ca^{2+} -koncentrációjú mesterséges cerebrospinális folyadékban (aCSF - artificial cerebrospinal fluid) hűtöttük közben a szövetet; a metsző aCSF összetétele: 130 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1 mM NaH_2PO_4 , 24 mM NaHCO_3 , 1 mM CaCl_2 , 3mM MgSO_4 és 10 mM D-glükóz (Sigma, Németország). Szikével a kisagy és a két nagyagy félteke hármass találkozásánál, valamint a Bregma után koronális metszést ejtettünk, így megkaptuk a hippocampust tartalmazó, mintegy 4 mm vastag szövetet. Ezután ebből a szövetből szintén 4 °C-os aCSF-ben 350 μm vastag koronális szeleteket készítettünk (Leica VT 1200S, Németország). Ezt követően, azokat a szeleteket, amelyek a hippocampus középső részét tartalmazták, szoba hőmérsékletű regisztráló aCSF-ben [130 mM NaCl,

3,5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃, 3 mM CaCl₂, 1,5 mM MgSO₄ és 10 mM D-glükóz (Sigma, Németország)] pihentettük. A szeletek minimum egy órán át pihentek a szelettartóban, majd ezt követően kezdtük meg felhasználásukat. Metszés és pihentetés alatt is oxigénnel dúsítottuk a folyadékokat, a sejtek életfunkciói megőrzése érdekében (5%/95% CO₂/O₂).

10. *Serkentő mezőpotenciálok regisztrálása*

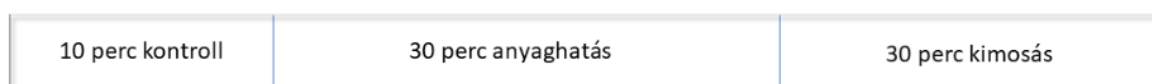
A szeleteket —pihentetést követően – interface agyszelettartó kamrába (Haas-típusú) helyeztük, és megkezdjük a mezőpotenciálok (fEPSP - field excitatory postsynaptic potencial) regisztrálását. Az fEPSP-k kiváltásához koncentrikus rozsdamentes acélelektrodát (Neuronelektrod Kft, Magyarország) használtunk, valamint regisztráló aCSF-fel feltöltött üvegelektrodákat ($R=1,5-2,5\text{ M}\Omega$) a regisztráláshoz, amelyeket laborunkban készítettünk el. A méréshez az ingerlelektrodát a hippocampus CA1-es régiójában a stratum radiatum rétegbe helyeztük, közvetlen a Schaffer-kollaterálisok közé, mivel ezek a kollaterálisok adnak serkentő bemenetet a CA1 régió piramissejtjeinek apikális dendritjein. A regisztráló elektrodákat szintén a CA1-es régióban helyeztük el, de a stratum radiatum központi részében, az ingerlő elektrodától orthodrom helyzetben. A regisztráló kamrát a mérések során regisztráló aCSF-fel perfundáltuk, 2-2,2 ml/perc sebességgel, a hőmérsékletet 34 °C-on ($\pm 0,5\text{ °C}$), míg a pH-t 7,4-en ($\pm 0,1$) tartottuk. A szeletet 20 másodpercenként ingereltük, és a fEPSP-eket 10 kHz-es mintavételezési frekvenciával rögzítettük. A keletkezett mezőpotenciálokat digitalizáltuk (AIF-03, Experimetria Kft, Budapest), a digitalizált jeleket a SPEL Advanced Intrasy v1.0.3.48 szoftver segítségével jelenítettük meg számítógépen, majd offline elemeztük az adatsorokat az Origin program segítségével (Origin2022b, OriginLab Corporation, Northampton, USA).



12. ábra. SPEL Advanced Intrasy v1.0.3.48 szoftver segítségével detektált fEPSP; **A**: kontroll érték, **B**: amplitúdó (1 divízió 2,5ms, 500µV)

11. *In vitro* hatásvizsgálat

In vitro méréseink képezik vizsgálataink alapját, amelyek során megfigyelhetjük, hogy melyik kinurénsav-analóg milyen hatással bír fiziológias körülmények között a Schaffer-kollaterálisokon keresztül kiváltott mezőpotenciálok amplitúdóira. Az anyaghatás-vizsgálatot minden esetben 10 perc kontrollszakasz felvétele előzte meg. Ezt követően a perfúziós oldatban feloldva juttatuk be a szelettartó kamrába a kinurénsavat, vagy az adott kinurénsav-analógot, amely hatása közben 30 percen keresztül rögzítettük a mezőpotenciálokat. Végül, minden esetben 30 perces kimosási szakasz következett regisztráló aCSF-fel (13. ábra).



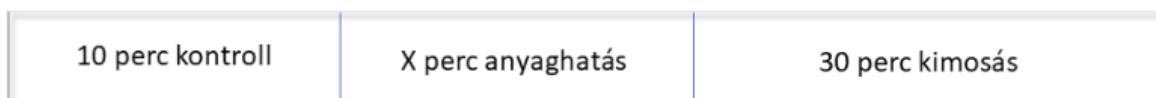
13. ábra. Az *in vitro* hatásvizsgálat időtényezői

12. *In vitro* oxigén-glükóz depriváció

A második kísérlet sorozatban azon analógokat vizsgáltuk tovább, amelyek esetén fiziológias körülmények között konzekvensen serkentő vagy gátló hatást tapasztaltunk. Az oxigén-glükóz deprivációs metodika lényege, hogy a glükóz és az oxigén megvonásán keresztül *in vitro* ischaemiát idézünk elő. A megvalósításhoz a már fent említett, és részletesen leírt regisztráló aCSF-ben a glükózt szacharózra cseréljük szintén 10 mM koncentrációban (OGD aCSF), az agyszelettartó kamrát

pedig nem oxigénes, hanem nitrogénes karbogén gázzal (N₂ / CO₂ 5 % / 95 %) buborékolatjuk⁸⁷. Kétféle kontrollt alkalmaztunk, ahol az első kontroll hatóanyagmentes volt, míg a második kontrollcsoportot a kinurénsavval kezelt csoport adta. Ahogy a fiziológiás körülmények között megvalósított mérések esetén, itt is az aCSF-ben oldottuk a KYNA-t és különböző analógjait.

Tíz perc kontrollszakasz felvétele után váltottunk az oxigénnel való buborékolatás és a nitrogénnel való kezelés között; illetve a fiziológiás állapot fenntartásához szükséges aCSF és az ún. OGD-aCSF között. Az OGD szakasz addig tartott, amíg az elektromos ingerlésre válaszul kiváltott aktivitást tudtunk regisztrálni, amiből a piramis sejtek elektromos aktivitására következtethettünk. Amint a biológiai jel megszűnt az aCSF-t is és a gázt is fiziológiásra váltottuk; 30 perces kimosási szakasz következett (14. ábra). A kísérlet során azt mértük, hogy a különböző analógok mennyi idővel képesek növelni az oxigén-glükóz deprivációval szembeni toleranciát (változás a kiváltott aktivitás eltűnésének idejében).



14. ábra. Az *in vitro* OGD hatásvizsgálat időtényezői

13. Intravénás injekció

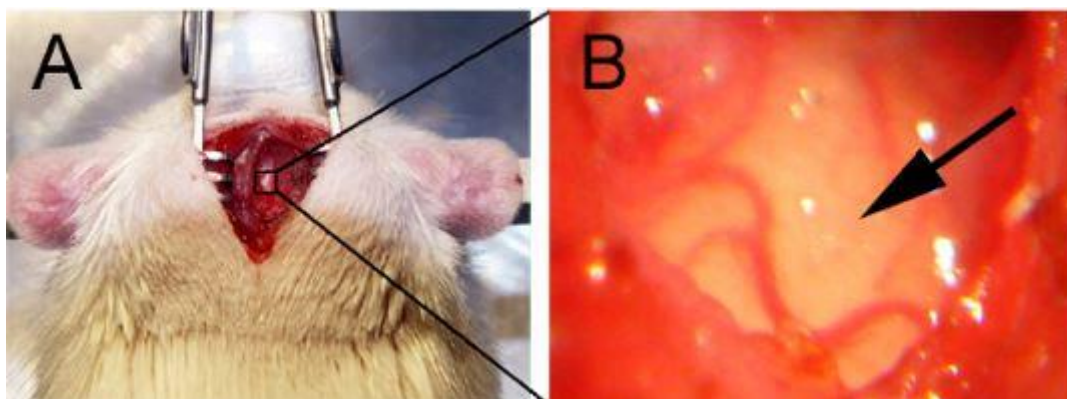
Összességében az *in vivo* szövetmegoszlási kísérlet során több okból döntöttünk az intravénás injekció mellett. Elsősorban humán esetben kórházi körülmények között is ez a leggyorsabb, műtéti eljárást nem igénylő kezelési útvonal. Másodsorban stroke esetén nagyon fontos, hogy a károsodás kezdetétől mennyi idő telik el a kezelés megkezdéséig, és leggyorsabban intravénásan lehet bejuttatni a hatóanyagot a szervezetbe. Harmadik okként a vér-agy gáton való átjutás vizsgálatához mindenképpen perifériásan kellett bejuttatnunk az anyagot.

Patkányok esetében az egyik legkönnyebben hozzáférhető véna a két laterális farokvéna, ezért ezt az útvonalat választottuk az anyag beadáshoz. A kísérlet során a feladat elvégzésére a 30G x 1/2" tűt választottuk. Első lépésként az állatot kalodába helyeztük, majd az egyik laterális véna mentén az állat farkát proximálisan

leszorítottuk, ezzel akadályoztuk a visszafolyást, és ez a szűrés pontosságát is elősegítette. Ezután a tűt a véna lefutásának megfelelően, metszlapjával felfelé körülbelül 30–45°-os szögben bevezettük a vénába, vigyázva, nehogy azt teljesen átszűrjük. Bármilyen anyag akkor adható be a vénán keresztül, ha a tű bevezetését követően vér jelenik meg a fecskendőben, így ezen jelenség megfigyelését követően adtuk csak be az anyagot.

14. *Occipitalis punctio*

Szövetmegoszlási vizsgálatainkhoz 3 féle mintát gyűjtöttünk az állatoktól. Az első minta a liquor volt, a mintát occipitalis punctio során nyertük. Az állatokat 4%-os klorál-hidráttal (KLH) altattuk, amelyet intraperitonealis (ip.) injekció formájában adtunk be. Miután az állatok mélyen aludtak, fejüket sztereotaxiás készülékbe fogtuk be. A fej pozicionálása után a szőrös bőrt felvagtuk, óvatos mozdulatokkal a kötőszövetet és az izmot eltávolítottuk, közben lidocain (lidocainum hydrochloricum) ecsetelést alkalmaztunk, majd egy 1 ml-es fecskendőre rögzített 30G x 1/2" injekciós tű metszlapját óvatosan átvezettük a cisterna magnát borító kötőszöveten. Így ~100-150 µl víztiszta liquort nyertünk. A mintát Eppendorf-csőben gyűjtöttük, és azonnal –80°-os hőmérsékletre hűtöttük.



15. ábra. **A:** a cisterna magnát borító kötőszövet preparálása, miközben az állat mélyaltatásban van. **B:** a cisterna magna feletti kötőszövet, amelyen átjuttatva az injekciós tű metszlapját kinyerhető a liquor⁸⁸.

