

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Neurológiai Klinika

**A triptofán lebontás kinurenin metabolit profiljának
vizsgálata a sclerosis multiplex cuprizon toxin által
kiváltott demielinizációs állatmodelljében**

A Ph.D. értekezés tézisei

Polyák Helga M.Sc.



Témavezetők: Prof. Dr. Vécsei László
Dr. habil. Rajda Cecília

Szeged

2024

A Ph.D. értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó eredeti közlemények:

- I. Polyák H.,** Cseh E.K., Bohár Zs., Rajda C., Zádori D., Klivényi P., Toldi J., Vécsei L. *Cuprizone markedly decreases kynurenic acid levels in the rodent brain tissue and plasma.* **Heliyon** 2021; 7:e06124. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06124 (original paper, **IF: 3.776 (2021); Q1**)

- II. Polyák H.,** Galla Zs., Nánási N., Cseh E.K., Rajda C., Veres G., Spekker E., Szabó Á., Klivényi P., Tanaka M., Vécsei L. *The tryptophan-kynurenine metabolic system is suppressed in cuprizone-induced model of demyelination simulating progressive multiple sclerosis.* **Biomedicines** 2023, 11, 945. doi: 10.3390/biomedicines11030945 (original paper, **IF: 4.7 (2022); Q1**)

A kapcsolódó közlemények összesített impakt faktora: 8.476

A Ph.D. értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

- I. Rajda C., Galla Zs., **Polyák H.**, Maróti Z., Babarczy K., Pukoli D., Vécsei L. *Cerebrospinal fluid neurofilament light chain is associated with kynurenine pathway metabolite changes in multiple sclerosis.* **Int. J. Mol. Sci.** **2020**, 21, 2665. doi: 10.3390/ijms21082665 (original paper, **IF: 5.924 (2020); Q1**)
- II. Cseh E.K., Veres G., Körtési T., **Polyák H.**, Nánási N., Tajti J., Párdutz Á., Klivényi P., Vécsei L., Zádori D. *Neurotransmitter and tryptophan metabolite concentration changes in the complete Freund's adjuvant model of orofacial pain.* **J. Headache Pain.** **2020**, 21: 35. doi: 10.1186/s10194-020-01105-6 (original paper, **IF: 7.277 (2020); Q1**)
- III. Pukoli D., **Polyák H.**, Rajda C., Vécsei L. *Kynurenines and neurofilament light chain in multiple sclerosis.* **Front. Neurosci.** **2021**, 15: 658202. doi: 10.3389/fnins.2021.658202 (**IF: 5.152 (2021); Q2**)
- IV. Tanaka M., Tóth F., **Polyák H.**, Szabó Á., Mándi Y., Vécsei L. *Immune influencers in action: metabolites and enzymes of the tryptophan-kynurenine metabolic pathway.* **Biomedicines** **2021**, 9: 734. doi: 10.3390/biomedicines9070734 (**IF: 4.757 (2021); Q1**)
- V. Tanaka M., Spekker E., Szabó Á., **Polyák H.**, Vécsei L. *Modelling the neurodevelopmental pathogenesis in neuropsychiatric disorders. Bioactive kynurenines and their analogues as neuroprotective agents—in celebration of 80th birthday of Professor Peter Riederer,* **J. Neural Transmi.** **2022**, 129:627-642. doi: 10.1007/s00702-022-02513-5 (**IF: 3.3 (2022) ; Q3**)
- VI. Tanaka M., Szabó Á., Spekker E., **Polyák H.**, Tóth F., Vécsei L. *Mitochondrial Impairment: A common motif in neuropsychiatric presentation? The link to the tryptophan–kynurenine metabolic system.* **Cells** **2022**, 11: 2607. doi: 10.3390/cells11162607 (**IF: 6.0 (2022); Q2**)

A Ph.D. értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó közlemények összesített impakt faktora: **32.41**

