



A kinurénsav és amid analógja, mint lehetséges gyógyszerjelöltek az opioid rendszer aktiváció szabályozására



Ph.D. értekezés összefoglalója

Dr. Reza Samavati

Témavezető:

Dr. Sándor Benyhe

Prof. Dr. László Vecsei

SZTE - ÁOK - Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ - Neurológiai Klinika.

Biokémiai Intézet, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Magyar Tudományos Akadémia.

Szeged, Hungary

2017

BEVEZETÉS

A kinurenin útvonal, mely jelen van az asztrocitákban, neuronokban, mikro- és oligodendrogliaiban, makrofágokban, endotél és dendrit sejtekben a központi idegrendszeren belül, fontos útvonala a triptofán katabolizmusának. A triptofán átalakulhat L-kinureninné, mely tovább metabolizálódik neuroprotektív kinurénsavvá (KYNA). Klinikai adatok azt mutatják, hogy a KYNA és annak metabolitjai fontos szerepet játszanak számos neurológiai rendellenesség patogenezisében, úgy mint a Huntington-kór, Parkinson-kór, epilepszia és ischaemiás stroke. A KYNA egy nemszelektív aktiváló aminósav receptor (mint az NMDA receptorok) antagonistája, részt vesz a glutamát neurotranszmisszióban. Mivel a KYNA részt vesz az endogén protektív mechanizmusban, megfelelő célpontja lehet a neurológiai betegségek kezelését célzó gyógyszerészeti fejlesztéseknek. Továbbá a G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR) és a KYNA kölcsönhatását már leírták.

Az opioid rendszer fájdalomcsillapításban játszott szerepe jól ismert. A rendszer három opioid receptorból áll: mü, kappa és delta (μ , κ és δ). Az opioid receptorok a GPCR családkhoz tartoznak és többnyire a Gi/o típusú G-fehérjéhez kapcsolódnak. Az opioid receptorok a gasztrointesztinális traktusban, a gerincvelőben és nagy mennyiségben az agyi kortextben és a striatum régióiban expresszálódnak. Korábbi tanulmányunkban leírtuk, hogy a KYNA és analógja, a KYNA1 (amelynek kationos centruma van a C-2 oldal láncon, SZR72-ként is ismert) nem kötődik közvetlenül az opioid receptorokhoz, de krónikus kezelés esetén szignifikáns változást okoztak a receptor funkcióban egér kortextben és striatumban.

Másrésztől feltételeztük, hogy a KYNA és a KYNA1 befolyásolhatja az opioid receptor funkciót a kolokalizált NMDA receptoron keresztül. Elsőként vizsgáltuk a KYNA akut hatását az opioid receptor funkcióra az NMDA receptor lehetséges bevonásával, összehasonlítva a KYNA1-gyel. Patkányokat kezeltünk akut módon egyszeri dózisú KYNA-val és KYNA1-gyel intraperitoniálisan, önmagukban illetve az MK-801, NMDA receptor antagonistával kombinálva. Továbbá mértük a KYNA és a KYNA1 plazma és gerincvelői folyadékbeli koncentrációit akut kezelés után. Végül, izolált patkány agy szöveteket kezeltünk *in vitro* KYNA-val, KYNA1-gyel és MK-801-gyel, hogy kizárjuk a véragyát és a KYNA és a KYNA1 periférikus metabolizmusát. A kortext és striatum mintákat opioid receptor vezérelt G-fehérje funkcionális tesztekben vizsgáltuk.

CÉLKITŰZÉSEK

Minden fent említett tanulmány azt mutatja, hogy bizonyára van kapcsolat a KYNA és az opioid rendszer aktivitása között. Mióta felmerült, hogy mind a KYNA mind az opioid rendszer neuroprotektív szerepet játszik kóros körülmények között, fontos lenne a KYNA opioid rendszerre gyakorolt lehetséges reakcióinak és hatásának vizsgálata. De ezidáig nem létezik összefüggő és összpontosított tanulmány erről a kapcsolatról. Jelen dolgozatban jellemezzük a KYNA és KYNA1 kötési tulajdonságait mind a három opioid receptoron kompetitív kötési vizsgálatban radiojelzett receptor specifikus opioid ligandokkal.

