

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

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Huszár Lászlóné Fehér Evelin



Témavezető: Dr. Farkas Tamás

egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

2022

Szeged

I. Bevezetés

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 listáján. Mind az alacsonyabb mind a magasabb bevételű országokban egyaránt jelentős szerepe van. A stroke nemtől, kortól és etnikai hovatartozástól függetlenül komoly globális egészségügyi probléma. A heveny agyi katasztrófák összességének körülbelül 15-20 %-a vérzéses, míg 80-85%-a ischaemiás kórereditű. Az akut szakasz lezajlását követően a betegek mintegy 30%-ának életét maradványtünetek kísérik; a betegek mintegy 25%-a 60 év alatti.

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. Ez a rendkívül magas Ca^{2+} -szint túlzott glutamát felszabadulást eredményez, amely glutamát szubsztrátja 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 ki. Ez a rendkívül magas Ca^{2+} -szint túlzott glutamát felszabadulást eredményez, amely a központi idegrendszer legfőbb serkentő neurotranszmittere. 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. A véráram helyreállításával ezen sejtek nagyobb része még megmenthető. 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 korlátozott. 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 kifejett hatásokra.

II. Célkitűzések

Első célkitűzés:

Újjonnan szintetizált kinurénsav-analógok *in vitro* elektrofiziológiai vizsgálata fiziológias körülmények között.

Második célkitűzés: ischaemiás körülmények

Stabil és megismételhető hatással rendelkező analógok ischaemiás körülmények között való vizsgálata.

Harmadik célkitűzés: szövetmegoszlás

Harmadik célkitűzésünk a vér-agy gáton történő penetráció intakt szervezetben való detektálása.

Negyedik célkitűzés: neurotranszmitter felszabadulás

Szintén a második fázis OGD-tolerancia alapján kiválasztott legígéretesebb molekulák neurotranszmitter felszabadulás szempontjából való vizsgálata.

III. Anyagok és módszerek

1. *In vitro* hatásvizsgálat

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).

2. *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. Kétféle kontrollt alkalmaztunk, ahol az első kontroll hatóanyagmentes volt, míg a második kontrollcsoportot a kinurénsavval kezelt csoport adta. Ahogy a fiziológias körülmények között megvalósított mérések esetén, itt is az aCSF-ben oldottuk a KYNA-t és különböző analógjait. A kísérlet során azt mértük, hogy a különböző analógok mennyi idővel képesek növelni az oxigén-glükóz deprivációval szembeni toleranciát.

3. Szövetmegoszlási vizsgálat

Az *in vivo* szövetmegoszlási kísérlet során a laterális farokvénán keresztül juttattuk be az analógot a patkányok szervezetébe.

Háromféle mintát gyűjtöttünk az állatoktól. A liquor mintát occipitalis punctio során nyertük a cisterna magnán keresztül. Az agyszöveti mintavétel előkészítéseként az állatokat transcardiális perfúciónak vetettük alá, amely során a szív jobb kamrájából vért is vettünk a vérplazma minta elkészítéséhez.

4. Szuperfúziós mérések

Kooperációban a Kórélettani Intézet munkatársaival az analógok neurotranszmitter felszabadulásra gyakorolt hatásait vizsgáltuk. Jelen dolgozatban az acetilkolin felszabadulására gyakorolt hatásról közlök eredményeket.

IV. Eredmények megbeszélése

1) **Fiziológiás körülmények között** az első olyan analóg, amely a vizsgálataink során konzekvens hatást gyakorolt a kiváltott mezőpotenciálokra az **SZR73** jelű anyag volt. 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. 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. Gátló hatású KYNA-analóg az **SZR105** jelű molekula. Érdekes, hogy az SZR105 jelű analóg-családba tartozó **SZR106** jelű molekula, már nem képes kiváltani ezt a gátló hatást, sőt inkább hatástalannak vagy facilitáló hatásúnak imponál.

2) Az **OGD toleranciát** két — fiziológiás körülmények között facilitáló — analóg volt képes kitolni, ezek pedig az **SZR73** és az **SZR104**. 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.

3) **Szuperfúziós méréseinket** tekintve a kontroll csoporthoz képest a KYNA hatására szignifikánsan megnőtt az acetilkolin felszabadulás, viszont az analógok hatása ***nem*** mutatott ***szignifikáns*** eltérést a kontroll csoporthoz képest.

4) **Szövetmegoszlási kísérleteinkhez** minden mintát begyűjtöttünk, azonban jelenleg is folyik a minták analitikai vizsgálata. Azt már most is tudjuk, hogy a legkisebb beoltott koncentrációban 30 perccel a beadást követően ***jelentős mennyiségű SZR104*** jelenik meg az agyszövetben, a kinurénsav mennyisége ennek a töredéke.

V. Summary

In the last decade many research labs examined the analogues of kynurenic acid. Presently, this molecule is the only known endogenous 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.

VI. Tudományos közlemények

MTMT azonosító: 10071960

Összesített IF: 7,429

Az értekezés alapjául szolgáló közlemény:

Fehér Evelin; Szatmári István*; Dudás Tamás; Zalatnai Anna;
Farkas Tamás; Lőrinczi Bálint; Fülöp Ferenc; Vécsei László; Toldi
József

Structural Evaluation and Electrophysiological Effects of Some
Kynurenic Acid Analogs

MOLECULES 24 : 19 Paper: 3502 , 13 p. (2019)

IF: 3,267

Egyéb közlemények:

Annus Ádám; Tömösi Ferenc; Rárosi Ferenc; Fehér Evelin; Janáky
Tamás; Kecskeméti Gábor; Toldi József; Klivényi Péter; Sztrihá
László; Vécsei László

Kynurenic acid and kynurenine aminotransferase are potential
biomarkers of early neurological improvement after thrombolytic
therapy : a pilot study

ADVANCES IN CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE 30 : 12
pp. 1225-1232. , 8 p. (2021)

IF: 2.485

Tarkanyi Gabor; Csecsei Peter; Szegedi Istvan; Feher Evelin;
Annus Adam; Molnar Tihamer; Szapary Laszlo

Detailed severity assessment of Cincinnati Prehospital Stroke
Scale to detect large vessel occlusion in acute ischemic stroke

BMC EMERGENCY MEDICINE 20 : 1 Paper: 64 , 6 p. (2020)

IF: 1,727

Nyilatkozat

Mint a Jelölt témavezetője nyilatkozom, hogy a Jelölt hozzájárulása a megnevezett közleményben jelentős volt. A Jelölt hozzájárulása a következő eredményekben volt meghatározó: elektrofiziológiai vizsgálatok kivitelezése kiértékelése. Ezeket az eredményeket saját magam és a további társszerzők tudományos fokozat megszerzéséhez nem használták fel, és ezt a jövőben sem fogják megtenni.

Szeged 2022. október 28.

.....