15. Vérmintavétel és perfúzió

Kísérleteink során rögtön a liquor levételét követően, és az agyszöveti mintavétel előkészítéseként az állatokat transcardiális perfúciónak vetettük alá annak érdekében, hogy az agyból a vért maradéktalanul kimossuk. Így a vérben található, beadott kinurénsav-analóg nem módosíthatta az agyszöveti mérés során detektált analóg mennyiségét. A perfúzió első lépéseként az állatok mellkasának alsó részén, a szegycsont kardnyúlványa felett bemetszettük a bőrt, majd átvágtuk a hasfalat, és V alakban hónaljig felvágtuk a mellkast. A szívet úgy tettük hozzáférhetővé, hogy a diafragmát is átvágtuk. A vérvétel a jobb kamrából fecskendő segítségével történt (18G x 2" tűvel), körülbelül 1,5–2 ml mennyiségben, amelyet etilén-diamin-tetra-ecetsavat (EDTA) tartalmazó vérvételi csőbe helyeztünk, ezt 6–8 alkalommal megforgattuk és centrifugálásig hűtőben (4 °C) tároltuk. Az EDTA-ra antikoaguláns és enzimaktivitás gátló hatásai miatt volt szükség. A vér levételét követően a szívcsúcson vágást ejtettünk, és a perfúziós pumpával összekapcsolt kanült az aortába helyeztük, majd a jobb pitvaron is vágást ejtettünk, hogy a vér szabadon elfolyhasson. A perfúziót 4 °C-os metsző aCSF-fel hajtottuk végre, hatására az agy vérmentessé vált, így lehetőség nyílt az agyszöveti mintavételre. Az agyszövet begyűjtését azzal a módszerrel tettük meg mintha túlélő agyszelet preparálást végeztünk volna. A korábban a jobb kamrából levett vért ezután centrifugáltuk 4 °C-on, 2700 RPM-en 10 percen keresztül, majd a felülúszót (vérplazma) Eppendorf- csőben –80 °C-on tároltuk az analitikai mérésekig.

16. Szuperfúziós mérések

További törekvésünk, hogy az analógok neurotranszmitter felszabadulásra tett hatásait jobban megismerjük. Ennek érdekében superfúziós vizsgálatokat⁸⁹ végzünk kooperációban a Kórélettani Intézet munkatársaival. Ezen mérések során neurotranszmitter felszabadulást idézünk elő elektromos ingerlés segítségével agyszeletekben, *ex vivo* superfúzió rendszert felhasználva (NEU-01, Experimetria, Magyarország)⁹⁰. Izotóppal jelölt neurotranszmitter felszabadulást mérünk folyadékszintillációs módszerrel. A kísérlet során a hippocampális agyszeletek (300 µm) superfúziós kamrákba kerülnek, amelyeket KREBS oldattal (pH 7,4;

Reanal, Magyarország) perfundálunk⁹¹. Ezen perfúziós oldattal mossuk a kinurénsavat, valamint a kinurénsav-analógokat az agyszeletekre. Az elfolyó perfúziós oldatot 2 percenkénti frakciókban gyűjtjük. A harmadik frakciónál kerül rámosásra a kinurénsav vagy analógja, és a hatodik frakció levételekor történik az impulzus. Ennek hatására a neurotranszmitter felszabadulás csúcsa a hetedik vagy nyolcadik frakcióban várható.

17. Statisztikai elemzés

A fiziológias *in vitro* kísérleteink statisztikai analízishez való előkészítésként a 20 másodpercenként regisztrált fEPSP amplitúdók nagyságát percenkénti értékekké átlagoltuk, majd az adatsorokat normalizáltuk. Kontrollként az alapvonalat használtuk, és percenként összevetettük az adott perchez tartozó amplitúdó nagyságával. Ezenfelül a szórás mértékét is feltüntettük. A kinurénsav és analógjainak a kontrollhoz való hasonlítását egyirányú, ismételt mérésekkel végzett ANOVA analízissel Dunnett post hoc teszttel végeztük el. A statisztikai elemzést csak azon analógok esetében végeztük el, amelyek egyértelmű és konzekvens hatást mutattak.

Az *in vitro* OGD kísérletek adatait szintén a fent leírt módon készítettük elő statisztikai elemzésre, azonban itt két kontrollcsoportot is alkalmaztunk. A KYNA és analógjainak hatását összehasonlítottuk a kezeletlen (OGD aCSF-fel „kezelt”) mérések adataival; majd a KYNA-val kezelt csoportot kontrollnak választva hasonlítottuk a kinurénsav analógok hatását a KYNA hatásához. Ezen méréseknél csak a pozitív hatást mutató molekulák esetében végeztünk statisztikai analízist.

V. Eredmények

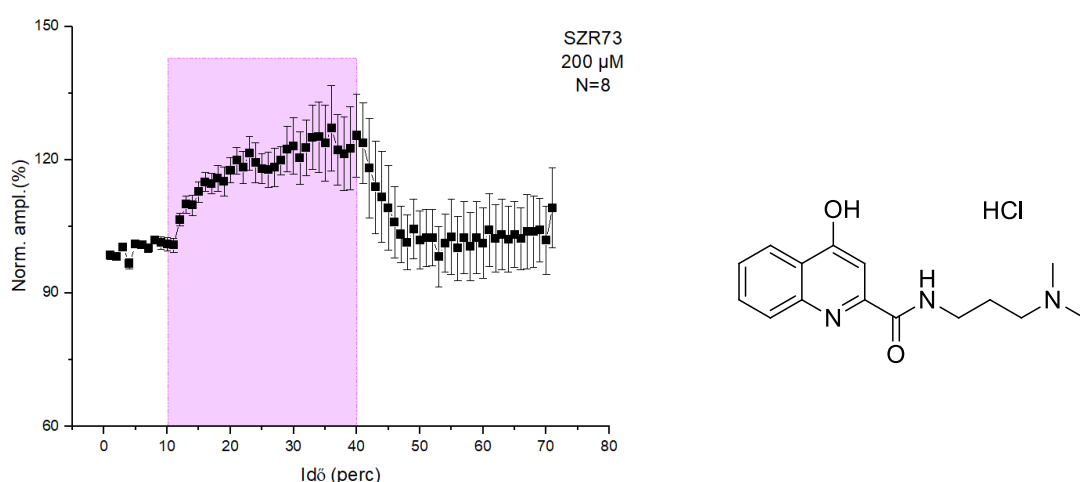
18. *In vitro* mérési eredmények fiziológias körülmények között

Számos kinurénsav-analógot vizsgáltunk az elmúlt években, amelyekről kiderült, hogy nem alkalmasak az agyszövetben való alkalmazásra:

- nem voltak oldhatóak desztillált vízben,
- aCSF-ben oldás után kicsapódtak,

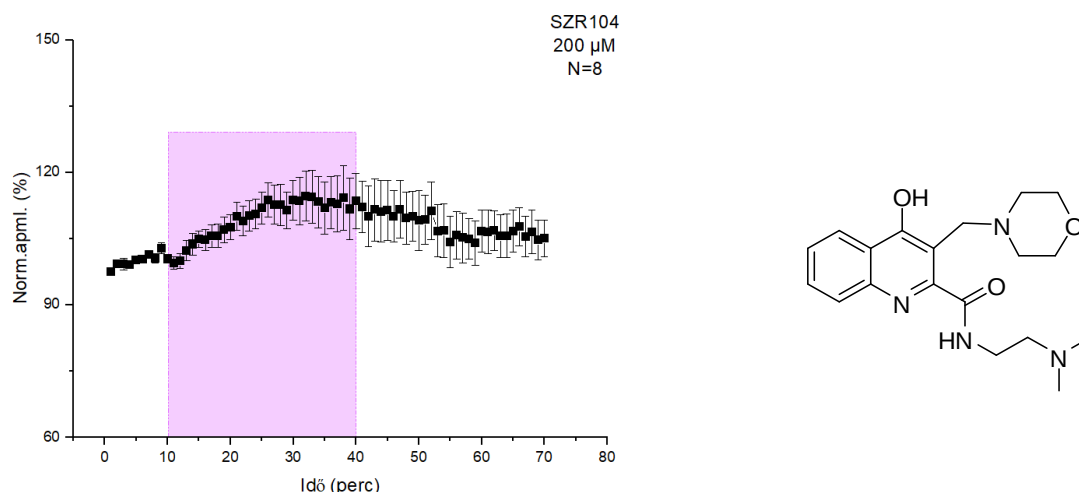
- pH-juk nem volt megtartott a fiziológias pH-n ($7,4 \pm 0,2$),
- sikeres beoldás, és megfelelő pH mellett hirtelen kiugrásokat, vagy gyors kiváltott impulzus csökkenést, majd a kiváltott impulzusok megszűnését okozták.

Az első olyan analóg, amely a vizsgálataink során konzekvens hatást gyakorolt a kiváltott mezőpotenciálokra az SZR73 jelű anyag volt. Ez a molekula az SZR72 analógcsaládba tartozik, annyi eltéréssel, hogy az amin-csoporthoz kapcsolódó szénlánc nem kettő, hanem három tagú. Fiziológias körülmények között mért eredményeink a 16. ábrán láthatóak. Megfigyelhetjük, hogy a kinurénsavval ellentétben hatása facilitáló, nem pedig gátló. Ezen jelenség háttere még nem tisztázott, azonban az szintén megfigyelhető, hogy a kezelést követően az anyag szinte maradéktalanul kimosható, a fEPSP-k amplitúdójának nagysága a kiindulási állapotot veszi fel.



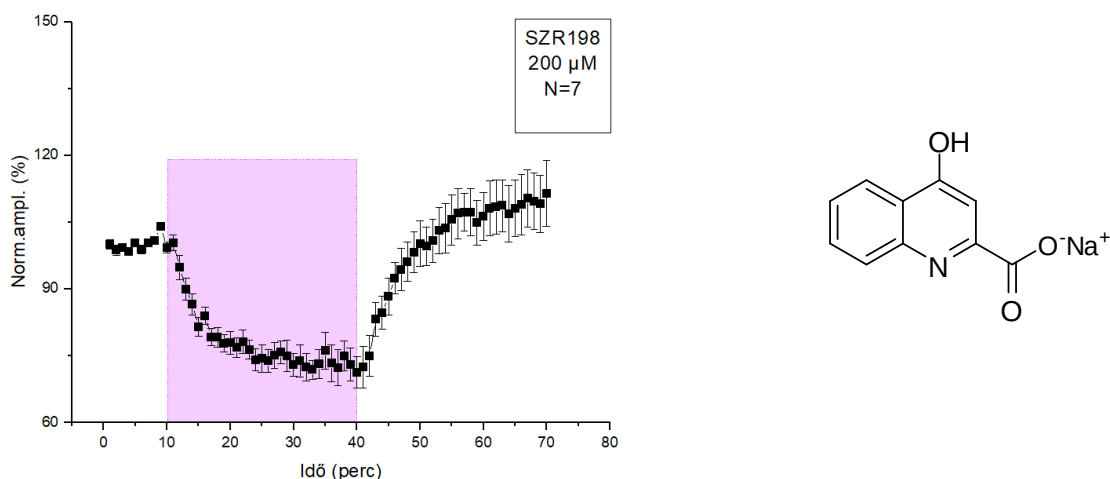
16. ábra. Az SZR73 jelű analóg fiziológias körülmények között kifejtett hatása a hippocampus CA1 régiójában található piramisjelekben kiváltott fEPSP-k-re. A színes téglalap az anyaghatás idejét jelöl, ami 30 perc volt a fiziológias kísérletek során. ($p < 0,001$)

Következő, szintén facilitáló hatást kiváltó kinurénsav-analóg az SZR104 jelű molekula, amely hatása ugyan kisebb mértékű volt az SZR73-hoz viszonyítva, azonban hatása stabilabbnak mutatkozott a mérések során. Mindemellett a 30 perces kimosási szakasz nem volt elég hosszú ahhoz, hogy az anyagot teljesen kimossuk a szövetből. A mérési eredményeket mutató 17. ábrán is látható, hogy a fEPSP-k amplitúdójának nagysága valamivel a kiindulási szint felett marad.



