

# **SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**

Természettudományi és Informatikai Kar  
Biológia Doktori Iskola  
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

## **Neuroprotekciós lehetőségek kinureninekkal**

PhD értekezés

**Gellért Levente**

Témavezetők:

Dr. Kis Zsolt és Dr. Toldi József

egyetemi adjunktus egyetemi tanár

2013

Szeged

# 1. Tartalomjegyzék

|       |                                                                                 |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2     | <b>Rövidítések jegyzéke</b> .....                                               | 5  |
| 3     | <b>Bevezetés</b> .....                                                          | 7  |
| 3.1   | Az agyi iszkémia és a glutamát excitotoxicitás .....                            | 7  |
| 3.1.1 | Az agy vérellátási zavarai .....                                                | 8  |
| 3.1.2 | Az iszkémiás agyszövet károsodás nem excitotoxikus útja .....                   | 8  |
| 3.2   | Az NMDA receptor szerepe a glutamát excitotoxicitásban és neuroprotekcióban ... | 10 |
| 3.3   | A hippocampus szerepe a térbeli tájékozódás és tanulás kialakulásában .....     | 15 |
| 3.3.1 | Az NMDA receptor szerepe a tanulási folyamatokban .....                         | 16 |
| 3.3.2 | A hippocampus iszkémia érzékenysége .....                                       | 17 |
| 3.4   | A kinureninek szerepe a neuromodulációban .....                                 | 18 |
| 3.4.1 | A kinurenin útvonal .....                                                       | 18 |
| 3.4.2 | A kinurenin anyagcsere patológiás folyamatokban .....                           | 20 |
| 3.4.3 | A KYNA szerepe iszkémiában .....                                                | 21 |
| 3.4.4 | A KYNA magatartásra gyakorolt hatása .....                                      | 22 |
| 4     | <b>Célkitűzések</b> .....                                                       | 25 |
| 5     | <b>Anyagok és módszerek</b> .....                                               | 27 |
| 5.1   | Iszkémiás modellek .....                                                        | 27 |
| 5.1.1 | Négy ér elzárás (four-vessel occlusion, 4VO) .....                              | 27 |
| 5.1.2 | Középső agyi artéria elzárás (dMCAO) .....                                      | 28 |
| 5.2   | Hisztológiai feldolgozás .....                                                  | 28 |
| 5.3   | Magatartás vizsgálat .....                                                      | 30 |
| 5.3.1 | Morris Water Maze .....                                                         | 30 |
| 5.3.2 | Nyílt porond (OF) és sugár útvesztő (RAM) vizsgálat .....                       | 31 |
| 5.3.3 | Szkopolamin amnézia .....                                                       | 32 |
| 5.4   | Elektrofiziológia .....                                                         | 33 |
| 5.4.1 | <i>In vitro</i> mérések .....                                                   | 33 |

|       |                                                                              |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.4.2 | <i>In vivo</i> elektrofiziológia .....                                       | 34 |
| 5.5   | Statisztikai elemzés .....                                                   | 35 |
| 6     | <b>A kísérletekben való részvétel</b> .....                                  | 36 |
| 7     | <b>Eredmények</b> .....                                                      | 37 |
| 7.1   | A KYNA analóg neuroprotektív hatása teljes előagyi iszkémiában .....         | 37 |
| 7.2   | A KYNA analóg neuroprotektív hatása funkcionális vizsgálatokban .....        | 41 |
| 7.2.1 | A szinaptikus jelátvitel .....                                               | 41 |
| 7.2.2 | A szinaptikus potencírozódás indukciója .....                                | 42 |
| 7.3   | A KYNA analóg neuroprotektív dózisának hatása magatartásvizsgálatokban ..... | 44 |
| 7.3.1 | Morris Water Maze .....                                                      | 44 |
| 7.3.2 | Nyílt porond teszt (OF) .....                                                | 47 |
| 7.3.3 | Sugár útvesztő (RAM) .....                                                   | 48 |
| 7.3.4 | Szkopolamin amnézia .....                                                    | 51 |
| 7.4   | A dMCAO modell <i>in vivo</i> elektrofiziológiai jellemzése .....            | 53 |
| 7.5   | Az L-kinurenin szulfát (L-KYNs) hatása a dMCAO modellben .....               | 54 |
| 8     | <b>Megbeszélés</b> .....                                                     | 58 |
| 8.1   | A KYNA analóg neuroprotektív hatása teljes előagyi iszkémiában .....         | 58 |
| 8.1.1 | Hisztológiai vizsgálatok .....                                               | 58 |
| 8.1.2 | Funkcionális vizsgálatok - I/O görbék .....                                  | 59 |
| 8.1.3 | Funkcionális vizsgálatok - szinaptikus potencírozódás .....                  | 59 |
| 8.1.4 | Az analóg neuroprotektív hatékonysága utókezelésben .....                    | 60 |
| 8.2   | A KYNA analóg hatása memória tesztekben .....                                | 61 |
| 8.2.1 | Vízi útvesztő (MWM) .....                                                    | 61 |
| 8.2.2 | Nyílt porond teszt .....                                                     | 62 |
| 8.2.3 | Sugár útvesztő .....                                                         | 63 |
| 8.2.4 | Szkopolamin amnézia .....                                                    | 64 |
| 8.3   | Az L-kinurenin szulfát hatása fokális iszkémiában .....                      | 65 |

|    |                                  |    |
|----|----------------------------------|----|
| 9  | <b>Következtetések</b> .....     | 68 |
| 10 | <b>Köszönetnyilvánítás</b> ..... | 70 |
| 11 | <b>Irodalomjegyzék</b> .....     | 71 |
| 12 | <b>Összefoglalás</b> .....       | 80 |
| 13 | <b>Summary</b> .....             | 83 |
| 14 | <b>Függelék</b> .....            | 86 |

## 2. Rövidítések jegyzéke

|                  |                                                     |
|------------------|-----------------------------------------------------|
| 3-HK:            | 3-hidroxi kinurenin                                 |
| $\alpha$ 7nAChR: | $\alpha$ -7 nikotinos acetilkolin receptor          |
| Akt:             | Akt kináz, protein kináz B                          |
| AMPA:            | alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propion sav |
| APV:             | AP5, d-2-amino-5-foszfonovalerián sav               |
| BAD:             | Bcl2-associated death promoter                      |
| BAX:             | Bcl-2-associated X protein                          |
| BIM:             | bcl-2 interacting mediator                          |
| CREB:            | cAMP response element-binding protein               |
| DAPI:            | 4',6-diamidino-2-fenilindol                         |
| DA:              | dopamin                                             |
| dMCAO:           | distális középső agyi artéria elzárás               |
| EPSC:            | excitatórikus posztzinaptikus áram                  |
| EPSP:            | excitatórikus posztzinaptikus potenciál             |
| ERK:             | extracellular signal-regulated kinase               |
| ESBA:            | etil-szulfonil benzoilalanin                        |
| Fas-ligand:      | apoptózis stimuláló fragment                        |
| fEPSP:           | excitatórikus posztzinaptikus mezőpotenciál         |
| FJ-C:            | Fluoro Jade C                                       |
| FOXO:            | Forkhead Box Protein O                              |
| GABA:            | gamma aminovajsav                                   |
| Glu:             | L-glutamát                                          |
| Gly:             | glicin                                              |
| IDO:             | indolamin -2,3 dioxigenáz                           |
| ip:              | intraperitoneális                                   |
| KATI:            | kinurenin aminosztransferáz I.                      |
| KATII:           | kinurenin aminosztransferáz II.                     |
| KCC2:            | kálium klorid kotranszporter 2                      |
| KMO:             | kinurenin monooxigenáz                              |
| KYN:             | L-kinurenin                                         |
| KYNA:            | kinurénsav                                          |
| L-KYNs:          | L-kinurenin szulfát                                 |

|                     |                                                          |
|---------------------|----------------------------------------------------------|
| LTP:                | long-term potentiation; hosszú távú potencírozódás       |
| MCU:                | mitokondriális $\text{Ca}^{2+}$ uniporter                |
| mitAAT:             | mitokondriális aszpartát amino transzferáz               |
| MK801:              | dizocilpin                                               |
| NAD:                | nikotinsavamid-adenin dinukleotid                        |
| NDS:                | normál számárszérum                                      |
| NFI:                | nagyfrekvenciás ingerlés                                 |
| NMDA:               | N-metil-D-aszpartát                                      |
| nNOS:               | neuronális nitrogén oxid szintáz                         |
| NO:                 | nitrogén monoxid                                         |
| OF:                 | Open Field, nyílt porond                                 |
| ONOO <sup>-</sup> : | peroxinitrit                                             |
| p53:                | tumor protein 53                                         |
| PCP:                | fenciklidin                                              |
| PI3K:               | foszfatidil inozitol 3 kináz                             |
| QUIN:               | kvinolénsav                                              |
| RAM:                | Radial Arm Maze, sugár útvesztő                          |
| STP:                | short-term potentiation; rövid távú potencírozódás       |
| SWR:                | sharpe-wave ripple                                       |
| TDO:                | triptofán dioxigenáz                                     |
| TRPM:               | transziens receptor potenciál melasztatin (ion csatorna) |
| Tx100:              | triton x100                                              |

## 3. Bevezetés

### 3.1 Az agyi iszkémia és a glutamát excitotoxicitás

Magas energia igényének köszönhetően az agyszövet a glükóz és oxigén ellátás csökkenésére különösen érzékeny. A kifejlett agyszövet neuronális elemei nem rendelkeznek raktározott tápanyaggal, a tápanyagraktárként szolgáló glikogént a neuronokban csak az embrionális életszakaszban és a születés után rövid ideig találjuk meg. A gliális elemek közé tartozó asztrociták ugyanakkor az egyedfejlődés későbbi szakaszában is képesek glikogén raktározására (Brown és Ransom, 2007), a tápanyag ellátás hiányára tehát kevésbé érzékenyek. Az idegszövet energia felhasználásának legnagyobb része a sejtek ionháztartásának fenntartására fordítódik, hiszen az idegsejtek és gliális elemek nyugalmi potenciáljának fenntartása illetve visszaállítása az idegrendszer működésének alapvető feltétele. A tápanyag és oxigén ellátás csökkenése rövid idő alatt a sejtek ATP tartalmának csökkenéséhez, az ATP -függő transzporterek és pumpák működési zavarához, végül az ionháztartás felborulásához vezet. A preszinaptikus terminálisok transzmitter kibocsátása a végződések megváltozott  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Na}^{+}$  koncentrációjától erősen függ (Sudhof, 1995, Annunziato és mtsai., 2004, Torok, 2007). Ilyen módon az oxigén/glükóz hiány szabályozatlan transzmitter ürülés/visszavétel kialakulásához vezet. Az iszkémiás állapot során a legnagyobb jelentőségű az idegvégződésekből nagy mennyiségben felszabaduló két neurotranszmitter, a glutamát (Glu) és a glicin (Gly).

A Glu a központi idegrendszer legfontosabb serkentő neurotranszmittere, koncentrációja a teljes agyszövetben megközelítőleg 10mM. Az extracelluláris tér Glu koncentrációja ugyanakkor csak 0,6  $\mu\text{M}$  körüli érték (Lipton és Rosenberg, 1994). A Glu legnagyobb része tehát az idegsejtek végződéseiben, vezikulumokban raktározva található. Fontos megjegyezni, hogy - pl. hippokampális piramissejtek vagy idegsejt tenyészetek esetében- 2-5  $\mu\text{M}$  Glu koncentráció már toxikus, a sejtek degenerációjához vezet. Könnyen belátható, hogy a nagy extra- és intracelluláris koncentráció különbség miatt a Glu kontrollálatlan felszabadítása rövid idő alatt a toxikus koncentráció kialakulásához vezet (Lipton és Rosenberg, 1994).

A Glu excitotoxicitás jelenségét Lucas és Newhouse írta le először az 1950-es években. Kísérletükben a szubkután adagolt L-Glu szelektív károsodást okozott a retina

ganglionsejtjeiben (Lucas és Newhouse, 1957). Az excitotoxicitás kifejezést hasonló kísérleti eredményei alapján a későbbiekben Olney használta először (Olney, 1969).

A folyamat részletes leírására és az iszkémiás állapotban az idegvégződésekből felszabaduló Gly jelentőségére az NMDA receptorokkal foglalkozó fejezetben térünk ki részletesen.

### **3.1.1 Az agy vérellátási zavarai**

Excitotoxikus extracelluláris Glu koncentráció a központi idegrendszer heveny és idült bántalmai során egyaránt kialakulhat. Az értekezés szempontjából a heveny vérellátási zavarok nyomán kialakuló tápanyag és oxigén hiány valamint a következményes excitotoxicitás a jelentős, ezért a krónikus, neurodegeneratív megbetegedésekben és az agyszövet mechanikus sérülése nyomán kialakuló hasonló folyamatokat nem tárgyaljuk.

Az iszkémiás folyamatokat a sértett terület nagysága és az iszkémia időtartama, valamint a vérellátási zavart kiváltó okok alapján csoportosíthatjuk. Teljes (globális) iszkémia vagy hipoperfúzió alakulhat ki az agyat ellátó nagy artériák elzáródásakor, a szív elégtelen pumpafunkciója következtében, vészes vérveszteség vagy vérnyomás esés kapcsán, illetve a szívműködés spontán vagy művi felfüggesztésekor. A vérellátási zavar ilyen esetekben az agyszövet egészét érinti, az iszkémiás károsodás az adott területek érzettségétől és iszkémia érzékenységétől függ. Fokális iszkémiáról beszélünk, ha adott agyterület vérellátása csökken vagy megszűnik. Átmeneti iszkémiát említünk, ha a vérellátási zavar bizonyos idő elteltével megszűnik, reperfúzió illetve rekanalizáció következik be. Állandósult iszkémia esetén a vérellátási zavar tartós. A vérellátási zavar kialakulása szempontjából megkülönböztetünk továbbá vérzéses (haemorrhágiás) és iszkémiás stroke-ot (szélütés). Előbbi esetben koponyaűri vérzés, utóbbi esetében kisebb agyi artéria, arteriola elzáródása vagy görcse vezet iszkémiához (lásd az összefoglaló munkát: (Endres és Dirnagl, 2002).

### **3.1.2 Az iszkémiás agyszövet károsodás nem excitotoxikus útja**

Bár az iszkémiás agyszövet károsodás központi mechanizmusa a Glu excitotoxicitás, a sértés kialakításában számos, az ionháztartás zavarából adódó ún. nem Glu-erg folyamat is szerepet játszik. Ezek megismerése nem csak a mechanizmus tisztázása, hanem új terápiás célpontok kijelölése szempontjából is fontos lehet.

### 3.1.2.1 Tranziens receptor potenciál melasztatin (TRPM) csatornák

A TRPM2 receptor a központi idegrendszerben általánosan elterjedt, számos sejttípusban kifejeződik,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  és más mono- és bivalens kationok számára is átjárható. A receptor aktiválását számos, az iszkémiás állapotban megjelenő faktor kiválthatja, így a hidrogén peroxid, az arachidonsav, a reaktív oxigén és hidrogén gyökök, a tumor nekrosis faktor és az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  felszaporodása. A receptorok aktiválódása az iszkémiában amúgy is magas intracelluláris  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  szintet tovább növeli, pozitív visszacsatoló működésével a kóros depolarizációt fokozza (Moskowitz és mtsai., 2010, Tymianski, 2011).

A TRPM7 receptorok szintén általánosan expresszálódó, aktivátoruk és áteresztő képességük szempontjából az előbbihez hasonló csatornaképző receptorok. A  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  ionok mellett  $\text{Zn}^{2+}$  és  $\text{Mn}^+$  ionok számára is átjárhatók. Mindkét receptor típus jelentős szerepet játszhat az iszkémiás neurodegeneráció nem excitotoxikus útjának kialakításában. A receptorok genetikai, vagy farmakológiai manipulálása ugyanis a Glu receptorok gátlásához hasonló mértékű szövettani, funkcionális és viselkedési szinten is megmutatkozó neuroprotektív képességet mutat kísérletes iszkémiában (Moskowitz és mtsai., 2010, Tymianski, 2011).

### 3.1.2.2 Sav-érzékeny csatornák

Az iszkémia egyik következménye az extracelluláris tér pH értékének csökkenése. Savanyú közegben az NMDA receptorok érzékenysége csökken, ez a savasodás kedvezőtlen hatásait valamelyest mérsékli. A savasodás mellett a megnövekedett tejsav és arachidonsav koncentrációra és a csökkent extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációra reagálnak a  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  ionok számára átjárható sav-érzékeny csatornák. Így a Glu és TRPM receptorok mellett a sav-érzékeny csatornák megnyílása jelenti a kóros  $\text{Ca}^{2+}$  szint és depolarizáció további, a Glu excitotoxicitástól független forrását. Neuronális kultúrában a pH érték csökkentése a Glu receptortól független  $\text{Ca}^{2+}$  beáramláshoz és neurodegenerációhoz vezet. A csatornák szelektív gátlása ebben az esetben is neuroprotektív (Moskowitz és mtsai., 2010, Tymianski, 2011).

## 3.2 Az NMDA receptor szerepe a glutamát excitotoxicitásban és neuroprotekcióban

### 3.2.1.1 Az NMDA receptor működése, felépítése és elhelyezkedése

Az NMDA típusú Glu receptor az ionotróp Glu receptorok közé tartozik, nevét a mesterséges, nagy affinitású agonistájáról kapta (N-metil-D-aszpartát). A receptor  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  és  $\text{Ca}^{2+}$  ionok számára egyaránt átjárható, de a fiziológiás és patofiziológiás folyamatokban betöltött kitüntetett szerepe  $\text{Ca}^{2+}$  áteresztő képességéhez kapcsolódik. A receptor az idegrendszer fejlődésében, a kifejezett idegrendszerben pedig a plasztikus folyamatokban, a tanulás és memória kialakulásában és az endogén neuroprotekcióban is nélkülözhetetlen szerepet játszik (Hardingham, 2009). Bár a Glu-erg transzmisszió maga serkentő folyamat, az NMDA receptor a GABA-erg gátló sejtek „meghajtásán” keresztül a gátló folyamatok szabályozásában is részt vesz (Gunduz-Bruce, 2009). Az NMDA receptor különlegességét az AMPA és kainát receptoroktól eltérő több sajátosságának köszönheti. Aktiválódásához, vagyis a csatorna nyílásához a Glu kötődése mellett a Gly vagy D-szerin kötődése is szükséges (Papouin és mtsai., 2012). Emellett a nyugalmi membrán potenciál értéken a csatornát  $\text{Mg}^{2+}$  ionok zárják el, a blokád csak a membrán depolarizációjakor (feszültség-függő  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákon keresztül) szűnik meg. Vagyis az NMDA receptor feszültség és (kettős) ligand-függő egy időben. A receptort ezek a sajátosságai teszik képessé a -szinaptikus plaszticitás szempontjából elengedhetetlen- ún. koincidencia detekcióra. A receptor nagy  $\text{Ca}^{2+}$  áteresztő képessége nem csak az idegsejt depolarizációját idézi elő, hanem számtalan  $\text{Ca}^{2+}$ -függő szignalizációs útvonalat is befolyásol.

Az NMDA receptor a központi idegrendszerben a neuronok mellett az asztrocitákon, oligodendrocitákon és mikrogliaon is megtalálható (Verkhratsky és Kirchhoff, 2007, Kaindl és mtsai., 2012). A receptor heterotetramer, két Gly/D-szerin kötő NR1 és két Glu kötő NR2 alegységből áll. Az NR1 alegység minden receptorban megtalálható, ez a működésének feltétele, az NR2 alegység pedig változatos formában (NR2A-D) van jelen. Az NR2 alegységet egyes esetekben az NR3A vagy B alegység helyettesíti. Az eltérő alegység összetételhez eltérő funkció és farmakológiai sajátosság tartozik (Hardingham, 2009).

A receptor elhelyezkedését tekintve posztzinaptikus, ezen belül különbséget tehetünk szinaptikus, periszinaptikus és extraszinaptikus NMDA receptorok között (Petrálie és mtsai., 2010).

### 3.2.1.2 Az NMDA receptor szerepe a glutamát excitotoxicitásban

Az NMDA receptor a Glu excitotoxicitás központi szereplője. Az iszkémiás állapotban kialakuló magas extracelluláris Glu koncentráció, a szinaptikus terminálisokból felszabaduló Gly (Fuchs és mtsai., 2012), a posztzinaptikus depolarizáció és az NMDA receptorok inkomplett deszenzitizációja toxikus intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedéshez vezet. A magas  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció apoptózishoz, végül sejthalálhoz vezető intracelluláris folyamatokat indít el.

A mitokondrium zavartalan működése a sejt energetikai és redox folyamatai szempontjából kritikus jelentőségű. Iszkémiás állapotban a mitokondrium potenciál-függő uniporterrel keresztül (mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter: MCU)  $\text{Ca}^{2+}$  ionokat vesz fel, és depolarizálódik. A mitokondrium membrán depolarizálódása a membrán ATP-áz működését gátolja, a sejt ATP készlete csökken, vagyis a sejt még kevésbé képes az ionháztartását fenntartani. A mitokondriális működés zavara emellett reaktív oxigén gyökök termeléséhez, oxidatív stressz kialakulásához is vezet (Hardingham, 2009).

A magas intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció további következménye az nNOS enzim aktivitásának fokozódása. A magas NO koncentráció a sejt számára toxikus, mivel a NO az oxigén gyökökkel reagálva peroxinitritet ( $\text{ONOO}^-$ ) képez. A NO és a  $\text{ONOO}^-$  károsítja a sejtalkotókat, gátolja a mitokondriális légzési láncot, előmozdítja a mitokondrium további depolarizációját, emellett a DNS egyszálú törését is előidézi (Arundine és Tymianski, 2004).

A  $\text{Ca}^{2+}$  szint növekedését fokozó, pozitív visszacsatoló folyamat a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő proteázok csoportjába tartozó calpain aktivációja. A proteáz gátolja a plazmamembrán  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolításért felelős pumpáját és a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  kicserélőt, ami további  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció növekedéshez vezet (Pottorf és mtsai., 2006).

Az NMDA receptor patológiás aktivációja a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis felborításán keresztül közvetlenül befolyásol számos, sejthalálhoz vezető intracelluláris szignalizációs útvonalat. A sejtmagi transzkripciós faktor CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein) szerepe az idegsejtek működésében sokoldalú. Az apoptózis és a sejt túlélése, a glükóz anyagcsere, az idegsejtek fejlődése, a neuronális plaszticitás és az emlékezőképesség rögzülése CREB-függő folyamatok (Carlezon és mtsai., 2005). Az intenzív NMDA receptor aktiváció a CREB defoszforilálásán keresztül a túlélési szignálok elnyomásához vezet.

A CREB útvonal aktiválásán és a BAD (Bcl2-associated death promoter) útvonal gátlásán keresztül az ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) aktiváció a sejtek túlélését

biztosítja. Az NMDA receptor túlzott aktivitását kísérő defoszforilációja annak inaktíválódását és a túlélési szignál elnyomását jelenti.

A FOXO (Forkhead Box Protein O) sejthalált közvetítő transzkripciós faktor, amely iszkémiás inzultus, oxidatív stressz és a trofikus faktorok megvonása során aktiválódik. Fiziológias körülmények között a FOXO foszforilálásáért és folyamatos sejtmagi exportjáért az Akt kináz felelős. Túlzott NMDA receptor aktiváció mellett az Akt kináz gátolt, a FOXO nukleáris exportja helyett a nukleáris import dominál, a transzkripciós faktor a sejtmagban sejthalálhoz vezető génexpressziós változásokat indít el (Hardingham és Bading, 2010).

### **3.2.1.3 Az NMDA receptor szerepe az endogén neuroprotekción**

Az NMDA receptor túlzott aktivitása és a sejthalál között egyértelmű összefüggés van, ugyanakkor a fiziológias receptor működés farmakológiai gátlása, vagy az alegységek genetikai manipulációja súlyos morfológiai és funkcionális változásokkal jár (Zhang és mtsai., 2007). A NMDA receptor fiziológias aktivitása tehát a sejt túlélése szempontjából elengedhetetlen. A receptor masszív blokája az egészséges sejtek számának csökkenéséhez és piknózishoz vezet a korai posztnatális időszakban (Gould és mtsai., 1994). Iszkémiás sértést vagy traumás agysérülést követő NMDA antagonistá adagolás súlyosbíthatja a neurodegenerációt és gátolja az új neuronok túlélését a gyrus dentatus területén (Pohl és mtsai., 1999, Ikonomidou és mtsai., 2000, Tashiro és mtsai., 2006).

Az NMDA receptor a sejt depolarizálásán túl a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok beáramlásán keresztül számos, a sejt túlélését biztosító intracelluláris jelátviteli folyamatot is szabályoz. Kissé leegyszerűsítve elmondhatjuk, hogy a receptor fiziológias és túlzott aktivitása ugyanazon szignalizációs útvonalakat befolyásolja, de ellentétesen, a sejt túlélését, vagy a sejthalált elősegítve.

A PI3K (phosphoinositide-3-kinase) – Akt útvonal számos túlélési és sejt növekedési faktort szabályoz, inaktíválja többek között a pro-apoptotikus BAD, BAX és p53 molekulákat (Yamaguchi és mtsai., 2001, Lafon-Cazal és mtsai., 2002). Az Akt kináz további célpontja a FOXO transzkripciós faktor, amely számos pro-apoptotikus gént, többek között a Fas-ligand és a BIM génjét is szabályozza (Brunet és mtsai., 1999, Gilley és mtsai., 2003). A FOXO nukleáris exportjának serkentésével a magi pro-apoptotikus Fas-ligand és BIM aktivációja csökken.

Az aktivitás-függő génexpressziós változások egyik legjelentősebb közvetítője a CREB, melynek aktivitását az NMDA receptor működés erősen befolyásolja (Lonze és Ginty, 2002). A CREB aktivitása  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-függő, így a fiziológias NMDA receptor funkció mentén

kialakuló  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis a sejtet a túlélés irányába mozdítja el. Iszkémiában a Glu és Gly kontrollálatlan felszabadulása, valamint az asztrocitákban kialakuló reverz Glu transzport (Rossi és mtsai., 2007) az NMDA receptorok egyre erősödő aktivációjához, növekvő intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációhoz vezet. A sejt túlélését elősegítő hírvivők  $\text{Ca}^{2+}$  érzékenysége alacsonyabb, mint a pro-apoptotikus útvonal szereplőié, így ezek a koncentráció enyhe emelkedésekor működésbe lépnek. Számos protektív hírvivőt nem közvetlenül a  $\text{Ca}^{2+}$  ion, hanem a  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin komplex konformáció változása aktivál. A calmodulin endogén  $\text{Ca}^{2+}$  szenzor, a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció kismértékű megváltozására is érzékenyen reagál. Ezzel szemben számos pro-apoptotikus hírvivőt, így a korábban tárgyalt calpain, nNOS-t és a mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  uniportert közvetlenül a  $\text{Ca}^{2+}$  aktiválja, így ezek a koncentráció nagyobb mértékű emelkedésekor, súlyosbodó iszkémiában aktiválódnak (Nicholls, 2004, Rameau és mtsai., 2007).

Az idegsejtek magas metabolikus aktivitása és reaktív oxigén szabadgyökök termelése kifejezetten intenzív, ugyanakkor antioxidáns rendszereik hatékonysága nem magas. Az iszkémiás állapotban jellemző oxidatív stresszre tehát kifejezetten érzékenyek. Bár a mechanizmus nem teljesen tisztázott, kísérletes körülmények között az NMDA receptor aktivitása antioxidáns védelmet jelent az oxidatív stresszel szemben (Papadia és mtsai., 2008).