Az értekezés tanulmányának céljai a következők:

- Megmérni a KYNA és a KYNA1 kötési affinitását az opioid rendszeren kompetíciós kötési tesztben opioid receptor specifikus radioligandokkal overexpresszáló CHO (Chinese Hamster Ovary) sejt membránokban a megfelelő opioid receptorokkal.
- Megvizsgálni az opioid receptor G-fehérje aktivitását, KYNA és KYNA1 detektálása *in vivo* és *in vitro* a GPCR jelátvitel kezdeti szakaszában [³⁵S]GTP γ S funkcionális méréssel.
- Megvizsgálni az opioid receptor G-fehérje aktivitását az egerek KYNA-val és KYNA1-gyel való krónikus kezelése után [³⁵S]GTP γ S funkcionális méréssel.
- Megmérni a KYNA-val és KYNA1-gyel történt akut kezelés hatását funkcionális [³⁵S]GTP γ S kísérletekben patkány agyi membránokban.
- Feltárni a KYNA és a KYNA1 működési mechanizmusát az opioid rendszer aktivitásának szintjén *in vivo* és *in vitro* kísérletekben.
- Megvizsgálni a lehetséges kölcsönhatásokat az opioid receptorok és az NMDA receptorok között.

MÓDSZEREK

1. Állatok

1.1. Krónikus kezelés

C57/B nőtényi egereket használtunk a kísérletekben. Három csoportra osztottuk őket: kontrol (0,9 %-os szalin), KYNA (128 mg/kg/nap) és KYNA1 csoport (200 mg/kg/nap). A vegyületeket intraperitoneálisan kilenc napon át kapták. A kilencedik napon, altatást követően az agy eltávolításra került és a kortex és a striatum kimetszésre került, majd -80 °C-on tároltuk.

1.2. Akut kezelés

Hím SPRD patkányokat használtunk fel *in vivo* és *in vitro* kísérletekhez.

➤ *In vivo* kezelések:

Egyik kísérleti beállításban hét csoport i.p. kezelése történt: 1.) kontroll csoport (szalin), 2.) KYNA1 (296 mg/kg), 3.) KYNA (189 mg/kg), 4.) MK-801 (1 mg/kg) + KYNA1 (296 mg/kg), 5.) MK-801 (1 mg/kg) + KYNA (189 mg/kg). Ezek a csoportok a kezelés után 30 perccel dekapitálva lettek. A 6. csoport 15 perccel, a 7. csoport 45 perccel később lett dekapitálva az MK-801-gyel (1 mg/kg) történő kezelés után. A másik kísérleti beállításban 5 csoport szerepelt: 1.) kontroll csoport (fiziológiás sóoldat), 2.) KYNA (189 mg/kg), 3.) KYNA1 (296 mg/kg), 4.) MK-801 (1 mg/kg) + KYNA (189 mg/kg), 5.) MK-801 (1 mg/kg) + KYNA1 (296 mg/kg). Itt az állatok dekapitálása a kezelések után 2 órával történt meg.

➤ *In vitro* kezelések:

A dekapitáció után az agyakat azonnal izolált szervi fürdőbe (36-37 °C, mesterséges gerincvelői folyadék) helyeztük. A kezeléshez négy csoportra osztottuk az állatokat: kontrol, KYNA, KYNA1 és MK-801. A kortex és a striatum leválasztása után a KYNA-t és KYNA1-t 200 µM, az MK-801-t 50 µM koncentrációban adtuk a folyadékhoz 300 percen keresztül, majd -80 °C tároltuk további felhasználásig.