Összesített impakt faktor: **40.88**

Rövidítésjegyzék

ANA – antranilsav

KIR– központi idegrendszer

CPZ – cuprizon

CO – kontrol

GFAP – gliális fibrilláris savas fehérje

3-HK – 3-hidroxi-L-kinurenin

HPLC – nagyteljesítményű folyadékkromatográfia

KP – kinurenin útvonal

KYNA – kinurénsav

LFB/CV – luxol gyors kék - crezil ibolya

MBP – mielin bázikus protein

SM – sclerosis multiplex

TRP – triptofán

UHPLCMS/MS – ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia tandem tömegspektrometriával

XA – xanturénsav

Bevezetés

A sclerosis multiplex (SM) a központi idegrendszer (KIR) immun-mediált, krónikus, gyulladásos, demielinizációs és progresszív betegsége, amely a demielinizáció okozta elváltozásokkal, az axonok és az oligodendrociták elvesztésével, gliózissal, az axonok károsodásával, valamint az agy és a gerincvelő neuronjainak elvesztésével jellemezhető. Világszerte körülbelül 2,8 millió ember szenved ebben a betegségben. Az SM általában fiatal felnőtt korban jelenik meg és súlyos terhet ró a betegség által érintettekre, a társadalomra és a gazdaságra. Az SM-et a nemek közti különbségek jellemzik, amelyek befolyásolják a betegség súlyosságát és előfordulását. Konkrét kiváltó oka még nem teljesen tisztázott, azonban különböző környezeti, életmódbeli és epigenetikai tényezők hozzájárulhatnak a betegség kialakulásához.

A betegség pontos patomechanizmusa, valamint a neuro-axonális károsodás mögött meghúzódó különböző molekuláris és anyagcserefolyamatok nem teljesen tisztázottak, azonban az oxidatív stressz nagymértékben hozzájárul az SM progressziójához, neuronális és axon károsodást okozva. Fontos befolyásoló tényező továbbá az immunrendszer szabályozása és működési zavara, a gyulladást elősegítő és gátló citokinek egyensúly zavara, a vér-agy gát károsodása, valamint a gliasejtek aktivációja. A perifériás T- és B-immunsejtek, valamint a makrofágok központi idegrendszeri beszűrődése, továbbá az asztrociták és mikroglia KIR-i reaktivitása a gyulladásos citokinek és a reaktív oxigénfajták túlzott termelődését idézi elő, ami a csökkent antioxidáns aktivitás mellett végső soron oxidatív stresszt eredményez. Kutatások alapján az oxidatív stressz és az immunrendszer által közvetített gyulladásos válaszok mellett egyéb neurodegeneratív folyamatok is hozzájárulnak az SM patogeneziséhez és progressziójához. A jelenleg rendelkezésre álló kezelések a betegségmódosító terápiákkal a betegség aktivitásának csökkentésére, a rohamok kezelésére és a tünetek enyhítésére összpontosítanak. A betegség kezelésére jelenleg immunmoduláló, immunszuppresszáns valamint immunrekonstitúciós terápiák állnak rendelkezésre.

A cuprizon (CPZ) toxin által kiváltott demielinizációs állatmodell kiválóan alkalmas a SM patomechanizmusának tanulmányozására. A CPZ toxin egy rézkelátképző szer, amely szelektíven indukálja az érett oligodendrociták apoptózisát. A CPZ befolyásolja a mitokondriális légzési lánc működését a komplexek gátlásával. Azonban a mérgezés okozta érett oligodendrocita sejthalál nem egyenletesen oszlik el a KIR-ben, kiterjedt demielinizációt figyeltek meg a corpus callosum, a kéreg, a striátum, a hippocampus és a kisagy területén,

valamint korlátozott mértékben, az agytörzsben és a gerincvelőben is. CPZ kezelés során megindul az oligodendrocitózis, ezt követően pedig a mikroglia, makrofág és asztrocita aktiváció. A toxin kezelés megszüntetését követően viszont egy gyors regeneráció következik be, mikor is remielinizáció során az oligodendrocita progenitor sejtekből érett oligodendrociták képződnek, s a gliózis is fokozatosan megszűnik.