#### **3.2.1.4 A szinaptikus és extraszinaptikus NMDA receptorok funkciója**

Agyi iszkémiában az NMDA receptor kettős, a sejt túlélése szempontjából ellentétes szerepét figyelembe véve felmerül a kérdés, hogy milyen körülmény határozhatja meg pontosan a receptor neuroprotektív vagy neurodegeneratív funkcióját.

Az inzultus kimenetelét tekintve fontos tényező lehet az aktivált NMDA receptor elhelyezkedése. A szinaptikus receptorok mellett periszinaptikus (a PSD 100-200 nm-es környezetében) és extraszinaptikus (a dendrittüske nyaki régiója és a sejttest) elhelyezkedésű receptorokat is megkülönböztethetünk (Petralia és mtsai., 2010). Az iszkémiában jellemző Glu túlcordulás („spill-over”) az extraszinaptikus Glu koncentráció növekedéséhez és az extraszinaptikus receptorok aktiválódásához vezet. Az utóbbi időben számos kísérletes eredmény és összefoglaló munka igazolta, hogy az extraszinaptikus NMDA receptorok az excitotoxicitás, míg a szinaptikus NMDA receptorok az endogén neuroprotekciónak közvetítésében játszanak szerepet (Zhang és mtsai., 2007, Papadia és mtsai., 2008, Hardingham és Bading, 2010, Li és Ju, 2012, Papouin és mtsai., 2012). A receptorok nem

csak elhelyezkedésükben, hanem alegység összetételükben is különböznek egymástól a kifejlett idegrendszerben. A receptorok térbeli eloszlása és alegység összetétele valamint a neurodegeneratív vagy neuroprotektív funkció egymással jól illeszkedik. A korai posztnatális életszakaszban a szinaptikus és extraszinaptikus receptorok -az NR1 alegységek mellett- NR2B alegységeket tartalmaznak. A későbbi életszakaszban az alegység eloszlás megváltozik, a szinaptikus receptorok főleg NR2A, az extraszinaptikus receptorok pedig NR2B alegységet hordoznak (Li és Ju, 2012). Mivel a szinaptikus receptorok a plasztikus változások fő közvetítői, az NR2A tartalmú receptorok gyorsabban inaktiválódnak, az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt szűk határok között, finoman szabályozzák. Ezzel szemben az extraszinaptikus receptorok NR2B alegysége lassabban inaktiválódik, így nagyobb, esetenként toxikus mennyiségű  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást tesz lehetővé. Az excitotoxicitás közvetítésében tehát az extraszinaptikus receptorokban jellemző NR2B alegység játszik jelentős szerepet (Liu és mtsai., 2007).

### **3.2.1.5 Az NMDA receptor gátláson alapuló neuroprotektív stratégiák, a kinurénsav szerepe**

Az akut neuroprotektív stratégiák legkézenfekvőbb célpontja a patológiásan aktív NMDA receptorok gátlása. Az *in vitro* és állatkísérletes iszkémia modellekben sikeresen alkalmazott farmakonok azonban a humán gyógyászatba nem kerültek át (Ikonomidou és Turski, 2002). A nagy affinitású nem kompetitív antagonisták a patológiás NMDA receptor aktivációt az iszkémiás periódusban ugyan gátolják, de emellett az NMDA receptorokhoz kapcsolódó neuroprotektív jelátviteli folyamatokat is akadályozzák. További problémát jelent, hogy az iszkémiás sértés után elérhető szűk terápiás ablakban gyakran nem sikerül az antagonista kezelést elvégezni (Ikonomidou és Turski, 2002, Hoyte és mtsai., 2004). Az iszkémia állatkísérletes modelljeiben továbbá nem, vagy kevésbé jelenik meg az antagonisták okozta pszihotomimetikus (Gunduz-Bruce, 2009) kardiális és respirációs zavar (Muir, 2006). Az NMDA receptor működés globális gátlása az iszkémia/neuroprotektív klinikai szempontjainak tehát nem felel meg.

Feltételezhetjük, hogy az endogén NMDA antagonista funkció serkentésével a fenti káros folyamatok kiküszöbölhetők. Az egyetlen ismert endogén Glu receptor antagonista az NR1 alegység Gly modulátoros helyén kötődő kinurénsav (KYNA). A KYNA számos, neuromodulációt és neuroprotektíót célzó kísérletben hatékonyan bizonyult (Salvati és mtsai., 1999). A KYNA ugyanakkor passzívan, csak nagy dózisu ún. bólus kezelésben jut át a

vér-agy gáton (Scharfman és mtsai., 2000). A KYNA előanyaga a kinurenin (KYN) ugyan aminosav transzporterek segítségével a vér-agy gáton könnyen átjut (Fukui és mtsai., 1991), további metabolizmusa időigényes, és nem kívánatos melléktermékek képződéséhez is vezet (Wonodi és Schwarcz, 2010). A KYNA-val folytatott neuroprotektív kísérleteket nagyban előre mozdította a KYNA olyan származékainak szintézise, amelyek a vér-agy gát hatékonyabb átlépése mellett megőrzik NMDA receptor modulációs képességeiket (Stone és mtsai., 2012). A klinikai szempontból tolerálható egyik fontos neuroprotektív stratégia tehát a kinurenin rendszer manipulálása.

Mivel vizsgálataink tárgya jórészt az iszkémiára kifejezetten érzékeny agyi struktúra, a hippokampusz volt, célszerűnek látszik egy rövid áttekintést adni a hippokampusz vizsgálataink szempontjából fontos tulajdonságaira.

### **3.3 A hippokampusz szerepe a térbeli tájékozódás és tanulás kialakulásában**

A hippokampusz a humán és rágcsáló agyban a temporális lebenyben elhelyezkedő ősi struktúra, az archikortex része. Szerveződését tekintve egyszerűbb, három rétegű. Serkentő principális sejtei és gátló interneuronjai anatómiailag jól körülhatárolható, kompakt struktúrát alkotnak, ezért a terület hisztológiai és elektrofiziológiai vizsgálatok szempontjából egyaránt kedvező. Egyszerűbb felépítése mellett a hippokampusz központi idegrendszerben betöltött szerepe bonyolult és sokrétű. Legfontosabb feladata az epizodikus memória, a deklarálnak emléknymok kialakítása. Emellett nélkülözhetetlen szerepet játszik a térbeli tájékozódás és tanulás kialakításában, a Papez gyűrű részeként pedig a limbikus rendszer működéséhez is kapcsolódik. Ventrális része (főemlősökben anterior), az ún. „meleg” hippokampusz az affektív reakciók és a stressz szabályozásában, dorzális része (főemlősökben poszterior) az ún. „hideg” hippokampusz a kognitív működésben vesz részt (Fanselow és Dong, 2010). Az értekezés további részében a hippokampális funkció alatt a rágcsáló dorzális hippokampusz működését értjük.

A terület emléknymok kialakításában betöltött nélkülözhetetlen szerepe a „H.M eset” kapcsán vált ismertté. A tanulmányban a kétoldali temporális lézió átesett beteg súlyos emléknym képződési zavarát írták le (Scoville és Milner, 1957). A hippokampusz térbeli tájékozódásban betöltött szerepére később O’ Keefe és mtsai. mutattak rá. Olyan principális sejteket fedeztek fel a hippokampuszban, amelyek a térbeli tereppontok bizonyos állásakor nagyobb frekvenciával tüzelnek. Feltételezték, hogy a külső tér a neurális hálózat speciális

sejtjeinek speciális tüzelési mintázatában képződik le, a hippocampusban ún. kognitív térkép alakul ki. A működést hordozó sejteket helysejteknek nevezték el (O'Keefe és Dostrovsky, 1971). A későbbiekben *in vitro* kísérletekben mások bizonyították, hogy a hippocampus perforáns pályájának és Schaffer kollaterálisainak nagyfrekvenciás ingerlésével a gyrus dentatus szemcse- és CA1 piramissejteken a szinaptikus áttevődés fokozható, ezek a szinapszisok potenciózódnak (Bliss és Lomo, 1973, Bliss és Collingridge, 1993). A kísérleti eredmények alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a hippocampusz a térbeli tájékozódás és tanulás, valamint az epizodikus memória kialakításában nélkülözhetetlen.

A térbeli tájékozódást és tanulást vizsgáló tesztekben az állatok aktívan térképezik a környezetüket, keresik a jutalmazást jelentő táplálékot, esetleg próbálnak megmenekülni a vízi útvesztőben. A feladat többszöri ismétlése során identikus útvonalon végighaladva -kissé leegyszerűsítve- ugyanazon helysejtek ugyanolyan sorrendben mutatnak aktivitást. Ez az aktivitási mintázat aztán a jutalmazás, később a nyugodt ébrenlét és a lassú hullám alvás során újra kialakul nagy frekvenciás (akár 200 Hz) ún. *sharp-wave ripple* (SWR) rezgés formájában. A nagyfrekvenciás rezgés a CA1 piramissejteken tulajdonképpen a kísérletes LTP és STDP természetes formája, vagyis a tájékozódás során használt aktivációs mintázat és neurális hálózat hatékonyságát növeli meg. (Battaglia és mtsai., 2011, Girardeau és Zugaro, 2011). Az aktív kereső magatartás közben a hippocampusz theta oszcillációja (7-14 Hz) jellemző és szükséges. Az oszcillációt a principális sejtek és az interneuronok finoman hangolt együttműködése alakítja ki, vagyis **akár az interneuronok, akár a principális sejtek működési zavara akadályozza a tájékozódást, a helysejtek működését, végeredményben az emléknymó képződést is**. Valóban, a SWR kialakulásának szelektív kísérletes gátlása a térbeli tájékozódási és tanulási folyamatokat rontja (Girardeau és mtsai., 2009).

### 3.3.1 Az NMDA receptor szerepe a tanulási folyamatokban

Az NMDA receptor koincidencia detekciós képességén keresztül a hippocampusz-függő térbeli tájékozódási és tanulási folyamatok kulcsszereplője. Bár az LTP NMDA receptortól független kialakulását is leírták (Kato és mtsai., 2009, Szabo és mtsai., 2012), az NMDA receptor funkció a tanulási folyamatban nélkülözhetetlen. Az NMDA receptor antagonistá APV (d-2-amino-5-foszfonovalerián sav) gátolja a tanulási folyamatokat a vízi útvesztőben, ha a feladat megoldása random indítási pontok és rejtett platform használatával hippocampusz-függő (Morris és mtsai., 1986). A hippocampális CA1-es régió piramissejtjeiben hordozott NR1 alegység mutáció abnormalis helysejt működést és a tanulási

képesség csökkenését eredményezi (Tsien és mtsai., 1996). Mindkét kísérletben az emlényom kialakulása (akvizíciója) gátolt. A farmakológiai manipuláció ugyanakkor kevésbé rontja a teljesítményt, ha a kezelést intenzív tréningezés, tanítás előzi meg. A CA3 piramissejt NR1 mutációt hordozó állatokban az információ gyors feldolgozása károsodik, de hosszas gyakorlással a teljesítmény a normális szintre emelhető (Nakazawa és mtsai., 2003). Az NMDA receptor farmakológiai gátlása a gyakorlás után bizonyos idővel nem rontja az állatok teljesítményét a későbbi tesztek során. Ugyanakkor a tanítási paradigmák és a farmakológiai beavatkozás sokfélesége miatt nem lehet teljesen kizárni, hogy az NMDA receptor az emlényom konszolidációjához is szükséges (Nakazawa és mtsai., 2002). Ha a tanítás és a teljesítmény felmérése között rövid idő telik el, leginkább az emlényom konszolidációját, kisebb mértékben az emlényom visszahívását (retrieval) vizsgáljuk. Hosszas (több nap), tréningmentes periódus beiktatásával azonban a valódi visszahívó funkciókat vizsgálhatjuk (Morris, 2006). A visszahívási funkcióban a CA1 piramissejtek NMDA receptorai minden valószínűség szerint már nem vesznek részt, ezzel szemben olyan paradigmákban, melyekben a teszt során a korábbi tréning környezet „kognitív kiegészítése” szükséges, az emlényom visszahívásában CA3 piramissejtek NMDA receptorai szerepet kapnak (Nakazawa és mtsai., 2004).

**Összességében kijelenthetjük, hogy a kísérleti paradigma megfelelő megválasztásával, esetleg az akvizíció és a konszolidáció együttes vizsgálatával a hippokampusz-függő térbeli tájékozódáshoz és tanuláshoz szükséges zavartalan NMDA receptor működés vizsgálható.**

### **3.3.2 A hippokampusz iszkémia érzékenysége**

A hippokampusz térbeli tájékozódásban és tanulásban betöltött szerepe mellett az értekezés szempontjából igen fontos annak kifejezett és szelektív iszkémia érzékenysége. Globális hipoperfúzió vagy iszkémia hatására a CA1-es régió piramissejtjei szelektíven károsodnak, vagyis ezek a sejtek az iszkémiás sértés érzékeny detektorai. A CA3 réteg piramissejtjei és a gyrus dentatus szemcsesejtjei ugyanakkor erőteljesebb iszkémia tűrést mutatnak (Schmidt-Kastner és Freund, 1991, Institoris és mtsai., 2007). A károsodás nem csak a CA1-es piramissejtek degenerációjában, hanem progresszív, a sértéssel arányos mértékű reaktív gliózisban is megmutatkozik (Sugawara és mtsai., 2002). A jelenség hátterében számos, a sejtek receptorait, intracelluláris hírvivő rendszereit és endogén protektív mechanizmusait érintő magyarázat lehet. A terület NMDA receptorokban -nem meglepő módon- kifejezetten

gazdag, ez az iszkémia érzékenységet már előre vetíti. Ugyanakkor a receptor sűrűség nem magyarázza a szelektív érzékenységet, mert a CA3 és CA1-es területeken a receptorok sűrűsége megegyező (Monyer és mtsai., 1994). A két terület azonban eltérő tirozin kináz és foszfatáz aktivitással rendelkezik, az eltérést tehát a hírvivő rendszerekben fennálló különbség is magyarázhatja (Gee és mtsai., 2006). A CA1-es piramissejtek és interneuronok közötti eltérő iszkémia érzékenységre ugyanakkor magyarázat lehet az NMDA okozta aktiváció, mert a két sejttípus NMDA receptor alegység összetétele erősen eltérő (Avignone és mtsai., 2005). Különbséget írtak le továbbá a CA1 és CA3 régiók azonnali korai génjei expressziójában. Bár a c-fos azonnali korai gén a neuronális aktivitás általános markere, feltételezték, hogy eltérő eloszlása magyarázat lehet a CA1-es piramissejtek érzékenységre (Cho és mtsai., 2001). A jelenség hátterében mindezek mellett az ionháztartást érintő különbség is állhat. A KCC2 kotranszporter a sejtek alacsony Cl<sup>-</sup> koncentrációjának kialakításáért, így a hatékony gamma aminovajsav (GABA) közvetített hiperpolarizációért felel. Expressziója a sérülékeny CA1-es piramissejtekben az iszkémiás inzultus után rövid idővel drasztikusan lecsökken, a sejtek a GABA-erg gátló beidegzésre kevésbé reagálnak (Papp és mtsai., 2008). Az iszkémia/neurprotekció és a kinureninek kapcsolata szempontjából fontos lehet, hogy a CA1-es régió szelektív iszkémia érzékenységét az asztrocita nyúlványok visszahúzódásával is összefüggésbe hozzák (Lavenex és mtsai., 2011).

**Az értekezés szempontjából a CA1 szelektív iszkémia érzékenysége mögött meghúzódó molekuláris biológiai háttér nem lényeges, itt csupán azt kell kiemelnünk, hogy az excitotoxikus károsodást az NMDA receptor antagonisták hatékonyan mérséklék.**

## **3.4 A kinureninek szerepe a neuromodulációban**

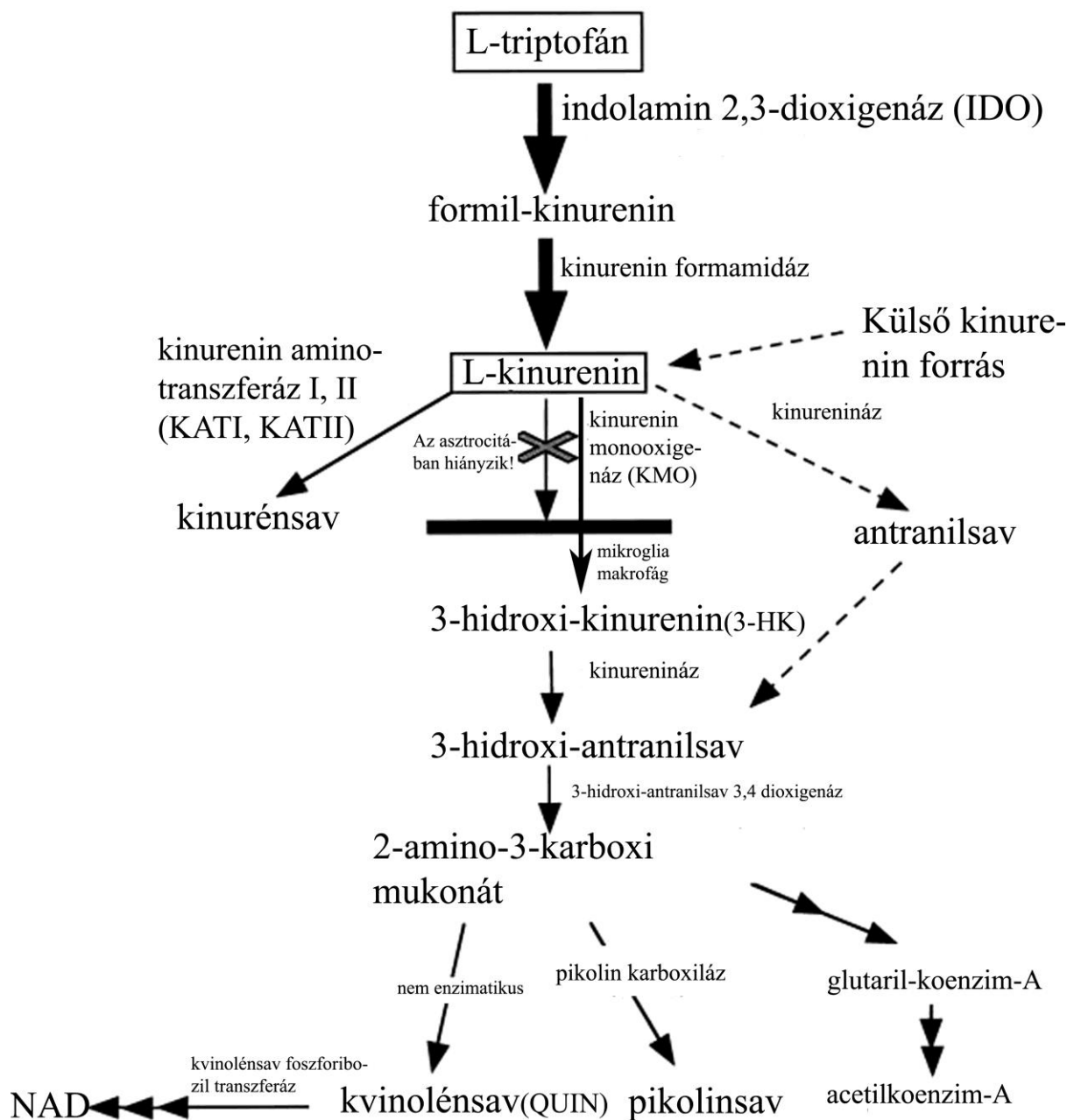
### **3.4.1 A kinurenin útvonal**

A triptofán aminosav oxidatív lebontásának legjelentősebb útvonala a -szerotonin képződése mellett- az ún. kinurenin útvonal. A metabolikus folyamat során három neuroaktív köztitermék is keletkezik: ezek egyike, a „zsákutcának” is nevezett kinurénsav oldalág végtermékeként keletkező KYNA. A másik kettő a kvinolénsav (QUIN) ágban keletkező 3-hidroxi kinurenin (3-HK), és a további átalakulások során létrejövő QUIN, melynek végterméke az elektronszállító NAD. Az említett köztitermékek az emlős agyban fiziológias körülmények között nanomólos, illetve mikromólos koncentrációban vannak jelen (Vecsei és mtsai., 2012). Ez a koncentráció a hatásos neuromodulációhoz szükséges koncentrációnál

jóval alacsonyabb, kismértékű megváltozása azonban befolyásolja a kognitív funkciók szempontjából igen jeletős dopamin (DA), acetilkolin (ACh) és Glu extracelluláris koncentrációját (Wu és mtsai., 2007, Zmarowski és mtsai., 2009, Pocivavsek és mtsai., 2011). Ezért valószínű, hogy a köztitermékek legfontosabb feladata a tónusos gátlás illetve serkentés (Wu és mtsai., 2000, Wu és mtsai., 2007, Zmarowski és mtsai., 2009, Wu és mtsai., 2010).

A köztitermékek hatása és keletkezési helye szempontjából számos különbséget találunk. A neuroprotekciónak szempontjából talán legjelentősebb KYNA az L-KYN irreverzibilis transz-aminációjával keletkezik enzimatis útön. A folyamatot először perifériás szövetekben, a májban és a vesében írták le (Knox és Mehler, 1950, Mehler és Knox, 1950, Mason, 1954, Gal és Sherman, 1980, Fukui és mtsai., 1991). Később a KYN-KYNA átalakulást a központi idegrendszerben is igazolták. A KYNA az asztrocitákban szintén az L-KYN irreverzibilis transz-aminációjával keletkezik. A folyamat végterméke a KYNA, amely további átalakulás nélkül az extracelluláris térbe kerül, és speciális lebontó folyamat hiányában a központi idegrendszert nem specifikus, probenecid érzékeny sav transzporterek segítségével képes elhagyni (Turski és mtsai., 1989). A KYNA szintézisét a KAT I, a KAT II és a mitAAT egyaránt képes elvégezni, ezek közül a humán és patkány agyban legnagyobb jelentőséggel a KAT II bír (Guidetti és mtsai., 2007). A KYNA képződés hasonló útját a neuronokban is leírták (Guillemin és mtsai., 2007).

A 3-HK és QUIN szintézise a monocita eredetű sejtekben, így a mikrogliaokban és gyulladásos folyamatok során az agyszövetbe vándorolt makrofágokban jellemző. A 3-HK a kinurenin monooxygenáz (KMO) segítségével keletkezik L-KYN-ből, majd további enzimatis lépésekben QUIN-é alakul (1. ábra).



1. ábra: A triptofán lebontás kinurenin útvonala és a lebontásban részt vevő enzimek.

### 3.4.2 A kinurenin anyagcsere patológiás folyamatokban

A KYN útvonal enzimeinek aktiválódását és a köztitermékek koncentrációjának növekedését számos krónikus, neurodegeneratív kórképben (Huntington-kór, Alzheimer demencia, AIDS demencia komplex, Parkinson kór, amiotrófiás laterálszklerózis) leírták (Heyes és mtsai., 1991, Vamos és mtsai., 2009a, Tan és mtsai., 2012). Az aktiválást az immun- és gyulladásos faktorokra érzékeny indolamin-2,3 dioxigenáz (IDO) és triptofán dioxigenáz (TDO) enzimek közvetítik, amelyek végeredményben nagyobb KYN hozzáférést tesznek lehetővé. Fontos

megjegyezni, hogy az agyi érendotélben expresszáldóIDO is képes a KYN szintézisére, a keletkezett KYN pedig a szolubilis guanilat cikláz aktiválásán keresztül a gyulladásos területen artéria relaxációt közvetít (Wang és mtsai., 2010). Aktiváló hatást fejtenek ki többek között a gyulladásos citokinek, az interferonok (főleg a gamma interferon), lipopoliszaharidok (bakteriális endotoxinok), az interleukin-1, és a TNF- $\alpha$ . A megnövekedett enzimaktivitás hatására felszaporodott köztitermékek hatása sokrétű, részben egymással ellentétes. A QUIN ág termékei közül a 3-HK a szabadgyök képzés és az oxidatív stressz fokozásával, a QUIN pedig direkt NMDA receptor aktivációval neurotoxikus hatású. A pikolinsav kelátképző és immunregulátoros funkcióján keresztül neuroprotektív. A KYNA ág végterméke a KYNA az NMDA receptor Gly modulátoros helyén kompetitív receptor antagonist, neuroprotektív hatású. A KYNA iszkémia-neuroprotekcióban betöltött szerepével és a lehetséges neuroprotekciós stratégiákkal a következőkben foglalkozunk.

### **3.4.3 A KYNA szerepe iszkémiában**

Az egyetlen ismert endogén NMDA receptor antagonist a KYNA (Mok és mtsai., 2009), amely e mellett az AMPA típusú Glu receptorokat (Prescott és mtsai., 2006) és az alfa-7 nikotinos acetilkolin receptorokat ( $\alpha 7nAChR$ ) is modulálja (Hilmas és mtsai., 2001). Számos állatkísérletes eredmény igazolta, hogy az agyi kinurénsav szint megnövelése csökkenti az iszkémiás sértés után kialakuló szöveti és funkcionális károsodást (Stone, 2000, Wu és mtsai., 2000, Schwarcz és Pellicciari, 2002, Stone és Addae, 2002, Vamos és mtsai., 2009b, Zadori és mtsai., 2009). Az iszkémiát követő patológias folyamatokban a kinurénsav szerepe sokoldalú, a receptor moduláción kívül gyulladásos folyamatokat (Moroni és mtsai., 2012), vaszkuláris funkciókat (Sas és mtsai., 2003, Wang és mtsai., 2010) antioxidáns reakciókat (Lugo-Huitron és mtsai., 2011) és a kolinerg rendszeren keresztül a sejtek ingerelhetőségét is befolyásolja (Banerjee és mtsai., 2012a, Banerjee és mtsai., 2012b).

Az agyi extracelluláris KYNA koncentráció növelését célzó neuroprotekciós kísérletek alapvetően négy stratégián alapulnak. A KYNA prekursor L-KYN koncentrációja az L-KYN szisztémás adagolása után az agyban gyorsan megemelkedik, mert az aminosav transzporterek segítségével a vér-agy gáton könnyen átjut (Fukui és mtsai., 1991). A továbbiakban a KYNA és a többi metabolit szintézise a KYN útvonal enzimeit tartalmazó minden sejttypusban elindul, de a keletkezett metabolitok aránya az egyes enzimek aktivitásától és a sejtek aktuális státuszától erősen függ (lásd az előző fejezetben és a megbeszélésben). Az endogén és az exogén KYNA koncentrációja hatásosan növelhető a probenecid érzékeny szerves sav transzporterek gátlásával, amelyeken keresztül a KYNA

távozik a központi idegrendszerből (Santamaria és mtsai., 1996, Shepard és mtsai., 2003, Vamos és mtsai., 2009b).

A KYN útvonal enzimeinek farmakológiai gátlásával az útvonal egyensúlya a kívánt metabolit irányába eltolható. A KMO gátlása a szintézist a 3HK és a QUIN visszaszorítása mellett a KYNA irányába tolja, a beavatkozás neuroprotektív (Wu és mtsai., 2000, Zwilling és mtsai., 2011).

A KYNA neuromodulátoros hatásának fokozására ad lehetőséget olyan KYNA származékok szintézise, amelyek a vér-agy gáton könnyen átjutnak. A módszer előnye, hogy -legalább is közvetlenül- nem befolyásolja a KYN útvonal többi termékét, nem vezet a 3-HK és QUIN koncentráció növekedéséhez.

#### **3.4.4 A KYNA magatartásra gyakorolt hatása**

Az agyi extracelluláris KYNA koncentráció változása közvetlen NMDA receptor moduláló hatásán és a kolinerg és dopaminerg transzmisszióra gyakorolt hatásán keresztül a magatartás megváltozásához vezethet. A kinurenin útvonal egyensúlyának eltolódását nem csak a krónikus, neurodegenerációval járó kórképekkel hozzák összefüggésbe, számos állatkísérletes és humán mérési eredmény utal a kinureninek neuro-pszichiátriai kórképekben betöltött szerepére.