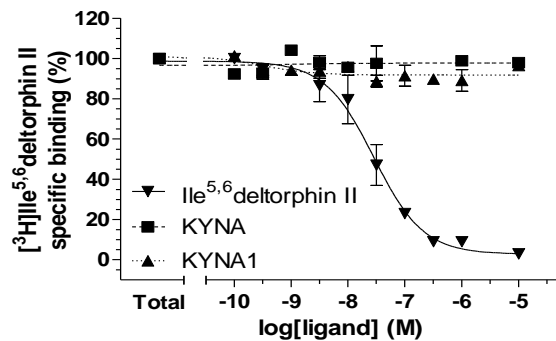
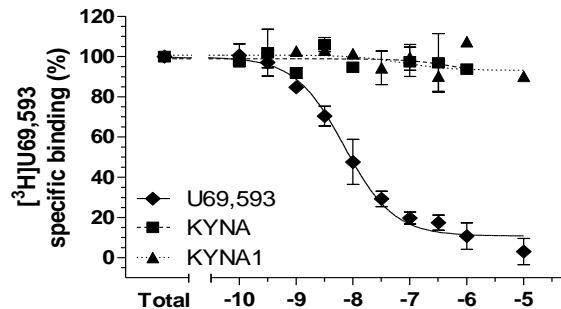
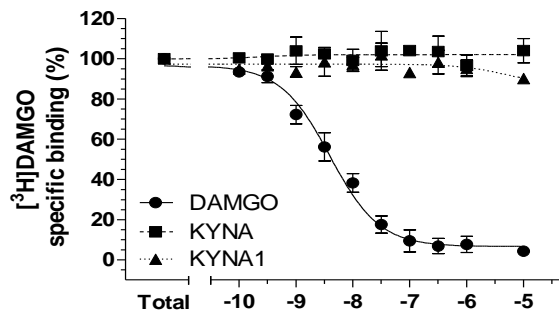
2. Funkcionális [³⁵S]GTPγS kötési teszt

A G-fehérje aktivációs kísérletek során a G α /o GDP/GTP kicserélődését monitorozzuk egy radioaktívan jelölt, nem hidrolizáló [35 S]GTP γ S GTP analóggal. Adott liganddal történő, növekvő koncentrációban (10^{-10} - 10^{-5} M) aktivált receptor esetén a specifikusan kötött [35 S]GTP γ S mennyisége információt ad a vizsgált receptor által közvetített G-fehérje maximális aktivitásáról és a receptort aktiváló ligand potenciáljáról.

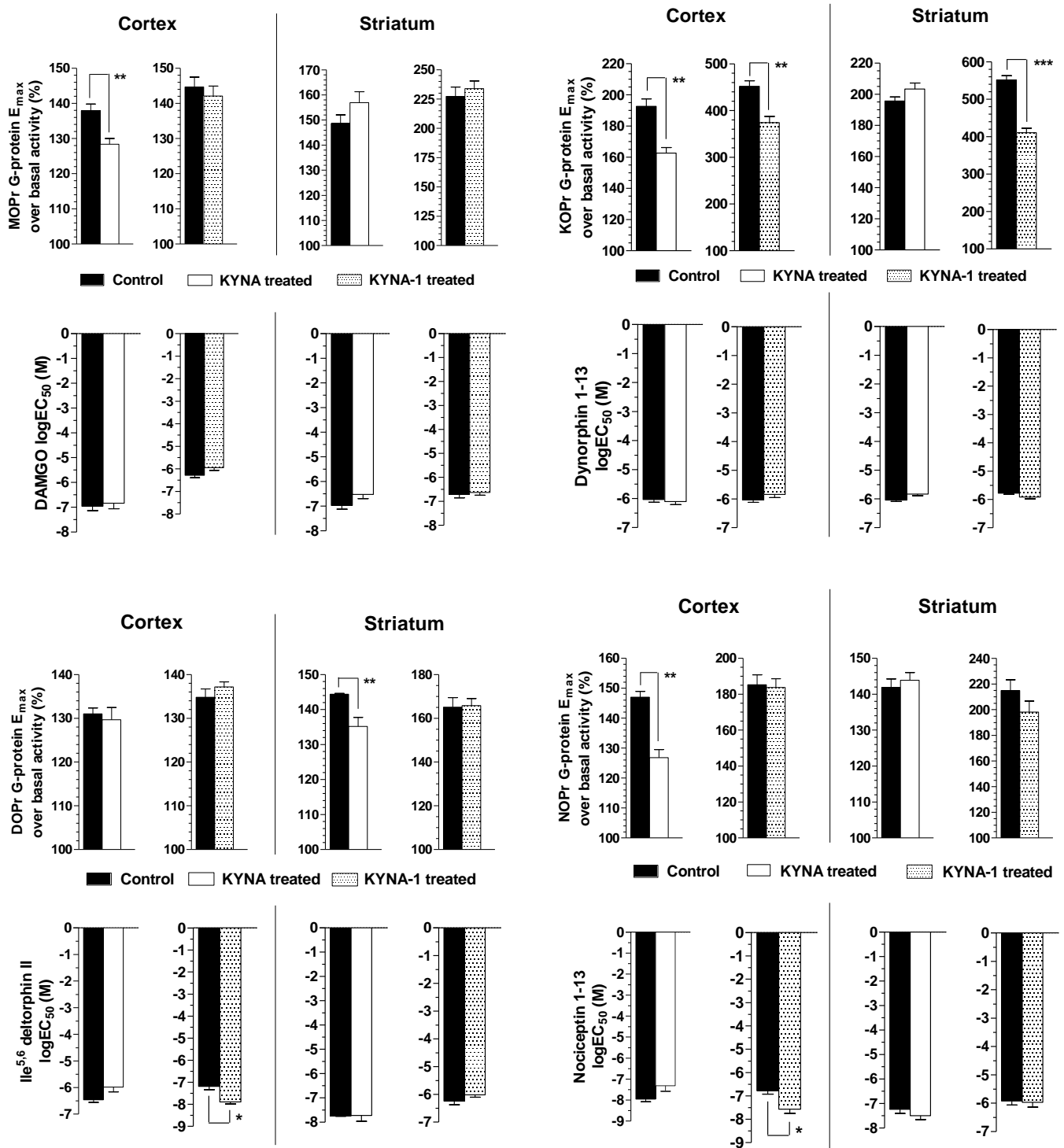
A három opioid receptor vizsgálata az adott receptorhoz tartozó szelektív ligandokkal történt: μ – DAMGO, κ - dinorfin 1-13, δ - Ile 5,6 -deltorfin II.