A CPZ modell alkalmas a SM progresszív formájában szerepet játszó mögöttes mechanizmusok vizsgálatára és teljes feltárására, mely folyamatok függetlenek az adaptív immunsejtek KIR-be való beszivárgásától. Ezek a demielinizációs folyamatok során tapasztalt hasonlóságok, valamint a remielinizációs fázis elemzése, mely könnyen befolyásolható a toxin kezelés hosszával, teszi előnyössé és relevánssá a CPZ modellt a SM patomechanizmusának vizsgálatára.

A triptofán (TRP), mint esszenciális aminosav, jelentős mértékben, körülbelül 95% -ban, a kinurenin útvonalon (KP), míg kisebb százalékban a szerotonin útvonalon keresztül metabolizálódik. A TRP anyagcsereje összefüggésbe hozható az idegrendszer működésével, továbbá a gyulladásos és az immunrendszeri folyamatokkal. A TRP lebomlása során különféle neuroaktív metabolitok képződnek. A KP-ban számos rendellenességet figyeltek meg különböző neurodegeneratív betegségekben, többek között SM-ben is.

Célkitűzések

A CPZ toxin által kiváltott SM rágszáló modell sikeres beállítását követően, terveink között szerepelt a TRP, szerotonin, L-kinurenin valamint a kinurénsav (KYNA) metabolitok koncentrációjának vizsgálata a TRP lebontás szerotonin és kinurenin útvonalában.

Az ebből született eredményeink alapján, vizsgálatunk további célja a TRP lebontás kinurenin útvonalában részt vevő metabolitok részletes feltérképezése volt a CPZ kezelés demielinizációs és felépülési szakaszában.

Anyagok és módszerek

Állatok

Vizsgálataink során, nyolc hetes hím C57Bl/6J törzsű egereket alkalmaztunk ($n = 224$). Az állatokat standard laboratóriumi körülmények között tenyésztettük és tartottuk 12–12 óra sötét/világos ciklus mellett, 24 ± 1 °C-on, valamint 45–55% közötti relatív páratartalom mellett a Szegedi Tudományegyetem Neurológiai Klinika Állatházában. A vizsgálatok az

Állatkísérletek Etikai Kódexében foglaltak szerint zajlottak, melyet a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Etikai Bizottsága és a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatala az XI/1101/2018 számú engedéllyel hagytak jóvá. Az állatokat polikarbonát ketrecekben (530 cm³ alapterületű) helyeztük el 4-5 fős csoportokban. A kísérletek megkezdése előtt minden állatot 2 héten keresztül hozzászoktattuk a por formájú standard rágcsálótáphoz, és minden másod napon testsúlymérést végeztünk, így követve az egerek egészségi állapotát az akklimatizáció során. Továbbá vizsgálataink teljes ideje alatt, a CPZ kezelés demielinizációs időszakában, valamint a felépülés szakaszban is folyamatosan ellenőriztük az állatok testsúlyát, minden második napon.

Kezelés

Vizsgálatainkban, az állatok fele, mint CPZ-kezelt csoport 0.2% CPZ toxint tartalmazó táplálékot kapott 5 héten keresztül standard rágcsáló tápba keverve, por formában, valamint ivóvízhez való szabad hozzáféréssel. A kontrol csoporthoz (CO) a toxin kezelt állatokkal nemben, korban és testsúlyban megegyező állatokat használtunk fel, amelyek standard rágcsáló táppal táplálkoztak szintén por formában és vízhez való szabad hozzáféréssel rendelkeztek. Az 5 hétig tartó CPZ kezelés végén (demyelinizációs időszak) a CPZ toxin kezelt és kontrol csoport állatainak felét véletlenszerűen kiválasztva termináltuk, a túlélő állatok pedig egy 4 hetes felépülési időszakban (remielinizációs fázis) vettek részt. Ezen időszak végén a fennmaradt állatokat szintén termináltuk és feldolgoztuk, mintanyerés céljából. A vizsgálat során a demielinizációs és remielinizációs időszak végén viselkedési tesztek végeztünk.