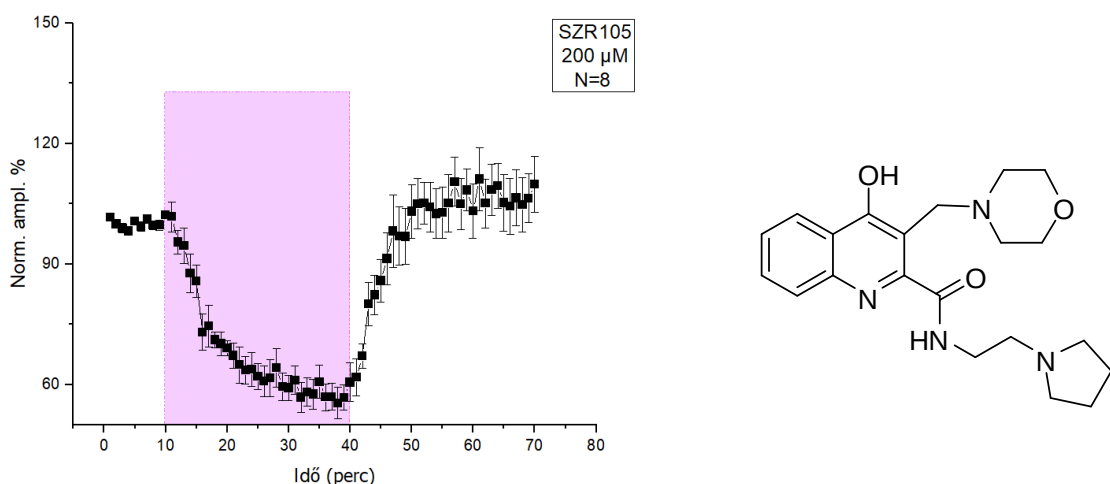
17. ábra. Az SZR104 jelű analóg fiziológias körülmények között kifejtett hatása a hippocampus CA1 régiójában található piramissejtekben kiváltott fEPSP-kre. A színes téglalap az anyaghatás idejét jelöli, ami 30 perc volt a fiziológias kísérletek során ($p < 0,01$).

A két facilitáló hatású analóg mellett több olyan molekulát is vizsgáltunk, amelyek a kinurénsavhoz hasonlóan gátló hatást mutattak. Az egyik ilyen analóg az SZR198 jelű molekula, amely konzekvensen gátló hatással bírt kísérleteink során, nagyon hasonlóan a kinurénsavhoz. Azonban aCSF-ben való oldás után vizes közegben nem tisztázott, hogy milyen állapotot vesz fel, mivel a kinurénsav oldalláncán található hidroxil-csoport hidrogénjét nátrium-ionra cserélték. Felmerült a kísérletek során, hogy vizes közegben a molekula visszaalakul kinurénsavvá, így ennek tisztázása még a jövőbeli feladataink közé tartozik.



18. ábra. Az SZR198 jelű analóg fiziológiás körülmények között kifejtett hatása a hippocampus CA1 régiójában található piramis sejtekben kiváltott fEPSP-kre. A színes téglalap az anyaghatás idejét jelöl, ami 30 perc volt a fiziológiás kísérletek során. A fent leírt bizonytalansági tényező miatt statisztika sem készült.

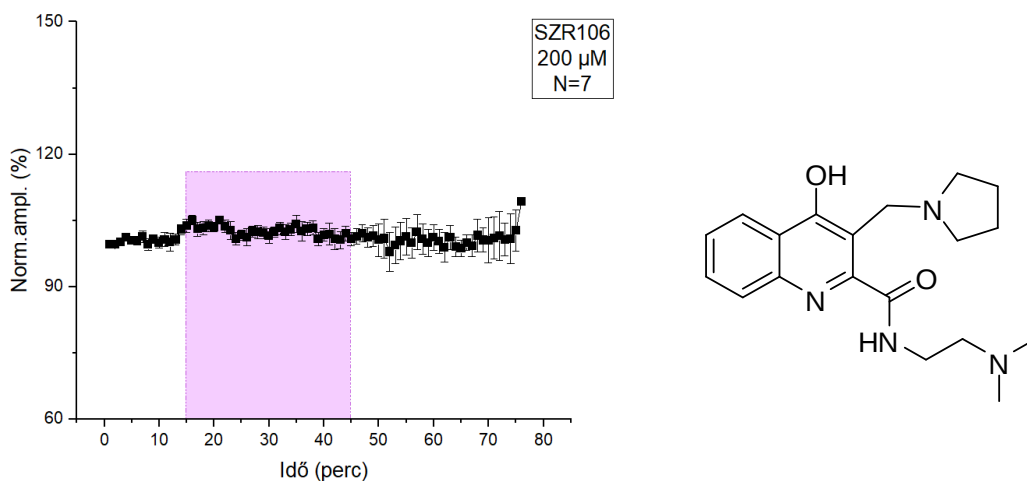
A következő gátló hatású KYNA-analóg az SZR105 jelű molekula (19. ábra), amelyet vizsgáltunk. Szintén azt találtuk, hogy a kinurénsavhoz hasonló gátló hatással rendelkezik. A többihez képest igen nagy méretű molekuláról van szó, amelyhez oldalláncként egy hattagú- és egy öttagú gyűrű is kapcsolódik.



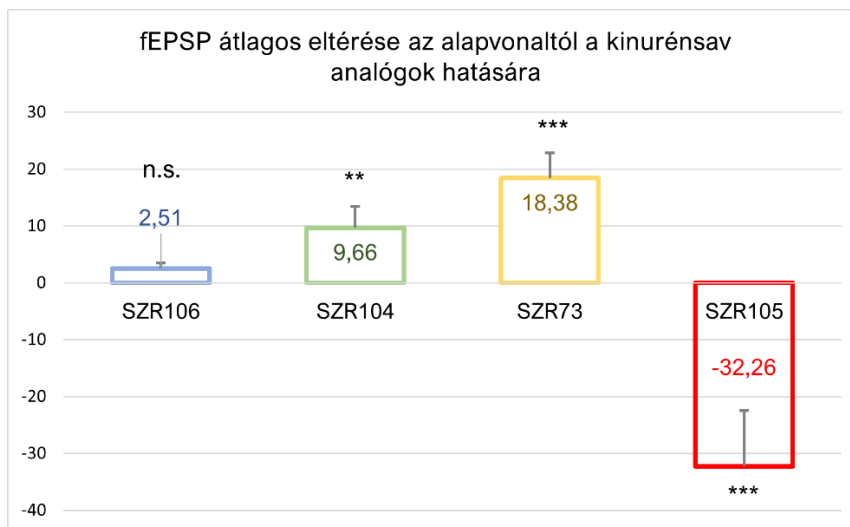
19. ábra. Az SZR105 jelű analóg fiziológiás körülmények között kifejtett hatása a hippocampus CA1 régiójában található piramis sejtekben kiváltott fEPSP-kre. A színes téglalap az anyaghatás idejét jelöl, ami 30 perc volt a fiziológiás kísérletek során ($p < 0,001$).

Érdekes, hogy az SZR105 jelű analóg-családba tartozó SZR106 jelű molekula (20. ábra), amely esetében az oldalláncként csatolt öttagú gyűrű hiányzik, már nem képes kiváltani ezt a gátló hatást, sőt inkább hatástalannak vagy facilitáló hatásúnak

imponál. Ezen vizsgálatok során a kontrollszakaszt már 15 percben határoztuk meg megjelent közleményünk bírálata során kapott észrevételek hatására.

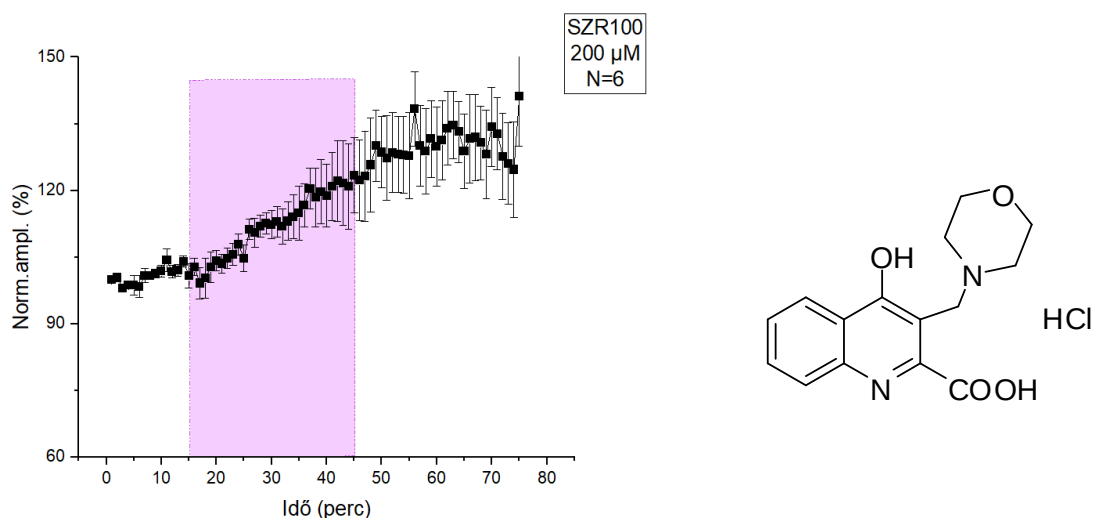


20. ábra. Az SZR106 jelű analóg fiziológias körülmények között kifejtett hatása a hippocampus CA1 régiójában található piramissejtekben kiváltott fEPSP-kre. A színes téglalap az anyaghatás idejét jelöli, ami 30 perc volt a fiziológias kísérletek során (nem szignifikáns).

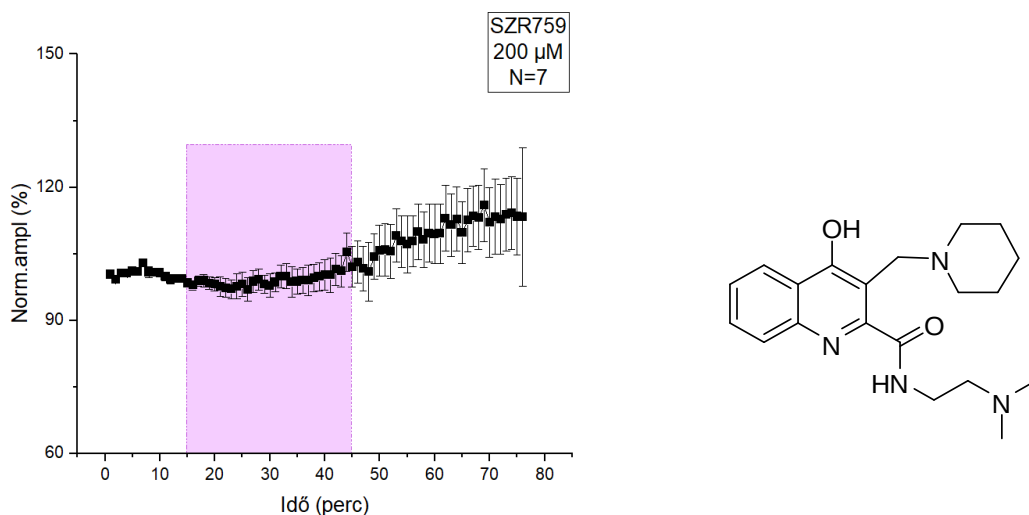


21. ábra. A fiziológias körülmények között elvégzett elektrofiziológiai mérések összefoglaló ábrája. ($p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***)

A következő két analógot ugyan több mérésnek vetettük alá, de sajnos amellet, hogy nem voltak kimoshatóak a szövetből, hatásuk sem volt kellően következetes, így nem folytattuk tovább velük a munkát. Ilyen volt az SZR100 (22. ábra) és az SZR759 jelű analóg (23. ábra).



22. ábra. Az SZR100 jelű analóg fizioiógias körülmények között kifejtett hatása a hippocampus CA1 régiójában található piramis sejtekben kiváltott fEPSP-kre. A színes téglalap az anyaghatás idejét jelöl, ami 30 perc volt a fizioiógias kísérletek során.