Eredmények

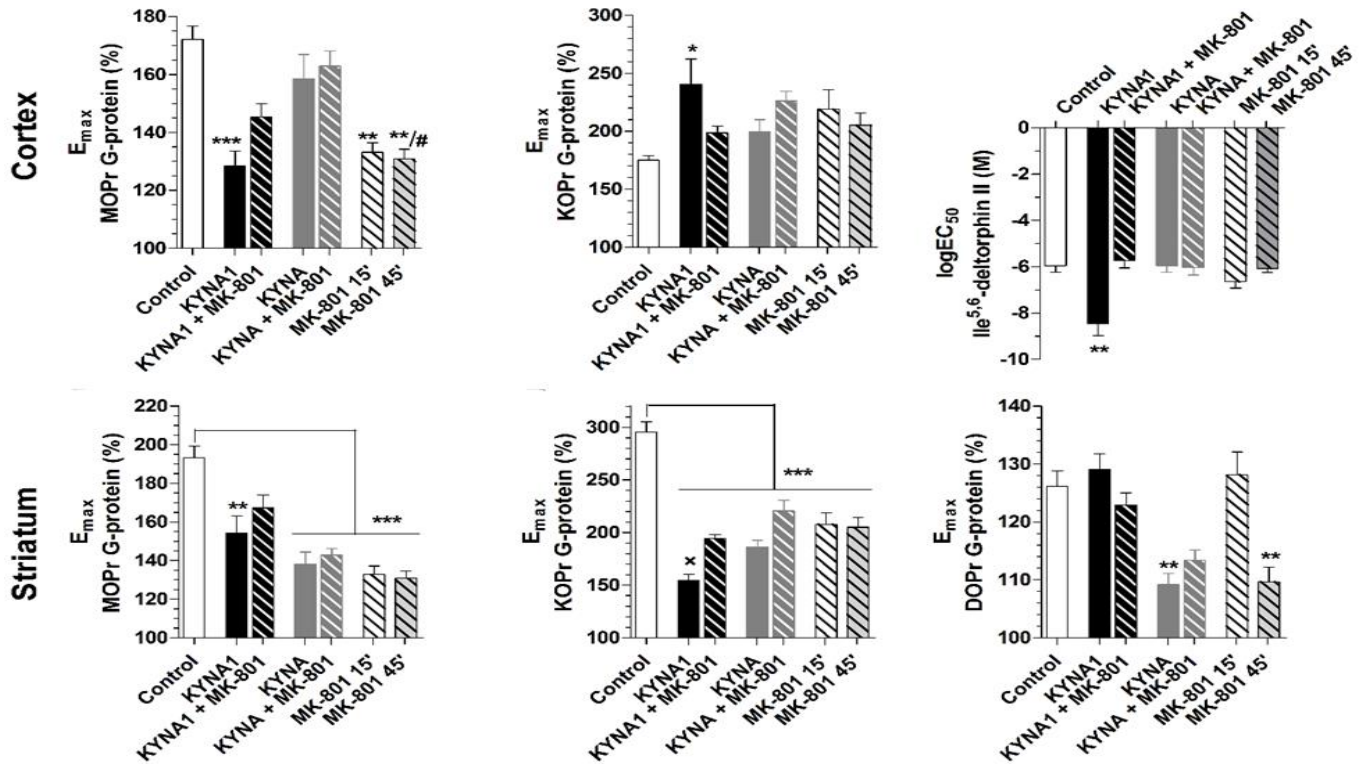
- Kompetitív binding assay



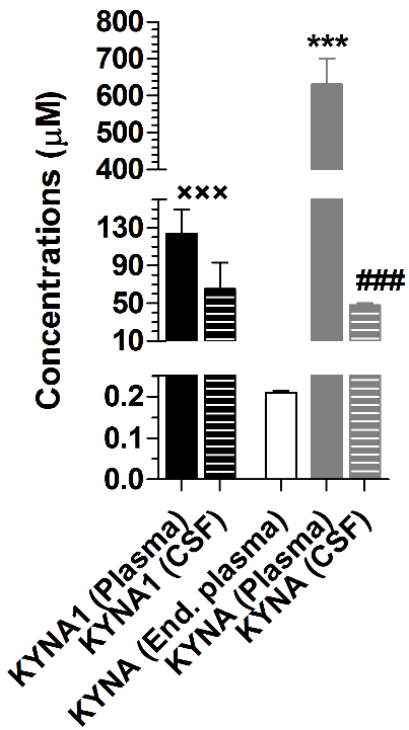
- Krónikus kezelés



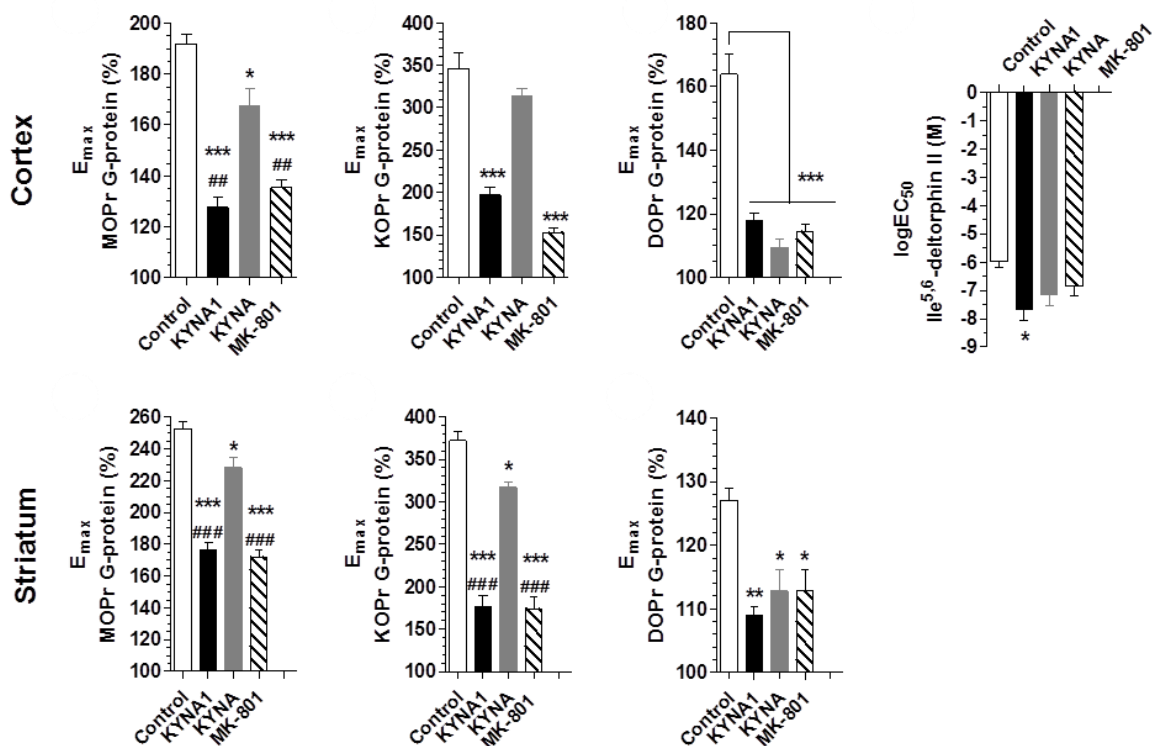
- Akut kezelés



- Vérplazma és CSF koncentrációk



- In vitro kezelés



MEGBESZÉLÉS ÉS AZ EREDMÉYNEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Először ebben a tanulmányban mutattuk ki, hogy a KYNA és a KYNA1 nem változtatja meg az opioid receptor funkciót krónikus és akut kezelés után sem, szövet és receptor specifikus úton. Ráadásul az NMDA receptor szelektív antagonistája, az MK-801 befolyásolta azt, jelezve, hogy a változásokat ez a receptor közvetíti. A hatások láthatóak voltak akut *in vitro* kísérletekben izolált cortex és striatum szövetekben. Kísérleteink alátámasztották korábbi eredményeinket, azaz a KYNA opioid receptor aktivitására gyakorolt hatását.

A krónikus (128 és 200 mg/kg/nap, i.p., 9 napon át) és az akut kezelések összehasonlításakor csak néhány esetben mutattak összhangban (DOP receptor cortexben és

striatumban, és KOP receptor striatumban KYNA kezelés esetén). Más esetekben az ellenkezője történt (KYNA1 kezelés KOP receptoron a striatumban) vagy nem láttunk szignifikáns változást a megfelelő akut kezelt csoport