A KYN és a KYNA megnövekedett koncentrációját mutatták ki szkizofréniában szenvedő betegek agy-gerincvelő folyadékában és a kérgi Brodmann 9-es areában (Schwarcz és mtsai., 2001, Linderholm és mtsai., 2012). Szkizofréniában a terület Glu és ACh szintje is megváltozik, a változás és a következményes kognitív deficit kialakulásában a kinurenerg hatás fontos szereplő lehet (Sathyaikumar és mtsai., 2011). A szkizofrénia terápiás lehetőségei között az irodalom újabban a kinurenin útvonal befolyásolásának lehetőségét is említi (Wonodi és Schwarcz, 2010).

A triptofán kinurenin útvonalon történő lebontásának fokozódását a depresszió számos formájában leírták. Depresszióban a gyulladásos citokinek és a glükokortikoidok szintje emelkedett lehet (Barden, 2004, Dowlati és mtsai., 2010), ami a kinurenin útvonal kapuját jelentő IDO és TDO enzimek aktiválásához vezet. A kinurenin útvonal aktiválódása végeredményben a Glu, ACh és DA szint megváltozásában is megjelenik, egyúttal alacsonyabb triptofán hozzáférést jelent a szerotonin útvonal számára (Laugeray és mtsai., 2010).

A kinureninek magatartásra gyakorolt hatását a metabolikus útvonal enzimeinek genetikai manipulációjával is igazolták. A rágcsáló és emlős agyban a KYNA szintézisét a KAT I, a

KAT II és a mitAAT enzim egyaránt képes elvégezni, ezek közül legnagyobb jelentőséggel az asztrocitákban kifejeződő KAT II bír (Guidetti és mtsai., 2007). Az enzim génjének null mutációja egérben átmeneti, ugyanakkor jelentős biokémiai, anatómiai és a viselkedési mintázatot érintő változásokat okozott. Az állatok korai posztnatális életszakaszában alacsony agyi KYNA koncentrációt, a dendrittüskék morfológiai és számbeli változását valamint hiperaktivitást és a motoros koordináció zavarát figyelték meg. Az egyedfejlődés későbbi szakaszában a változások eltűntek, feltehetőleg a KAT II izoformák megjelenésének köszönhetően (Yu és mtsai., 2004). Hasonló kísérleti törzs létrehozásával igazolták továbbá, hogy a KYNA szintézis csökkenése emelkedett hippocampális Glu koncentrációhoz vezet. Nem meglepő, hogy ezek az állatok különböző, a tanulási képességeket vizsgáló tesztekben jobban teljesítettek, *in vitro* LTP indukciós kísérletekben pedig a kontroll állatokhoz képest emelkedett EPSC amplitúdó értékeket mutattak (Potter és mtsai., 2010).

A KYNA koncentráció illetve szintézis kétirányú farmakológiai befolyásolása a hippocampális Glu koncentráció és a vízi útvesztőben nyújtott teljesítmény fluktuálásához vezet patkányban. Mikrodialízis segítségével a hippocampusba juttatott KYN a Glu koncentrációt csökkentette, a tanulási folyamatokat pedig gátolta. Ezzel ellentétben a KYNA szintézisét a KAT II gátlásán keresztül csökkentő etil-szulfonil benzoilalanin (ESBA) a hippocampális Glu koncentrációt és az útvesztőben nyújtott teljesítményt egyaránt növelte (Pocivavsek és mtsai., 2011).

A prekursor KYN szisztémás adagolásával megnövelt agyi KYNA szint patkányok tájékozódási és emlékező képességét a sugár útvesztőben szintén csökkentette (Chess és mtsai., 2007).

A szkizofrénia egyik -rágcsáló modellben is jól vizsgálható- kísérő jelensége a szenzoros kapuzó funkció (sensory gating) károsodása. A kapuzó működés a környezeti ingerek közötti különbségtételhez, a felesleges információ kiszűréséhez elengedhetetlen. A vonatkozó állatkísérlet, az úgynevezett *pre-pulse inhibition* során a párosított, averzív hangingerekre adott egész test válaszokat (startle response) vizsgálják. Kontroll állatokban a párosított hanginger második tagja kisebb mértékű összerezzenést vált ki. Szisztémás KYN adagolás vagy a kinurenin útvonal KYNA képződés irányába történő eltolása –NMDA receptor antagonisták, PCP, MK801 hatásához hasonlóan- a kapuzó funkciót károsítja (Erhardt és mtsai., 2004).

Egy további kísérletben a pre- és korai posztnatális életszakaszban adagolt KYN viselkedési és tanulási mintázatra gyakorolt hosszú távú hatását vizsgálták patkányban. Ebben az esetben az anyaállatok táplálékát a gesztáció 15. napjától az utódok posztnatális életének 21. napjáig

KYN-el dúsították. A továbbiakban normál táplálás mellett a hippocampális Glu szintet és a vízi útvesztőben valamint passzív elkerüléssel tesztben nyújtott teljesítményt a posztnatális 56-80. napokon vizsgálták. A csökkent Glu szint és teljesítmény érdekes módon a normál táplálás után is fennmaradt, vagyis a központi idegrendszer fejlődése alatt kialakított KYN/KYNA expozíció hatása az egyedfejlődés későbbi szakaszait is érintheti (Pocivavsek és mtsai., 2012).

## 4. Célkitűzések

Az értekezés alapját képező kísérletes munka három feladat köré csoportosul. Megvizsgálni, hogy

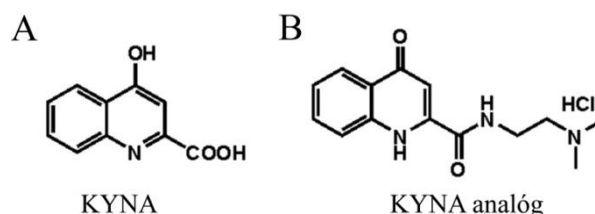
- a) az új KYNA analóg rendelkezik-e neuroprotektív képességgel (célkitűzés 1).
- b) az új analóg károsan befolyásolja-e a magatartási, tanulási illetve memória funkciót (célkitűzés 2-4).
- c) a fentiektől eltérő, átmeneti, fokális iszkémiát előidéző modellben a KYNA előanyag az L-kinurenin szulfát (L-KYNs) neuroprotektív-e utókezelésben (célkitűzés 5).

### Célkitűzés 1:

Kísérleteink során célul tűztük ki egy, a kollaboráns partnereink által szintetizált KYNA analóg 2-(2-N,N-dimetilaminoetilamin-1-karbonil)-1H-kvinolén-4-on hidroklorid (Fulop és mtsai., 2009), Patent Application No: 104448-1998/Ky/me) neuroprotektív sajátosságainak felmérését teljes előagyi iszkémiában patkányban. A protektív képességet a hippocampusz CA1-es régió piramisneuronok degenerációjának változásával követtük nyomon.

További célunk volt, hogy a neuroprotektív képességet a szinaptikus javítás és a szinaptikus plaszticitás felmérésével is igazoljuk (2. ábra).

2. ábra



**A:** A KYNA szerkezeti képlete

**B:** A KYNA analóg szerkezeti képlete: 2-(2-N,N-dimetilaminoetilamin-1-karbonil)-1H-kvinolén-4-on hidroklorid

### Célkitűzés 2:

Kísérletünk során célul tűztük ki, hogy felmérjük a neuroprotektív KYNA analóg hippocampusz-függő térbeli tájékozódásra és tanulásra gyakorolt hatását a vízi útvesztő segítségével patkányban.

### **Célkitűzés 3:**

Kísérletünk során célul tűztük ki, hogy felmérjük a neuroprotektív KYNA analóg egerek explorációs aktivitására gyakorolt hatását a nyílt porond vizsgálatban.

További célunk volt az explorációs aktivitást nem befolyásoló dózis megválasztása után az analóg hippocampusz-függő térbeli tájékozódásra és tanulásra gyakorolt hatásának vizsgálata a sugár útvesztő segítségével egérben.

### **Célkitűzés 4:**

Kísérletünk során célul tűztük ki a neuroprotektív KYNA analóg neuromodulátoros képességének igazolását a szkopolamin amnézia modell segítségével egérben.

### **Célkitűzés 5:**

Kísérletünk során célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a kinurenin útvonal KYNA szintézis irányába történő eltolása L-kinurenin szulfáttal neuroprotektív-e átmeneti fokális iszkémiában patkányban.

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1 Iszkémiás modellek

#### 5.1.1 Négy ér elzárás (four-vessel occlusion, 4VO)

250-300g testsúlyú Wistar patkányokat 1ml/100 ttg 4%-os klorál-hidrát intraperitoneális (ip.) adagolásával altattuk, a mélyalvás kialakulásáig (15 perc) fénytől és zajtól izoláltuk. Az állatok fejét előre hajlított helyzetben szeterotaxiás befogóban (David Kopf Instruments) rögzítettük, majd a nyak bőrét és a cervico-auricularis izmot az atlasz csigolya felett rostro-caudális irányban átvágtuk. Az atlasz csigolyát a paravertebrális izomzat tompa boncolásával tártuk fel. A foramen alare-n kilépő dorzális kis artériát elektrokauterrel elégettük, a preparált bőrt és izomzatot sebterpesszel rögzítettük. A foramen alare-t fogászati fúró segítségével a vertebrális artériák sértése nélkül mindkét oldalon kitágítottuk, majd mindkét vertebrális artériát kauterizáltuk (Geiger Thermal Cautery Unit). Többszöri kauterezés után a foramen alare-t tovább tágtítottuk. Az érelzárást sikeresnek ítéltük, ha a foramen alare-ban az artéria proximális és disztális csonkja is megjelent.

A furások és égetések alatt a területet hideg fiziológiás sóoldattal folyamatosan hűtöttük. A beavatkozás után a terpesztett izomzatot és bőrt anatómiai helyzetbe rendeztük és a sebet összevarrtuk. A következőkben a nyak ventrális oldalán hosszanti vágást ejtettünk, a bőr alatti kötőszövetet tompán boncoltuk, majd az a. carotis communist mindkét oldalon feltártuk. Az artériáról a szimpatikus és bolygóideget gondosan leválasztottuk és az ér köré lazán steril sebvarró cérnát hurkoltunk. A feltárt területet anatómiai helyzetbe rendeztük és a sebet összevarrtuk. A műtétek alatt az állatok testhőmérsékletét automata fűtőpaddal 37°C – on tartottuk (Supertech TMP-5a). 24 órás pihentetés után az a. carotisokat felületes érertatásban újra feltártuk, és atraumatikus klipsszel 10 percre elzártuk. A teljes előagyi iszkémia kialakítását sikeresnek ítéltük, ha az állatok érert további adagolása nélkül is komatózus állapotban maradtak és fénymerev pupilla mellett a szaruhártya reflexet nem tudtunk kiváltani. A 10 perces carotis elzárás után a véráramlás megindulását operáló mikroszkóp alatt ellenőriztük, majd a nyaki sebet összevarrtuk. Az iszkémia kialakítását követően görcstevékenységet mutató állatokat a kísérletből kizártuk.

### **5.1.2 Középső agyi artéria elzárás (dMCAO)**

A 250-300g testsúlyú Wistar patkányokat Nembutallal ip. altattuk (60mg/ttkg). A maghőmérsékletet rektális szenzorral és csatlakoztatott fűtőpaddal  $37 \pm 0.5$  °C-on tartottuk (Supertech TMP-5a). Az állatok fejét sztereotaxiás befogóban rögzítettük (David Kopf Instr.), majd a bal oldali rágóizmot részlegesen eltávolítottuk. A koponya temporális régióját megtisztítottuk, és az agyfelszín a középső agyi artéria felett fogászati fűró segítségével feltártuk. A következőkben az ér alá mikro-sebészeti kampót helyeztünk úgy, hogy az az agykérget ne sértse, és ne okozzon vérzést. Az ér okklúzióját a kampó agyfelszínre merőleges irányú, mikromanipulátorral történő elmozdításával váltottuk ki (kb. 1200µm). 30 perces érelzárás után a kampót visszaengedtük és az ér alól eltávolítottuk. A véráramlás megindulását operáló mikroszkóp alatt ellenőriztük. A feltárt területet anatómiai helyzetbe rendeztük, a sebet összevarrtuk, és jódtartalmú oldattal fertőtlenítettük. A műtét lépéseit az egyes állatok között időben szigorúan szinkronizáltuk, hogy az altatószer kísérletre gyakorolt esetleges hatását egységesítsük.

## **5.2 Hisztológiai feldolgozás**

Az állatokat 0,5 ml /100 ttg 30%- os uretán ip. adagolásával altattuk, perfúziós pumpa segítségével 0,1 M foszfát pufferrel (PB), majd 4%-os paraformaldehiddel (pH 7,4) transzkardiálisan perfundáltuk. 24 órás utófixálás után vibratommal (Leica VT1000 S) 30 és 20 µm vastag koronális agyszeleteket készítettünk. A további feldolgozást zselatinózott (2 %) tárgylemezre húzott vagy szabadon úszó metszeteken végeztük.

### **5.2.1.1 Fluoro Jade C festés**

A degenerálódott sejteket Fluoro Jade C (FJ-C) festéssel tettük láthatóvá, a szeleteken a maganyagot festő DAPI ellenfestést is alkalmaztunk. Szárítás után a metszeteket szobahőmérsékleten leszálló alkoholsorban rehidráltuk, 10 percig 0,06 %-os kálium-permanganát, 20 percig 0,004 %-os FJ-C festőoldatban inkubáltuk. Mosás és szárítás után a metszeteket xilol bázisú fedőanyaggal fedtük (Fluoromount, Serva).

#### **5.2.1.2 Immunhisztokémia**

A szabadon úszó szeleteket 0.1 M PB-ben mostuk, az endogén Fc receptorokat 10 %-os normál szamar szérumban (NDS) blokkoltuk. Az antitesteket 0,1 M PB, 2% NDS, 0,4 % Tx100 és 0,01% Na-Azid tartalmú oldatban vettük fel. A metszeteket az elsődleges antitestben 4°C-on 24 óráig, a megfelelő másodlagos antitestben (Jackson Immunoresearch) szobahőmérsékleten 2 óráig inkubáltuk. Mosást követően a szeleteket zselatinózott (2 %) tárgylemezre húztuk fel, és vízbázisú fedőanyaggal fedtük (Fluoromount-G<sup>TM</sup> SouthernBiotech).

#### **5.2.1.3 Kvantitatív vizsgálatok**

Mennyiségi összehasonlítást a FJ-C+ sejtek számának becslésével végeztünk. A dorzális hippokampuszból készült 30 µm vastag szeleteken bregma -2.3 és -4.3 között az Ammon szarv CA1-es régiója konvex-konkáv átmenetében a FJ-C+ sejteket 20x-os objektív alatt egy látótérben manuálisan számoltuk.

A szomatoszenzoros kérgi léziót bregma -0,5-től -4-ig 0,5 mm-es lépésekben vett mintákból becsültük. A FJ-C+ sejteket 4x-es objektív alatt saját fejlesztésű szoftverrel automatizálva detektáltuk (MATLAB programkörnyezet; MATLAB 7.1, Mathworks, Natick, Massachusetts, USA). Automatikus küszöbszint beállítás és zajcsökkentés után 25-400-µm<sup>2</sup> méretű objektumokat számoltuk bináris képeken.

## 5.3 Magatartás vizsgálat

### 5.3.1 Morris Water Maze

A kísérletben 250-300 g súlyú hím Wistar patkányokat használtunk ( $n=10$ ). A kísérlet megkezdése előtt fordított nappal/éjszaka ciklust állítottunk be. Ehhez és a kísérleti apparátushoz az állatokat két hétig szoktattuk. Vizsgálatainkhoz 1,6 m átmérőjű, 0,35 m mély műanyag medencét használtunk. A medencét 0,2 m mély szobahőmérsékletű vízzel töltöttük fel, amelyet 10 ml sötétkék temperával tettük átlátszatlaná. A vízbe egy 8 cm átmérőjű platformot helyeztünk el úgy, hogy annak felszíne a víz alatt 1,5-2 cm-rel legyen. A platformot a kísérlet során következetesen ugyanazon kvadráns közepén helyeztük el. A medence területén öt indítási pontot jelöltünk ki. A medence közeli környezetében számos tereptárgyat helyeztünk el. A szórt fényű megvilágítást tejüveggel borított fénycsővek, „fehér” zajt pedig a teremben folyamatosan üzemelő szellőztető ventilátor biztosították.

#### 5.3.1.1 A kísérlet menete

Az 5 napos habituációs szakaszban az állatokat ( $n=10$ ) naponta egyszer úsztattuk, az úszásokat a medence tetszőlegesen kiválasztott indítási pontjairól indítva. Ha az állatok a víz alatti platformot 1 perc alatt nem találták meg, oda tereltük őket. Miután a platformra felmáshztak, 20 másodpercet adtunk a térbeli tájékozódásra. A habituációs periódus után a térbeli tájékozódási és tanulási folyamatot hét napon keresztül vizsgáltuk. Az egyes napokon 3 egymást követő tesztet végeztünk el: i) a legelső úsztatás, az ún. tréning előtti teszt platform nélkül, ii) öt úsztatásból álló tréning öt különböző indítási pontról, iii) tréning utáni teszt platform nélkül.

Menekülési latenciaként értelmeztük a platform megtalálásához szükséges időt az első tréning úszás során. Átlagos menekülési latenciaként értelmeztük a platform megtalálásához szükséges idők átlagát az öt tréning úszás során. Zóna preferenciaként értelmeztük a célkvadránsban eltöltött, a többi kvadránshoz viszonyított időt (tréning előtti és tréning utáni úszások platform nélkül).

### **5.3.1.2 Hatóanyag adagolás**

A kísérletben egyetlen állatcsoportot használtunk. A hatodik napon a csoportot 1,5 ml vivő anyaggal (0,1 M PB), a hetedik napon 1 mmol/ttkg analóggal (kb. 285 mg/ttkg, 1,5 ml 0,1 M PB-ben feloldva), a kísérletek előtt 1 órával, ip. kezeltük.

### **5.3.2 Nyílt porond (OF) és sugár útvesztő (RAM) vizsgálat**

#### **5.3.2.1 Nyílt porond**

A kísérletekben 9-16 hetes hím CFLP egereket használtunk (n=10 minden csoportban). A nyílt porondot egy 50X50X50 cm-es plexiüveg dobozban alakítottuk ki. Az oldalfalakat világosszürke kartonpapírral borítottuk, a talapzatot pedig érdesítettük.

#### **5.3.2.2 A kísérlet menete**

Az állatokat a farkuknál megemelve az OF ugyanazon falának közepéhez helyeztük, ezután azok az arénában 5 percig szabadon mozogtak. A vizsgálatban három csoportot képeztünk. A kontroll csoportot ip. 0,4 ml PB-vel (pH 7,4) kezeltük. További két csoport 1 illetve 2 mmol/ttkg KYNA analógot kapott (PB-ben feloldva, pH 7,4). A kezeléseket a teszt előtt egy órával végeztük el.

#### **5.3.2.3 Sugár útvesztő**

A kísérletekben 9-16 hetes hím CFLP egereket használtunk. Az útvesztő egy 24,5 cm átmérőjű központi platformból és nyolc 38 cm hosszú, 9 cm széles, 8 cm magas sugar irányú karból áll. A karok felül nyitottak, oldalfaluk átlátszó plexiüveg. A karok végében a táplálékszemcsék számára egy-egy kis tálkát helyeztünk el.

A RAM teszthez az állatokat rendszeres ellenőrzés mellett normális testsúlyuk 85-90 %-ra fogyasztottuk. Fordított nappal/éjszaka ciklushoz és a kísérleti apparátushoz az állatokat két hétig szoktattuk. A habituációs időszakban az állatok 4-4 percig tartózkodtak az útvesztőben, ahol véletlenszerűen táplálékszemeket helyeztünk el (az eredeti tápjukból származó morzsalék). A későbbiekben a táplálékszemeket szisztematikusan közelítettük a karok végében lévő tálákhoz. Végül csak a tálákban helyeztük el azokat. A habituációs időszak utolsó szakaszában minden második karban helyeztünk el táplálékszemeket. A KYNA analóg krónikus alkalmazásának hatását vizsgáló kísérletben az állatokat 8 egymást követő napon kezeltük, és futtattuk és kezeltük ( $n_{\text{kontroll}}=10$  és  $n_{\text{KYNA analóg}}=12$ ).

Az állatok teljesítményét a következő paraméterek szerint értékeltük:

Referencia memória hibaként értékeltük a nem jutalmazott karokba történő első belépést (tehát legfeljebb 4).

Összes hibaként értékeltük a nem jutalmazott karba történő összes belépést.

Munkamemória hibaként értékeltük a jutalmazott karba történő ismételt belépést.

Mértük továbbá a négy jutalom megtalálásához szükséges időt.

Az OF és RAM kísérletekben az apparátust minden egyes futás után 50 %-os alkohollal alaposan megtisztítottuk, hogy a további kísérletet szagnyomok ne befolyásolják. A kontroll csoport a futtatások előtt egy órával 0,4 ml PB-t (pH 7,4), az analóggal kezelt csoport 1 mmol/ttkg KYNA analógot kapott (PB-ben feloldva, pH 7,4).

### **5.3.3 Szkopolamin amnézia**

A kísérletekben 9-16 hetes hím CFLP egereket használtunk. A teszt kivitelezését tekintve a korábbi RAM metódus szerint jártunk el. A kísérletben a szkopolaminnal és a szkopolamin+KYNA analóggal kezelt állatcsoportjainkat egy homogén, jól teljesítő kontroll populációból (n=20) hoztuk létre. A két kezelt csoport teljesítményét a kiválasztást szolgáló tesztet követő napon mértük fel. A kísérlet utolsó napján a kontroll állatcsoport egyik fele (n=10) 0,2 mg/ttkg szkopolamin (szkopolamin-hidroklorid, Sigma), a másik fele (n=10) 0,2 mg/ttkg szkopolamin+1 mmol/ttkg KYNA analóg (PB-ben feloldva, pH 7,4) kezelést kapott. Az analógot 1, a szkopolamint 0,5 órával a futtatás előtt ip. adagoltuk.

Az állatok mozgását minden magatartás kísérletben a „SMART video tracking system” rendszerrel követtük és rögzítettük (Panlab).

## 5.4 Elektrofiziológia

### 5.4.1 *In vitro* mérések

Dekapitálás után az állatok agyát jéghideg mesterséges agy-gerincvelő folyadékban (ACSF) eltávolítottuk, majd vibratómmal (Campden Instruments) a dorzális hippokampuszt is tartalmazó 350  $\mu\text{m}$  vastag, koronális agyszeleteket készítettünk. Az inkubáló ACSF oldatot a következőképpen állítottuk össze (az összetevők mmol-ban): 130 NaCl, 3.5 KCl, 1  $\text{NaH}_2\text{HPO}_4$ , 24  $\text{NaHCO}_3$ , 1  $\text{CaCl}_2$ , 3  $\text{MgSO}_4$  és 10 D-glükóz. A méréseket Haas típusú regisztráló kamrában folytattuk. A mérőoldat az inkubáló oldattól az alábbiakban különbözött;  $\text{CaCl}_2$  koncentráció: 3 mM és  $\text{MgSO}_4$  koncentráció: 1.5 mM

Az oldatokat a kísérletek előtt és a kísérletek alatt folyamatosan 95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  összetételű karbogén gázzal (Messer) oxigenáltuk. A kísérleteket 34°C-on állandó sebességű ACSF áramlás mellett végeztük.

#### 5.4.1.1 Serkentő poszt-szinaptikus mezőpotenciál (fEPSP) regisztrálás

Théta kapillárisból húzott üvegelektrodával orthodrom ingerlést végeztünk a hippokampusz str. radiatum Schaffer kollaterálisain az Ammon szarv CA1-es régiójában (ingerszélesség: 0.2-ms, ingerlési frekvencia: 0.05 Hz). A kontroll stimulus intenzitását úgy választottuk meg, hogy az fél-maximális fEPSP választ váltson ki az intakt állatokban (30-60  $\mu\text{A}$ ).

A hippokampusz CA1-es régió str. radiatum és str. pyramidale rétegeiből az excitatórikus mezőpotenciálokat (fEPSP) 1-2 M $\Omega$  ellenállású, Ag/AgCl üveg elektrodával vezettük el. Az elektrodát regisztráló ACSF-el töltöttük fel. Az elvezetett fEPSP-eket 100-szoros erősítés után 5 kHz-es felül áteresztő szűrőn szűrtük. Az elvezetett jeleket digitalizáltuk és „off-line” elemeztük (Digidata 1200 interface, Axoscope10.0 recording system, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

#### 5.4.1.2 Input-output (I/O) görbék

A szinaptikus jeltovábbítást ún. I/O görbék felvételével mértük fel. Ennek során a 0-100  $\mu\text{A}$  erősségű 10  $\mu\text{A}$ -es lépésben fokozatosan emelt ingeráramokra adott fEPSP válaszokat regisztráltuk.

#### **5.4.1.3 A szinaptikus potencírozódás indukciója**

A hippocampusz CA1-es régió piramissejtjeinek apikális dendritjei és a Schaffer kollaterálisok szinapszisainak potencírozódását nagyfrekvenciás ingerléssel (NFI) indukáltuk (ingerszélesség: 0.2 ms; ingerlési frekvencia: 100 Hz; ingerlési időtartam: 5 s). Az indukció előtt a stabil alapvonal kialakulásáig (kb. 40-60 min) kontroll paraméterek mellett regisztráltunk. Az indukció után kontroll ingerlési paraméterek mellett a fEPSP-k alakulását 60 percig követtük.

#### **5.4.2 *In vivo* elektrofiziológia**

*In vivo* elektrofiziológiai méréseket a dMCAO modell karakterizálásához készítettünk. A megtisztított koponya felszínéről (Br -3 mm, antero-laterálisan 2mm) gömbfejű ezüst elektródával elektroencefalogramot (EEG) vettünk fel (mintavételi frekvencia: 1024 Hz, erősítés 1000x; Experimetria NeuroSys szoftver ,Experimetria Ltd. Hungary). Az EEG teljesítmény spektrum analízist a MATLAB programkörnyezetben EEGLab toolbox segítségével végeztük (Delorme és Makeig, 2004). Az elvezetett jeleket 2-20 Hz-es frekvencia tartományra szűrtük, a további elemzést ebben a tartományban végeztük.

## 5.5 Statisztikai elemzés

Adataink eloszlását a Shapiro-Wilk normalitás teszttel, a szórások homogenitását a Levene próbával vizsgáltuk. Adatainkat vonal- és oszlopdiagrammal vagy doboz ábrával szemléltettük. A vonal- és oszlopdiagramokon az átlagot és az átlag hibáját, a doboz ábrákon az adatok mediánját, az interkvartilis tartományt és a szélső értékeket ábrázoltuk.

A hippokampális FJ-C+ piramis sejtek mennyiségi összehasonlítását lineáris kevert modellel végeztük az R programkörnyezetben. Modellünkbe Poisson hibaeloszlást, az állatok random hatását és a kezelések fix hatását építettük be (lme4 package; R; Crawley, M. J. 2007: The R Book. - John Wiley: New York pp: 627-685 szerint).

A szomatoszenzoros kérgi FJ-C+ sejtek mennyiségi összehasonlítása során az állatok random hatását és a kezelés fix hatását szintén figyelembe vettük (General Linear Model, IBM SPSS Statistics version 20).