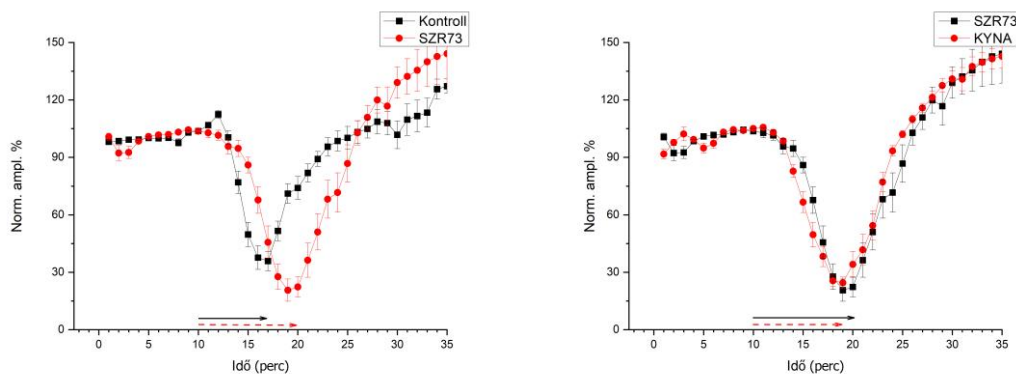


23. ábra. Az SZR759 jelű analóg fizioiógias körülmények között kifejtett hatása a hippocampus CA1 régiójában található piramis sejtekben kiváltott fEPSP-kre. A színes téglalap az anyaghatás idejét jelöl, ami 30 perc volt a fizioiógias kísérletek során.

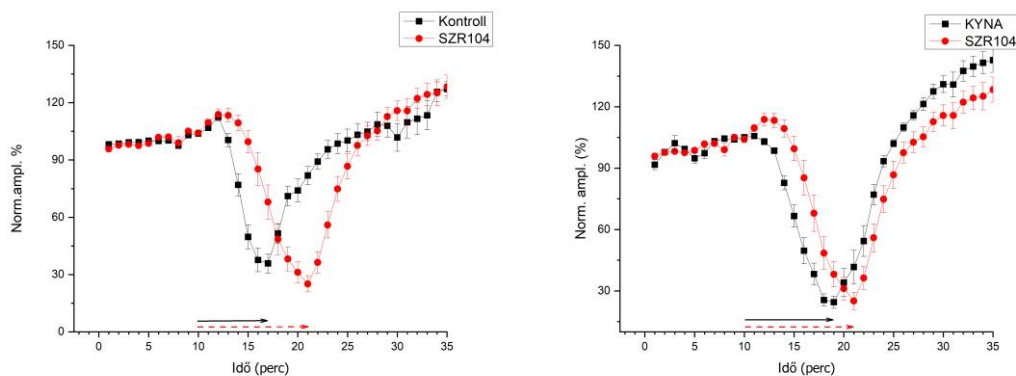
19. In vitro mérési eredmények OGD során

Kísérleteink ezen szakaszába olyan molekulák vizsgálatát vittük tovább, amelyek következetes hatással rendelkeztek. Így vizsgáltuk az SZR73, SZR104, SZR105, valamint az SZR106 jelű analógokat. Az általunk alkalmazott OGD-idő kifejezést itt szeretném definiálni: ez azt az időt jelenti, amennyi idő alatt — az OGD-aCSF és a N_2/CO_2 gáz agyszelettartó kamrába való érkezésétől számítva — a kiváltott mezőpotenciálok detektálhatósága megszűnik, vagyis megszűnik a szeletek ingerelhetősége.

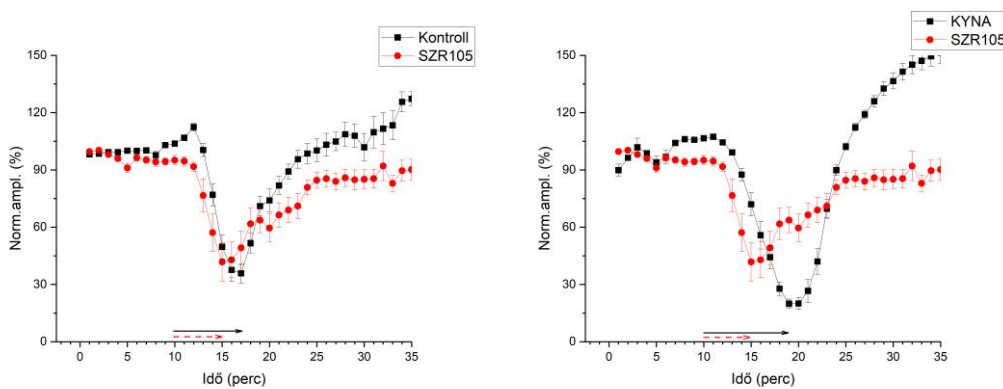
Két kontrollcsoportot alkalmaztunk, az analógok hatását összehasonlítottuk az OGD-aCSF-fel „kezelt” csoporttal, azonban ami még fontosabb, hogy a KYNA vizsgálata során mért adatokkal összehasonlítva, milyen hatást tud az adott analóg elérni.



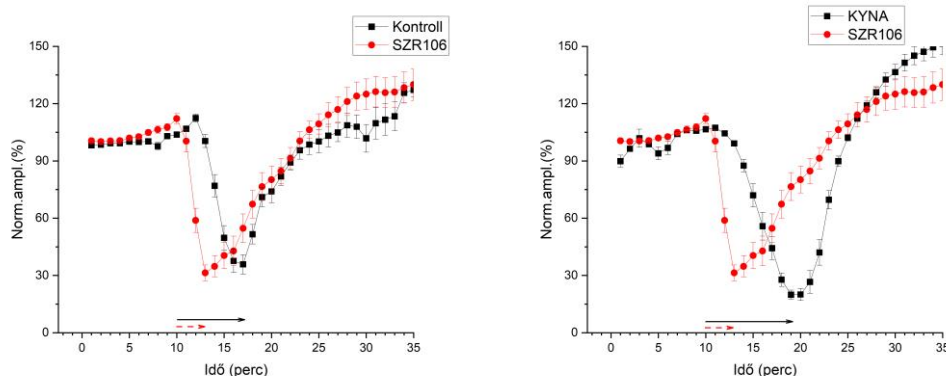
24. ábra. Az SZR73 jelű analóg OGD-ideje összevetve a kontrollcsoport ($p < 0,05$) és a KYNA-val kezelt csoport OGD-idejével.



25. ábra. Az SZR104 jelű analóg OGD-ideje összevetve a kontrollcsoport ($p < 0,001$) és a KYNA-val kezelt csoport OGD-idejével.



26. ábra. Az SZR105 jelű analóg OGD-ideje összevetve a kontrollcsoport és a KYNA-val kezelt csoport OGD-idejével.

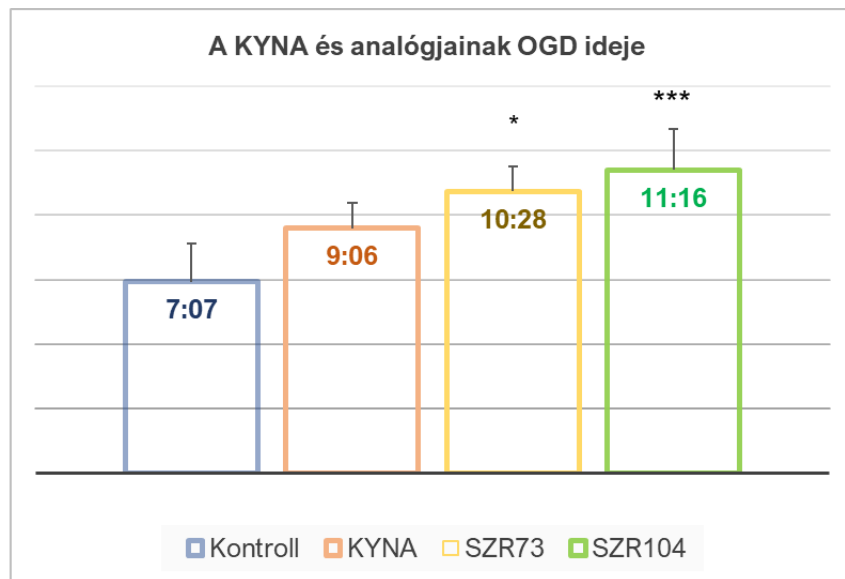


27. ábra. Az SZR106 jelű analóg OGD-ideje összevetve a kontrollcsoport és a KYNA-val kezelt csoport OGD-idejével.

OGD idő	Kontrollcsoport	Különbség	KYNA-val kezelt csoport
Kezelés nélkül	7p és 7mp	1p és 59mp	9p és 6mp
SZR73	+3p és 21mp		+1p és 22mp
SZR104	+4p és 9mp		+2p és 10mp
SZR105	-2p és 20mp		-4p és 19mp
SZR106	-3p és 9mp		-5p és 8mp

1.táblázat. Az OGD idők a különböző csoportokban. Zöld színnel kiemelve a pozitív, míg piros színnel a negatív hatású analógok OGD ideje.

Az eredmények is jól tükrözik, hogy az OGD toleranciát két — fizioiógias körülmények között facilitáló — analóg volt képes kitolni, ezek pedig az SZR73 és az SZR104. Az SZR73 a kontrollcsoportéhoz képest 3 perc 21 másodperccel volt képes megnövelni az ingerelt piramissejt-hálózat OGD toleranciáját, míg az SZR104 szintén a kontrollcsoportéhoz képest 4 perc 09 másodperccel. A kinurénsav 1 perc 59 másodperccel képes a piramissejtek OGD toleranciáját növelni a hippocampus CA1-es régiójában, ehhez képest az SZR73 1 perc 22 másodperccel, míg az SZR104 2 perc 10 másodperccel képes az OGD toleranciát növelni. Az SZR105 és az SZR106 OGD körülmények között nem mutattak pozitív hatást.

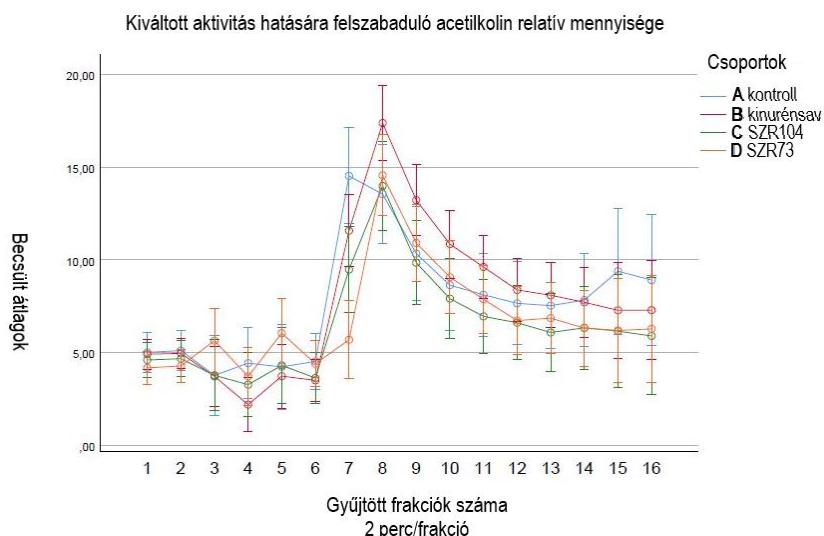


28.ábra. A kontroll csoport, a KYNA, valamint a két legsikeresebb analóg OGD ideje. ($p < 0,001$ ***, $p < 0,05$ *)

20. Szuperfúziós vizsgálat

A szakirodalomban számos adat található arról, hogy az endogén kinurénsav koncentráció-változás hatással van különböző neurotranszmitterek extracelluláris koncentrációjára. Ennek nyomán mindenképpen fontos adat lehet, hogy adott kinurénsav-analóg milyen hatással bír a kiváltott aktivitás során tapasztalható neurotranszmitter felszabadulásra. Jelenleg egy – acetilkolin – neurotranszmitter felszabadulásának vizsgálatát fejeztük be, még kettő – glutamát és GABA – neurotranszmitter felszabadulását kívánjuk vizsgálni. A kinurénsav acetilkolin-felszabadulásra tett hatásával kapcsolatos kísérletes eredmények ellentmondóak, a kinurénsav-analógok vizsgálata ebből a szempontból is fontos lehet. Saját méréseink alapján a KYNA facilitálja ezen neurotranszmitter felszabadulását, míg az SZR73 és az SZR104 nincs rá hatással (29. ábra). A kontroll csoporthoz képest a KYNA hatására szignifikánsan megnőtt az acetilkolin felszabadulás ($p < 0,05$), viszont az analógok hatása nem szignifikáns a kontroll csoporthoz képest. Azonban, ha a KYNA-val való kezelést választjuk kontrollnak, akkor az analógok hatására szignifikánsan kisebb az acetilkolin felszabadulás relatív mértéke ($p < 0,05$). Az összehasonlításhoz a neurotranszmitter felszabadulásának maximális mennyiségét