összehasonlításakor (KYNA1 a MOP receptoron). A KYNA NMDA receptorhoz való kötődése igazolt - habár alacsony mikromoláris koncentrációban az NMDA és az opioid receptorok közötti kölcsönhatás is sok szinten. Így annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk az NMDA receptor lehetséges szerepét, MK-801-t (dizocilpin), erős NMDA receptor szelektív antagonistát alkalmaztunk. Az MK-801 opioid receptor közvetítésre gyakorolt hatását igazolták, azonban nem kötődik direkt módon az opioid receptorhoz hasonlóan a KYNA-hoz.

Az MK-801 magában úgy viselkedik, mint a KYNA vagy a KYNA1. Az MK-801 a KYNA-val és a KYNA1-gyel való kombinálása esetén egy enyhe csökkenés jelenik meg az opioid receptor G-fehérje aktivitásában összehasonlítva a KYNA1-gyel vagy az MK-801-gyel önmagukban. Az eredmények magyarázhatóak a KYNA1/KYNA gyengülésével és az MK-801 egyedi aktivitásával az egyidejű detektálásuk esetén, mivel az általuk kifejtett hatások önmagukban hasonlóak, jelezve egy NMDA receptor által közvetített hatást. Ugyanez a magyarázat felmerül, a striatumban expresszálódó MOP és KOP receptoroknál, ahol a KYNA és az MK-801 önmagukban vagy kombinálva csökkentik a G-fehérje jelátvitelt. A DOP receptor a kortexben, a továbbfejlesztett agonista ligand (Ile5,6-deltorfin II) potenciálja 30 perces KYNA1 kezelést követően a kontrol szintig csökkent az MK-801 előkezelés esetén. Érdekes módon az MK-801 magában nem okozott változást a ligand potenciáljában 15 illetve 45 perccel a mérés után, amely azt jelzi, hogy az MK-801 gátolja a KYNA1 hatását az NMDA receptoron keresztül. Továbbá, azt is mutatja, hogy a KYNA1 specifikus hatása potenciálja a továbbfejlesztett DOP receptor agonista ligand affinitását, mivel a legyengült opioid receptor G-fehérje aktivitás a kortexben (MOP és DOP receptor) és a striatumban (mind a három opioid receptor) az MK-801-gyel függnek össze.

Ahogy csak a 30 perces időtartam mutatott szignifikáns különbséget, így a KYNA1 és KYNA koncentrációs szintek HPLC mérését a gerincvelői folyadékban 30 perces kezelést követően hajtottuk végre. Ahogy azt vártuk, a KYNA gerincvelői folyadékbeli koncentráció szintek drámaian csökkentek összehasonlítva a plazma szintekkel, amíg a KYNA1 esetén csak kis különbség volt. Ez bizonyítja, hogy a KYNA1 sokkal könnyebben hatol át a

véragyágon, mint a KYNA, amely egybevág az előzetes tanulmányokkal. Továbbá, a KYNA1 koncentrációk szignifikánsan alacsonyabbak a plazmában, mint a KYNA-é, jelezve, hogy a KYNA1 esetleg KYNA-vá bomlik.