A magatartás vizsgálatok során a többszörös összehasonlításokat variancia analízissel (ANOVA) és Dunette T3 „post-hoc” próbával végeztük. Ismételt mérésekhez és kapcsolt mintákhoz a Friedman nem paraméteres próbát alkalmaztuk. Ismételt mérések esetén, több faktor együttes vizsgálatához a generalizált lineáris modell/generalizált becslő egyenletek módszerét alkalmaztuk. Statisztikai számításokhoz és az eredmények ábrázolásához az SPSS (IBM SPSS Statistics version 20). és Origin (Origin 7.0 OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) programokat alkalmaztuk.

Az I/O görbék vizsgálata során „General linear model/Repeated measures” módszert alkalmaztuk. Az egyes stimulus intenzitásokhoz tartozó páronkénti összehasonlítást Kruskal-Wallis ANOVA-val végeztük (IBM SPSS Statistics version 20).

A szinaptikus potencírozódás analízisét lineáris kevert modellel végeztük el az R programkörnyezetben. Modellünkbe Gauss hibaeloszlást, az állatok random hatását és a kezelések fix hatását építettük be. (lme4 package; R; Crawley, M. J. 2007: The R Book. - John Wiley: New York pp: 627-685 szerint).

Az EEG elemzés során a teljesítmény spektrumot 1 Hz-es intervallumokra bontottuk fel (2-20 Hz). Az egyes frekvenciákhoz tartozó teljesítményt egyedi adatként kezeltük, és azokat ismételt mérések variancia analízisnek vetettük alá. Az analízist „General Linear Model\Repeated measures” modellben végeztük (IBM SPSS Statistics version 20).

## **6. A kísérletekben való részvétel**

Az *in vitro* elvezetések Fuzik János, a dMCAO modellállatok preparálását és az EEG elvezetést Knapp Levente készítette. A szkopolamin amnézia kísérletben az állatok tréningezését és tesztelését Gyengéné Ruzska Marian végezte. Az EEG értékeléshez használt programot Németh Kornél fejlesztette.

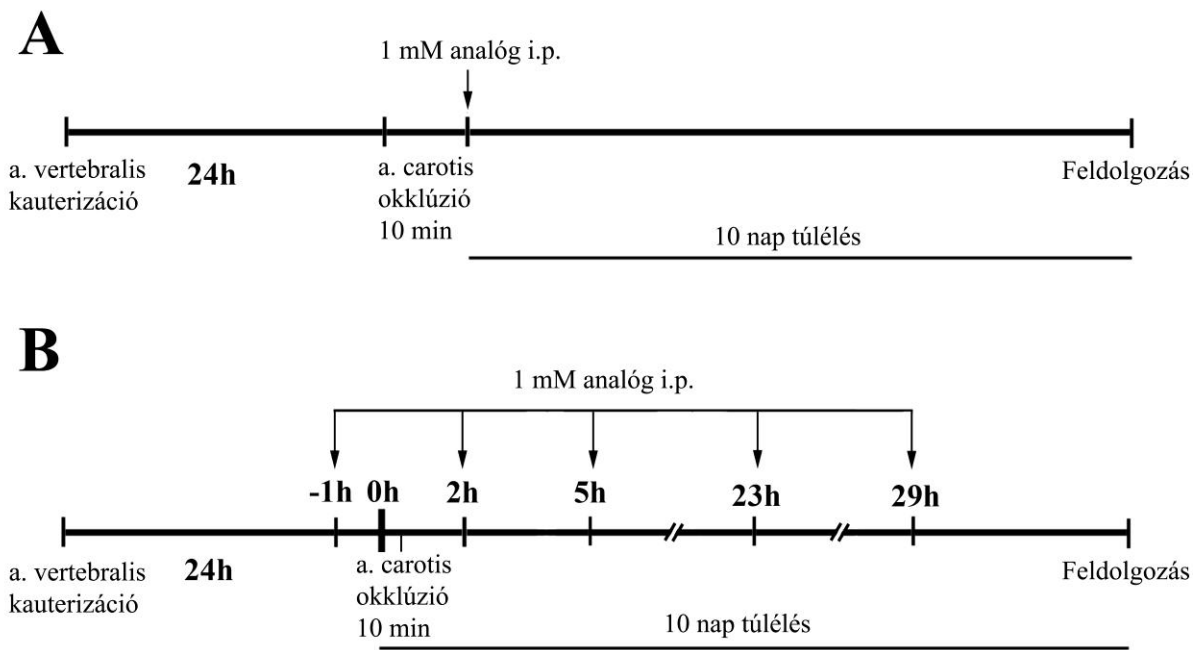
## 7. Eredmények

### 7.1 A KYNA analóg neuroprotektív hatása teljes előagyi iszkémiában

A 10 perces teljes előagyi iszkémia kiterjedt léziót okozott a dorzális hippocampusz CA1-es régiójában. 10 napos túlélési idő után intenzív FJ-C jelölődést kaptunk az Ammon szarv CA1-es régiójában és a dorzális szubikulumban ( $n_{\text{állat}}=4$ ;  $n_{\text{metszet}}=96$ , medián=158.5). A FJ-C jelölés és a DAPI ellenfestés alapján kijelenthetjük, hogy a CA1-es régióban a piramissejtek legnagyobb része elpusztult. A festődés kiterjedt a str. oriens és str. lacunosum moleculare rétegekre is, vagyis a piramissejtek apikális és bazális dendritje, valamint axonja is jelölődött (4. ábra, A panel). A CA2, CA3 régiók valamint a gyrus dentatus principális sejtjei nem károsodtak (4. ábra, áttekintő kép).

Neuroprotektíós kísérletünk első szakaszában a hatóanyag adagolásával korábbi kísérleti elrendezésekhez igazodtunk (Sas és mtsai., 2008). Az analógot az iszkémiás sértés előtt egy órával, majd azt követően többször ismételve adtuk (3. ábra, B panel). A kezelés hatására szignifikáns FJ-C jelölt sejtszám csökkenés következett be a CA1-es régióban (5. ábra;  $n_{\text{állat}}=5$ ;  $n_{\text{metszet}}=120$ ; medián=105;  $p=0,001$ ).

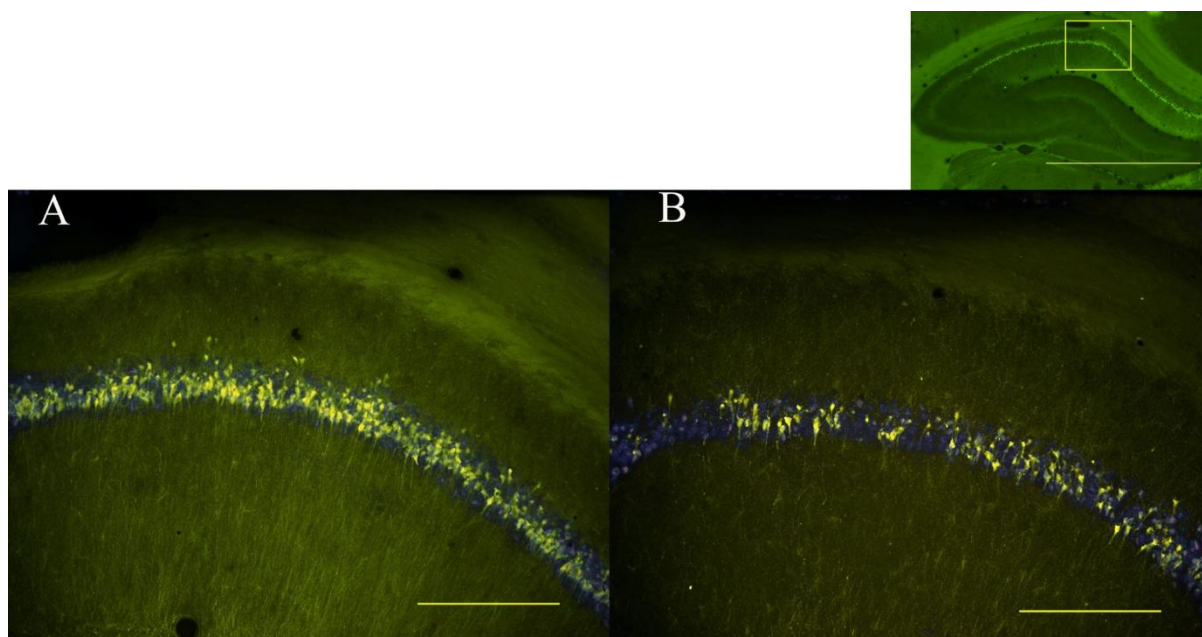
Egy következő kísérletsorozatban a kezelési paradigmát megváltoztattuk, az analógot ebben az esetben csupán egyszer, a 10 perces iszkémiás időszak után, a reperfúzió pillanatában adtuk (3. ábra, A panel). A kezelés hatására ebben az esetben is jelentős, szignifikáns FJ-C+ sejtszám csökkenést tapasztaltunk, bár a korábbinál kisebb mértékben (5. ábra;  $n_{\text{állat}}=5$ ;  $n_{\text{metszet}}=120$ ; medián=120;  $p=0,016$ ).



### 3. ábra: A műtéti protokoll és a hatóanyag adagolás időrendje a 4VO modellben

**A tengely: Egyszeri analóg adagolás.** Az analóg 1mmol/ttkg-os adagját az a. carotisok reperfúziója után közvetlenül i.p. adagoltuk.

**B tengely: Ismételt analóg adagolás.** Az analóg 1mmol/ttkg-os adagját az a. carotisok leszorítása előtt 1 órával, majd azt követően 2, 5, 23 és 29 órával adagoltuk i.p.



**4. ábra: Reprezentatív mikroszkópos felvételek a hippocampusz koronális metszetéről.**

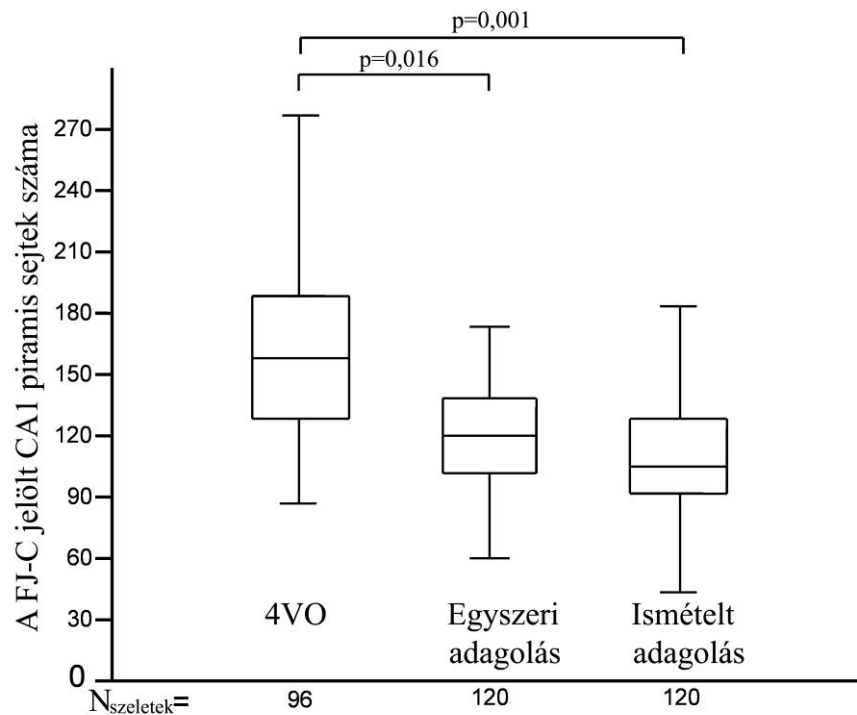
**Jobb felső áttekintő kép:** FJ-C-vel jelölt metszet a dorzális hippocampusz területéről (sztereotaxiás koordináta: Br -3,8, 40x nagyítás, mérce: 2000  $\mu\text{m}$ ). A sárga négyzet a CA1-es régió konvex-konkáv átmenetét foglalja magába, a FJ-C+ sejtek számolását ezen a területen végeztük.

**A és B panel: FJ-C/DAPI kettős festés hippocampális koronális metszeten.**

(sztereotaxiás koordináta: Br -3,8 nagyítás 200x, mérce: 200  $\mu\text{m}$ ) A DAPI festődést csak a str. pyr. területén ábrázoltuk.

**A:** A 4VO csoportban a piramissejtek rétege nagymértékben degenerálódott. A FJ-C festődés (sárgás-zöld szín) a sérült sejtestekben és nyúlványokban is megjelenik. A nagyszámú FJ-C+ sejt között elszórtan látunk ép, DAPI+ neuronokat (kék szín).

**B:** Az ismételt KYNA analóg kezelés hatására a FJ-C+ sejtek száma lecsökkent. A sérült sejtek között jóval több ép, DAPI+ neuron jelenik meg. A neurodegeneráció részleges.



##### 5. ábra: A FJ-C+ sejtek száma a hippocampusz CA1-es régiójában !

Az egyes csoportokban számolt FJ-C+ sejtszám alakulását doboz ábrával mutatjuk be.

**4VO:** 4VO csoport (medián: 158.5)

**Egyszeri adagolás:** Az analóg egyszeri adagolása szignifikánsan csökkentette a degenerálódott sejtek számát. (medián=120;  $p=0.016$ ).

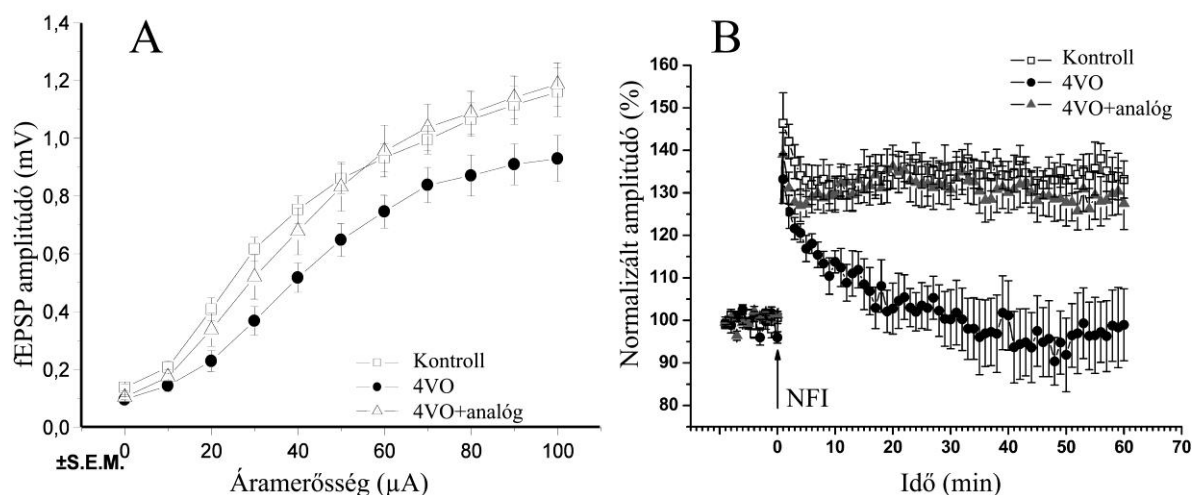
**Ismételt adagolás:** Az analóg ismételt adagolása szignifikánsan csökkentette a degenerálódott sejtek számát. (medián=105;  $p=0.001$ ).

## 7.2 A KYNA analóg neuroprotektív hatása funkcionális vizsgálatokban

### 7.2.1 A szinaptikus jelátvitel

A szinaptikus jelátvitel vizsgálatára I/O görbéket vettünk fel az iszkémia által érintett hippocampális területen. Az iszkémiás állapotot a korábbiakban leírtakkal megegyezően állítottuk elő, a vizsgálatokat 10 napos túlélési idő után végeztük. A mérések során kontroll, 4VO és a 4VO+analóggal többször kezelt csoportok eredményeit vetettük össze. A lépcsőzetesen emelt ingeráramokra a kontroll csoport fokozatosan növekvő fEPSP amplitúdókkal válaszolt, a görbe telítési jelleget mutatott (6. ábra, A panel;  $n_{\text{állat}}=3$ ;  $n_{\text{szelet}}=6$ ). A 4VO csoport fEPSP amplitúdói összességében szignifikánsan alacsonyabb értéket mutattak (6. ábra, A panel; ;  $n_{\text{állat}}=4$ ;  $n_{\text{szelet}}=7$ ;  $p=0.045$ ). Az analóggal kezelt csoport fEPSP amplitúdó értékei azonban nem tértek el szignifikánsan a kontroll csoport értékeitől (6. ábra, A panel;  $n_{\text{állat}}=3$ ;  $n_{\text{szelet}}=8$ ;  $p=0.997$ ).

Az I/O görbék eredményei a hisztológiai vizsgálatokkal összhangban azt mutatják, hogy a 10 perces iszkémia súlyos morfológiai és funkcionális károsodást okozott a hippocampus CA1-es régiójában. Az analóggal történő ismételt kezelés megőrizte a hálózat szinaptikus jeltovábbítási képességét.



**6. ábra: *In vitro* elektrofiziológiai vizsgálatok kontroll, kezeletlen 4VO és analóggal kezelt állatcsoportokban**

**A: Input–output (IO) fEPSP elvezetések az intakt (□), 4VO (●) és az analóggal kezelt (Δ) állatcsoportból.**

Szignifikáns különbséget találtunk a kontroll és a kezeletlen 4VO állatok fEPSP amplitúdói között ( $p=0.045$ ). Az előagyi iszkémia tehát károsította a szinaptikus ingerület átvitelt. A kontroll és analóggal kezelt állatok fEPSP amplitúdói között ugyanakkor szignifikáns különbség nem mutatkozott ( $p=0.997$ )

**B: A szinaptikus potencírozódás indukciója nagyfrekvenciás ingerléssel (NFI)**

Nyíl jelzi az nagyfrekvenciás ingerlés időpontját.

A nagyfrekvenciás ingerlés a kontroll állatokban (□) szinaptikus potencírozódást váltott ki. Az átmeneti, poszt-tetániás potencírozódás után a megemelkedett fEPSP amplitúdók a regisztrálás teljes időtartama alatt stabilan megmaradtak.

A 4VO csoport (●) amplitúdó értékei az átmeneti poszt-tetániás potencírozódás után rövid idővel kontroll értékre estek vissza. Szinaptikus potencírozódás nem alakult ki.

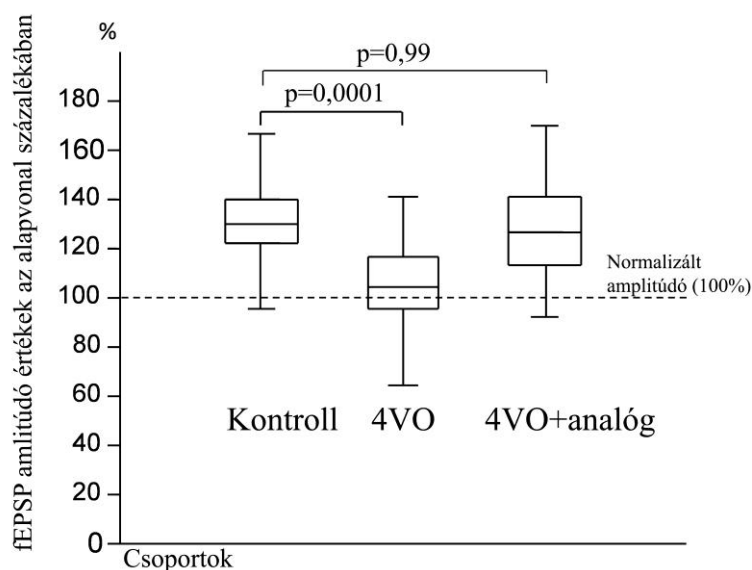
Az analóggal kezelt csoport (Δ) fEPSP amplitúdó értékei a nagyfrekvenciás stimulust követően megközelítették a kontroll csoport értékeit, szinaptikus potencírozódás a kontroll csoporthoz közeli szintet ért el.

## 7.2.2 A szinaptikus potencírozódás indukciója

A bazális szinaptikus funkció felmérése mellett a károsodott hippocampális régió szinaptikus plaszticitását is felmértük. A kísérletben a Schaffer kollaterális-CA1 piramissejt apikális dendritek szinapszisainak facilitációját váltottuk ki. Intakt állatokban a nagyfrekvenciás ingerlés a fEPSP amplitúdók erőteljes és stabil növekedését eredményezte. A fEPSP amplitúdók a kezdeti poszt-tetánikus potenciálnövekedés után a kontroll amplitúdókhoz képest mintegy 30-40 %-os növekedést mutattak, és az egy óras követés alatt ez stabilan fennmaradt (6. ábra, B panel;  $n_{\text{állat}}=3$ ;  $n_{\text{szelet}}=6$ ; medián=129). Ezzel szemben a 4VO csoportban a poszt-tetánikus potenciálnövekedés után a fEPSP amplitúdók rövid idő alatt a kontroll értékre estek vissza, a szinapszisok facilitációja nem alakult ki (6. ábra, B panel;

$n_{\text{állat}}=4$ ;  $n_{\text{szelet}}=7$ ; medián=104;  $p=0,0001$ ). Az analóggal kezelt csoportban a potencírozódás indukciója után elvezetett fEPSP amplitúdók alig maradtak a kontroll állatok értékei alatt, szignifikáns különbséget nem találtunk. (6. ábra, B panel; medián=126;  $n_{\text{állat}}=3$ ;  $n_{\text{szelet}}=8$ ;  $p=0,99$ ).

Az adatok statisztikai összehasonlítása megmutatta, hogy a kontroll és a 4VO csoport eredményei között szignifikáns különbség van, ugyanakkor a kezelt csoport nem különbözik szignifikánsan a kontroll csoporttól (7. ábra). A hisztológiai eredmények, és az I/O görbék értékei mellett az indukciós kísérlet is igazolta, hogy a kezelés a hippocampusz Schaffer kollaterális-CA1 piramissejt apikális dendritek szinapszisainak plaszticitását is megőrizte.



### 7. ábra: Az *in vitro* potencírozódott fEPSP amplitúdó értékek páronkénti összehasonlítása

Doboz ábrán szemléltetjük az egyes csoportok fEPSP amplitúdó értékeit az alapvonalhoz (a kontroll felvétel átlagos fEPSP amplitúdó értéke) viszonyított százalékban kifejezve. Szaggatott vonal jelzi a normalizált alapvonal fEPSP értéket (100%).

**Kontroll:** Az intakt állatokból származó szeletekben a nagyfrekvenciás ingerlést a fEPSP amplitúdók mintegy 30%-os növekedése követte (medián=129).

**4VO:** A 4VO csoportban szinaptikus potencírozódást nem sikerült kiváltani, a fEPSP amplitúdó értékek a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan alacsonyabb értékeket mutattak (medián=104;  $p=0.0001$ ).

**4VO+analóg:** Az analóggal kezelt csoportban a fEPSP amplitúdó értékek nem tértek el szignifikánsan a kontroll csoport értékeitől (medián=126;  $p=0.99$ ). A szinaptikus potencírozódást az analóggal kezelt csoportban is sikerült kiváltani.

## 7.3 A KYNA analóg neuroprotektív dózisának hatása magatartásvizsgálatokban

### 7.3.1 Morris Water Maze

A kísérletben a KYNA analóg térbeli tájékozódási és tanulási képességre gyakorolt hatását vizsgáltuk egészséges állatokban. A kísérleti felállás lehetővé tette, hogy a munkamemóriaként értékelhető folyamatokat és a konszolidálódó emléknymok előhívását egyszerre vizsgáljuk (Baldi és mtsai., 2005).

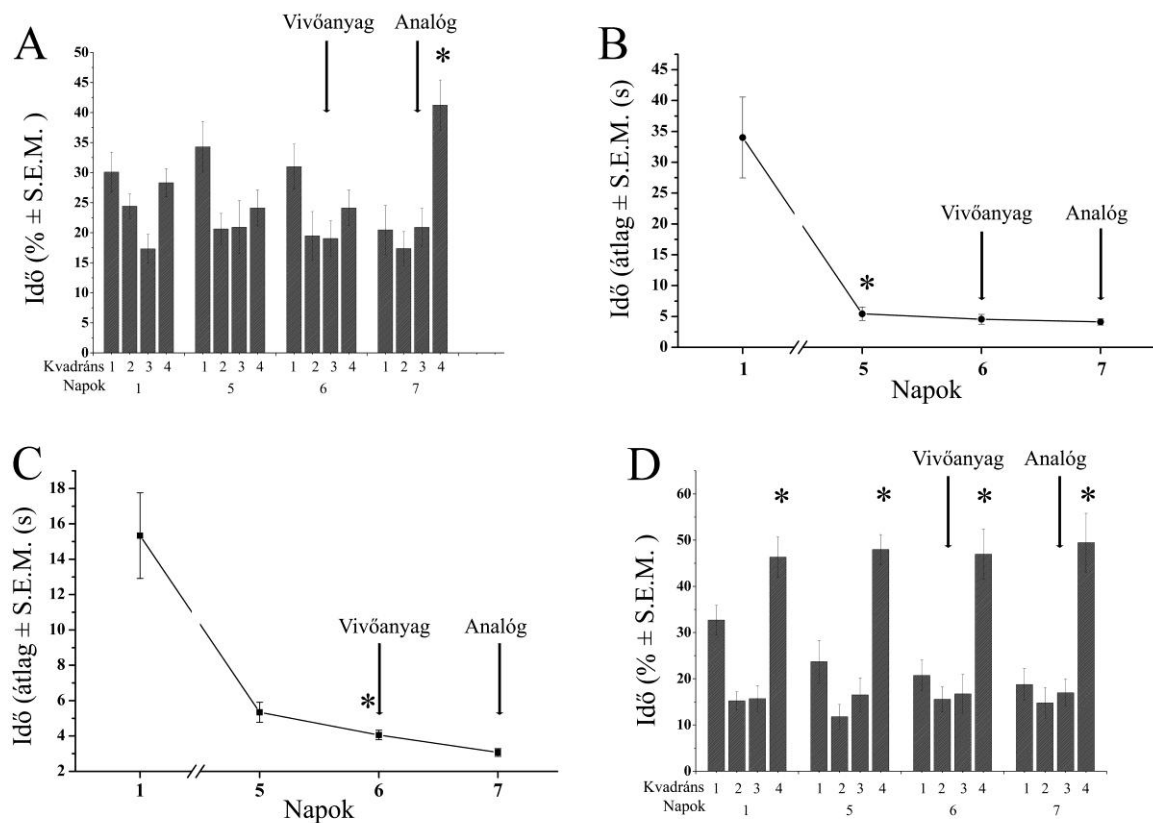
Az egy hetes kísérleti periódus első öt napjában a tréning előtti tesztek során a célkvadránsra irányuló zóna preferenciát nem tapasztaltunk. A hatodik napon a vivőanyaggal történő kezelés nem okozott érzékelhető változást. Ugyanakkor a hetedik napon, az 1 mmol/ttkg

analóggal történő kezelés hatására a célkvadránsra irányuló szignifikáns zóna preferencia jelent meg (8. ábra, A panel;  $n_{\text{nállat}}=10$ ;  $p=0,02$ ).

A menekülési latenciát tekintve az ötödik napon a teljesítmény szignifikáns javulását tapasztaltuk (8. ábra, B panel;  $n_{\text{nállat}}=10$ ;  $p=0,001$ ). A tendenciát sem a vivőanyaggal, sem az analóggal történő kezelés nem rontotta, az további javulást mutatott (8. ábra, B panel).

A konszolidálódó emlékenyom kialakulását az átlagos menekülési latencia alakulásával is megvizsgáltuk. Ebben az esetben a platform megtalálásához szükséges idők átlaga az öt tréning úszás során folyamatos csökkenést mutatott. Sem a vivőanyag, sem az analóg nem rontotta a tendenciát, a legjobb teljesítmény a hatodik és hetedik napon jelent meg (8. ábra, C panel;  $n_{\text{nállat}}=10$ ;  $p=0,001$ ).