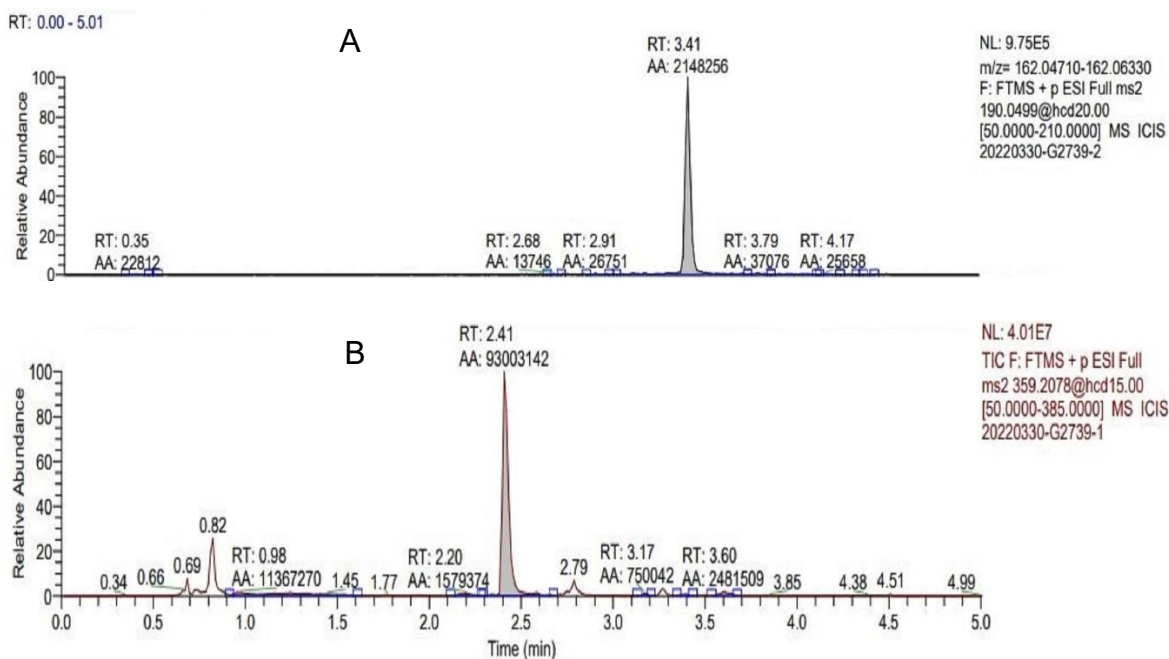
vettük alapul kezelési csoportonként. Ez a kontroll csoport esetében a 7. frakciónál, míg a kezelések alkalmával a 8. frakciónál volt.



29.ábra. Kiváltott aktivitás hatására felszabaduló acetilkolin relatív mennyisége kezeletlen (A), kinurénissavval kezelt (B), SZR104 jelű analóggal kezelt (C) és SZR73 jelű analóggal kezelt (D) túlélő agyszövetben.

21. Előzetes tömegspektrometriás eredmények

A fenti eredményeket áttekintve, és figyelembe véve azt a tényt, hogy az SZR104 jelű analógot több kutatócsoport is vizsgálta a központi idegrendszerrel összefüggésben, ezzel a molekulával végeztük el a szövetmegoszlási vizsgálatot. Azt szeretnénk bizonyítani, hogy a molekula intakt szervezetben is megfelelően átjut a vér-agy gáton. Három koncentrációt (0,15mmol/ttkg, 0,03mmol/ttkg, 0,003mmol/ttkg) és 4 hatóidőt (30 perc, 60 perc, 120 perc, 24 óra) választottunk a mintavételhez. Valamennyi mintát sikeresen begyűjtöttük az állatokból, és a liquort, a plazmát és az agyszövetet tömegspektrometriai módszerrel jelenleg is vizsgálják a Gyógyszeranalitikai Intézet munkatársai. A módszer jelentősége abban rejlik, hogy gáz halmazállapotú ionokat állítanak elő a mintából, amelyek fajlagos tömegük alapján elválaszthatóak. A módszer érzékenysége egyedülálló, tömegtartománya széles, mintaigénye kicsi. Jelenleg is folyik a minták analitikai vizsgálata, de azt már most is tudjuk, hogy a legkisebb beoltott koncentrációban 30 perccel a beadást követően jelentős mennyiségű SZR104 jelenik meg az agyszövetben, a kinurénisav mennyisége ennek a töredéke (30. ábra).



30. ábra. Agyszöveti mintából származó kromatogram, ahol az állat 15mmol/ttkg SZR104 kezelésen esett át 30 perccel a mintavételt megelőzően (RT-retenciós idő, AA-csúcs alatti terület, ms2-protonált atomtömeg). **A** KYNA, **B** SZR104

A retenciós idő azt mutatja meg, hogy a műszerbe való injektálást követően hány perccel lehet detektálni az anyag maximális megjelenését a detektorban. A csúcs alatti terület arányos a minta mennyiségével, amelyet a csúcs fölötti AA szám jelöl. Látható, hogy az **SZR104** (30/B ábra) a legkisebb dózisban adagolva is nagyságrendekkel nagyobb koncentrációban jelent meg az agyszövetben, mint a **kinurénsav** (30/A ábra). Azonban ezek a mérések még a kezdeti fázisukban tartanak, ezért végleges konklúziót csak az összes adat megléte után vonhatunk le.

VI. Diszkusszió

A szerzett rokkantság leggyakoribb és a WHO által összeállított halált okozó betegségek listáján is a második helyen szerepel a stroke¹. Leginkább az idősebb társadalmi réteget sújtja, de sajnos igen nagy, mintegy 25% a betegek között a 60 év alattiak aránya⁵. Hazánkban évente mintegy 45–50 000 akut stroke eset kerül felvételre a stroke centrumokba, amely esetek kb. 80–85 %-a ischaemiás eredetű, míg a fennmaradó mintegy 20–25 % vérzéses eredetű stroke⁶. A betegséget túlélők kb. 30 %-a valamilyen maradványtünettel küzd, amelyek között gyakori a féloldali bénulás, a depresszió és a beszédzavar is³. A betegség tünetei sokfélék lehetnek, azonban az akut kialakulás mindegyikre jellemző. Így az éppen zajló stroke tünete a hirtelen kialakuló féloldali zsibbadás vagy gyengeségérzet, a hirtelen elhomályosuló látás, ha hirtelen zavarodottá válik az egyén, a szédülés vagy az egyensúlyvesztés, és a hirtelen fellépő nagyon erős fejfájás^{5,11}. Az akut stroke krónikus károsodásának megelőzésében kulcsfontosságú, hogy a beteg minél előbb — az ún. „arany órában” — a megfelelő betegellátó intézménybe kerüljön⁷. Az egyetlen ma elérhető nem invazív beavatkozás az ún. trombolízis, amely alkalmazására fennálló időkeret 3–4,5 óra¹². Az egyre jobban elterjedő korszerű képalkotó technikákkal, mint a PET-CT, akár 12 órás kiterjesztett időablak is elérhető, de mindenképpen figyelembe kell venni, hogy a minél gyorsabb ellátás pozitívabb kimenetelt tesz lehetővé. Az érvényben lévő ajánlások alapján stroke gyanúhoz érkező mentőgépkocsit trombolízisre alkalmas klinikára kell irányítani, ahol rövidített betegúton juthat hozzá a páciens a szükséges kezeléshez⁷.

Az ischaemiás stroke kialakulásakor a lézió helyén ún. ischaemiás kaszkádfolyamat indul el, amely sejt- és molekuláris szinten zajló folyamatokat takar. Ezen kaszkádfolyamatok egyik központi eleme a glutamát indukálta excitotoxicitás, ami a kontrollálatlan glutamát felszabadulás, a szabályozatlan glutamát visszavétel és az intracellulárisan felhalmozódó Ca^{2+} miatt alakul ki⁶. A fellépő oxigénhiány hatására sérül a sejtek ATP szintézisének folyamata, aminek következtében a sejtek nem képesek fenntartani a nyugalmi membránpotenciált¹⁶. A depolarizáció hatására a preszinaptikus sejtekből glutamát szabadul fel, ami a posztzinaptikus sejtek glutamát receptorral rendelkező ioncsatornáihoz köt. Hatására nyitnak ezen

ioncsatornák, és egyéb ionok mellett Ca^{2+} áramlik a sejtek belsejébe¹⁸. A plazmamembrán típusú kalcium pumpák sem megfelelően működnek ATP hiányában, ami szintén a Ca^{2+} intracelluláris felhalmozódását segíti elő, amely folyamatok hatására az intracelluláris Ca^{2+} mértéke gyorsan meghaladja a felső — 100 nM-os — koncentrációhatárt; ún. Ca^{2+} „overload” alakul ki¹⁷. A glutamát visszavétel is sérül, amely szintén ATP igényes folyamat. Végül az excitotoxicitás öngerjesztő folyamattá alakul, amely hatására a sejtekben apoptózis indukálódik.

Szöveti szinten a haemodinamikai, a molekuláris és ionháztartásbeli folyamatok nem egységesen érintik a lézió területét. A központi részen az apoptotikus folyamatok elérik a nekrotikus küszöböt, ezért nekrotikus szövet alakul ki, ami egy irreverzibilis folyamat, az itt található sejtek funkcionális és morfológiai károsodása már nem megfordítható. Az itt található véráramlás a normál átáramlás 20 %-a alá csökken. Ez az ún. „core” régió²⁰. A normál agyszövet és a core régió között találjuk a penumbrát, amely jellemzően még rendelkezik akkora vérellátással, hogy a sejtek fenn tudják tartani metabolikus folyamataik nagy részét, így csak reverzibilis funkcionális károsodást szenvednek, amely visszafordítható folyamat. Kezelés hiányában a core régió végül átterjedhet a penumbra régióra is, vagy másodlagos károsodás alakulhat ki, pl. postischaemiás gyulladás vagy kúszó depresszió²¹.

A triptofán, amely egy esszenciális aminosav, metabolizmusa több úton zajlik a szervezetben, de legnagyobb része, mintegy 95 %-a az ún. kinurenin útvonalon metabolizálódik⁴⁵. Ezen útvonal során több neuroaktív molekula is keletkezik, amelyek között találhatóak neurotoxikus és neuroprotektív hatással rendelkezők is. Előbbiek közé tartozik például a kvinolinsav, utóbbiak közé pedig a kinurénsav⁴⁶. Összességében elmondható, hogy az útvonal metabolitjainak aránya és enzimeinek aktivitása befolyással bír az idegsejtek életképességére⁷⁶. Ezen arányok eltolódásának szerepe más neurodegeneratív megbetegedésekben is megfigyelhető, ilyen a Huntington-kór, a Parkinson-kór és az Alzheimer-kór is. Központi molekulája, amely kialakulása után három irányba ágazik el az útvonal, az L-kinurenin. Ezen metabolitból kinurenin-aminotranszferázok közreműködésével jön létre a kinurénsav, amely egy neuroprotektív tulajdonsággal bíró molekula, és az általunk vizsgált analógok kiindulási metabolitja⁸⁵.