Magatartásvizsgálati elemzések

Az állatok mozgásmintázatának elemzésére ú.n. open field tesztet használtunk, míg a CPZ toxin kezelés motoros funkciókra gyakorolt hatásának meghatározására rotarod vizsgálatot alkalmaztunk a kezelt és kontrol csoport minden állatán.

A magatartás elemzéseket a CPZ mérgezés 3., 4. és 5. hetében valamint a felépülés időszak 3. és 4. hetében végeztük el hetente egyszer, ugyan azokon a napokon.

Immunhisztokémiai vizsgálatok

Immunhisztokémiai elemzéseink során, anti-gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) festést alkalmaztunk az asztrocita reaktivitás vizualizálására, valamint anti-mielin bázikus fehérje (MBP) festést a mielin kimutatására. Továbbá a mielin károsodást a luxol gyors kék- krezil ibolya (LFB/CV) festéssel is értékeltük. Az asztroglíózis mennyiségi meghatározását a corpus

callosum területén megtalálható GFAP-immunpozitív sejtek manuális sejtszámolásával végeztük. A myelin tartalmat pedig a MBP és LFB/CV festést követően intenzitásméréssel határoztuk meg.

Bioanalitikai mérések

A nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) méréshez a plazma és agymintákat kicsapással fehérjementesítettük korábbi leírások alapján. A mozgófázis minden esetben 200 mM cink-acetát oldat volt, a plazmánál 6.2-es pH-n, míg az agyszövetek esetében 5.8-on, 5%-os acetonitrile végkoncentrációval.

Az ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia tandem tömegspektrometriás (UHPLC-MS/MS) elemzéshez a plazmamintákat vizes hangyasavval (FA) és jéghideg aceton–MeOH tartalmú SIL-IS keverékkel kevertük össze, majd a felülúszóval dolgoztunk tovább. Az agyminták esetében, az 5 különböző agyterület tömegének meghatározását követően, az adott tömeghez viszonyítva háromszoros mennyiségű jégűtött LC-MS vízben homogenizáltuk. Ezt követően ugyanazokat a lépéseket végeztük el, mint a plazma minták esetében, azzal a különbséggel, hogy a kicsapás 100%-os acetonitrillel történt. Ezután a plazmamintákat és az agyrégiókat UHPLC-MS/MS segítségével mértük már korábban publikált módszer alapján.

Statisztikai elemzések

A testtömegek statisztikai elemzéséhez két-utas ismételt méréses ANOVA-t alkalmaztunk. A szövettani vizsgálatokhoz egy-tényezős varianciaanalízist (ANOVA), majd az adatok varianciáitól függően Sidak vagy Tahmane féle T2 post hoc tesztet használtunk. A csoportátlagok páronkénti összehasonlítása a becült határátlagokon alapult Sidak vagy Tahmane féle T2 post hoc tesztjével, többszörös összehasonlítás kiigazításával. A csoportértékeket átlag \pm SEM-ként adtuk meg, az elemzéseket pedig SPSS Statisztikai szoftverrel végeztük. A HPLC méréseket illetően, ha az eloszlás (Shapiro–Wilk test) Gauss-féle volt és a szórások egyenlőek voltak (Levene test) akkor a páronkénti összehasonlításhoz ANOVA-t alkalmaztunk Tukey HSD post hoc tesztel, egyébként Kruskal-Wallis tesztel, Wilcoxon post hoc tesztet használtunk. Az adatokat mediánként ábrázoltuk (1–3. kvartilis). Az UHPLC-MS/MS mérésekkel kapcsolatban a feltételek ellenőrzése (kiugró értékek ellenőrzése, Shapiro és Levene tesztek) után két-utas ANOVA-t végeztünk becült hatérték post hoc tesztekkel, hogy meghatározzuk a kezelési csoportok közötti szignifikanciát, a mérési időket és azok kölcsönhatását. Abban az esetben, ha a feltételek nem teljesültek, post hoc tesztként Sheirer–Ray–Hare tesztet alkalmaztunk Dunn post hoc tesztel. A többszörös összehasonlításból származó I. típusú hibákat Bonferroni módszerrel ellenőriztük. A