A megfigyelt hatások *in vivo* 30 perccel a KYNA1 kezelés után kapcsolódhatnak a KYNA-hoz. Ennek lehetőségének tanulmányozására G-fehérje aktivitást mértünk a kortexben és a striatumban KYNA1, KYNA és MK-801-gyel történt kezeléssel izolált szerv fürdőben 30 perces időtartammal. Ezzel a beállítással kizártuk illetve minimalizáltuk a KYNA1 periférikus metabolizmusát és eliminációját és kizártuk a véragyátat a rendszerből, a lehetséges receptor-receptor kölcsönhatás épen tartásával. Eszerint a KYNA1 ugyanazt a hatást mutatja az *in vivo* kísérletekben (hasonlóan a KYNA-hoz és az MK-801-hez), így a KYNA1 önmagában hat az opioid receptor G-fehérje aktivitására. Azonban a KOP receptor esetén a kortexben ellenkező hatást mértünk összehasonlítva az *in vivo* kísérletekkel. Továbbá, néhány esetben az *in vitro* eredmények szignifikáns változást mutattak, ahol az *in vivo* beállítás nem.

Ezek a különbségek az *in vivo* és az *in vitro* eredmények között következhetnek a vegyület gyors periférikus metabolizmusából és a véragyát jelenlétéből. A legmeglepőbb eredmény a KOP G-fehérje aktivitás növekedése volt, amely a KYNA1-gyel történő kezelés után csak a kortexben *in vivo* volt látható. A megnövekedett KOP receptor aktivitást kiválthatja a KYNA1 kezelés a KOP receptor kompenzációs mechanizmusaként, mutatva neuroprotektav hatását a csökkent kortex véráramlás ellenében. Továbbá, a KYNA1 mechanizmusa alatt átalakulhat KYNA-vá a kortexben, kifejtve érszűkítő hatását magas koncentrációban. A KYNA kezelés nem volt hatással a KOP receptor aktivitásra a kortexben, valószínűleg a véragyágon való nehéz átjutása miatt.

KONKLÚZIÓ

Jelen tanulmány először szolgál bizonyítékkal egy indirekt, NMDA receptor által közvetített mechanizmusra, tekintettel a KYNA és a KYNA1 az opioid receptor funkciójára gyakorolt hatásaira a receptor G-fehérje szintjén. Így a KYNA és a KYNA1 egy lehetséges gyógyszer-jelölt az opioid rendszer aktivitásának szabályozására az NMDA receptoron keresztül, például opioid megvonás alatt függőség vagy fájdalom kezelés esetén.

Közlemények listája

A értekezés alapját képező közlemények:

- I. Ferenc Zádor, *Reza Samavati*, Eszter Szlávicz, Bernadett Tuka, Engin Bojnik, Ferenc Fülöp, József Toldi, László Vécsei, Anna Borsodi. **Inhibition of opioid receptor mediated G-protein activity after chronic administration of kynurenic acid and its derivative without direct binding to opioid receptors.** CNS Neurol Disord Drug Targets. 2014;13(9):1520-9. (Impact factor: 2.628)
- II. *Reza Samavati*, Ferenc Zádor, Edina Szűcs, Bernadett Tuka, Diána Martos, Gábor Veres, Róbert Gáspár, István Mándity, Ferenc Fülöp, László Vécsei, Sándor Benyhe, Anna Borsodi. **Kynurenic acid and its analogue can alter the opioid receptor G-protein signaling after acute treatment via NMDA receptor in rat cortex and striatum.** Journal of the Neurological Sciences. doi: 10.1016/j.jns.2017.02.053 (Impact factor: 2.128)

Egyéb közlemények:

- I. Adriano Mollica, Roberto Costante, Ferenc Zádor, *Reza Samavati*, Borsodi Anna, Benyhe Sandor, Azzurra Stefanucci, Irina Vetter, Richard J. Lewis, Stefano Pieretti. **Design, characterization and biological evaluation of novel multi-target compounds with opioid agonist and N-type voltage-sensitive calcium-channel blocking activity.** Chem Biol Drug Des. 2014 Nov 13. (IF: 2.507)

- II. Adriano Mollica, Alfonso Carotenuto, Ettore Novellino, Antonio Limatola, Roberto Costante, Francesco Pinnen, Azzurra Stefanucci, Stefano Pieretti, Ferenc Zádor, *Reza Samavati*, Anna Borsodi, Engin Bojnik, Sándor Benyhe, Peg Davis, Frank Porreca, Victor J. Hruby **Development of potent opioid peptides: synthesis, biological evaluation and conformational properties of two new cyclic biphalin analogues.** ACS Med Chem Lett. 2014 Jul 14;5(9):1032-6. (IF: 3.703)
- III. Zádor F, Lénárt N, Csibrány B, Sántha M, Molnár M, Tuka B, *Samavati R*, Klivényi P, Vécsei L, Marton A, Vizler C, Nagy GM, Borsodi A, Benyhe S, Páldy E.. **Low dosage of rimonabant leads to anxiolytic-like behavior via inhibiting expression levels and G-protein activity of kappa opioid receptors in a cannabinoid receptor independent manner.** Neuropharmacology. 2014 Oct 16;89C:298-307. (IF: 4.936)
- IV. Judit Bóta, Judit Hajagos-Tóth, Eszter Ducza, *Reza Samavati*, Anna Borsodi, Sándor Benyhe, Róbert Gáspár. **The effects of female sexual hormones on the expression and function of α 1A- and α 1D-adrenoceptor subtypes in the late-pregnant rat myometrium.** DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.11.015. (IF: 2.730)
- V. Hajagos-Toth J, Bota J, Ducza E, Csanyi A, Tiszai Z, Borsodi A, *Samavati R*, Benyhe S, Gaspar R. **The effects of estrogen on the α 2-adrenergic receptor subtypes in rat uterine function in late pregnancy in vitro.** Croat Med J. 2016 Apr 23;57(2):100-9. (IF: 1.483)
- VI. Monti L, Stefanucci A, Pieretti S, Marzoli F, Fidanza L, Mollica A, Mirzaie S, Carradori S, De Petrocellis L, Schiano Moriello A, Benyhe S, Zádor F, Szűcs E, Ötvös F, Erdei A, *Samavati R*, Dvoráckó S, Tömböly C, Novellino E. **Evaluation of the analgesic effect of 4-anilidopiperidine scaffold containing ureas and carbamates.** J Enzyme Inhib Med Chem. 2016 Apr 11:1-10. (IF: 3.428)
- VII. Hajagos-Tóth J, Bóta J, Ducza E, *Samavati R*, Borsodi A, Benyhe S, Gáspár R. **The effects of progesterone on the alpha2-adrenergic receptor subtypes in late-pregnant uterine contractions in vitro.** Reprod Biol Endocrinol. 2016 Jun 14;14(1):33. (IF: 2.147)
- VIII. Mollica A, Pelliccia S, Famiglini V, Stefanucci A, Macedonio G, Chiavaroli A, Orlando G, Brunetti L, Ferrante C, Pieretti S, Novellino E, Benyhe S, Zador F, Erdei A, Szucs E, *Samavati R*, Dvrorasko S, Tomboly C, Ragno R, Patsilinakos A, Silvestri R. **Exploring the first Rimonabant analog-opioid peptide hybrid compound, as bivalent ligand for CB1 and opioid receptors.** J Enzyme Inhib Med Chem. 2017 Dec;32(1):444-451. (IF: 3.428)

- IX.** Hajagos-Tóth J, Ducza E, *Samavati R*, Vari SG, Gaspar R. **Obesity in pregnancy: a novel concept on the roles of adipokines in uterine contractility.** Croat Med J 58:(2) pp. 96-104. (2017). (IF: 1.483)
- X.** Szűcs KF, Grosz G, Süle M, Nagy A, Tiszai Z, *Samavati R*, Gáspár R. **Identification of myoelectric signals of pregnant rat uterus: new method to detect myometrial contraction.** Croat Med J 58:(2) pp. 141-148. (2017). (IF: 1.483)

Összes impakt faktor: 32.084