A kinurénsav egy poláros, kvinolinvázis molekula, amelyet Justus von Liebig fedezett fel 1853-ban a kutyák vizeletében⁴⁸. A triptofán metabolizmus kinurenin útvonalával való kapcsolatát Ellinger bizonyította 1904-ben⁴⁹, tehát endogén módon jelen van a szervezetben. Stroke esetén klinikai felhasználásának gátja molekulaszervezetében rejlik, mivel igen alacsony mértékben képes átmenni a vér-agy gáton⁴⁶. A kinurénsavnak tulajdonított neuroprotektív tulajdonság a glutamát felszabadulás gátlásán, reaktív szabadgyökök semlegesítő képességén, és gyulladáscsökkentő hatásán alapszik⁷⁶. Különböző receptorok működésének modulálására képes, amelyek között megtalálhatóak az NMDA receptorok⁵⁶⁻⁶³, a nem NMDA típusú glutamát receptorok (AMPA / kainát)^{57,58,63,64}, nikotinos acetilkolin receptor⁶⁵ és a GPR35^{66,67} nevű G-fehérjéhez kapcsolt receptor. A receptorok működésének modulálásán túl a különböző neurotranszmitterek felszabadulásának mértékére is hatással van. Szakirodalmi adatok alapján a kinurénsav extracelluláris koncentrációjának enyhe növekedésének hatására is csökken a glutamát, a dopamin és a GABA koncentrációja, míg a KYNA koncentrációjának enyhe csökkenésére az említett neurotranszmitterek koncentrációja emelkedni kezd az agyban⁶⁹⁻⁷³.

A kinurénsavat számos pozitív hatása miatt kívánták klinikai alkalmazásba is vonni, de ez a központi idegrendszer esetében nehézségekbe ütközik. Ennek okán több irányban is indult törekvés annak érdekében, hogy bejutását megkönnyítsék^{51,52}. Szegeden több évtizedes múltra tekint vissza a kinurénsav analógok szintézise, amely eljárások során különböző oldalláncok kombinációival látják el a kinurénsav vázát. Ezen analógok ischaemiás stroke szempontjából való vizsgálatán alapszik a dolgozatom is.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy *in vitro* elektrofiziológiai rendszerünkben először fiziológias körülmények között vizsgáljuk meg, a számunkra a Gyógyszerkémiai intézet által biztosított, kinurénsav analógokat. Olyan analógot vagy analógokat kerestünk, amelyek konzekvens hatással rendelkeznek az általunk rögzített fEPSP amplitúdóra mérésről mérésre. Ez a hatás lehet gátló vagy facilitáló is. Azon analógokat, amelyek ilyen konzekvens hatással bírnak, célunk volt *in vitro* ischaemiás modellben is, az ún. OGD modellben vizsgálni, ahol azt figyeltük meg,

hogy melyik analóg képes legalább akkora vagy nagyobb toleranciát biztosítani az ingerelt idegsejthálózat neuronjainak az ischaemiával szemben, mint a kinurénsav. A vizsgálat során nagyobb toleranciát biztosító analógokat neurotranszmitter felszabadulásra tett hatásuk szempontjából is vizsgálni kívánjuk. Kollaborációban, a Kórélettani Intézet munkatársai segítségével célunk szuperfúziós rendszerben vizsgálni az analógok neurotranszmitter felszabadulásra gyakorolt hatását. Végül, célul tűztük ki, hogy a legnagyobb ischaemiával szembeni toleranciát biztosító kinurénsav-analógot *in vivo* is megvizsgáljuk a vér-agy gáton való áthaladási képességének szempontjából. A vizsgálat során gyűjtött mintákat a Gyógyszeranalitikai Intézet munkatársai tömegspektrometriás méréseknek vetik alá. Az állatoktól liquor, vérplazma és perfundált agyszövetet gyűjtöttünk, az analóg beadását követően 30, 60 és 120 perccel, valamint a negyedik kísérleti csoportban 24 órával. Pilot vizsgálatunkhoz az összes minta begyűjtése megtörtént.

In vitro vizsgálatainkat hippocampális túlélő agyszeleten végeztük, amely mérésekhez a hippocampus felépítése miatt különösen alkalmas. Különböző rétegeket különböztetünk meg neuroanatómiai felépítésében, amely rétegekben külön-külön találhatóak meg a sejtestek, az apikális és a bazális dendritek. Méréseink során Schaffer-kollaterális ingerlést végeztünk, amely kollaterálisok ingerlésével a CA1 régió apikális dendritjein képesek vagyunk kiváltott választ generálni. Ezen válaszok amplitúdójának mértékére tett analóghatást vizsgáltuk. Az OGD kísérletek során, ugyanígy fEPSP-eket rögzítettünk, de az ischaemiás tolerancia méréséhez ischaemiás körülményeket kellett teremtenünk az interface kamrában, ahol a túlélő agyszelet-preparátumok vizsgálata történt. Ehhez olyan mesterséges cerebrospinális folyadékot alkalmaztunk, amelyben a glükózt szacharózra (OGD-aCSF) cseréltük, és a folyadékot nem oxigénes karbogén gázzal (O_2 / CO_2 5 % / 95 %), hanem nitrogénes karbogén gázzal (N_2 / CO_2 5 % / 95 %) dúsítottuk. Az ún. OGD-időt az OGD-aCSF kamrába érkezésétől mértük a kiváltott aktivitás teljes megszűnéséig, majd az összes mérést követően csoportonként átlagot számítottunk.

Fiziológias körülmények között történt vizsgálataink során hét analógot vizsgáltunk, ezek közül öt olyan analógot találtunk, amelyek konzekvens hatással

bírtak a fEPSP amplitúdók mértékére. Ezen hatások között találtunk gátló és facilitáló hatású molekulát is. Az SZR73 és SZR104 jelű analógok szignifikánsan facilitálták az amplitúdók mértékét, míg az SZR105 jelű molekula szignifikánsan gátolta. Az SZR106 jelű analóg szintén konzekvens hatással bírt, de jelentősen nem volt hatással az amplitúdók nagyságára. Az SZR100 és SZR759 jelű analógok hatása nem volt stabil, míg az SZR198 jelű molekula vizes közegben való disszociációja kérdéseket vetett fel bennünk a molekula szerkezete miatt. Így OGD vizsgálatainkba az SZR73, SZR104, SZR105 és SZR106 jelű molekulákat vontuk be. Az ischaemiával szembeni toleranciával kapcsolatban azt találtuk, hogy az SZR105 és SZR106 még a kinurénsavnál is kisebb toleranciát biztosít, míg az SZR73 és az SZR104 jelentősen megnövelte azt, abban az esetben is, ha a kontroll csoportot választjuk statisztikai kontrollnak és abban az esetben is, ha a kinurénsavval kezelt csoport a méréseink kontrollja. A továbbiakban az SZR73 és az SZR104 jelű molekula acetilkolin felszabadulásra tett hatását vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a neurotranszmitter relatív felszabadulására egyik analóg sincs hatással, míg a kinurénsav növelte a felszabadulás mértékét. A vizsgálatok céljának és a kísérletsorozat ívének könnyebb megértése miatt ismertetem *in vivo* kísérleti eredményeinket is, bár még nem készült el az összes mintánk tömegspektrometriás vizsgálata. Korábban a szakirodalomban leírták, hogy az SZR104 analóg vér-agy gáton való áthaladási képessége kb. kétszerese a kinurésavénak⁷⁸. Ezen áthaladási képességét pedig úgy tűnik, hogy a mi *in vivo* vizsgálataink is igazolhatják, mivel a legkisebb koncentrációban beadva a legrövidebb kísérleti idő után is nagy mennyiségben található meg a perfundált agyszövetben.

Összességében elmondhatjuk, hogy az analógok vizsgálata nagy múltra tekint vissza Szegeden. Preklinikai vizsgálataink során megállapítottuk, hogy létezik olyan analóg, amely a kinurénsavéhoz mérhető ischaemiával szembeni toleranciát képes biztosítani a neuronoknak, és ez az analóg intakt szervezetben is megfelelő módon képes a vér-agy gáton való penetrációra, azonban mindenképpen szükség lesz egy *in vivo* ischaemiás modell beállítására. Ezen modell beállítása hosszabb távú terveink között szerepel, amely vizsgálatot a fenti eredmények komplettálása és összegzése után kívánunk összeállítani. Terveink között szerepel *in vivo* modellben vizsgálni középagyi-artéria elzáródás (MCAo) talaján kialakult ischaemiás stroke mértékére

gyakorolt analóghatásokat. Továbbá a neurotranszmitter felszabadulás szempontjából a glutamát és a GABA felszabadulására gyakorolt analóghatásokat is vizsgálni kívánjuk.

Érdekes kérdéseket vetnek fel az eddig elvégzett vizsgálataink. Továbbra is kérdéses, hogy a legnagyobb OGD-toleranciát biztosító kinurénsav analógok miért ellentétes hatásúak fiziológias körülmények között, mint a kinurénsav. Vajon milyen úton képesek a vér-agy gáton keresztül jutni, melyik az a transzportmechanizmus, amely átszállítja őket a védelmi hálón. Ischaemiás stroke során a vér-agy gát felépítésében szerepet játszó endothélsejtek között található szoros kapcsolatok is nagy mértékben sérülhetnek, sőt tartós magasvérnyomás-betegség során is áteresztőbbé válhat a vér-agy gát a fiziológiához képest⁹². Ennek okán mindenképpen vizsgálni kell a kinurénsav átjutási képességeit is intakt szervezetben ischaemiás körülmények között. Továbbá az is kérdés, hogy a kinurénsav útvonal már intermediereinek termelődésére, és enzimeinek aktivitására milyen hatást fognak gyakorolni az analógok. Az eddig ismeretes, káros hatásokkal rendelkező arányok irányába való eltolódást mindenképpen meg kell akadályozni.

VII. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni prof. dr. Toldi Józsefnek és prof. dr. Vécsei Lászlónak a lehetőséget, hogy laborjaikban dolgozhattam és dolgozhatok a kinurénsav-analógokkal. Az elmúlt évek alatt szenvedélyemmé vált az ischaemiás stroke kutatási területe.

Köszönöm, hogy a szintetizált analógokat biztosították számunka a Gyógyszerkémiai Intézet munkatársai, prof. dr. Fülöp Ferenc[†], prof. dr. Szatmári István és dr. Lőrinczi Bálint.

Köszönöm a szuperfúziós mérésekben nyújtott segítséget a Kórélettani Intézet munkatársainak dr. Csabafi Krisztinának és Bodnár Évának.

Köszönöm a tömegspektrometriás mérésekben nyújtott segítséget dr. Berkecz Róbertnek és Vasas Gabriellának.

Köszönöm az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék minden munkatársának a támogatást és biztatást, szakdolgozóinknak Földi Gittának és Gödör Nórának a laborban nyújtott segítséget.

Köszönöm férjemnek, Huszár Lászlónak, gyermekeimnek Farkas Nórinak és Farkas Rékának, hogy mindig támogattak és viselték a munkámmal járó következményeket. Édesanyámnak, hogy az utolsó pillanatig tartotta bennem a lelket, akkor is, amikor már feladtam volna.

Végül, de egyáltalán nem utolsó sorban, köszönöm dr. Farkas Tamás témavezetőmnek a tanítását, a támogatását és biztatását. Köszönöm, hogy szakmai észrevételeivel és tapasztalatával mutatta az utat már szakdolgozó, majd doktori iskolás éveimben is.

VIII. Irodalomjegyzék

1. World Health Organization. The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (2020).
2. Donnan, G. A., Fisher, M., Macleod, M. & Davis, S. M. Stroke. *The Lancet* **371**, 1612–1623 (2008).
3. Lakhan, S., Kirchgessner, A. & Hofer, M. Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* **7**:97. *Journal of translational medicine* **7**, 97 (2009).
4. Hui, C., Tadi, P. & Patti, L. *Ischemic Stroke*. *StatPearls [Internet]* (StatPearls Publishing, 2022).
5. Magyar Stroke Társaság. Ismerje meg a stroke-ot és mindent, amit tudni érdemes róla! https://stroketars.info.hu/?web_id= (2021).
6. Dirnagl, U. *et al.* Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences* **22**, 391–397 (1999).
7. A Magyar Stroke Társaság és az Egészségügyi Szakmai Kollégium Neurológiai Tagozata. Az akut ischaemiás stroke diagnosztikájáról és kezeléséről. *Ideggyógyászati Szemle Proceedings* 58–103 (2017).
8. A Magyar Stroke Társaság és az Egészségügyi Szakmai Kollégium Neurológiai Tagozata. A nem traumás intracerebrális vérzések diagnosztikájáról és kezeléséről. *Ideggyógyászati Szemle Proceedings* 105–138 (2017).
9. Harbison, J. *et al.* Diagnostic Accuracy of Stroke Referrals From Primary Care, Emergency Room Physicians, and Ambulance Staff Using the Face Arm Speech Test. *Stroke* **34**, 71–76 (2003).