A rövid távú munkamemóriaként értelmezett teljesítmény alakulását a tréningek után egy platform nélküli úsztatással vizsgáltuk. Szignifikáns zóna preferencia mind a vivőanyaggal, mind a KYNA analóggal történő kezelés esetében ( $p=0,008$ ) mutatkozott (8. ábra, D panel;  $n_{\text{nállat}}=10$ ).



## 8. ábra: A térbeli tájékozódási és tanulási képesség alakulása a vízi útvesztőben

Az ábrán csillag jelzi a szignifikáns különbségeket

### A: Zóna preferencia

Az egyes kvadránsokban eltöltött idő a teljes úszási idő (60 s) százalékában az 1., 5., 6. és 7. napokon (átlag±S.E.M.). Az oszlopok az egyes kvadránsokat jelképezik, a 4. oszlop a célkvadráns. A célkvadránsra vonatkozó szignifikáns zóna preferencia csak az analóggal történő kezelés napján alakult ki ( $p=0.02$ )

### B: Menekülési latencia

A rejtett platform megtalálásához szükséges átlagos idő az első tréning úsztatások során az 1., 5., 6. és 7. napokon (átlag±S.E.M.). Az 5. napra a menekülési latencia szignifikáns csökkenést mutatott ( $p=0.001$ ). A teljesítményt sem a vivőanyaggal, sem az analóggal történő kezelés nem rontotta.

### C: Átlagos menekülési latencia

A menekülési latencia 5 tréning úszás eredményéből vont átlaga az 1., 5., 6. és 7. napokon. (átlag±S.E.M.). Az átlagos menekülési latencia a hatodik napon szignifikáns csökkenést mutatott ( $p=0.001$ ). A vivőanyaggal és az analóggal történő kezelés a teljesítményt a hatodik és a hetedik napon nem rontotta.

### D: Munkamemória teljesítmény

Az egyes kvadránsokban eltöltött idő a tréningek utáni úsztatás során (platform nélkül), a teljes úszási idő (60 s) százalékában az 1., 5., 6. és 7. napokon (átlag±S.E.M.). Az oszlopok az egyes kvadránsokat jelképezik, a 4. oszlop a célkvadráns. A célkvadránsra vonatkozó szignifikáns zóna preferencia minden kísérleti napon megjelent. A teljesítményt sem a vivőanyaggal, sem az analóggal történő kezelés nem rontotta ( $p=0.008$ ).

Az összes vizsgált paramétert figyelembe véve elmondhatjuk, hogy az állatok vízi útvesztő kísérletben történő tanítása sikeres volt. Az eltérő memória folyamatokra jellemző teljesítmény a kísérletben folyamatosan nőtt, minden esetben statisztikailag szignifikáns eredménnyel.

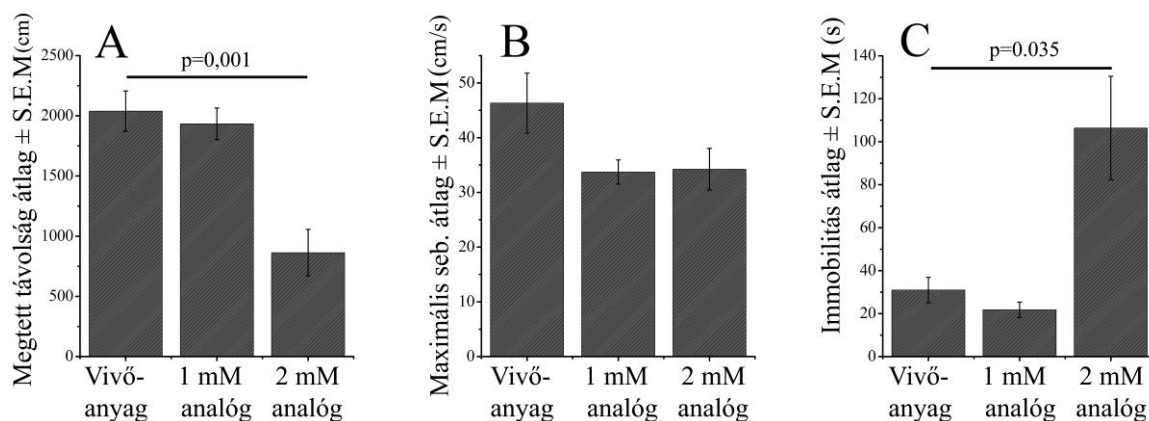
A kísérleti eredmények számszerűsítése alapján kijelenthetjük, hogy a vivőanyaggal történő kezelés nem zavarta meg a tanulási és konszolidációs folyamatokat. Az analóg hatására sem következett be teljesítmény csökkenés, sőt, a tréning előtti zóna preferencia esetében javulást tapasztaltunk. További vizuális megfigyelésünk volt, hogy az analóg hatására az állatok nyugodtabban oldották meg a feladatokat.

### 7.3.2 Nyílt porond teszt (OF)

A kísérletben az analóg két dózisének egerek explorációs aktivitásra gyakorolt hatását vizsgáltuk (vivőanyag, 1 ill. 2 mmol/ttkg KYNA analóg (0,4 ml PB-ben oldva, pH 7,4);  $n_{\text{állat}}=10$  minden csoportban).

A vivőanyaggal történő kezeléshez képest az 1 mmol/ttkg analóg az állatok OF-ben megtett összes útját tekintve elhanyagolható csökkenést okozott. 2 mmol/ttkg hatására ez az érték szignifikánsan csökkent (9. ábra, A panel;  $\text{átlag}_{\text{vivőanyag}}$ : 2038 cm;  $\text{átlag}_{1\text{mM}}$ : 1933 cm,  $\text{átlag}_{2\text{mM}}$ : 863 cm;  $p=0,001$ ). Az állatok maximális sebességét a vivőanyaghoz képest az analóg mindkét dózisa egyenlő mértékben csökkentette, a változás azonban nem volt szignifikáns (9. ábra, B panel;  $\text{átlag}_{\text{vivőanyag}}$ : 46 cm/s,  $\text{átlag}_{1\text{mM}}$ : 33 cm/s,  $\text{átlag}_{2\text{mM}}$ : 34 cm/s  $p=0,069$ ). Az immobilitás idejének szignifikáns emelkedését ugyanakkor csak az analóg nagyobb dózisa váltotta ki (9. ábra, C panel;  $\text{átlag}_{\text{vivőanyag}}$ : 30 s;  $\text{átlag}_{1\text{mM}}$ : 21 s,  $\text{átlag}_{2\text{mM}}$ : 106 s;  $p=0,035$ ). Mivel az OF széli és középső zónáinak látogatása arányában nem láttunk különbségeket, ezért ezeket nem vizsgáltuk elkülönítve. Hasonló módon, sztereotip viselkedési formák feltűnő megjelenését sem tapasztaltuk, kvantitatív vizsgálatokat ezek tekintetében nem végeztünk.

A kísérleti eredmények számszerűsítése alapján elmondhatjuk, hogy a hatóanyag alacsonyabb (1 mmol/ttkg) dóziséval történő kezelés az állatok explorációs aktivitását jelentősen nem befolyásolja. A magasabb dózis (2mmol/ttkg) azonban jelentősen csökkentette az OF feltérképezése során megtett utat, és az immobilitás növekedését is kiváltotta.



## 9. ábra: Az explorációs aktivitás alakulása a nyílt porond vizsgálatban

### A: Megtett távolság

Az oszlopok az egyes csoportok nyílt porondon megtett útját mutatják centiméterben (átlag±S.E.M.). Az analóg alacsonyabb dózisa (1 mM) a megtett utat elhanyagolható mértékben csökkentette. A magasabb dózis (2 mM) ugyanakkor szignifikáns csökkenést okozott (átlag<sub>vivőanyag</sub>: 2038 cm; átlag<sub>1mM</sub>: 1933 cm, átlag<sub>2mM</sub>: 863 cm;  $p=0,001$ ).

### B: Maximális sebesség

Az oszlopok az állatok maximális sebességét mutatják (cm/s). A maximális sebességet az analóg alacsonyabb (1 mM) és magasabb (2 mM) dózisa egyaránt csökkentette, a változás statisztikai értelemben azonban nem volt szignifikáns (átlag<sub>vivőanyag</sub>: 46 cm/s, átlag<sub>1mM</sub>: 33 cm/s, átlag<sub>2mM</sub>: 34 cm/s;  $p=0,069$ ).

### C: Immobilitás

Az oszlopok az állatok mozdulatlanságban töltött idejét mutatják (átlag±S.E.M.). Az analóg alacsonyabb dózisa (1 mM) a nyugalomban töltött időt kis mértékben csökkentette, a nagyobb adag (2 mM) ugyanakkor szignifikáns növekedést okozott (átlag<sub>vivőanyag</sub>: 30 s; átlag<sub>1mM</sub>: 21 s, átlag<sub>2mM</sub>: 106 s;  $p=0,035$ ).

## 7.3.3 Sugár útvesztő (RAM)

A kísérletben a krónikusan adagolt analóg térbeli tájékozódásra és tanulásra gyakorolt hatását vizsgáltuk vivőanyaggal ( $n=10$ ) és 1 mmol/tkg KYNA analóggal kezelt állatokban ( $n=12$ ). A vizsgálathoz a hatóanyag OF-ben használt alacsonyabb dózisát választottuk. Feltételeztük, hogy ez az állatokat a feladat megoldásában -legalább is az explorációs aktivitás csökkentésén keresztül- nem gátolja.

A kísérletet nyolc egymást követő napon folytattuk, a vizsgálandó paramétereket pedig úgy határoztuk meg, hogy azokkal a munkamemóriaként értékelhető folyamatokat és a konszolidálódó emlényomok előhívását egyszerre vizsgálhassuk.

A kísérlet hatodik napjára az emlényom konszolidációjára utaló, ún. referencia memória hiba szignifikáns csökkenést mutatott a vivőanyaggal és KYNA analóggal kezelt csoportban egyaránt ( $p=0,001$ ). A tendencia a kísérlet hátralevő részében tovább javult mindkét

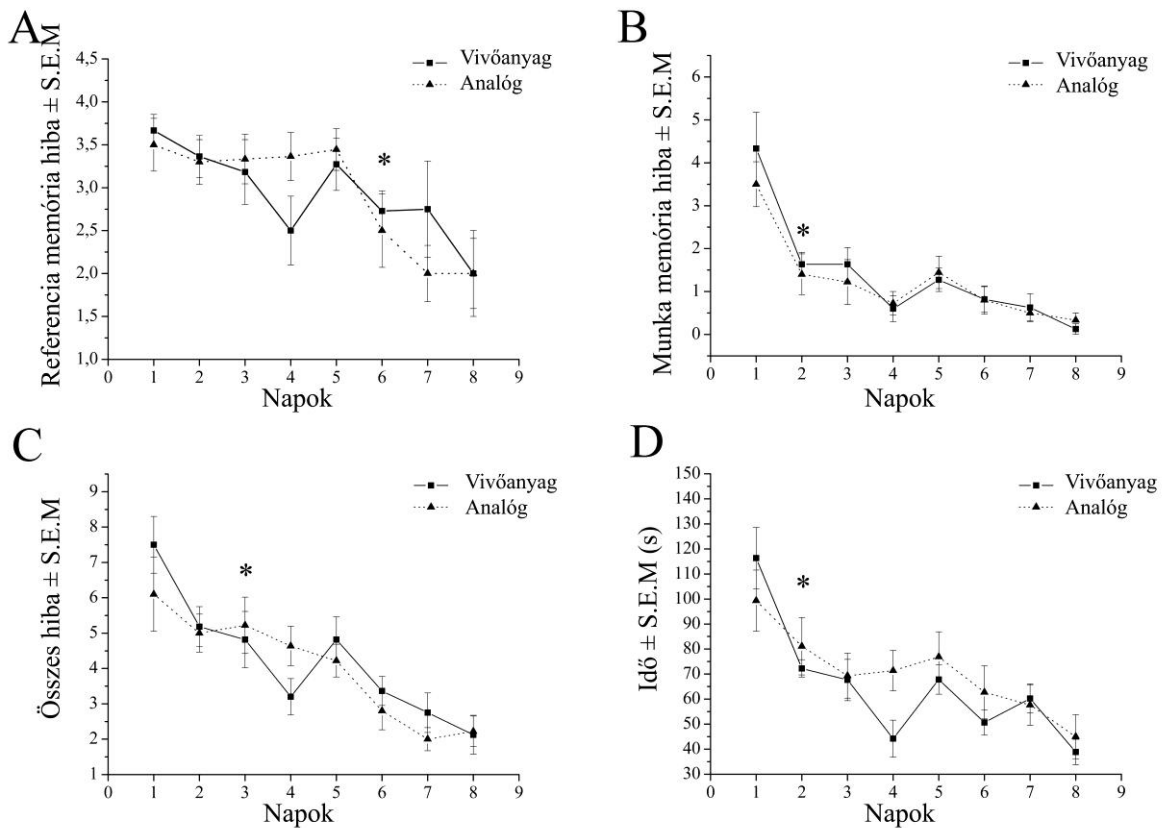
csoportban. Statisztikai analízis alapján a két csoport nyolc napos teljesítménye szignifikáns különbséget nem mutatott (10. ábra, A panel;  $p=0,523$ ).

A rövid távú teljesítményre utaló ún. munkamemória hiba már a kísérlet második napján szignifikáns csökkenést mutatott mindkét csoportban ( $p=0,001$ ), és ez a teljesítmény a kísérlet hátralevő részében tovább javult. Statisztikai analízis alapján a két csoport nyolc napos teljesítménye szignifikáns különbséget nem mutatott (10. ábra, B panel;  $p=0,356$ ).

A referencia memória hibából származtatott ún. összes hiba alakulása szintén folyamatosan javuló tendenciát mutatott. Szignifikáns javulás a harmadik napon jelentkezett ( $p=0,042$ ), és a teljesítmény a kísérlet hátralevő részében tovább javult. A két csoport között statisztikai különbséget itt sem tudtunk kimutatni (10. ábra, C panel,  $p=0,121$ ).

Kísérletünkben megvizsgáltuk továbbá a feladat megoldásához szükséges összes idő alakulását. A korábban vázolt paraméterekhez hasonlóan az idő tekintetében is folyamatos javulást tapasztaltunk. Szignifikáns csökkenés a kísérlet második napján látható ( $p=0,001$ ). A csoportok között szignifikáns eltérést itt sem találtunk (10. ábra, D panel;  $p=0,753$ ).

Az összes vizsgált paramétert figyelembe véve elmondhatjuk, hogy az állatok RAM paradigmában történő tanítása sikeres volt. Az eltérő memória folyamatokra jellemző hibás választások száma a kísérletben folyamatosan csökkent, minden esetben statisztikailag szignifikáns eredménnyel. Ugyanakkor, az analóggal történő kezelés nem okozott teljesítmény csökkenést vagy eltérést a vivő anyaggal kezelt csoport eredményéhez képest.



**10. ábra: A térbeli tájékozódás és tanulás alakulása a sugár útvesztőben**

Az ábrán csillag jelzi a szignifikáns különbségeket.

**A: Referencia memória hiba**

Vonal ábra szemlélteti a referencia memória hiba alakulását a kísérlet nyolc napja alatt (átlag±S.E.M.). A 6. npra a referencia memória hibák száma szignifikáns csökkenést mutatott a vivőanyaggal (folytonos vonal) és az analóggal kezelt csoportban (szaggatott vonal) egyaránt ( $p=0,001$ ). A két csoport teljesítményében a kísérlet időtartama alatt összességében nem mutatkozott szignifikáns különbség ( $p=0,523$ ).

**B: Munkamemória hiba**

Vonal ábra szemlélteti a munkamemória hiba alakulását a kísérlet nyolc napja alatt (átlag±S.E.M.). A 2. npra a munkamemória hibák száma szignifikáns csökkenést mutatott a vivőanyaggal (folytonos vonal) és az analóggal kezelt csoportban (szaggatott vonal) egyaránt ( $p=0,001$ ). A két csoport teljesítményében a kísérlet időtartama alatt összességében nem mutatkozott szignifikáns különbség ( $p=0,356$ ).

**C: Összes hiba**

Vonal ábra szemlélteti a teljes hiba alakulását a kísérlet nyolc napja alatt (átlag±S.E.M.). A 3. npra a teljes hibák száma szignifikáns csökkenést mutatott a vivőanyaggal (folytonos vonal) és az analóggal kezelt csoportban (szaggatott vonal) egyaránt ( $p=0,042$ ). A két csoport teljesítményében a kísérlet időtartama alatt összességében nem mutatkozott szignifikáns különbség ( $p=0,121$ ).

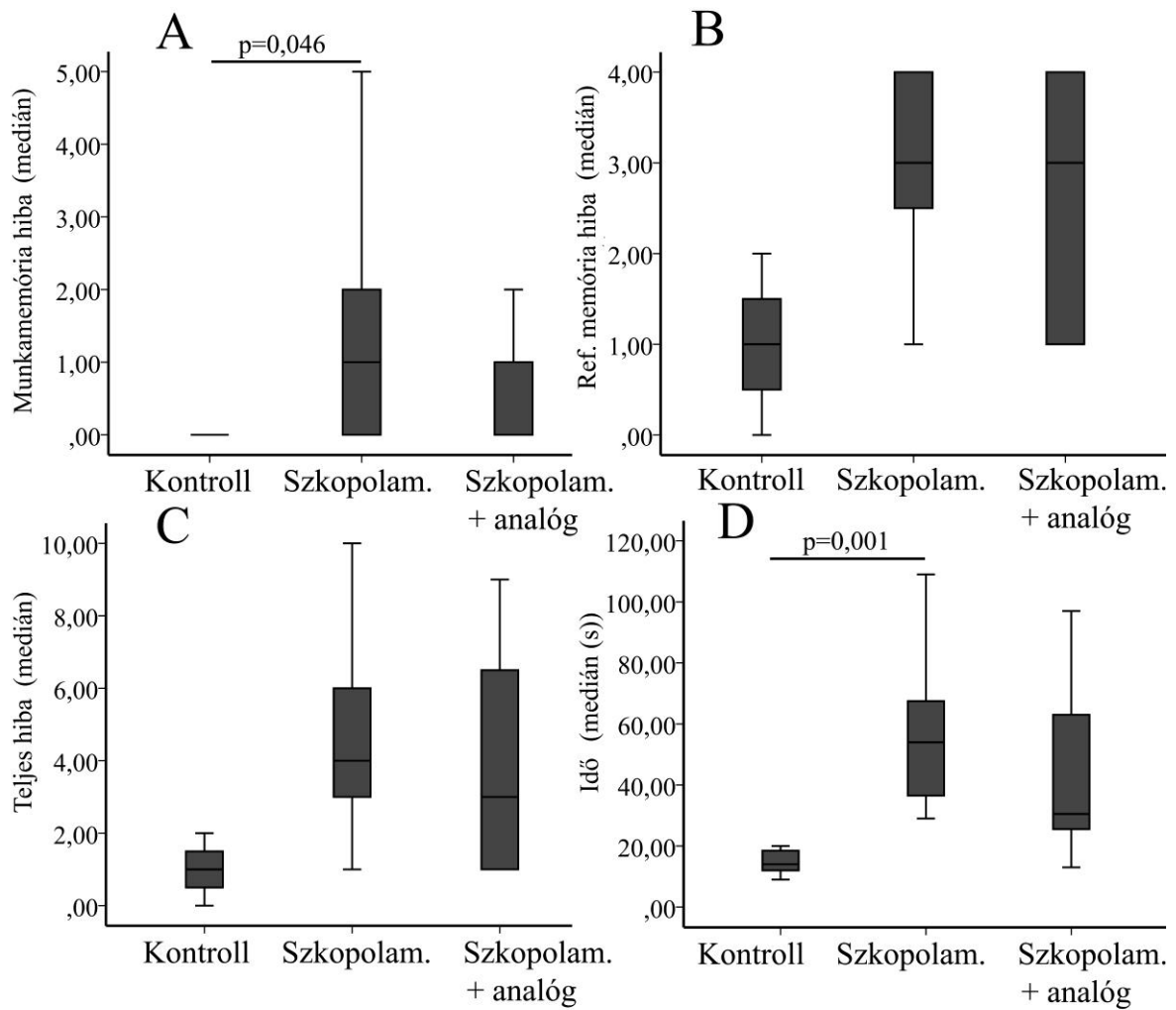
**D: A feladat teljesítéséhez szükséges idő**

Vonal ábra szemlélteti a feladat teljesítéséhez szükséges idő alakulását a kísérlet nyolc napja alatt (átlag±S.E.M.). A 2. napon az idő tekintetében szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a vivőanyaggal (folytonos vonal) és az analóggal kezelt csoportban (szaggatott vonal) egyaránt ( $p=0,001$ ). A két csoport teljesítményében a kísérlet időtartama alatt összességében nem mutatkozott szignifikáns különbség ( $p=0,753$ ).

### 7.3.4 Szkopolamin amnézia

A kísérletben az analóg ún. szkopolamin amnéziában kifejtett hatását vizsgáltuk (a vizsgálati csoportok és elemszámok képzése tekintetében lásd az 5.3.3. fejezetet) A szkopolamint a RAM paradigma szerint betanított állatokon alkalmaztuk. Ebben az esetben tehát a szkopolamint és az analógot a kísérlet utolsó napján adagoltuk, és vizsgáltuk az analóg szkopolamin okozta teljesítményromlást befolyásoló hatását. A vizsgált paraméterek a korábbi RAM vizsgálattal megegyeztek. A kísérletben szignifikáns változást a csoportok között a munkamemória ( $\text{medián}_{\text{vivőanya}}=0,0$ ,  $\text{medián}_{\text{szkopolamin}}=1,0$ ,  $\text{medián}_{\text{szkop+analóg}}=0,0$ ,  $p=0,029$ ) és a teljesítéshez szükséges idő ( $\text{medián}_{\text{vivőanya}}=15$  s,  $\text{medián}_{\text{szkopolamin}}=56$  s,  $\text{medián}_{\text{szkop+analóg}}=43$  s,  $p=0,003$ ) tekintetében tapasztaltunk, a többi paraméter számadatait ezért nem jelenítjük meg. A páronkénti összehasonlítás során a munkamemória hiba tekintetében a kontroll és szkopolamin+analóg csoport teljesítménye között a különbség nem volt szignifikáns (11. ábra, A panel;  $p=0,530$ ). A teljesítéshez szükséges idő esetében a páronkénti összehasonlítás alapján a kontroll és szkopolamin+analóg csoport teljesítménye között szintén nem találtunk szignifikáns különbséget ( $p=0,137$ ). A szkopolamin+analóg csoport teljesítménye tehát a szkopolaminnal kezelt csoport teljesítményét e két paraméter tekintetében felülmúlta. (11. ábra, D panel).

Hasonló tendenciát a referencia memória hiba és teljes hiba alakulásában is felfedeztünk (11. ábra, B és C panel).



**11. ábra: Az analóg (1mM) hatása szkopolamin amnéziában**

Doboz ábrával szemléltetjük az állatok teljesítményének alakulását a szkopolamin amnézia kísérletben

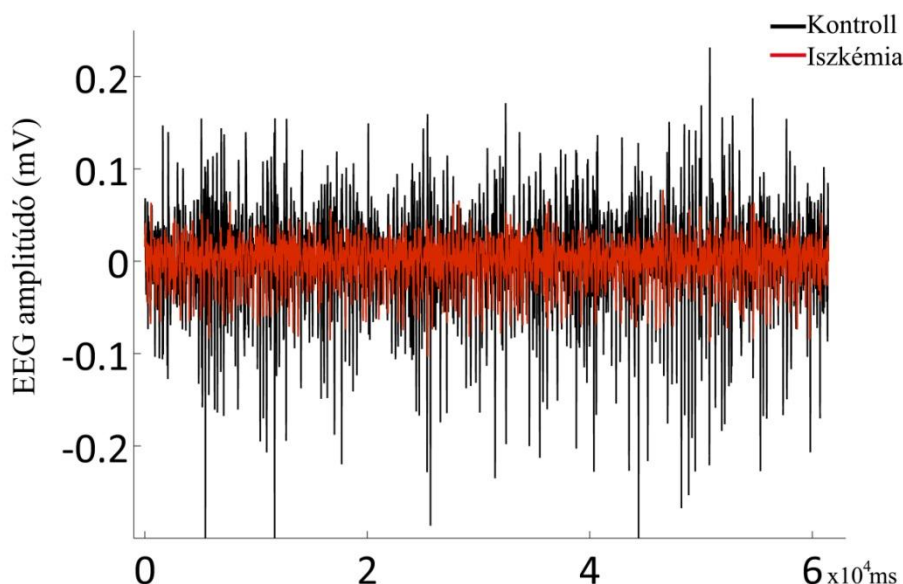
**A:** A munkamemória hiba vizsgálata kapcsán a csoportok között szignifikáns különbséget találtunk ( $p=0,029$ ). A páronkénti összehasonlítás alapján a kontroll és szkopolamin+analóg csoport teljesítménye között ugyanakkor nem volt szignifikáns különbség ( $p=0,530$ ).

A referencia memória **(B)** és teljes hiba **(C)** vizsgálata során a csoportok között szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk.

**D:** A teljesítéshez szükséges idő tekintetében a csoportok között szignifikáns különbséget találtunk ( $p=0,003$ ). A teljesítéshez szükséges idő esetében a páronkénti összehasonlítás alapján a kontroll és szkopolamin+analóg csoport teljesítménye között szintén nem találtunk szignifikáns különbséget ( $p=0,137$ ).

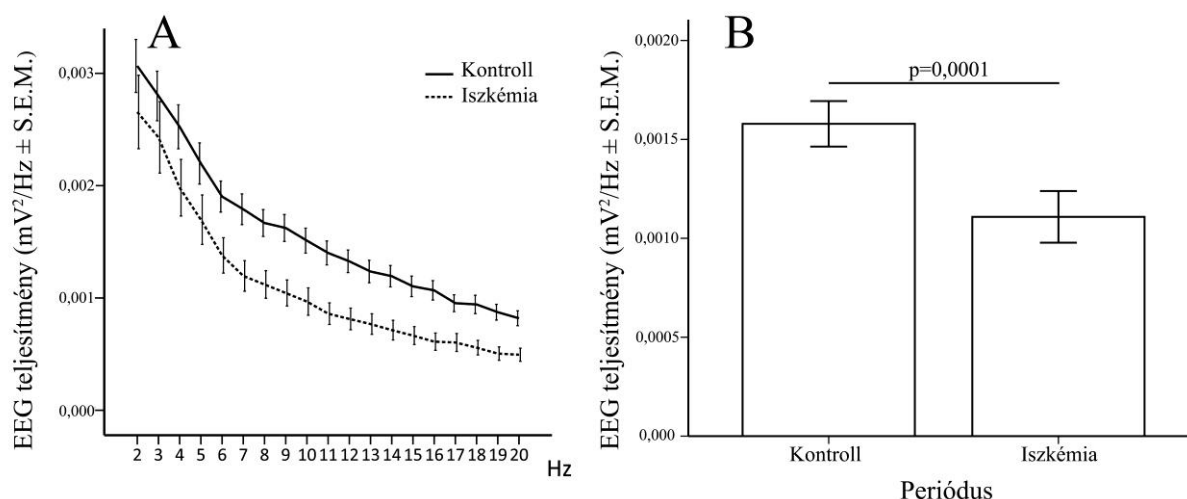
## 7.4 A dMCAO modell *in vivo* elektrofiziológiai jellemzése

Iszkémiás modellünk elektrofiziológiai jellemzése kapcsán korábban a szomatoszenzoros kiváltott potenciálok alakulását vizsgáltuk az ér okklúziója alatt akut kísérletben (Knapp és mtsai, közlés alatt). Ennek eredménye egyértelműen igazolta az MCA által ellátott kéregterület véráramlásának jelentős visszaesését. Mivel hosszabb túlélés esetén nem célszerű a koponyacsont nagyobb darabjának eltávolítása, a kísérletben elektro-encefalogramot vettünk fel a letisztított koponyafelszínről ( $n_{\text{állat}}=23$ ). Az állatok ipszilaterális, szomatoszenzoros kéreg feletti koponyaterületéről a 30 perces ér okklúzió előtt és az iszkémiás periódusban egy csatornán vettünk fel EEG-t. A két periódus teljesítmény spektrumában jelentős különbséget tapasztaltunk (12. ábra).