nullhipotéziseket elvetettük, ha a korrigált p érték < 0.05 volt, és ilyen esetekben a különbségeket szignifikánsnak vettük.

Eredmények

I. A TRP metabolizmusának elemzése CPZ toxin által kiváltott demielinizációs rágszáló modell beállítását követően.

Vizsgálataink során már a CPZ kezelés harmadik napján szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a CPZ toxin kezelt csoport testtömegében a CO csoporttal összehasonlítva ($***p < 0.001$). Azonban a csoportok közötti különbség a felépülési szakaszban eltűnt.

Az 5 hetes CPZ kezelés továbbá kiterjedt mielin károsodást okozott a corpus callosumban a demielinizációs periódus végén, amit a MBP ($**p < 0.01$) és LFB/CV ($*p < 0.05$) festéssel elemeztünk. A GFAP immunfestés jelentős asztrogliózist mutatott a corpus callosum területén a CPZ kezelt állatok esetében a kontrol csoporthoz képest, a demielinizációs és remielinizációs fázisban egyaránt ($***p < 0.001$).

A HPLC mérések során, a kezelési időszak végén a KYNA koncentrációjában jelentős mértékű csökkenés volt tapasztalható a toxin kezelt állatok plazmájában ($***p < 0.001$), hipocampusában ($*p < 0.05$) és kérégében ($**p < 0.01$), mely eltérések a felépülési időszak 4. hetére teljesen megszűntek a csoportok között.

II. A TRP metabolizmus kinurenin útvonalában szereplő metabolit koncentrációk feltérképezése a CPZ-indukált rágszáló modellben

CPZ kezelés során jelentős mértékű csökkenés volt megfigyelhető a toxin kezelt állatok testtömegében a kontrol állatokkal összehasonlítva ($***p < 0.001$). A remielinizációs időszak alatt viszont ez a különbség csökkenő tendenciát mutatott és a felépülés végére teljesen megszűnt a csoportok között.

A LFB/CV festéssel végzett immunhisztokémiai elemzéseink során a CPZ mérgezés jelentős mielin károsodást okozott a corpus callosum területén a kezelés 3. hetében ($**p < 0.01$), és a demielinizáció még kiterjedtebbé vált a toxin kezelés 5. hetére ($***p < 0.001$). A felépülési szakasz 2. hetén azonban már nem volt mielin károsodás jele fellelhető a vizsgált agyszeleteken.

Az UHPLC-MS/MS bioanalitikai méréssel végzett vizsgálataink során, a CPZ kezelés 1. hetében jelentős csökkenést tapasztaltunk a plazma minták KYNA (*****p < 0.001**), 3-hidroxi-kinurenin (3-HK) (***p < 0.05**) és xanturénsav koncentrációjában (XA) (*****p < 0.001**), mely eltérések az intoxikáció végéig fennálltak, míg a CPZ kezelés 5. hetében a KYNA (****p < 0.01**), 3-HK (*****p < 0.001**) és XA (*****p < 0.001**) mellett, a plazma TRP (****p < 0.01**) és antranilsav (ANA) (*****p < 0.001**) koncentrációjában is eltérések voltak fellelhetők a CPZ kezelt és CO csoportok között. Ezek a koncentráció eltérések azonban a felépülés 2. hetére teljesen megszűntek, miközben az említett metabolitok szintje mindkét csoportban azonos tartományban mozgott a gyógyulási időszakban.