10. Xian, Y. *et al.* Use of Strategies to Improve Door-to-Needle Times With Tissue-Type Plasminogen Activator in Acute Ischemic Stroke in Clinical Practice. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes* **10**, e003227 (2017).
11. Stroke Symptoms. www.stroke.org <https://www.stroke.org/en/about-stroke/stroke-symptoms>.
12. Hacke, W. *et al.* Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med* **359**, 1317–1329 (2008).
13. Rolfe, D. F. & Brown, G. C. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* **77**, 731–758 (1997).
14. Brown, A. M., Baltan Tekkök, S. & Ransom, B. R. Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen. *Neurochemistry International* **45**, 529–536 (2004).
15. Bertram, R., Gram Pedersen, M., Luciani, D. S. & Sherman, A. A simplified model for mitochondrial ATP production. *Journal of Theoretical Biology* **243**, 575–586 (2006).
16. Huang, H. *et al.* Down-regulated Na⁺/K⁺-ATPase activity in ischemic penumbra after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 12708–12717 (2015).
17. Gleichmann, M. & Mattson, M. P. Neuronal Calcium Homeostasis and Dysregulation. *Antioxid Redox Signal* **14**, 1261–1273 (2011).
18. White, B. C. *et al.* Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* **179**, 1–33 (2000).
19. Lipton, S. A. & Rosenberg, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* **330**, 613–622 (1994).

20. Hermann, D. M., Hossmann, K.-A. & Mies, G. Expression of c-jun, mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, caspase-3 and glial fibrillary acidic protein following cortical cold injury in rats: relationship to metabolic disturbances and delayed cell death. *Neuroscience* **123**, 371–379 (2004).
21. Tsuchiya, M., Sako, K., Yura, S. & Yonemasu, Y. Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats. *Exp Brain Res* **89**, 87–92 (1992).
22. Dongen, A. M. V. *Biology of the NMDA Receptor*. (CRC Press/Taylor & Francis, 2009).
23. Bergendi, L., Benes, L., Duracková, Z. & Ferencik, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* **65**, 1865–1874 (1999).
24. Ridnour, L. A. *et al.* The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem* **385**, 1–10 (2004).
25. Allen, C. L. & Bayraktutan, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke* **4**, 461–470 (2009).
26. Hattori, H., Subramanian, K. K., Sakai, J. & Luo, H. R. Reactive oxygen species as signaling molecules in neutrophil chemotaxis. *Commun Integr Biol* **3**, 278–281 (2010).
27. Cuzzocrea, S., Riley, D. P., Caputi, A. P. & Salvemini, D. Antioxidant Therapy: A New Pharmacological Approach in Shock, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. *Pharmacol Rev* **53**, 135–159 (2001).
28. Betz, A. L., Schielke, G. P. & Yang, G.-Y. Interleukin-1 in Cerebral Ischemia. *Keio j. med* **45**, 230–238 (1996).

29. Lambertsen, K. L., Biber, K. & Finsen, B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **32**, 1677–1698 (2012).
30. Wang, L. *et al.* $\gamma\delta$ T Cell in Cerebral Ischemic Stroke: Characteristic, Immunity-Inflammatory Role, and Therapy. *Front Neurol* **13**, 842212 (2022).
31. Perjési, P. Gyógyszermetabolizmus és gyógyszertoxicitás. <https://dtk.tankonyvtar.hu/xmlui/handle/123456789/3577> (2011).
32. Costantino, I. The Janus Face of Cyclooxygenase-2 in Ischemic Stroke. <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/01.STR.0000153797.33611.d8> (2005) doi:10.1161/01.STR.0000153797.33611.d8.
33. Lakhan, S., Kirchgessner, A., Tepper, D. & Aidan, L. Matrix Metalloproteinases and Blood-Brain Barrier Disruption in Acute Ischemic Stroke. *Frontiers in Neurology* **4**, (2013).
34. Do, P. T., Wu, C.-C., Chiang, Y.-H., Hu, C.-J. & Chen, K.-Y. Mesenchymal Stem/Stromal Cell Therapy in Blood–Brain Barrier Preservation Following Ischemia: Molecular Mechanisms and Prospects. *Int J Mol Sci* **22**, 10045 (2021).
35. Lopez-Rojas, J. & Kreutz, M. Mature Granule Cells of the Dentate Gyrus - Passive Bystanders or Principal Performers in Hippocampal Function? *Neuroscience and biobehavioral reviews* **64**, (2016).
36. Biscoe, T. J. & Straughan, D. W. Micro-electrophoretic studies of neurones in the cat hippocampus. *J Physiol* **183**, 341–359 (1966).
37. Soghomonian, J. J. & Martin, D. L. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci* **19**, 500–505 (1998).

38. Unal, G., Joshi, A., Viney, T. J., Kis, V. & Somogyi, P. Synaptic Targets of Medial Septal Projections in the Hippocampus and Extrahippocampal Cortices of the Mouse. *J Neurosci* **35**, 15812–15826 (2015).
39. Dannenberg, H., Young, K. & Hasselmo, M. Modulation of Hippocampal Circuits by Muscarinic and Nicotinic Receptors. *Frontiers in Neural Circuits* **11**, (2017).
40. Anand, K. S. & Dhikav, V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol* **15**, 239–246 (2012).
41. *The Hippocampus Book*. (2006).
doi:10.1093/acprof:oso/9780195100273.001.0001.
42. Bentivoglio, M. & Kristensson, K. Tryps and trips: cell trafficking across the 100-year-old blood-brain barrier. *Trends Neurosci* **37**, 325–333 (2014).
43. Benarroch, E. E. Blood–brain barrier: Recent developments and clinical correlations. *Neurology* **78**, 1268–1276 (2012).
44. Jiang, X. *et al.* Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. *Prog Neurobiol* **163–164**, 144–171 (2018).
45. Badawy, A. A.-B. Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. *Int J Tryptophan Res* **10**, 1178646917691938 (2017).
46. Vécsei, L., Szalárdy, L., Fülöp, F. & Toldi, J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 64–82 (2013).
47. Annus, Á. *et al.* Kynurenic acid and kynurenine aminotransferase are potential biomarkers of early neurological improvement after thrombolytic therapy: A pilot study. *Adv Clin Exp Med* **30**, 1225–1232 (2021).
48. Liebig, J. Ueber Kynurensäure. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **86**, 125–126 (1853).

49. Ellinger, A. Die Entstehung der Kynurensäure. **43**, 325–337 (1905).
50. Fukui, S., Schwarcz, R., Rapoport, S. I., Takada, Y. & Smith, Q. R. Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J Neurochem* **56**, 2007–2017 (1991).
51. Varga, N. *et al.* Targeting of the kynurenic acid across the blood–brain barrier by core-shell nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **86**, 67–74 (2016).
52. Nagy, K. *et al.* Synthesis and biological effects of some kynurenic acid analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **19**, 7590–7596 (2011).
53. Bratek-Gerej, E., Ziembowicz, A., Godlewski, J. & Salinska, E. The Mechanism of the Neuroprotective Effect of Kynurenic Acid in the Experimental Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia: The Link to Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel)* **10**, 1775 (2021).
54. Mándi, Y. & Vécsei, L. The kynurenine system and immunoregulation. *J Neural Transm (Vienna)* **119**, 197–209 (2012).
55. Stone, T. W. Development and therapeutic potential of kynurenic acid and kynurenine derivatives for neuroprotection. *Trends in Pharmacological Sciences* **21**, 149–154 (2000).
56. Henderson, G., Johnson, J. W. & Ascher, P. Competitive antagonists and partial agonists at the glycine modulatory site of the mouse N-methyl-D-aspartate receptor. *J Physiol* **430**, 189–212 (1990).
57. Kessler, M., Baudry, M. & Lynch, G. Quinoxaline derivatives are high-affinity antagonists of the NMDA receptor-associated glycine sites. *Brain Research* **489**, 377–382 (1989).

58. Kessler, M., Terramani, T., Lynch, G. & Baudry, M. A Glycine Site Associated with N-Methyl-d-Aspartic Acid Receptors: Characterization and Identification of a New Class of Antagonists. *J Neurochem* **52**, 1319–1328 (1989).
59. Kloog, Y., Lamdani-Itkin, H. & Sokolovsky, M. The Glycine Site of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Channel: Differences Between the Binding of HA-966 and of 7-Chlorokynurenic Acid. *J Neurochem* **54**, 1576–1583 (1990).
60. Mayer, M. L., Westbrook, G. L. & Vyklicky, L. Sites of antagonist action on N-methyl-D-aspartic acid receptors studied using fluctuation analysis and a rapid perfusion technique. *Journal of Neurophysiology* **60**, 645–663 (1988).
61. Moroni, F. *et al.* Glycine and kynurenate modulate the glutamate receptors in the myenteric plexus and in cortical membranes. *European Journal of Pharmacology* **163**, 123–126 (1989).
62. Robinson, M. B., Schulte, M. K., Freund, R. K., Johnson, R. L. & Koerner, J. F. Structure-function relationships for kynurenic acid analogues at excitatory pathways in the rat hippocampal slice. *Brain Research* **361**, 19–24 (1985).
63. Danysz, W., Fadda, E., Wroblewski, J. T. & Costa, E. Kynurenate and 2-amino-5-phosphonovalerate interact with multiple binding sites of the N-methyl-d-aspartate-sensitive glutamate receptor domain. *Neuroscience Letters* **96**, 340–344 (1989).
64. Fisher, J. L. & Mott, D. D. Distinct Functional Roles of Subunits within the Heteromeric Kainate Receptor. *Journal of Neuroscience* **31**, 17113–17122 (2011).
65. Stone, T. W. Does kynurenic acid act on nicotinic receptors? An assessment of the evidence. *J. Neurochem.* **152**, 627–649 (2020).

66. Wang, J. *et al.* Kynurenic Acid as a Ligand for Orphan G Protein-coupled Receptor GPR35. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 22021–22028 (2006).
67. Guo, J., Williams, D. J., Puhl, H. L. & Ikeda, S. R. Inhibition of N-type calcium channels by activation of GPR35, an orphan receptor, heterologously expressed in rat sympathetic neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **324**, 342–351 (2008).
68. Rassoulpour, A., Wu, H., Ferrè, S. & Schwarcz, R. Nanomolar concentrations of kynurenic acid reduce extracellular dopamine levels in the striatum. *Journal of Neurochemistry* **93**, 762–765 (2005).
69. Carpenedo, R. *et al.* Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release. *European Journal of Neuroscience* **13**, 2141–2147 (2001).
70. Konradsson-Geuken, Å. *et al.* CHANGES IN CORTICAL KYNURENIC ACID BIDIRECTIONALLY MODULATE PREFRONTAL GLUTAMATE LEVELS AS ASSESSED BY MICRODIALYSIS AND RAPID ELECTROCHEMISTRY. *Neuroscience* **169**, 1848–1859 (2010).
71. Pocivavsek, A., Notarangelo, F. M., Wu, H.-Q., Bruno, J. P. & Schwarcz, R. Astrocytes as Pharmacological Targets in the Treatment of Schizophrenia. in *Handbook of Behavioral Neuroscience* vol. 23 423–443 (Elsevier, 2016).
72. Amori, L. *et al.* Specific inhibition of kynurenate synthesis enhances extracellular dopamine levels in the rodent striatum. *Neuroscience* **159**, 196–203 (2009).
73. Beggiato, S. *et al.* Endogenous kynurenic acid regulates extracellular GABA levels in the rat prefrontal cortex. *Neuropharmacology* **82**, 11–18 (2014).
74. Rózsa, É., Robotka, H., Vécsei, L. & Toldi, J. The Janus-face kynurenic acid. *J Neural Transm* **115**, 1087–1091 (2008).