**12. ábra: A kontroll és iszkémiás periódusban rögzített EEG alakulása a dMCAO modellben**

1 perc hosszúságú EEG regisztrátum szemlélteti a kérgi elektromos aktivitás változását a dMCAO-t megelőző és azt követő időszakban. A kontroll (fekete szín) és az iszkémiás (piros szín) periódus amplitúdó értékeit egymásra illesztettük. A 2-20 Hz között szűrt EEG regisztrátumon az iszkémiás periódusban jelentős amplitúdó csökkenés látszik.



**13. ábra: A dMCAO modellben regisztrált kontroll és iszkémiás EEG teljesítmény spektrum statisztikai összehasonlítása**

**A panel:** Vonal ábra szemlélteti az EEG teljesítmény spektrum változását a kontroll (folytonos vonal) és az iszkémiás (szaggatott vonal) periódusban, 1 Hz-es felbontásban. (átlag±S.E.M.).

**B panel:** Az EEG teljesítmény szignifikáns csökkenést mutatott az iszkémiás periódusban (átlag±S.E.M.);  $p=0,0001$ ).

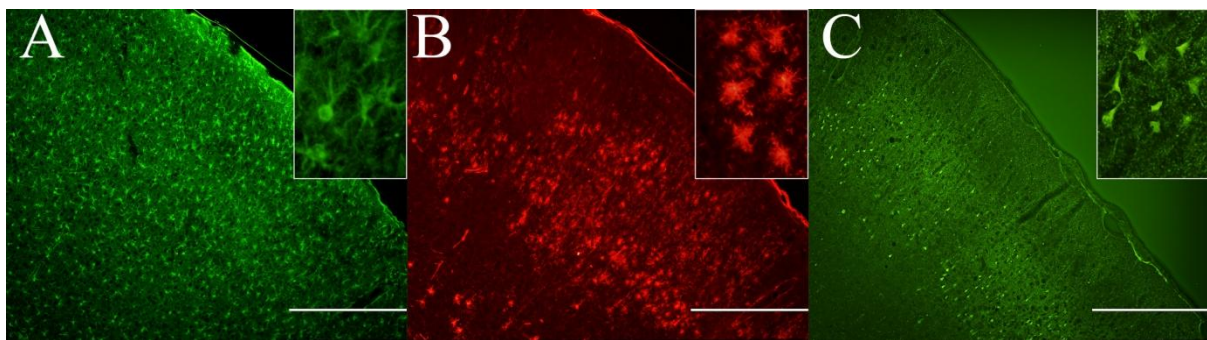
A 2-20 Hz tartományban szűrt EEG az iszkémiás periódusban szignifikánsan alacsonyabb teljesítmény spektrum értéket adott (13. ábra, A és B panel; átlag<sub>kontroll</sub>: 0,00157 mV<sup>2</sup>/Hz, átlag<sub>iszkémia</sub>: 0,00110 mV<sup>2</sup>/Hz;  $p=0,0001$ ). A korábbi kiváltott válasz amplitúdók alakulása és a saját EEG mérések alapján elmondhatjuk, hogy modellállataink minden esetben a 30 perces iszkémia alatt jelentős kérgi elektromos aktivitásváltozáson estek át.

## 7.5 Az L-kinurenin szulfát (L-KYNs) hatása a dMCAO modellben

A 30 perces MCA okklúziót követő szövettani változásokat a degenerálódott idegsejtek és a gliális reakciók követésével vizsgáltuk. Mivel a kontralaterális oldalon egyetlen esetben sem tapasztaltunk szövettani változást, a mikroszkópos felvételeken és a mennyiségi összehasonlítás során csak az ipszilaterális kéregterülettel foglalkozunk. A megfigyeléseket az érelzárás koordinátájától kaudálisan olyan távolságban végeztük, ahol a beavatkozásból fakadó primer szöveti károsodás már nem látszott.

A 30 perces iszkémiás sértés következményeként az állatok megközelítőleg felében jelentkezett egyértelmű hisztológiai változás. Az állatok fennmaradó részében sem FJ-C

jelölődést, sem a vizsgált gliális elemek mennyiségi vagy morfológiai változását nem tapasztaltuk. A szövetkárosodás vizsgálata során változékony FJ-C jelölődési mintázatot láttunk a szomatoszenzoros kéreg II-VI. rétegében. A degenerálódott sejtek eloszlásában kifejezett tendenciát nem fedeztünk fel. A iszkémiás féltekén jellegzetes asztroglialis változás is megjelent. Az s100 pozitív sejtek jellegzetes hipertróf, vakuoláris fenotípust mutattak, nyúlványaik megrövidültek és megvastagodtak. Az iszkémiás területen a mikroglia aktivációját szintén megfigyeltük. A nyugalmi, és gyengén festődő ún. elágazó fenotípus helyett a sejttest megnagyobbodott, és a másodlagos és harmadlagos elágazások visszahúzódtak. A sejtek ilyen átalakulása a reaktív vagy fagocitotikus fázisukban jellemző (14. ábra). Mennyiségi összehasonlítást az egyértelmű szövettani változást mutató állatokon végeztünk. A vizsgálat során vizuális megfigyelésünk volt, hogy a gliózis az L-kinurenin szulfáttal kezelt csoportban a kéreg nagyobb területét érinti, és a megváltozott morfológiájú gliális elemek száma magasabb.



**14. ábra: Reprezentatív mikroszkópos felvétel a patkány szomatoszenzoros kérgéről az iszkémiás sértéssel azonos oldalról L-KYNs kezelést követően**

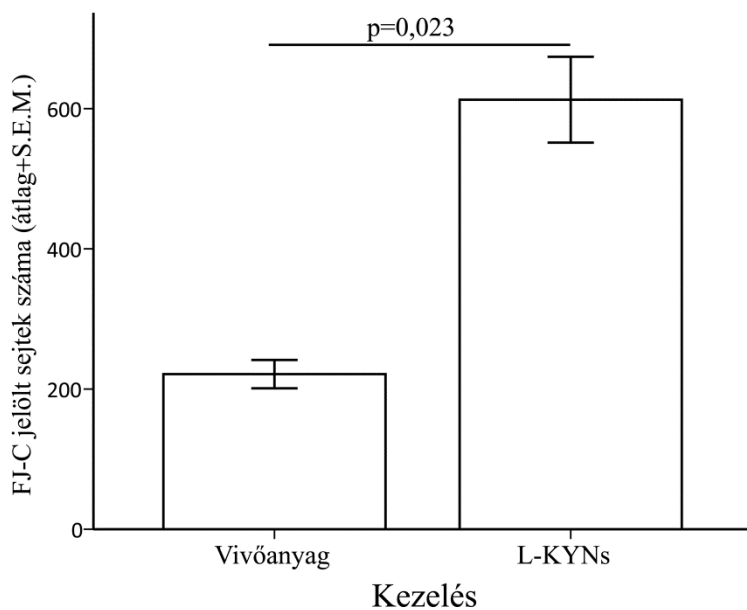
**A, B és C panel** (100x nagyítás, mérce: 500  $\mu$ m): Kettős immunjelölés jeleníti meg a reaktív asztrocitákat (**A**) és mikrogliaikat (**B**). FJ-C jelölés (**C**) a szomszédos agyszeleten.

Az aktivált asztrocitákat hipertróf, vakuolizált sejttest és a nyúlványok megvastagodása jellemzi. (A panel).

A mikrogliaik szintén aktivált fenotípust mutatnak, megnagyobbodott sejttest, a másodlagos és harmadlagos nyúlványok visszahúzódása jellemző (B panel).

A reaktív gliózis mellett az azonos oldali szomatoszenzoros kérgen a kiterjedt neurodegeneráció nagy számú FJ-C+ neuron formájában is megjelenik (C panel). A FJ-C festési mintázat az aktivált mikrogliaik elrendeződését szorosan követi (vö: B és C panel).

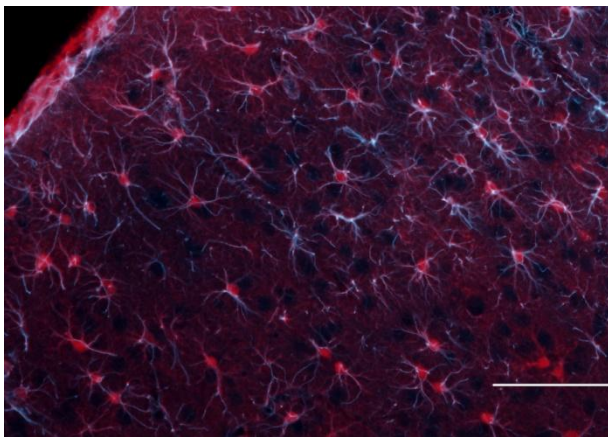
Tényleges mennyiségi összehasonlítást a FJ-C+ sejtek számának becslésével végeztünk. Statisztikai analízis alapján az L-KYNs kezelt csoportban a FJ-C+ sejtek száma szignifikánsan magasabb volt (15. ábra; átlag<sub>vivőanya</sub>: 221, átlag<sub>L-KYNs</sub>: 612;  $p=0,023$ ).



**15. ábra: FJ-C+ sejtek száma a dMCAO modellben az iszkémiás sértéssel azonos oldalon**

Oszlop diagram szemlélteti az iszkémiás sértéssel azonos oldalon számolt FJ-C+ sejtek számát a vivőanyaggal és L-KYNs-al kezelt csoportokban (átlag±S.E.M.). A FJ-C+ sejtek száma az L-KYNs-al kezelt csoportban szignifikánsan magasabb ( $p=0.023$ ).

Bár az s100 marker nem kizárólag az asztrogliákban jelenik meg, az a sejtestest morfológiai változásait a GFAP jelöléshez képest sokkal szemléletesebben mutatja. Az asztroglia s100 és GFAP kettős immunjelölésével emellett igazoltuk, hogy a GFAP teljes kolokalizációt mutat az s100+ sejtekkel. Elenyésző számú s100+, de GFAP negatív sejtet találtunk az iszkémiás területen (16. ábra).



**16. ábra: s100-GFAP kettős immunjelölés a dMCAO modellben az iszkémiás sértéssel azonos oldalon**

A GFAP (világos kék) és az s100 (piros) immunjelölés az iszkémiás sértésen átesett területen 100%-os kolokalizációt mutat. A s100 jelölés intenzíven jelöli a sejttesteket, míg a GFAP a nyúlvány rendszert rajzolja ki (200x nagyítás; mércse:200 $\mu$ m)

## 8. Megbeszélés

### 8.1 A KYNA analóg neuroprotektív hatása teljes előagyi iszkémiában

#### 8.1.1 Hisztológiai vizsgálatok

Az L-kinurenin szulfát és a kinurénsav származékainak neuroprotektív hatását korábban számos eredményes neuroprotektációs kísérletben, különböző előagyi iszkémia modellekben igazolták. A kísérletekben az iszkémiás inzultus előtt szisztémásan adagolt hatóanyagok a neurodegeneratív folyamatokat hatékonyan mérsékeltek (Scharfman és Ofer, 1997, Gigler és mtsai., 2007, Robotka és mtsai., 2008). További kísérletekben kiderült az is, hogy a neuroprotektív hatás szerves sav transzporterek gátlásával (probenecid) tovább növelhető, mert így az agyi kinurénsav koncentráció hosszabb ideig emelkedett szinten marad (Santamaria és mtsai., 1996). Mivel a neuroprotektációs kísérletünk tervezésekor a KYNA analóggal kapcsolatos iszkémia-neuroprotektációs kísérleti eredmény még nem állt rendelkezésre, a hatóanyag adagolását tekintve a fenti kísérleti eredményekre támaszkodtunk. Hogy a protektív képesség felmérését adjuvánssal ne zavarjuk meg, a kísérletben a szerves sav transzporterek farmakológiai gátlása helyett az analógot a sértés előtt, majd azt követően többször ip. adagoltuk. Az ismételt kezelés azért is indokolt, mert teljes előagyi iszkémiában az excitotoxikus extracelluláris Glu koncentráció órákig fennmarad (Globus és mtsai., 1991, Caragine és mtsai., 1998), továbbá a másodlagos excitotoxicitás és konvulzió másodlagos neuronpusztuláshoz vezethet. Bár pontosan nem tisztázott, hogy a FJ-C festék pontosan mely, a neurodegeneráció során megjelenő marker jelölését végzi (Schmued és mtsai., 2005), továbbá a nekrotikus és apoptotikus folyamatok cerebrális iszkémiában átfedhetnek (Unal-Cevik és mtsai., 2004), a hosszú túlélés után egyértelmű FJ-C jelölődést mutató sejteket nem funkcionáló sejteknek tekintettük. A 4VO hisztopatológiai következményeit a hippocampusban hagyományos krezilibolya festéssel és a reaktív gliózis követésével is vizsgáltuk. A principális sejtek és a gliális elemek morfológiájának megváltozása az irodalmi adatoknak megfelelően alakult (Sugawara és mtsai., 2002). Vizsgálatainkban a str. pyr. területén található sejttypusokat nem azonosítottuk, ugyanakkor tudjuk, hogy a rétegben az interneuronok a sejtek csupán 10 százalékát adják, és ezek az iszkémiás inzultusra sokkal kevésbé érzékenyek (Avignone és mtsai., 2005). Az analóggal történő kezelés hatására

bekövetkező CA1 FJ-C pozitív sejtszám csökkenése egyértelműen a principális sejtek neurodegenerációjának alacsonyabb fokát jelenti.

### **8.1.2 Funkcionális vizsgálatok - I/O görbék**

Neuroprotekciós eljárásunk hatékonyságát a morfológiai vizsgálatok mellett funkcionális vizsgálatokkal is igazoltuk. Az I/O görbék felvétele során a lépcsőzetesen emelt ingeráramokra kialakuló, telítési jelleget mutató fEPSP amplitúdó növekedés a principális sejtek apikális dendritjeinek valamint a Schaffer kollaterálisok itt kialakított szinapszisainak épségét mutatja kontroll állatokban. A 10 perces iszkémia nem pusztítja el maradéktalanul a terület piramissejtjeit, ép sejteket a morfológiai vizsgálatok során láthatunk. Irodalmi adatok alapján azonban tudjuk, hogy a sejtek dendritikus arborizációja megváltozik és a dendriteken található szinapszist képző tüskék száma is csökken (Gonzalez-Burgos és mtsai., 2007). A Schaffer kollaterálisok ingerlésével fEPSP-t továbbra is ki tudtunk váltani, ugyanakkor az egyes ingeráramokhoz tartozó amplitúdók szignifikánsan alacsonyabb értéket mutattak. Az analóggal kezelt csoport amplitúdó értékei nem különböztek szignifikánsan a kontroll csoport értékeitől, vagyis a kezelés nem csak nagyobb számú ép principális sejttest, hanem a sejtek szinaptikus kapcsolatainak megőrzését is jelentette.

### **8.1.3 Funkcionális vizsgálatok - szinaptikus potencírozódás**

A hippocampális CA1-es piramissejt réteg magasabb szintű funkcionális vizsgálatára leginkább a terület szinaptikus plaszticitásának felmérése ad lehetőséget. A Schaffer kollaterálisok és a CA1 piramissejt apikális dendritek szinapszisainak aktivitástól-függő adaptív változása a tanulás és a memórianyomok kialakulásának alapvető feltétele, a hippocampális hálózat épségét igényli. Bár a kísérletesen kiváltott potencírozódás és a jelenség fiziológiás megfelelője közötti kapcsolat jelenleg nem teljesen tisztázott (Bramham, 2010), a módszerrel jól vizsgálhatjuk a terület szinapszisainak hatékonyságát és dinamikus változását. A szinaptikus áttevődés fokozásának két leggyakrabban alkalmazott módja a Schaffer kollaterálisok rövid ideig tartó nagyfrekvenciás ingerlése (Andersen és mtsai., 1977) és a theta stimuláció (rövid megszakításokkal adott nagyfrekvenciás inger „csomagok”) (Larson és mtsai., 1986). Bár a nagyfrekvenciás ingerlés hatékonysága a theta stimulációét nem éri el (Kim és mtsai., 2012), a potencírozódás mesterséges kiváltására mindkettő alkalmas. A kiváltó ingerek eltérése mellett további különbségeket találunk a potencírozódás időtartamát illetően. Újabban a rövid és hosszú távú folyamatok kialakulása során eltérő NMDA receptor folyamatokat is azonosítottak (Volianskis és mtsai., 2013). A kísérleti

paradigmák és a feltárt mechanizmusok sokfélesége miatt saját kísérleteinkben a hosszútávú vagy rövidtávú potencírozódás (STP, LTP) elnevezések helyett egyszerűen szinaptikus potencírozódásként értelmeztük a nagyfrekvenciás indukció után megjelenő fEPSP amplitúdó emelkedést.

Kontroll állatainkban a nagyfrekvenciás ingerlést követően az elvezetett fEPSP-k amplitúdója tartósan és stabilan megnövekedett, a szinaptikus áttevődés hatékonyságát sikerült növelnünk. Az iszkémiás sértésen átesett állatokban a szinaptikus potencírozódás elmaradt, a fEPSP amplitúdók az indukció után röviddel kontroll értékeket mutattak. Az analóggal kezelt állatokban az indukció ugyanakkor a kontroll állatokhoz hasonló mértékű szinaptikus potencírozódást váltott ki, szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest nem tapasztaltunk. A morfológiai vizsgálatok és az I/O görbék eredményei mellett a Schaffer kollaterális CA1 piramissejt apikális dendritek szinapszisai dinamikus sajátságainak vizsgálatával igazoltuk, hogy a kezelés a terület magasabb szintű hálózati funkcióját, plaszticitását is megőrizte.

#### **8.1.4 Az analóg neuroprotektív hatékonysága utókezelésben**

Bár neuroprotekciós kísérletünk első fázisában a hatóanyagot az iszkémiás inzultus kialakulása után is adagoltuk, a legelső kezelés az iszkémia kialakítását egy órával megelőzte. A hatóanyaggal végzett független kísérletekből tudjuk, hogy az a szisztémás adagolás után egy órával már eléri a hatékony neuromodulációhoz szükséges koncentrációt a központi idegrendszerben (Knyihar-Csillik és mtsai., 2008). Így az excitotoxicitást kísérő Glu-erg folyamatok első kísérletünkben már egy modulált „háttéren” indultak el. A humán gyógyászati szempontokat figyelembe véve az ilyen kezelési mód mellett megjelenő neuroprotekciós képesség is jelentős, hiszen az iszkémia-reperfúzió kialakulása sok esetben kiszámítható, hangolható (szívműtétek, művi rekanalizáció). Nagyobb jelentősége lehet azonban az olyan farmakonoknak, amelyek a beadásukat követően rövid idővel, akár az iszkémiás inzultus után alkalmazva is képesek az excitotoxikus folyamatok mérséklésére. Kísérletünk második fázisában az analógot az a. carotis communisok reperfúziója után azonnal adagoltuk. Hisztológiai feldolgozást követően a korábbi kezelési mód után tapasztalt mérsékelt neurodegenerációt ebben az esetben is tapasztaltuk. Bár a FJ-C pozitív sejtek számának csökkenése a korábbi értéket nem érte el, a 4VO csoporthoz képest itt is szignifikáns javulást tapasztaltunk. Korábbi vizsgálatunkban igazoltuk, hogy a degenerálódott sejtek számának csökkenése a terület funkcionális károsodásának csökkenését is jelenti. Az utókezelésben alkalmazott analóg esetében elektrofiziológiai vizsgálatokat ezért nem végeztünk.

## 8.2 A KYNA analóg hatása memória tesztekben

A túlzott NMDA receptor funkció gátlásán alapuló neuroprotekció nem újkeletű. A receptor csatorna vagy a modulátoros kötőhelyek kompetitív vagy nem kompetitív gátlása számos iszkémiás modellben jelentős neuroprotekciós kapacitást mutat.

Az NMDA és  $\alpha 7$ nACh receptorok a humán és rágcsáló hippocampusz principális sejtjei és interneuronjai szinapszisaiban is nagy sűrűségben fordulnak elő (Nyiri és mtsai., 2003, Drever és mtsai., 2011), így a receptorokhoz köthető Glu-erg és nikotinerg jelátvitel integritása elengedhetetlen számos hippocampusz-függő kognitív működéshez. A funkció megváltozása jól nyomon követhető többek között a térbeli tájékozódást és tanulást vizsgáló ún. orientációs tesztekkel. A hippocampális és striatális Glu-erg és kolinerg jelátvitel erőteljes gátlása ilyen tesztekben a teljesítmény csökkenéséhez vezet (Butelman, 1989, Ohno és mtsai., 1993, 1994, Nakazawa és mtsai., 2004, Yoshihara és Ichitani, 2004, Surmeier és mtsai., 2009).

### 8.2.1 Vízi útvesztő (MWM)

A vízi útvesztővel végzett kísérletünkben az analóg neuroprotekcióban hatékony dózisának orientációs képességekre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A kísérleti körülmények kialakítása és a tanítási paradigmánk alapján feltételeztük, hogy a feladatok végrehajtása a tér komplex reprezentációját igényli, egyszerű társítással nem megoldható, végeredményben a tanulás hippocampusz-függő. Feltételeztük továbbá, hogy az analóg által kiváltott masszív Glu-erg/kolinerg blokádnál a hippocampális funkció zavart szenved, és ez a tanulási képesség megváltozásában is megjelenik. Kísérletünkben a tréning előtt adagolt analóg hatással lehet a tréning során gyűjtött információ bevézésére (munkamemória), illetve a korábbi tréningek konszolidálódó emléknymainak előhívására. Konszolidálódó emléknym kialakulását és ennek sikeres előhívását a napi első úsztatások során nem értük el. Valószínű, hogy az ilyen teljesítmény eléréséhez naponta többször ismételt tréningezésre van szükség. Váratlan eredményként jelentkezett, hogy a kísérlet utolsó napján, az analóggal történő kezelés után a célkvadránsra irányuló szignifikáns zóna preferencia jelent meg. Azaz, ebben az egy esetben az emléknym előhívása sikeres volt. Az eredmény magyarázatául szolgálhat az NMDA receptor funkció gátlása nyomán kialakuló enyhe anxiolitikus hatás, melyet más NMDA antagonisták esetében is leírtak (Guimaraes és mtsai., 1991). Ilyen módon a feladat sikeres megoldása egyszerűen az úszás okozta szorongás csökkentésével függ össze. A teljesítmény enyhe növekedésének ettől eltérő magyarázatát a „szkopolamin amnézia” fejezetben adjuk

meg. A kísérlet többi paraméterének vizsgálata után kijelenthetjük, hogy az analóg neuroprotektív, 1 mmol-os dózisa a rövid távú, munkamemóriaként értékelhető hippocampális folyamatokat nem rontotta, emellett a konszolidáló emlényomok előhívására irányuló kísérletben nem várt, pozitív eredményt hozott.

### 8.2.2 Nyílt porond teszt

Bár neuroprotekciós kísérleteinkben az iszkémiás sértést patkányokon alakítottuk ki, célszerűnek láttuk az analóg kognitív funkciókra gyakorolt hatását intakt egerekben is megvizsgálni. Az analóg neuroprotektív/neuromodulátoros sajátságaira vonatkozó adatok *in vivo* patkány vizsgálatokból származnak (Knyihar-Csillik és mtsai., 2008, Vamos és mtsai., 2009b, Gellert és mtsai., 2011), ezért az orientációs tesztek elvégzése előtt nyílt porond vizsgálatban mértük fel az analóg két dózisének explorációs aktivitásra gyakorolt hatását. Vizsgálatunk legfőbb kérdése az volt, hogy az egerek eltérő anyagcsere, esetleg vér-agy gát sajátságai lehetővé teszik-e az analóg patkányokéval azonos, mmol-os nagyságrendben történő alkalmazását az orientációs tesztekben. A kinurénsav transzmitter rendszerekre gyakorolt sokrétű hatása és a transzmitter rendszerek bonyolult kölcsönhatása nem teszi lehetővé, hogy a nyílt porond tesztben kapott eredmények mögött meghúzódó neurofiziológiai változást pontosan meghatározzuk. A magyarázatot tovább nehezíti, hogy a vizsgálat -felépítéséből adódóan- többféle neurofiziológiai változás nyomon követésére is alkalmas egy időben. A vizsgálat eredményeit a szorongás, a motoros funkciók és a motiváció megváltozása egyaránt befolyásolhatja. Esetünkben a vizsgálat mégis alkalmas arra hogy i) az analóg vér-agy gáton történő átjutását igazoljuk, ii) és meghatározzunk egy olyan elhanyagolható változást okozó dózist, ami az orientációs vizsgálatot -legalább is az explorációs aktivitás befolyásolásán keresztül- nem torzítja.

Kísérletünkben a hatóanyag nagyobb adagja (2 mmol/ttkg) jelentősen csökkentette a nyílt porond feltérképezése során megtett utat, és az immobilitás növekedését is kiváltotta. Az alacsonyabb (1mmol/ttkg) adaggal történő kezelés az állatok aktivitását ugyanakkor jelentősen nem befolyásolta. Eredményeink igazolták, hogy i) az analóg egerben is képes átjutni a vér-agy gáton, ii) az 1 mmol/ttkg-os adag alig befolyásolja az állatok aktivitását, tehát alkalmas a térbeli tájékozódást és tanulást befolyásoló hatás felmérésére orientációs vizsgálatokban.

### 8.2.3 Sugár útvesztő

A sugár útvesztőben végzett kísérletünkben az analóg orientációs képességekre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A hatóanyag adagját a nyílt porond tesztben kapott eredmények alapján határoztuk meg. A feladat megoldása a vízi útvesztőhöz hasonlóan itt is a tér komplex reprezentációját igényli, egyszerű társítással nem megoldható, végeredményben a tanulás hippocampusz-függő. A Glu-erg és kolinerg ingerület átvitel befolyásolása a sugár útvesztőben a teljesítmény változásához vezet. A jelenséget nem csak a hagyományosnak tekinthető NMDA receptor antagonisták (MK801, APV, PCP) alkalmazásakor, hanem a kinurénsav kapcsán is leírták. Ugyanakkor a KATII enzim mutációját hordozó egerek hasonló tesztekben, az alacsonyabb endogén kinurénsav szint következtében jobban teljesítenek (lásd A kinureninek magatartásra gyakorolt hatása című fejezetet). Feltételeztük, hogy az analóg által kiváltott masszív Glu-erg/kolinerg blokád esetén a hippocampális funkció zavart szenved, és ez a tanulási képesség megváltozásában, a teljesítmény csökkenésében is megjelenik. Előkészítő kísérletünkben a nem kompetitív ún. nyitott csatorna blokkoló MK801 hatását mi is vizsgáltuk. Nem meglepő módon, az antagonistával kezelt állatok teljesítménye a kontroll csoporthoz képest jelentősen romlott. A kísérlet eredménye nem újdonság, részletes leírását éppen ezért az értekezésben mellőzzük. Az eredmények ismeretében azonban kijelenthetjük, hogy a kísérleti felállásunk alkalmas a térbeli tájékozódás és tanulás kapcsán megjelenő teljesítmény romlás vizsgálatára. Kísérletünkben - a vízi útvesztővel szemben- az analóg 1mmol/ttkg-os adagját a tréningek előtt, a tanítási periódus alatt folyamatosan alkalmaztuk. A kontroll csoport teljesítménye a vizsgálat során minden paraméter tekintetében folyamatosan javult, a kiindulási állapothoz képest szignifikáns eredménnyel. Ugyanilyen tendenciát tapasztaltunk az analóggal kezelt csoport esetében is. Ugyan a csoportokon belül és a csoportok között is tapasztaltuk a teljesítmény bizonyos ingadozását, a jelenséget a magatartásvizsgálat természetes velejárójának tekinthetjük, hiszen az állatok a környezeti hatások bármilyen megváltozására igen érzékenyen reagálnak. Az analóggal történő krónikus kezelés a tanulási tendenciát nem befolyásolta, a kísérletben mindkét állatcsoportot sikerült tanítanunk, a vízi útvesztőben tapasztalt teljesítménynövekedést ebben az esetben nem fedeztük fel. Összességében elmondhatjuk, hogy az analóg krónikus alkalmazás mellett sem károsítja a térbeli tájékozódáshoz és tanuláshoz szükséges hippocampális működést. A neuroprotektív hatás magyarázataként leírt NMDA receptor moduláló hatás ebben az esetben kevésbé jelentős

lehet, hiszen a Gly kötőhelyen történő modulálás erősen aktivitás-függő (Li és mtsai., 2009), illetve az analóg hatása a szinaptikus és nem szinaptikus NMDA receptorokon szintén eltérő.