Az agyi régiók vizsgálatát tekintve, a CPZ mérgezés jelentős mértékű 3-HK (*****p < 0.001**) és ANA (*****p < 0.001**; ****p < 0.01**) csökkenést okozott a striátum, kéreg, hippocampus és agytörzs területén a toxin kezelt csoportban. Emellett, a kezelés hatására emelkedett TRP szint volt látható a CPZ kezelt állatok striátum (*****p < 0.001**), kéreg (*****p < 0.001**) és hippocampus (****p < 0.01**) agyrégióiban a demielinizációs időszak végén.

Megbeszélés

Az elmúlt évtizedekben az SM-et és annak CPZ toxin által kiváltott demielinizációs állatmodelljét széleskörben kutatták. A TRP metabolizmusa és annak KP-a azonban mindeddig nem állt a kutatások középpontjában CPZ indukált rágcsáló modellben.

Kutatócsoportunk elsőként számolt be a KP eltéréseiről CPZ egér modellben, mely alkalmas az SM progresszív formájának modellezésére, mivel a mérgezés okozta károsodások fő kórszöveti megjelenése nagymértékben hasonlít a SM III-as és IV-es típusú lézió mintázatának elváltozásaihoz, melyet demielinizáció, oligodendrocita apoptózis, valamint mikroglia és makrofág aktiváció jellemez.

A CPZ toxin által kiváltott demielinizációs állatmodellben bioanalitikai mérésekkel részletesen megvizsgáltuk a TRP lebontását, az anyagcseréje során keletkező különböző metabolitok szintjét, ezáltal feltérképeztük a TRP, szerotonin és egyes kinurenin metabolitok eloszlását a plazma mintákban és a különböző agyi régiókban, beleértve a mérgezés okozta károsodás által leginkább érintett területeket; továbbá a CPZ kezelés okozta eltéréseket a demielinizációs fázisban, valamint a remielinizáció során a felépülési időszakban. A modellben végzett vizsgálataink során már a kezelés kezdetén jelentős mértékű testtömeg különbséget tapasztaltunk a CPZ kezelt és a CO csoportok között, mely eltérés a

demielinizációs periódus végéig fennállt, majd a felépülési időszakban eltűnt és a két csoport testtömege azonos tartományban mozgott a vizsgálat végén. A magatartásvizsgálati elemzéseink nem mutattak ki eltérést a csoportok között. Az immunhisztokémiai elemzéseink azonban jelentős mértékű demielinizációt és asztrocita aktivációt mutattak a CPZ kezelt csoportban a mérgezés 5. hetében a CO csoporttal összehasonlítva. Az agyi régiók és plazmaminták HPLC technikával végzett elemzése során a CPZ kezelt csoport plazmájában, hippocampusában valamint kérgében a kezelés hatására markáns KYNA koncentráció csökkenést figyeltünk meg, mely eltérések a gyógyulási időszakban teljesen megszűntek, s a metabolit szintek mindkét csoport esetében ugyanabban a tartományba kerültek.

A szakirodalmi adatokkal összhangban lévő szövettani eredményeink, valamint a HPLC mérési adataink arra sarkalltak bennünket, hogy részletesen megvizsgáljuk, hogyan változik a TRP metabolikus útja a CPZ kezelés hatására, valamint annak megvonását követően. A toxin kezelés különböző időpontjaiban gyűjtött minták lehetővé tették a mielin károsodás mértékének és a TRP lebontás szerepet játszó metabolitok koncentráció változásának nyomon követését.

Az intoxikáció okozta szövettani károsodás elemzése alkalmával a kezelés 1. hetében nem volt látható eltérés a mielintartalomban a csoportok között. A mérgezés 3. hetében viszont jelentős mielin károsodást tapasztaltunk a CPZ kezelt csoportban, ami a mérgezés 5. hetétől még markánsabbá vált és súlyos demielinizációvá fejlődött a corpus callosum területén, mely állapotot jelentős és súlyos mielin és axon károsodás, valamint kiterjedt asztroglózis és mikroglózis jellemez.