75. Fehér, E. *et al.* Structural Evaluation and Electrophysiological Effects of Some Kynurenic Acid Analogs. *Molecules* **24**, 3502 (2019).
76. Schwarcz, R. Kynurenines and Glutamate. in *Advances in Pharmacology* vol. 76 13–37 (Elsevier, 2016).
77. Lőrinczi, B. & Szatmári, I. KYNA Derivatives with Modified Skeleton; Hydroxyquinolines with Potential Neuroprotective Effect. *Int J Mol Sci* **22**, 11935 (2021).
78. Molnár, K. *et al.* SZR-104, a Novel Kynurenic Acid Analogue with High Permeability through the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutics* **13**, 61 (2021).
79. Juhász, L. *et al.* Divergent Effects of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist Kynurenic Acid and the Synthetic Analog SZR-72 on Microcirculatory and Mitochondrial Dysfunction in Experimental Sepsis. *Front Med (Lausanne)* **7**, 566582 (2020).
80. Knyihar-Csillik, E. *et al.* The kynurenate analog SZR-72 prevents the nitroglycerol-induced increase of c-fos immunoreactivity in the rat caudal trigeminal nucleus: Comparative studies of the effects of SZR-72 and kynurenic acid. *Neuroscience Research* **61**, 429–432 (2008).
81. Tanaka, M. *et al.* Antidepressant-like Effects of Kynurenic Acid Analogues. in *Proceedings of 1st International Electronic Conference on Biomedicine* 10301 (MDPI, 2021). doi:10.3390/ECB2021-10301.
82. Breda, C. *et al.* Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) inhibition ameliorates neurodegeneration by modulation of kynurenine pathway metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 5435–5440 (2016).

83. Ostapiuk, A. & Urbanska, E. M. Kynurenic acid in neurodegenerative disorders-unique neuroprotection or double-edged sword? *CNS Neurosci Ther* **28**, 19–35 (2022).
84. Baran, H., Jellinger, K. & Deicke, L. Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* **106**, 165–181 (1999).
85. Guillemin, G. J. Neurodegenerative Diseases: Tryptophan Metabolism. in *Encyclopedia of Neuroscience* (eds. Binder, M. D., Hirokawa, N. & Windhorst, U.) 2620–2623 (Springer, 2009). doi:10.1007/978-3-540-29678-2_3821.
86. Zádori, D., Klivényi, P., Plangár, I., Toldi, J. & Vécsei, L. Endogenous neuroprotection in chronic neurodegenerative disorders: with particular regard to the kynurenines. *J Cell Mol Med* **15**, 701–717 (2011).
87. Kocsis, K. *et al.* Acetyl-L-carnitine restores synaptic transmission and enhances the inducibility of stable LTP after oxygen-glucose deprivation. *Neuroscience* **332**, 203–211 (2016).
88. Pegg, C. C., He, C., Stroink, A. R., Kattner, K. A. & Wang, C. X. Technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in rat. *J Neurosci Methods* **187**, 8–12 (2010).
89. Richardson, I. W. & Szerb, J. C. The release of labelled acetylcholine and choline from cerebral cortical slices stimulated electrically. *Br J Pharmacol* **52**, 499–507 (1974).
90. Muramatsu, I. *et al.* Novel regulatory systems for acetylcholine release in rat striatum and anti-Alzheimer's disease drugs. *Journal of Neurochemistry* **149**, 605–623 (2019).

91. Ibos, K. E. *et al.* Kisspeptin-8 Induces Anxiety-Like Behavior and Hypolocomotion by Activating the HPA Axis and Increasing GABA Release in the Nucleus Accumbens in Rats. *Biomedicines* **9**, 112 (2021).
92. Iadecola, C. *et al.* Impact of Hypertension on Cognitive Function: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension* **68**, e67–e94 (2016).

IX. Összefoglaló

Az elmúlt évtizedek során számos kísérleti metodikával, számos támadási ponton igyekeztek a kutatók olyan módosításokat végrehajtani a kinurenin útvonallal vagy magával az útvonal intermediereivel, katalizáló enzimeivel kapcsolatban, amelynek hatására az egészséges KYNA/QUIN arány fenntartható vagy újra elérhető. Ennek oka, hogy számos neurodegeneratív megbetegedés hátterében felfedezték ezen arány eltolódását, ilyen pl. a Huntington-kór, a Parkinson-kór és az Alzheimer-kór is.

Fő kutatási témánk az ischaemiás stroke, amely a WHO halált okozó betegségek listáján a második helyén szerepel, bár pár éve még csak a harmadik helyen volt megtalálható. Továbbá a szerzett rokkantság fő okaként tartják számon. Ischaemia során az idegsejteket érintő károsodás egyik alapmechanizmusa a glutamát okozta excitotoxicitás, amely az oxigén hiány miatt kialakuló, sejt- és molekuláris szinten zajló ischaemiás kaszkád egyik részfolyamata. Kialakulásában szerepet játszik az extracelluláris glutamát-visszavétel sérülése, nagy mértékű felszabadulása, valamint a nagy mennyiségű Ca^{2+} intracelluláris térbe való bejutása. A kinurénsav az egyetlen jelenleg ismert endogén NMDA-receptor antagonist, ami azért is jelentős, mert glutamát receptorral rendelkező ioncsatorna, amely a nagymennyiségű glutamát felszabadulásának hatására túlműködik ischaemia során. Ezenfelül számos már területen is leírták a kinurénsav pozitív tulajdonságait, amelyek szintén hozzájárulnak neuroprotektív jellegéhez, ilyen pl. szabadgyök-semlegesítő vagy gyulladáscsökkentő hatása.

Magyarországon évente 45–50.000 akut stroke-on átesett páciens kerül a stroke centrumokba. A páciensek nagy százaléka valamilyen maradványtünettel kénytelen együtt élni, ami igen nagy terhet jelent a családoknak, a társadalomnak és az egészségügynek is. Legfőképpen az időseket érinti, azonban az érintettek ~25%-a a 60 év alatti korosztályból kerül ki. A betegséget túlélő összes páciens mintegy 30 %-a élete hátralévő részében maradványtünetektől szenved, amelyek között a féloldali bénulás, a beszédértési nehézségek, a szótalálási problémák és depresszió is szerepelhet.

Kutatócsoportunk a kinurénsav és analógjainak vizsgálatával igyekszik támogatni ezen kutatási területet. A Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerkémiai Intézetében évtizedes múltra tekint vissza a kinurénsav analógok szintézise, amire azért van szükség, mert a kinurénsav bár neuroprotektív hatással rendelkezik, perifériásan adagolva csak nagyon kis mértékben jut át a vér-agy gáton. Az eddigi tapasztalatokra építve vizsgáltunk különböző, újonnan szintetizált KYNA analógokat, amelyek hatása szinte teljesen ismeretlen volt.

Laborunkban hippocampális túlélő agyszeleteken vizsgáltuk a különböző analógok kiváltott aktivitásra, az extraszinaptikus serkentő mezőpotenciálok amplitúdóinak nagyságára gyakorolt hatását. Rendszerünkben *in vitro* elektrofiziológiai módszereket alkalmaztunk — először fiziológias körülményeket teremtve —, és a serkentő poszt-szinaptikus potenciálokot számítógépen digitalizáltuk és rögzítettük. A mezőpotenciálokban beállt változásokat az adatok analízise során összegeztük.

A stabil és megismételhető hatással rendelkező analógokat a következő lépésben *in vitro* ischaemiás rendszerünkben, oxigén-glükóz deprivációs modellben vizsgáltuk. Ennek lényege, hogy mesterséges ischaemiát idézünk elő a túlélő agyszelettartó kamrában azzal, hogy az eddig rendelkezésre álló glükózt szacharózra cseréltük, a vizsgálati rendszert pedig oxigén helyett nitrogénnel dúsítottuk. Ekkor az ingerelt neuronhálózat nem képes tartósan fenntartani válaszadó-képességét, mivel az ischaemia hatására a sejtek funkcionális károsodást szenvednek. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy van-e olyan új kinurénsav-analóg, amely segíti a válaszadó-képesség hosszabb fenntartását.

A kísérletek során találtunk két olyan analógot, amelyek képesek ezen válaszadó-képességet hosszabb ideig fenntartani, mint a kinurénsav. Ezen analógokat vizsgáljuk neurotranszmitter felszabadulásra gyakorolt hatásuk és *in vivo* vér-agy gát áthaladási képességük szempontjából is.

Jelenleg az acetilkolin felszabadulására gyakorolt hatással kapcsolatban vannak eredmények, amelyeket kollaborációban a Kórélettani Intézet munkatársaival végeztünk. A superfúziós mérések alapján elmondhatjuk, hogy a kinurénsav facilitálta a neurotranszmitter relatív felszabadulását, míg az analógok nem voltak rá

hatással. Tervezzük még a glutamát és a GABA neurotranszmitterek felszabadulására gyakorolt hatásokat vizsgálni.

Az *in vivo* vér-agy gáton való áthaladás vizsgálatához az állatokat az egyik laterális farokvénán keresztül oltottuk a fiziológiás sóban oldott analóggal. Összesen 12 csoportba (3 koncentráció, 4 időpont) osztottuk az állatokat; majd liquor, plazma és perfundált agyszövet mintát gyűjtöttünk. A mintáink analóg tartalmát a Gyógyszeranalitikai Intézet munkatársai tömegspektrométerrel vizsgálják. Az előzetes eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az SZR104 jelű analóg a legkisebb beoltott koncentrációban (15 mmol/ttkg), az oltás után 30 perccel jelentős mennyiségben megjelenik az agyszövetben.

Hosszabb távú tervünk összeállítani egy olyan *in vivo* kísérletsorozatot, amelyben a középagyi-artéria elzáródás (MCAo) talaján kialakult ischaemiás károsodás kiterjedésére gyakorolt analóghatást vizsgáljuk.

X. Summary

In the last decade many research labs examined the analogues of kynurenic acid. Presently, this molecule is the only known endogen N-methyl-D-aspartate receptor antagonist have neuroprotective effect. The examinations described more positive effects in the field of immunology and other neurodegenerative diseases, too.

In our lab we focused on ischaemic stroke, and we try to find an analogue of kynurenic acid have similar effects. The molecules we examined was synthesized by co-workers of Institute of Pharmaceutical Chemistry.

Firstly, we examined the molecules by *in vitro* electrophysiological method under physiological circumstances. Hippocampal rat brain slices were used. The field excitatory postsynaptic potentials were registered on computer. In case, the molecule has consequence effect on the activity of hippocampal pyramid neurons, we took it in the second phase.

Secondly, the analogues which have consequence effect, we took them into *in vitro* oxygen-glucose deprivation model. There were four molecules which we examined in this method, and the best was the as known as SZR104 analogue.

Thirdly, effects of analogues were examined on neurotransmitter release in collaboration with Department of Pathophysiology. Changes of kynurenic acid concentration has effect on extracellular concentration some neurotransmitter, include glutamate, γ -butyric-acid, dopamine and acetylcholine. So, it is necessary to know the effects of the analogues on neurotransmitter concentrations. In this thesis was presented the effects on acetylcholine release.

Finally, we try to prove the presence this molecule in brain tissue, in liquor and in plasma after tail vein injection in rats. We administered the molecule in three concentrations and used four periods after administration until terminated the animals. The samples were analysed with mass spectrometry by co-workers of Institute of Pharmaceutical Analysis. About the preliminary results we can told, that the molecule SZR104 administered the smallest concentrate (15 mmol/ bwkg) after the shortest time (30 minutes) is present in a detectable manner the brain tissue.

The results above are important because the starting molecule kynurenic acid has a poor ability to penetrate through the blood brain barrier, so we cannot use as a medicine in acute ischaemic stroke.

Our long-lasting plan to make an *in vivo* examination method to investigate the SZR104 under ischaemic condition *in vivo*. Furthermore, we would like to know more about the molecular effect of this analogue.

And why is this research so important? The ischaemic stroke is the second leading cause of death worldwide. Annually, in Hungary admitted 45-50 thousand patients with acute ischaemic stroke in ambulance and emergency rooms. Thirty percent of these patients must live with residual symptoms (motion impairment, difficulty with speaking, paralysis on one or both side) after stroke.