#### **8.2.4 Szkopolamin amnézia**

A vízi és sugár útvesztő kísérletekben sikerült igazolnunk, hogy az analóg neuroprotektív, 1 mmol/ttkg-os adagja orientációs tesztekben a tanulási képességeket nem rontja. A kísérleti eredmények azonban nem igazolják, hogy központi idegrendszeri hatás, neuromoduláció a hatóanyag hatására egérben bekövetkezik. A „szkopolamin amnézia” kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a szkopolaminnal megzavart hippocampális működést, így a térbeli tájékozódást és tanulást az analóg 1 mmol/ttkg-os adagja elmozdítja-e bármilyen irányba. A szkopolamin „amnesztikus” hatását számos kísérletben igazolták (Appenroth és Fleck, 2010, Kay és mtsai., 2010, Antonova és mtsai., 2011). A szkopolamin befolyásolja a hippocampus jellegzetes, az orientációs feladatokban kulcsfontosságú ún.  $\theta$  oszcillációját (Barry és mtsai., 2012). A kísérleti felállástól függően a szkopolamin az emlékenyom kialakulásának más-más szakaszára hathat, de leginkább a bevéődés és a konszolidációs folyamat károsodik (Agrawal és mtsai., 2009). A szkopolamin és a nem kompetitív ún. nyitott NMDA csatorna blokkoló MK801 önmagában hatástalan, „szub-effektív” adagjának együttes alkalmazása során a rövidtávú memória kialakulása károsodott (Hlinak és Krejci, 1998). A fentiek figyelembe vételével a sugár útvesztőben betanított egereket kezeltük a szkopolamin alacsony, de hatásos adagjával (2mg/ttkg), valamint 1 mmol/ttkg analóggal. A szkopolamin kezelés előkísérleteinknek megfelelően csökkentette az állatok teljesítményét minden paraméter tekintetében. Ugyanakkor a szkopolamin és az analóg együtt adása a teljesítmény romlását mérsékelte. Szignifikáns változást a munkamemória hiba vizsgálata során kaptunk. (Megjegyezzük, hogy a kísérletet a szkopolamin nagyobb, 3 mg/ttkg-os adagjával is elvégeztük, és tendenciájában megegyező eredményt kaptunk. Ennek részletezésére az értekezésben nem térünk ki.) Az eredmény magyarázatául a hippocampus kolinerg beidegzése és az  $\alpha 7$  nikotinos acetilkolin receptorok kinurénsavval szemben mutatott magas affinitása szolgálhat. A hippocampus jelentős kolinerg beidegzést kap a mediális szeptum/Broca féle diagonális köteg komplexből. A hippocampus tanulási folyamatokat kísérő szinaptikus plaszticitását a kolinerg beidegzés erősen befolyásolja, bár a plasztikus folyamatok a kolinerg rostok hiányában is végbe mennek (Drever és mtsai., 2011). A hippocampális kolinerg hatás számos receptoron keresztül megvalósul, esetünkben a nikotinos receptorok működése jelentős. Az ACh vagy a nikotin a principális sejteken serkentő funkciójú. A hatás valószínűleg a CA1 piramis sejtek rekurrens axon kollaterálisain

kifejeződött, tehát a neuron szempontjából preszinaptikus elhelyezkedésű ACh receptorok aktiválásának következménye (Szabo és mtsai., 2008). Ugyanakkor a str. radiatum gátló interneuronjain kifejeződő receptorok aktiválásukon keresztül a principális sejtek gátlását fokozzák. Mivel az interneuronokon az  $\alpha 7$ nACh receptorok sűrűsége nagyobb, a nikotinerg beidegzés az interneuronokon keresztül a gátlást erősíti (Szabo és mtsai., 2008). Fontos továbbá megjegyezni, hogy a kinurénsav legnagyobb affinitást ( $IC_{50}$ :  $7\mu\text{mol}$ ) a nikotonos receptorokkal szemben mutat (Banerjee és mtsai., 2012b). A szkopolamin okozta teljesítményromlás hátterében a principális sejteken elhelyezkedő mACh receptorok gátlása áll (Drever és mtsai., 2011). Nem meglepő tehát, hogy szkopolamin és MK801 együttes adagolásával a negatív hatás a principális sejtek szintjén összegződik. Erősen spekulatív, de a fenti folyamatok figyelembe vételével lehetséges, hogy az analóg az interneuronok gátlásával végeredményben diszinhibíciót okozott a principális sejtek szintjén, ezen keresztül a szkopolamin okozta teljesítmény csökkenés mérsékléséhez vezetett. A neuroprotektív hatáshoz kapcsolt NMDA receptor moduláló funkció ebben az esetben kevésbé jelentős, hiszen a Gly kötőhelyen történő modulálás erősen aktivitás-függő, legalább is a kinurénsav esetében a receptor affinitás alacsonyabb, illetve az analóg hatása a szinaptikus és nem szinaptikus NMDA receptorokon szintén eltérő lehet.

Végeredményben az analóg sugár és vízi útvesztőben alkalmazott adagjával kapcsolatban – ahol ez különösebb hatást nem mutatott- a szkopolamin amnézia kísérletben igazoltuk annak neuromodulátoros hatását.

### **8.3 Az L-kinurenin szulfát hatása fokális iszkémiában**

A szisztémásan adagolt L-kinurenin iszkémiában kifejtett neuroprotektív hatását számos vizsgálat igazolta. A neurodegeneráció hatékony mérséklését a kísérletekben akkor érték el, ha a hatóanyagot az iszkémiás sértés előtt, esetleg többször megismételve adagolták. Az agyi iszkémia ezekben az esetekben már egy megemelkedett – az L-kinureninből származó-kinurénsav koncentrációt mutató „háttérén” alakult ki (Gigler és mtsai., 2007, Sas és mtsai., 2008). A kísérletek további jellemzője, hogy azokban a globális vagy permanens fokális iszkémia következtében megemelkedett extracelluláris Glu szint, az ún. Glu „túlsordulás” (glutamate spill-over) nagyobb mértékű, és hosszabb ideig fenn marad. Az L-kinurenin átmeneti, fokális iszkémia nyomán kialakuló neurodegenerációra gyakorolt hatásáról azonban nem áll rendelkezésünkre kísérletes eredmény.

Saját vizsgálatainkban a középső agyi artéria disztális szakaszának elzárásával átmeneti, fokális iszkiémiát idéztünk elő patkány szomatoszenzoros kérgében. Neuroprotekciónak eljárásaként L-kinurenin szulfátot adagoltunk a reperfúzió után közvetlenül. A rövid ideig tartó iszkiémia az állatok csak bizonyos hányadában indít el neurodegeneratív folyamatokat (Memezawa és mtsai., 1992, Aspey és mtsai., 2000, Popp és mtsai., 2009). Ezekkel az eredményekkel összhangban saját kísérletünkben a dMCA 30 perces elzárása a kezeléstől függetlenül az állatok felében okozott neurodegenerációt. Kérdésként merülhet fel, hogy az új, még kevésbé körülírt iszkiémiás modell kellő megbízhatósággal váltja-e ki az ér által ellátott területek iszkiémiáját. Az iszkiémiás állapotot megelőzően és az alatt rögzített EEG regisztrátumok elemzése alapján kijelenthetjük, hogy az ér elzárása az érintett agyterületen minden esetben a véráramlás jelentős csökkenéséhez, a kérgi elektromos aktivitás szignifikáns változásához vezetett. A neurodegeneráció megjelenésének hiánya tehát nem kísérleti műtermék, sokkal inkább az egyes állatok eltérő iszkiémia érzékenysége, esetleg vaszkuláris eltéréseinek a következménye. (Az ér elzárás következményeként a szomatoszenzoros kérgi kiváltott válaszokban bekövetkező szignifikáns változást munkacsoportunk független kísérletben is igazolta (Knapp és mtsai. közlés alatt), ennek részletezésére az értekezésben nem térünk ki).

Kísérletünkben az L-KYNs szisztémás adagolása a neurodegeneráció kialakulásának valószínűségét nem változtatta meg, ugyanakkor kiterjesztette a sérülés és a gliózis mértékét a neurodegeneratív folyamatokat beindító állatokban.

A hippocampusz principális sejtek dendritjein elhelyezkedő extraszinaptikus NMDA receptorok megközelítőleg egyharmada kapcsolatban áll az asztrociták nyúlványaival (Petralia és mtsai., 2010). Az asztrocitákban az L-kinureninből szintetizált KYNA tehát a szinaptikus és extraszinaptikus NMDA receptorok működését egyaránt modulálhatja, ezen keresztül befolyásolhatja a receptorokhoz kötődő endogén neurodegeneratív vagy neuroprotektív folyamatokat is. A szisztémásan adagolt L-KYNs asztrocitákban történő átalakulása és a *de novo* szintetizált KYNA megjelenése időigényes folyamat. Az L-KYNs beadásától a KYNA megjelenéséig eltelt idő tehát az excitotoxikus folyamatok szempontjából igen lényeges (Swartz és mtsai., 1990). Ugyanakkor a rövid ideig tartó fokális iszkiémiás állapothoz köthető Glu túlcsoordulás és NMDA receptor aktiváció a perces nagyságrendbe esik (Benveniste és mtsai., 1984, Ikonomidou és Turski, 2002). Kísérletünkben a reperfúzió után adagolt L-KYNs és az abból kialakuló KYNA valószínűleg a túlzott NMDA receptor aktiváció lecsengése után fejtette ki a hatását, az endogén

neuroprotekcíóhoz szükséges szinaptikus NMDA receptor működés gátlásával. Vagyis a neuromodulátoros hatás a terápiás ablakon kívül a neurodegeneráció fokozásához vezetett.

A jelenség egy másik magyarázata lehet, hogy a neurodegeneráció kiterjedését az L-KYNs adagolás után a neurotoxikus 3-HK és QUIN felszaporodása okozta. A KYNA koncentráció L-KYNs szisztémás adagolása után történő növekedését számos kísérlet bizonyította. Swartz és mtsai. igazolták, hogy a striatális KYNA koncentráció növekedése a növekvő L-KYNs adagolást jól követi (Swartz és mtsai., 1990). Egy további, az L-KYNs kérgi kúszó depolarizációra gyakorolt hatását vizsgáló tanulmányban az L-KYNs 300mg/ttkg-os adagja a KYNA koncentráció 40-szeres emelkedéséhez vezetett patkányban (Chauvel és mtsai., 2012). Shepard és mtsai. az L-KYNs szenzoros kapuzásra gyakorolt hatását vizsgáló munkájában az L-KYNs szisztémás adagolása nem vezetett a QUIN koncentráció növekedéséhez (Shepard és mtsai., 2003). Az asztrocitákban a KMO enzim nem fejeződik ki, ezért ezekben a sejtekben QUIN és 3-HK nem termelődik, ugyanakkor a mikroglia első sorban ezen metabolitok szintézisét végzik. A QUIN további forrása a gyulladásos folyamatok során az agyszövetbe vándorló makrofág (Guillemin és mtsai., 2001, Wonodi és Schwarcz, 2010). Az extracelluláris QUIN koncentráció növekedésének fő forrása tehát az aktiválódott mikroglia és bevándorolt makrofág (Schwarcz és Pellicciari, 2002). Az előagyi iszkémiás sértésen átesett ugróegerek agyszövetében a QUIN koncentráció erőteljes emelkedése a sértés után több nappal következett be (Heyes és Nowak, 1990). Fontos megjegyezni továbbá, hogy a vérből az agyszövetbe nagy mennyiségben áramló L-KYN felülmúlja a KMO enzimátikus kapacitását, tehát az L-KYNs legjellemzőbb átalakulása az asztrocitákban történő KYNA termelés (Wonodi és Schwarcz, 2010). A mikroglia aktiváció és makrofág bevándorlás az iszkémiás sértést csak bizonyos idő elteltével követi, ezért úgy gondoljuk, hogy kísérletünkben a neurodegeneráció kiterjedését nem a neurotoxikus 3-HK és QUIN felszaporodása, hanem az NMDA receptor közvetített endogén neuroprotektív mechanizmusok gátlása okozta.

## 9. Következtetések

### Eredmények és a belőlük levonható következtetések

Neuroprotekciós kísérleteink során egy új kinurénsav analóg neuroprotekciós képességeit mértük fel teljes előagyi iszkémiában, patkányban.

#### Célkitűzés 1-re kapott eredmények:

A hatóanyag szisztémás adagolásával jelentősen mérsékeljük az iszkémiás sértésre kifejezetten érzékeny hippokampális CA1-es régió neurodegenerációját. A protektív hatást nem csak a morfológiai változások nyomon követésével, hanem funkcionális vizsgálatokkal is igazoltuk. Fontos megjegyezni, hogy a protektív hatás nem csak az iszkémiát megelőző, hanem az azt követő adagolás után is megjelent. A kinurénsav gyakran alkalmazott, neuromodulációt kifejtő dózisához képest (300 mg/ttkg, 1,57 mM) az analóg 1mM-ja egyharmados csökkenést jelent. Az analóg tehát a vér-agy gáton átjut és neuroprotektív.

#### Célkitűzés 2-re kapott eredmények:

Az analóg térbeli tájékozódásra és tanulásra gyakorolt hatását patkányban és egérben is megvizsgáltuk. A vízi útvesztő kísérlet alapján megállapíthatjuk, hogy az analóg neuroprotekció szempontjából hatásos adagja (1mM) a tanulási képességeket nem rontja.

#### Célkitűzés 3-re kapott eredmények:

Az egérrel nyílt porond és sugár útvesztő paradigmákban végzett vizsgálatok pedig azt mutatják, hogy az analóg magasabb dózisa (2 mM) egérben is neuromodulátoros hatást fejt ki, az alacsonyabb dózis (1 mM) viszont nem rontja a tanulási képességeket.

#### Célkitűzés 4-re kapott eredmények:

Az alacsonyabb dózis vér-agy gát penetrációját és neuromodulátoros hatását egérben a „szkopolamin amnézia” modellel segítségével igazoltuk.

**Neuroprotekciós és a tanulási képességeket vizsgáló kísérleteink fő eredménye tehát az, hogy az analóg alkalmazott adagja teljes előagyi iszkémiában neuroprotektív, és olyan neuromodulátoros sajátságokat mutat, amely a tanulási képességeket vizsgáló tesztekben az állatok teljesítményét nem rontja.**

#### Célkitűzés 5-re kapott eredmények:

Neuroprotekciós kísérleteink másik fő típusában az utókezelésben alkalmazott L-kinurenin szulfát hatását vizsgáltuk átmeneti, fokális agyi iszkémiában. A kísérlet eredménye a várttal ellentétesen alakult. A kezelés hatására a patkány szomatoszenzoros kérgében a neurodegeneráció kiterjedt, a degenerálódott idegsejtek száma, és a reaktív gliózis mértéke is

megnőtt. Elképzeléseink szerint a neurodegeneráció fokozásáért nem az L- kinurenin átalakulása során keletkező 3-hidroxi-kinurenin és kvinolénsav, hanem a kinurénsav NMDA receptor-függő endogén neuroprotekciós folyamatokra kifejtett gátlása a felelős.

**Kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy a vér-agy gáton átjutó és neuroprotektív sajátságot mutató kinurénsav analógok fejlesztése és alkalmazása a klinikai szempontokat figyelembe véve kedvezőbb. Az L-kinurenin szulfáttal ellentétben az analógok további átlakulás nélkül, a kezelést követő rövid időn belül kifejtik a hatásukat, ezért az iszkémiás inzultust jellemző rövid terápiás ablakba könnyebben beilleszthetők. Kísérleteink alapján azt is kijelenthetjük, hogy az analógok esetében meghatározható egy olyan dózis, ami hatásos neuroprotekció mellett nem fejt ki a klinikum szempontjából elfogadhatatlan kardio-respiratórikus és pszihotomimetikus mellékhatásokat.**

## 10. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a szüleimnek és a testvéreimnek, hogy tanítottak.

Köszönöm Toldi József Professzor Úrnak a végtelen bizalmat, a szakmai és erkölcsi támogatást, a nevelést és a páratlan légkört. Köszönöm Dr Kis Zsoltnak a barátságát, praktikus tanácsait és a laboratóriumi munkában nyújtott rengeteg segítséget. Köszönöm Dr Farkas Tamásnak a támogató hozzáállását. Köszönöm a közvetlen munkatársaknak a kísérletes munkában nyújtott segítséget és a munkavégzésben való részvételt.

Köszönöm Vécsei László Professzornak hogy minden módon támogatta munkacsoportunk kísérleteit.

Köszönöm az összes tanszéki munkatársnak a baráti légkört és a technikai segítséget.

## 11. Irodalomjegyzék

- Agrawal R, Tyagi E, Saxena G, Nath C (2009) Cholinergic influence on memory stages: A study on scopolamine amnesic mice. *Indian journal of pharmacology* 41:192-196.
- Andersen P, Sundberg SH, Sveen O, Wigstrom H (1977) Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices. *Nature* 266:736-737.
- Annunziato L, Pignataro G, Di Renzo GF (2004) Pharmacology of brain Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacological reviews* 56:633-654.
- Antonova E, Parslow D, Brammer M, Simmons A, Williams S, Dawson GR, Morris R (2011) Scopolamine disrupts hippocampal activity during allocentric spatial memory in humans: an fMRI study using a virtual reality analogue of the Morris Water Maze. *Journal of psychopharmacology* 25:1256-1265.
- Appenroth D, Fleck C (2010) Influence of age on cognition and scopolamine induced memory impairment in rats measured in the radial maze paradigm. *Arzneimittel-Forschung* 60:293-298.
- Arundine M, Tymianski M (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 61:657-668.
- Aspey BS, Taylor FL, Terruli M, Harrison MJ (2000) Temporary middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke and reperfusion. *Neuropathology and applied neurobiology* 26:232-242.
- Avignone E, Frenguelli BG, Irving AJ (2005) Differential responses to NMDA receptor activation in rat hippocampal interneurons and pyramidal cells may underlie enhanced pyramidal cell vulnerability. *Eur J Neurosci* 22:3077-3090.
- Baldi E, Efofudebe M, Lorenzini CA, Bucherelli C (2005) Spatial navigation in the Morris water maze: working and long lasting reference memories. *Neurosci Lett* 378:176-180.
- Banerjee J, Alkondon M, Albuquerque EX (2012a) Kynurenic acid inhibits glutamatergic transmission to CA1 pyramidal neurons via  $\alpha 7$  nAChR-dependent and -independent mechanisms. *Biochem Pharmacol* 84:1078-1087.
- Banerjee J, Alkondon M, Pereira EF, Albuquerque EX (2012b) Regulation of GABAergic inputs to CA1 pyramidal neurons by nicotinic receptors and kynurenic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 341:500-509.
- Barden N (2004) Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. *Journal of psychiatry & neuroscience* : JPN 29:185-193.
- Barry C, Heys JG, Hasselmo ME (2012) Possible role of acetylcholine in regulating spatial novelty effects on theta rhythm and grid cells. *Frontiers in neural circuits* 6:5.
- Battaglia FP, Benchenane K, Sirota A, Pennartz CM, Wiener SI (2011) The hippocampus: hub of brain network communication for memory. *Trends in cognitive sciences* 15:310-318.
- Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH (1984) Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43:1369-1374.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology* 232:331-356.

- Bramham CR (2010) LTP not equal Learning: Lessons from Short-Term Plasticity. *Frontiers in behavioral neuroscience* 4:3.
- Brown AM, Ransom BR (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55:1263-1271.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868.
- Butelman ER (1989) A novel NMDA antagonist, MK-801, impairs performance in a hippocampal-dependent spatial learning task. *Pharmacol Biochem Behav* 34:13-16.
- Caragine LP, Park HK, Diaz FG, Phillis JW (1998) Real-time measurement of ischemia-evoked glutamate release in the cerebral cortex of four and eleven vessel rat occlusion models. *Brain Res* 793:255-264.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends in neurosciences* 28:436-445.
- Chauvel V, Vamos E, Pardutz A, Vecsei L, Schoenen J, Multon S (2012) Effect of systemic kynurenine on cortical spreading depression and its modulation by sex hormones in rat. *Exp Neurol* 236:207-214.
- Chess AC, Simoni MK, Alling TE, Bucci DJ (2007) Elevations of endogenous kynurenic acid produce spatial working memory deficits. *Schizophr Bull* 33:797-804.
- Cho S, Park EM, Kim Y, Liu N, Gal J, Volpe BT, Joh TH (2001) Early c-Fos induction after cerebral ischemia: a possible neuroprotective role. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21:550-556.
- Delorme A, Makeig S (2004) EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. *Journal of neuroscience methods* 134:9-21.
- Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctot KL (2010) A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry* 67:446-457.
- Drever BD, Riedel G, Platt B (2011) The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav Brain Res* 221:505-514.
- Endres M, Dirnagl U (2002) Ischemia and stroke. *Adv Exp Med Biol* 513:455-473.
- Erhardt S, Schwieler L, Emanuelsson C, Geyer M (2004) Endogenous kynurenic acid disrupts prepulse inhibition. *Biol Psychiatry* 56:255-260.
- Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:7-19.
- Fuchs SA, Peeters-Scholte CM, de Barse MM, Roeleveld MW, Klomp LW, Berger R, de Koning TJ (2012) Increased concentrations of both NMDA receptor co-agonists D-serine and glycine in global ischemia: a potential novel treatment target for perinatal asphyxia. *Amino Acids* 43:355-363.
- Fukui S, Schwarcz R, Rapoport SI, Takada Y, Smith QR (1991) Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J Neurochem* 56:2007-2017.
- Fulop F, Szatmari I, Vamos E, Zadori D, Toldi J, Vecsei L (2009) Syntheses, transformations and pharmaceutical applications of kynurenic acid derivatives. *Curr Med Chem* 16:4828-4842.
- Gal EM, Sherman AD (1980) L-kynurenine: its synthesis and possible regulatory function in brain. *Neurochemical research* 5:223-239.
- Gee CE, Benquet P, Raineteau O, Rietschin L, Kirbach SW, Gerber U (2006) NMDA receptors and the differential ischemic vulnerability of hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 23:2595-2603.

- Gellert L, Fuzik J, Goblos A, Sarkozi K, Marosi M, Kis Z, Farkas T, Szatmari I, Fulop F, Vecsei L, Toldi J (2011) Neuroprotection with a new kynurenic acid analog in the four-vessel occlusion model of ischemia. *Eur J Pharmacol* 667:182-187.
- Gigler G, Szenasi G, Simo A, Levay G, Harsing LG, Jr., Sas K, Vecsei L, Toldi J (2007) Neuroprotective effect of L-kynurenine sulfate administered before focal cerebral ischemia in mice and global cerebral ischemia in gerbils. *Eur J Pharmacol* 564:116-122.
- Gilley J, Coffey PJ, Ham J (2003) FOXO transcription factors directly activate bcl-2 gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *The Journal of cell biology* 162:613-622.
- Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsaki G, Zugaro MB (2009) Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nature neuroscience* 12:1222-1223.
- Girardeau G, Zugaro M (2011) Hippocampal ripples and memory consolidation. *Current opinion in neurobiology* 21:452-459.
- Globus MY, Busto R, Martinez E, Valdes I, Dietrich WD, Ginsberg MD (1991) Comparative effect of transient global ischemia on extracellular levels of glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in vulnerable and nonvulnerable brain regions in the rat. *J Neurochem* 57:470-478.
- Gonzalez-Burgos I, Letechipia-Vallejo G, Lopez-Loeza E, Morali G, Cervantes M (2007) Long-term study of dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal cells, after neuroprotective melatonin treatment following global cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett* 423:162-166.
- Gould E, Cameron HA, McEwen BS (1994) Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology* 340:551-565.
- Guidetti P, Hoffman GE, Melendez-Ferro M, Albuquerque EX, Schwarcz R (2007) Astrocytic localization of kynurenine aminotransferase II in the rat brain visualized by immunocytochemistry. *Glia* 55:78-92.
- Guillemin GJ, Cullen KM, Lim CK, Smythe GA, Garner B, Kapoor V, Takikawa O, Brew BJ (2007) Characterization of the kynurenine pathway in human neurons. *J Neurosci* 27:12884-12892.
- Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, Smith DG, Kapoor V, Armati PJ, Croitoru J, Brew BJ (2001) Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J Neurochem* 78:842-853.
- Guimaraes FS, Carobrez AP, De Aguiar JC, Graeff FG (1991) Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology (Berl)* 103:91-94.
- Gunduz-Bruce H (2009) The acute effects of NMDA antagonism: from the rodent to the human brain. *Brain Res Rev* 60:279-286.
- Hardingham GE (2009) Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans* 37:1147-1160.
- Hardingham GE, Bading H (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature reviews Neuroscience* 11:682-696.
- Heyes MP, Brew BJ, Martin A, Price RW, Salazar AM, Sidtis JJ, Yergey JA, Mouradian MM, Sadler AE, Keilp J, et al. (1991) Quinolinic acid in cerebrospinal fluid and serum in HIV-1 infection: relationship to clinical and neurological status. *Annals of neurology* 29:202-209.
- Heyes MP, Nowak TS, Jr. (1990) Delayed increases in regional brain quinolinic acid follow transient ischemia in the gerbil. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* :

- official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 10:660-667.
- Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz R, Albuquerque EX (2001) The brain metabolite kynurenic acid inhibits  $\alpha 7$  nicotinic receptor activity and increases non- $\alpha 7$  nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci* 21:7463-7473.
- Hlinak Z, Krejci I (1998) Concurrent administration of subeffective doses of scopolamine and MK-801 produces a short-term amnesia for the elevated plus-maze in mice. *Behav Brain Res* 91:83-89.
- Hoyte L, Kaur J, Buchan AM (2004) Lost in translation: taking neuroprotection from animal models to clinical trials. *Exp Neurol* 188:200-204.
- Ikonomidou C, Stefovskaja V, Turski L (2000) Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12885-12890.
- Ikonomidou C, Turski L (2002) Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol* 1:383-386.
- Institoris A, Farkas E, Berczi S, Sule Z, Bari F (2007) Effects of cyclooxygenase (COX) inhibition on memory impairment and hippocampal damage in the early period of cerebral hypoperfusion in rats. *Eur J Pharmacol* 574:29-38.
- Kaindl AM, Degos V, Peineau S, Gouadon E, Chhor V, Loron G, Le Charpentier T, Josserand J, Ali C, Vivien D, Collingridge GL, Lombet A, Issa L, Rene F, Loeffler JP, Kavelaars A, Verney C, Mantz J, Gressens P (2012) Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Annals of neurology* 72:536-549.
- Kato HK, Watabe AM, Manabe T (2009) Non-Hebbian synaptic plasticity induced by repetitive postsynaptic action potentials. *J Neurosci* 29:11153-11160.
- Kay C, Harper DN, Hunt M (2010) Differential effects of MDMA and scopolamine on working versus reference memory in the radial arm maze task. *Neurobiology of learning and memory* 93:151-156.
- Kim E, Owen B, Holmes WR, Grover LM (2012) Decreased afferent excitability contributes to synaptic depression during high-frequency stimulation in hippocampal area CA1. *Journal of neurophysiology* 108:1965-1976.
- Knox WE, Mehler AH (1950) The conversion of tryptophan to kynurenine in liver. I. The coupled tryptophan peroxidase-oxidase system forming formylkynurenine. *J Biol Chem* 187:419-430.
- Knyihar-Csillik E, Mihaly A, Krisztin-Peva B, Robotka H, Szatmari I, Fulop F, Toldi J, Csillik B, Vecsei L (2008) 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. *Neurosci Res* 61:429-432.
- Lafon-Cazal M, Perez V, Bockaert J, Marin P (2002) Akt mediates the anti-apoptotic effect of NMDA but not that induced by potassium depolarization in cultured cerebellar granule cells. *Eur J Neurosci* 16:575-583.
- Larson J, Wong D, Lynch G (1986) Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res* 368:347-350.
- Laugeray A, Launay JM, Callebort J, Surget A, Belzung C, Barone PR (2010) Peripheral and cerebral metabolic abnormalities of the tryptophan-kynurenine pathway in a murine model of major depression. *Behav Brain Res* 210:84-91.
- Lavenex P, Sugden SG, Davis RR, Gregg JP, Lavenex PB (2011) Developmental regulation of gene expression and astrocytic processes may explain selective hippocampal vulnerability. *Hippocampus* 21:142-149.