A bioanalitikai mérésekhez UHPLCMS/MS analízist alkalmaztunk a TRP lebontásban szereplő metabolitok feltérképezésére. Már a CPZ kezelés kezdetén eltérést tapasztaltunk a plazma minták KYNA, XA és 3-HK koncentrációjában, mely különbségek a mérgezés végéig fennálltak, kiegészülve a TRP és ANA szintben látható különbségekkel a CPZ kezelt csoportban, mely csoportok közötti eltérések a felépülési fázisban eltűntek. Vizsgálatainkban a CPZ-mérgezés előre haladtával, az egyre kifejezettebb demielinizáció mellett, a testtömegben és a kinurenin metabolitok megoszlásában is eltéréseket figyeltünk meg, mely különbségek a gyógyulási szakaszban gyorsan eltűntek, ami a remielinizáció hatékonyságára utal. Nem beszélve az agyi régiók vizsgálatánál az ANA, 3-HK és TRP koncentrációk eltéréséről a demielinizációs fázisban, illetve a koncentrációk normalizálódásáról a felépülési periódusban.

Vizsgálatunk során a 3-HK és ANA szintjének jelentős csökkenését, valamint a TRP metabolit koncentrációjának növekedését figyeltük meg a toxinnal kezelt csoport bizonyos agyi régióiban, beleértve a striátumot, hippocampust, kérget és az agytörzset, mely területeket a szakirodalom súlyosan demielinizált agyrégióként említ CPZ mérgezés alatt.

Jelen tanulmányunkban megerősítettük a TRP lebontás metabolikus útvonalának szerepét a CPZ rágcsáló modellben. A KP eltérései és egyes metabolit koncentrációk változásai alapján azonban további kérdések merülnek fel ezen eltolódások háttérében meghúzódó mechanizmusokat illetően. Előfordulhat, hogy a CPZ mérgezés befolyásolja a KP bizonyos enzimeinek működését, ezáltal szabályozva a metabolitok koncentrációját, vagy egyes neuroprotektív metabolitok jótékony hatásuk miatt elhasználnának, ezáltal csökkentve a károsodás mértékét és elősegítve a remielinizáció folyamatát, de kompenzációs mechanizmus is felléphet a háttérben, vagy talán ezektől teljesen eltérő folyamatok. Mindazonáltal a TRP metabolikus lebomlásának pontos szerepe és hatása a CPZ demielinizációs modellben további kutatásokkal felderíthető.

Összességében elmondható, hogy kutatásunk során a HPLC és UHPLC-MS/MS bioanalitikai méréseink során a CPZ-vel kezelt csoport plazma KYNA, 3-HK, XA és ANA koncentrációiban jelentős mértékű csökkenést, míg a TRP szintben egy markáns növekedést tapasztaltunk toxin mérgezés következtében. A HPLC elemzéssel kapott csökkent KYNA koncentrációt az említett agyi régiókban nem tudtuk reprodukálni. Ennek egyik lehetséges oka vizsgálataink során alkalmazott eltérő bioanalitikai módszerek. Mindazonáltal a CPZ mérgezés eredményeként a 3-HK és ANA szintjének jelentős csökkenése volt megfigyelhető számos agyi régióban, beleértve a striátum, hippocampus, kéreg valamint az agytörzs területét, míg a TRP koncentrációja jelentősen megemelkedett a CPZ kezelés hatására a toxin kezelt állatok striátumában, hippocampusában és kérgében a kontrol csoporthoz képest.

Következtetések

A CPZ toxin által kiváltott demielinizációs állatmodellben végzett vizsgálatunk volt az első, amely teljes részletességgel számolt be a progresszív demielinizáció során bekövetkező TRP lebontás kinurenin metabolit profiljáról.

Az alapvető szövettani vizsgálatokon, magatartási és fizikai állapotfelmérésen kívül feltártuk a kinurenin metabolitok megoszlását a CPZ mérgezés okozta károsodási folyamatokban a vér- vagy gát mindkét oldalán, majd rávilágítottunk a remielinizációs képesség hatékonyságára a TRP anyagcsere területén.

Kutatási eredményeink kiindulópontként szolgálhatnak további vizsgálatok elvégzéséhez, amelyek segítségével még közelebb kerülhetünk a károsodást okozó folyamatok és a TRP lebontását összekötő mechanizmusok megértéséhez, hogy milyen szerepet tölthetnek be egyes metabolitok a károsodás létrejöttében, s hogyan befolyásolják a demielinizációs vagy remielinizációs folyamatokat. Továbbá ezen folyamatok tanulmányozásával egy átláthatóbb képet kaphatunk és közelebb kerülhetünk az SM patomechanizmusának felderítéséhez.

A közeljövőben pedig az egyes metabolitok mennyiségének szabályozása lehetséges terápiás eszközként szolgálhat a SM kezelésében, valamint potenciális célpontja lehet a gyógyszerkutatásnak. A kutatás tehát alapul szolgálhat olyan mesterségesen szintetizált, új támadáspontokkal rendelkező vegyületek létrehozásához, amelyek új terápiás lehetőségeket jelenthetnek a SM kezelésében.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt végtelen köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek Vécsei László Professor Úrnak és Dr. Rajda Cecíliának személyes útmutatásukért, szakmai javaslataikért, folyamatos támogatásukért, valamint hogy hallgatói éveim alatt formálták az általános nézetem a tudományos kutatásról és felbecsülhetetlen értékű tanácsokat adtak.

Köszönetet szeretnék mondani Klivényi Péter Professor Úrnak, hogy lehetőséget és háttérrel biztosított a kutatási tevékenységemhez.

Kollégáim részéről ezúton szeretném kifejezni hálámat Dr. Veréb Edina Katalinnak, hogy megtanított a kutatási problémák meghatározására és megoldására, a folyamatos támogatásokért, bátorításokért és baráti tanácsaiért.

Szeretnék köszönetet mondani továbbá munkatársaimnak, akikkel a kutatómunkát együtt végeztem, Horváth Orsolyának, Martos Diánának és Dr. Nánási Nikolettnek a támogatásokért, beszélgetésekért és a munkám során nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom munkatársaimnak Dr. Galla Zsoltnak, Dr. Fülöpné-Bohár Zsuzsannának, Dr. Zádori Dénesnek és Dr. Veres Gábornak hogy segítették kutatómunkám és hasznos tanácsokkal láttak el.

Köszönetemet fejezem ki továbbá Ivánkovitsné Kiss Orsolyának és Fülöp Krisztinának az értékes szakmai segítségükért és a laboratóriumi munka technikai részeinek bemutatásáért.

Köszönet illeti minden barátomat, akik mindig mellettem álltak és bátorítottak.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném kifejezni külön köszönetemet és végtelen hálámat szeretett családomnak a feltétel nélküli szeretetükért, folyamatos támogatásukért, hogy együtt örültek velem a sikereimnek, mindig hittek bennem és mellettem álltak az évek során.

Köszönöm továbbá az anyagi támogatásokat a GINOP-2.3.2-15-2016-00034, EFOP-3.6.1-16-2016-00008, a Nemzeti Kutatás, Fejlesztés és Innovációs Hivatal - NKFIH K138125, az ÚNKP-20/21/22/23-3 – az Innovációs és Technológiai Minisztérium – Új Nemzeti Kiválósági Programja a Nemzeti Kutatás, Fejlesztés És Innovációs Alap Forrásából, valamint az EFOP 3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 pályázatoknak. Kutatói éveim idején részben a Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola támogatott.