- Li ST, Ju JG (2012) Functional roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in physiological and pathological neuronal activities. *Current drug targets* 13:207-221.
- Li Y, Krupa B, Kang JS, Bolshakov VY, Liu G (2009) Glycine site of NMDA receptor serves as a spatiotemporal detector of synaptic activity patterns. *Journal of neurophysiology* 102:578-589.
- Linderholm KR, Skogh E, Olsson SK, Dahl ML, Holtze M, Engberg G, Samuelsson M, Erhardt S (2012) Increased levels of kynurenine and kynurenic acid in the CSF of patients with schizophrenia. *Schizophr Bull* 38:426-432.
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330:613-622.
- Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, Wang YT (2007) NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27:2846-2857.
- Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:605-623.
- Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA archives of ophthalmology* 58:193-201.
- Lugo-Huitron R, Blanco-Ayala T, Ugalde-Muniz P, Carrillo-Mora P, Pedraza-Chaverri J, Silva-Adaya D, Maldonado PD, Torres I, Pinzon E, Ortiz-Islas E, Lopez T, Garcia E, Pineda B, Torres-Ramos M, Santamaria A, La Cruz VP (2011) On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol Teratol* 33:538-547.
- Mason M (1954) The kynurenine transaminase of rat kidney. *J Biol Chem* 211:839-844.
- Mehler AH, Knox WE (1950) The conversion of tryptophan to kynurenine in liver. II. The enzymatic hydrolysis of formylkynurenine. *J Biol Chem* 187:431-438.
- Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK (1992) Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 23:552-559.
- Mok MH, Fricker AC, Weil A, Kew JN (2009) Electrophysiological characterisation of the actions of kynurenic acid at ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 57:242-249.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Moroni F, Cozzi A, Sili M, Mannaioni G (2012) Kynurenic acid: a metabolite with multiple actions and multiple targets in brain and periphery. *J Neural Transm* 119:133-139.
- Morris RG (2006) Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci* 23:2829-2846.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-776.
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C (2010) The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67:181-198.
- Muir KW (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Curr Opin Pharmacol* 6:53-60.
- Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA, Tonegawa S (2004) NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nature reviews Neuroscience* 5:361-372.
- Nakazawa K, Quirk MC, Chitwood RA, Watanabe M, Yeckel MF, Sun LD, Kato A, Carr CA, Johnston D, Wilson MA, Tonegawa S (2002) Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* 297:211-218.

- Nakazawa K, Sun LD, Quirk MC, Rondi-Reig L, Wilson MA, Tonegawa S (2003) Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience. *Neuron* 38:305-315.
- Nicholls DG (2004) Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Current molecular medicine* 4:149-177.
- Nyiri G, Stephenson FA, Freund TF, Somogyi P (2003) Large variability in synaptic N-methyl-D-aspartate receptor density on interneurons and a comparison with pyramidal-cell spines in the rat hippocampus. *Neuroscience* 119:347-363.
- O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171-175.
- Ohno M, Yamamoto T, Watanabe S (1993) Blockade of hippocampal nicotinic receptors impairs working memory but not reference memory in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 45:89-93.
- Ohno M, Yamamoto T, Watanabe S (1994) Intrahippocampal administration of a glycine site antagonist impairs working memory performance of rats. *Eur J Pharmacol* 253:183-187.
- Olney JW (1969) Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 28:455-474.
- Papadia S, Soriano FX, Leveille F, Martel MA, Dakin KA, Hansen HH, Kaindl A, Sifringer M, Fowler J, Stefovskaja V, McKenzie G, Craighero M, Corriveau R, Ghazal P, Horsburgh K, Yankner BA, Wyllie DJ, Ikonomidou C, Hardingham GE (2008) Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nature neuroscience* 11:476-487.
- Papouin T, Ladepeche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet JP, Oliet SH (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150:633-646.
- Papp E, Rivera C, Kaila K, Freund TF (2008) Relationship between neuronal vulnerability and potassium-chloride cotransporter 2 immunoreactivity in hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neuroscience* 154:677-689.
- Petralia RS, Wang YX, Hua F, Yi Z, Zhou A, Ge L, Stephenson FA, Wenthold RJ (2010) Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations. *Neuroscience* 167:68-87.
- Pocivavsek A, Wu HQ, Elmer GI, Bruno JP, Schwarcz R (2012) Pre- and postnatal exposure to kynurenine causes cognitive deficits in adulthood. *Eur J Neurosci* 35:1605-1612.
- Pocivavsek A, Wu HQ, Potter MC, Elmer GI, Pellicciari R, Schwarcz R (2011) Fluctuations in endogenous kynurenic acid control hippocampal glutamate and memory. *Neuropsychopharmacology* 36:2357-2367.
- Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ, Stadthaus D, Hubner C, Olney JW, Turski L, Ikonomidou C (1999) N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2508-2513.
- Popp A, Jaenisch N, Witte OW, Frahm C (2009) Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS One* 4:e4764.
- Potter MC, Elmer GI, Bergeron R, Albuquerque EX, Guidetti P, Wu HQ, Schwarcz R (2010) Reduction of endogenous kynurenic acid formation enhances extracellular glutamate, hippocampal plasticity, and cognitive behavior. *Neuropsychopharmacology* 35:1734-1742.
- Pottorf WJ, 2nd, Johannis TM, Derrington SM, Strehler EE, Enyedi A, Thayer SA (2006) Glutamate-induced protease-mediated loss of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump activity in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 98:1646-1656.

- Prescott C, Weeks AM, Staley KJ, Partin KM (2006) Kynurenic acid has a dual action on AMPA receptor responses. *Neurosci Lett* 402:108-112.
- Rameau GA, Tukey DS, Garcin-Hosfield ED, Titcombe RF, Misra C, Khatri L, Getzoff ED, Ziff EB (2007) Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. *J Neurosci* 27:3445-3455.
- Robotka H, Sas K, Agoston M, Rozsa E, Szenasi G, Gigler G, Vecsei L, Toldi J (2008) Neuroprotection achieved in the ischaemic rat cortex with L-kynurenine sulphate. *Life Sci* 82:915-919.
- Rossi DJ, Brady JD, Mohr C (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nature neuroscience* 10:1377-1386.
- Salvati P, Ukmar G, Dho L, Rosa B, Cini M, Marconi M, Molinari A, Post C (1999) Brain concentrations of kynurenic acid after a systemic neuroprotective dose in the gerbil model of global ischemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 23:741-752.
- Santamaria A, Rios C, Solis-Hernandez F, Ordaz-Moreno J, Gonzalez-Reynoso L, Altagracia M, Kravzov J (1996) Systemic DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology* 35:23-28.
- Sas K, Csete K, Vecsei L, Papp JG (2003) Effect of systemic administration of L-kynurenine on corticocerebral blood flow under normal and ischemic conditions of the brain in conscious rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 42:403-409.
- Sas K, Robotka H, Rozsa E, Agoston M, Szenasi G, Gigler G, Marosi M, Kis Z, Farkas T, Vecsei L, Toldi J (2008) Kynurenine diminishes the ischemia-induced histological and electrophysiological deficits in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis* 32:302-308.
- Sathyaikumar KV, Stachowski EK, Wonodi I, Roberts RC, Rassoulpour A, McMahon RP, Schwarcz R (2011) Impaired kynurenine pathway metabolism in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Schizophr Bull* 37:1147-1156.
- Scharfman HE, Goodman JH, Schwarcz R (2000) Electrophysiological effects of exogenous and endogenous kynurenic acid in the rat brain: studies in vivo and in vitro. *Amino Acids* 19:283-297.
- Scharfman HE, Ofer A (1997) Pretreatment with L-kynurenine, the precursor to the excitatory amino acid antagonist kynurenic acid, suppresses epileptiform activity in combined entorhinal/hippocampal slices. *Neurosci Lett* 224:115-118.
- Schmidt-Kastner R, Freund TF (1991) Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 40:599-636.
- Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L (2005) Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res* 1035:24-31.
- Schwarcz R, Pellicciari R (2002) Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther* 303:1-10.
- Schwarcz R, Rassoulpour A, Wu HQ, Medoff D, Tamminga CA, Roberts RC (2001) Increased cortical kynurenate content in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 50:521-530.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.
- Shepard PD, Joy B, Clerkin L, Schwarcz R (2003) Micromolar brain levels of kynurenic acid are associated with a disruption of auditory sensory gating in the rat. *Neuropsychopharmacology* 28:1454-1462.
- Stone TW (2000) Development and therapeutic potential of kynurenic acid and kynurenine derivatives for neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci* 21:149-154.
- Stone TW, Addae JI (2002) The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. *Eur J Pharmacol* 447:285-296.

- Stone TW, Forrest CM, Darlington LG (2012) Kynurenine pathway inhibition as a therapeutic strategy for neuroprotection. *The FEBS journal* 279:1386-1397.
- Sudhof TC (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375:645-653.
- Sugawara T, Lewen A, Noshita N, Gasche Y, Chan PH (2002) Effects of global ischemia duration on neuronal, astroglial, oligodendroglial, and microglial reactions in the vulnerable hippocampal CA1 subregion in rats. *Journal of neurotrauma* 19:85-98.
- Surmeier DJ, Plotkin J, Shen W (2009) Dopamine and synaptic plasticity in dorsal striatal circuits controlling action selection. *Curr Opin Neurobiol* 19:621-628.
- Swartz KJ, During MJ, Freese A, Beal MF (1990) Cerebral synthesis and release of kynurenic acid: an endogenous antagonist of excitatory amino acid receptors. *J Neurosci* 10:2965-2973.
- Szabo A, Somogyi J, Cauli B, Lambolez B, Somogyi P, Lamsa KP (2012) Calcium-permeable AMPA receptors provide a common mechanism for LTP in glutamatergic synapses of distinct hippocampal interneuron types. *J Neurosci* 32:6511-6516.
- Szabo SI, Zelles T, Lendvai B (2008) Intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics of hippocampal interneurons following nicotinic acetylcholine receptor activation. *Neurochem Int* 52:135-141.
- Tan L, Yu JT, Tan L (2012) The kynurenine pathway in neurodegenerative diseases: mechanistic and therapeutic considerations. *J Neurol Sci* 323:1-8.
- Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH (2006) NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442:929-933.
- Torok TL (2007) Electrogenic Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchange of nerve and muscle cells. *Prog Neurobiol* 82:287-347.
- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87:1327-1338.
- Turski WA, Gramsbergen JB, Traitler H, Schwarcz R (1989) Rat brain slices produce and liberate kynurenic acid upon exposure to L-kynurenine. *J Neurochem* 52:1629-1636.
- Tymianski M (2011) Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia. *Nature neuroscience* 14:1369-1373.
- Unal-Cevik I, Kilinc M, Can A, Gursoy-Ozdemir Y, Dalkara T (2004) Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia. *Stroke* 35:2189-2194.
- Vamos E, Pardutz A, Klivenyi P, Toldi J, Vecsei L (2009a) The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: possibilities for neuroprotection. *J Neurol Sci* 283:21-27.
- Vamos E, Pardutz A, Varga H, Bohar Z, Tajti J, Fulop F, Toldi J, Vecsei L (2009b) l-kynurenine combined with probenecid and the novel synthetic kynurenic acid derivative attenuate nitroglycerin-induced nNOS in the rat caudal trigeminal nucleus. *Neuropharmacology* 57:425-429.
- Vecsei L, Szalardy L, Fulop F, Toldi J (2012) Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nature reviews Drug discovery* 12:64-82.
- Verkhatsky A, Kirchhoff F (2007) NMDA Receptors in glia. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 13:28-37.
- Volianskis A, Bannister N, Collett VJ, Irvine MW, Monaghan DT, Fitzjohn SM, Jensen MS, Jane DE, Collingridge GL (2013) Different NMDA receptor subtypes mediate induction of long-term potentiation and two forms of short-term potentiation at CA1 synapses in rat hippocampus in vitro. *The Journal of physiology* 591:955-972.
- Wang Y, Liu H, McKenzie G, Witting PK, Stasch JP, Hahn M, Changsirivathanathamrong D, Wu BJ, Ball HJ, Thomas SR, Kapoor V, Celermajer DS, Mellor AL, Keaney JF, Jr.,

- Hunt NH, Stocker R (2010) Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. *Nature medicine* 16:279-285.
- Wonodi I, Schwarcz R (2010) Cortical kynurenine pathway metabolism: a novel target for cognitive enhancement in Schizophrenia. *Schizophr Bull* 36:211-218.
- Wu HQ, Guidetti P, Goodman JH, Varasi M, Ceresoli-Borroni G, Speciale C, Scharfman HE, Schwarcz R (2000) Kynurenergic manipulations influence excitatory synaptic function and excitotoxic vulnerability in the rat hippocampus in vivo. *Neuroscience* 97:243-251.
- Wu HQ, Pereira EF, Bruno JP, Pellicciari R, Albuquerque EX, Schwarcz R (2010) The astrocyte-derived alpha7 nicotinic receptor antagonist kynurenic acid controls extracellular glutamate levels in the prefrontal cortex. *J Mol Neurosci* 40:204-210.
- Wu HQ, Rassoulpour A, Schwarcz R (2007) Kynurenic acid leads, dopamine follows: a new case of volume transmission in the brain? *J Neural Transm* 114:33-41.
- Yamaguchi A, Tamatani M, Matsuzaki H, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, Mitsuda N, Tohyama M (2001) Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. *J Biol Chem* 276:5256-5264.
- Yoshihara T, Ichitani Y (2004) Hippocampal N-methyl-D-aspartate receptor-mediated encoding and retrieval processes in spatial working memory: delay-interposed radial maze performance in rats. *Neuroscience* 129:1-10.
- Yu P, Di Prospero NA, Sapko MT, Cai T, Chen A, Melendez-Ferro M, Du F, Whetsell WO, Jr., Guidetti P, Schwarcz R, Tagle DA (2004) Biochemical and phenotypic abnormalities in kynurenine aminotransferase II-deficient mice. *Molecular and cellular biology* 24:6919-6930.
- Zadori D, Klivenyi P, Vamos E, Fulop F, Toldi J, Vecsei L (2009) Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies. *J Neural Transm* 116:1403-1409.
- Zhang SJ, Steijaert MN, Lau D, Schutz G, Delucinge-Vivier C, Descombes P, Bading H (2007) Decoding NMDA receptor signaling: identification of genomic programs specifying neuronal survival and death. *Neuron* 53:549-562.
- Zmarowski A, Wu HQ, Brooks JM, Potter MC, Pellicciari R, Schwarcz R, Bruno JP (2009) Astrocyte-derived kynurenic acid modulates basal and evoked cortical acetylcholine release. *Eur J Neurosci* 29:529-538.
- Zwilling D, Huang SY, Sathyaikumar KV, Notarangelo FM, Guidetti P, Wu HQ, Lee J, Truong J, Andrews-Zwilling Y, Hsieh EW, Louie JY, Wu T, Searce-Levie K, Patrick C, Adame A, Giorgini F, Moussaoui S, Laue G, Rassoulpour A, Flik G, Huang Y, Muchowski JM, Masliah E, Schwarcz R, Muchowski PJ (2011) Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. *Cell* 145:863-874.

## 12. Összefoglalás

Az emlős agy fajlagos energia és oxigén felhasználása az egyéb szervrendszerekhez képest kiemelkedően magas. Az energia és oxigén felhasználás legnagyobb része az idegelemek ionháztartásának fenntartására, nyugalmi potenciáljának stabilizálására és visszaállítására fordítódik. Az ionháztartás dinamikus állandósága a központi idegrendszer működésének és épségének egyaránt feltétele, hiszen a serkentő és gátló neurotranszmitterek felszabadítása szintén az ionok intracelluláris koncentrációjával függ össze.

Az L-glutamát (Glu) a központi idegrendszer legfontosabb serkentő neurotranszmittere, koncentrációja a teljes agyszövetben megközelítőleg 10 mM. Az extracelluláris tér Glu koncentrációja ugyanakkor csak 0,6  $\mu\text{M}$  körüli érték. A transzmitter legnagyobb része az idegsejtek végződéseiben, vezikulumokban raktározva található. Hippokampális piramis sejtek és idegsejt tenyészetek esetében a 2-5  $\mu\text{M}$  Glu koncentráció már toxikus, a sejtek degenerációját okozza.

Az agy vér és/vagy oxigén ellátási zavara következtében rövid időn belül komoly energia adósság alakul ki. A sejtek ATP tartalma csökken, az ATP-függő transzporterek és pumpák működési zavara végül az ionháztartás felborulásához vezet. A Glu kontrollálatlan felszabadítása következtében a toxikus extracelluláris koncentráció gyorsan kialakul.

A magas Glu koncentráció toxikus hatásának közvetítésében az NMDA típusú Glu receptor kulcsszerepet játszik. A receptor nagy  $\text{Ca}^{2+}$  áteresztő képessége következtében a sejteket depolarizálja, közvetve pedig számos  $\text{Ca}^{2+}$ -függő intracelluláris jelátviteli utat befolyásol. Az iszkémia/neuroprotekciónak szempontjából éppen ezért kézenfekvő a túlzott NMDA receptor aktiváció farmakológiai gátlása. Az iszkémia állatkísérletes modelljeiben elért, az NMDA receptor gátlásán alapuló neuroprotekciónak sikerei ellenére az alkalmazott farmakonok a humán gyógyászatba nem kerültek át. Az NMDA receptorok erőteljes és általános gátlása számos, humán gyógyászati szempontból elfogadhatatlan mellékhatással jár. A fenciklidin és a ketamin a kardio-respirációs mellékhatások mellett a szkizofrénia pozitív és negatív tüneteire hasonló jelenségeket egyaránt kiválthat. A blokádnak további hátránya, hogy az nem csak a neurodegenerációhoz vezető túlzott receptor aktivációt, hanem az excitotoxicitás akut fázisa után igen jelentős, NMDA receptor-függő endogén neuroprotektív folyamatokat is gátolhatja. Ennek megfelelően, az iszkémiás sértés után alkalmazott NMDA receptor blokádnak neurodegenerációt fokozó hatását számos esetben megfigyelték. A gyógyászati szempontokat figyelembe véve tehát az ideális elvárás az excesszív NMDA receptor funkció gátlása, a

fiziológiás szinaptikus NMDA receptor funkció megőrzése mellett. Az elvárásoknak az endogén KYNA felelhet meg.

A kinurénsav a triptofán lebontása során keletkező, a receptorok glicin modulátoros helyén kötő endogén NMDA receptor antagonist. Szerepe a központi idegrendszerben sokrétű, közvetlen NMDA receptor moduláló hatásán kívül a kolinerg és dopaminerg transzmisszióra is hatást gyakorol. A kinurenin útvonal egyensúlyának eltolódását nem csak a krónikus, neurodegenerációval járó kórképekkel hozzák összefüggésbe, számos állatkísérletes és humán mérési eredmény utal a kinureninek neuro-pszichiátriai kórképekben betöltött szerepére. A KYNA szisztémás alkalmazása ugyanakkor nehézkes, mert az passzívan csak nagy dózisú, ún. bólus kezelésben jut át a vér-agy gáton. A KYNA neuroprotektív lehetőségeinek kiaknázására tehát két lehetőségünk van. Az első a kinurenin útvonal egyensúlyának a KYNA képződés irányába történő eltolása, a második a vér-agy gáton jobban penetráló, neuroprotektív KYNA származékok szintézise. Az utóbbi lehetőséggel kutatócsoportunk és több kollaboráns partnerünk hosszú ideje foglalkozik.

Kísérleteink első részében egy új KYNA analóg neuroprotektív sajátosságait mértük fel morfológiai és funkcionális vizsgálatokkal a teljes előagyi iszkémia 4VO modelljében, patkányban. Az analóg intakt állatok kognitív funkcióira gyakorolt hatását a térbeli tájékozódást és tanulást vizsgáló kísérletekkel követtük nyomon.

Neuroprotektív vizsgálataink célpontjául a hippocampuszt választottuk, mert az az iszkémiás sértésre kifejezetten érzékeny, továbbá a CA1-es régiója piramissejt rétegében bekövetkező morfológiai és funkcionális változások viszonylag egyszerűen nyomon követhetők. A hatóanyag szisztémás adagolásával jelentősen mérsékeljük a hippocampális CA1-es régió neurodegenerációját. A protektív hatást funkcionális vizsgálatokkal is igazoltuk. Fontos megjegyezni, hogy a protektív hatás nem csak az iszkémiát megelőző, hanem az azt követő adagolás után is megjelent és a kinurénsav gyakran alkalmazott, neuromodulációt kifejtő dózisához képest (300 mg/ttkg, 1,57 mM) az analóg 1mM-ja egyharmados csökkenést jelent. Az analóg tehát a vér-agy gáton átjut és neuroprotektív.

Az analóg térbeli tájékozódásra és tanulásra gyakorolt hatását patkányban és egérben is megvizsgáltuk. A vízi útvesztő kísérlet alapján megállapíthatjuk, hogy az analóg neuroprotekció szempontjából hatásos adagja (1mM) a tanulási képességeket nem rontja. Az egérrel nyílt porond és sugár útvesztő paradigmákban végzett vizsgálatok pedig azt mutatják, hogy az analóg magasabb dózisa (2 mM) egérben is neuromodulátoros hatást fejt ki, az alacsonyabb dózis (1 mM) viszont nem rontja a tanulási képességeket. Az alacsonyabb dózis vér-agy gát penetranciáját és neuromodulátoros hatását egérben a „szkopolamin amnézia” modell segítségével igazoltuk.

Neuroprotekciós kísérleteink második szakaszában az utókezelésben alkalmazott L-kinurenin szulfát hatását vizsgáltuk átmeneti, fokális agyi iszkémiában. Az L-kinurenin szisztémás adagolása a kinurenin útvonal egyensúlyát a KYNA képződés irányába tolja, ezért kísérletünkben a neurodegeneráció csökkenését vártuk. A kísérlet eredménye a várttal ellentétesen alakult. A kezelés hatására a patkány szomatoszenzoros kérgében a neurodegeneráció kiterjedt, a degenerálódott idegsejtek száma, és a reaktív gliózis mértéke is megnőtt. Az eredmény egyik lehetséges magyarázata, hogy a neurodegeneráció kiterjedését a az L-KYNs adagolás után, az útvonal melléktermékeként felszaporodó neurotoxikus 3-HK és QUIN okozta. Az irodalmi adatok alapján azonban ezek a melléktermékek az iszkémiás inzultust napokkal követő gyulladásos folyamatokban érnek el magas koncentrációt.

Fokális iszkémiás sértés során a toxikus, magas Glu koncentráció és a fokozott NMDA receptor aktiváció csak rövid ideig figyelhető meg, a szisztémás L-kinurenin adagolásából származó KYNA megjelenése ugyanakkor időigényes. Elképzeléseink szerint a neurodegeneráció fokozásáért a KYNA excesszív NMDA receptor működést követő NMDA receptor-függő endogén neuroprotekciós folyamatokra kifejtett gátlása a felelős.

Kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy a vér-agy gáton átjutó és neuroprotektív sajátságot mutató kinurénsav analógok fejlesztése és alkalmazása a klinikai szempontokat figyelembe véve kedvezőbb. Az L-kinurenin szulfáttal ellentétben az analógok további átalakulás nélkül, a kezelést követő rövid időn belül kifejtik hatásukat, ezért az iszkémiás inzultust jellemző rövid terápiás ablakba könnyebben beilleszthetők. Kísérleteink alapján azt is kijelentjük, hogy az analógok esetében meghatározható egy olyan dózis, ami hatásos neuroprotekció mellett nem fejt ki a klinikum szempontjából elfogadhatatlan kardio-respiratórikus és pszihotomimetikus mellékhatásokat.

## 13. Summary

Relative to other organs, bulk energy and oxygen consumption of the mammalian brain is extremely high. Most of the consumed energy is focused on stabilization and recovery of ionic homeostasis of the nerve cells. Release of excitatory and inhibitory neurotransmitters partly depends on changes to intracellular ion concentrations; therefore steady-state stability of ionic regulation is the most obvious condition of brain function.

L-glutamate (L-Glu) is the main excitatory amino acid in the brain, reaching a concentration of approximately 10mM across the whole brain tissue. However, the concentration of L-Glu in the extracellular space is only around 0.6 mM. Most of this transmitter is stored in synaptic vesicles in nerve endings. Hippocampal pyramidal cells and neural cultures undergo degeneration if they are exposed to 2-5 mM extracellular Glu concentration.

Short-term insufficiency of the blood supply in the brain tissue is followed by serious “energy debt”. The ATP content of the neurons decreases, which results in the ATP-dependent transporters in the neurons and glia malfunctioning. Ionic dysregulation and depolarization of the cell membrane leads to glutamate, the main excitatory amino acid in the brain, to be released without control from its neuronal and glial stores. Toxic extracellular Glu concentration occurs within a short time period.

Mediating the harmful effect of toxic extracellular Glu, NMDA-type glutamate receptors play an essential role in this process. Due to a high  $\text{Ca}^{2+}$  permeability, activation of the receptors results in the depolarization of the neuron, and indirectly the activation of several  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent intracellular messenger pathways. With a view to neuroprotection after ischemic insult, it would therefore seem obvious to antagonize the excessive NMDA receptor function. Although neuroprotective strategies based on NMDA receptor antagonism were successful in the animal models of brain ischemia, the pharmacons could not be used in human therapy. Global NMDA receptor antagonism results in several adverse side effects that are unacceptable in human therapy. For instance, phencyclidine and ketamine may produce indications that mimic the negative and positive symptoms observed in schizophrenia, beyond respiratory depression or cardiovascular dysregulation. A further disadvantage of this strategy is that it may antagonize not only the excessive NMDA receptor function, but also the NMDA receptor-dependent endogenous neuroprotective processes that play an essential role in neuronal survival. Indeed, the harmful effect of NMDA receptor antagonists has been observed in several experiments after cerebral ischemia.

Concerning clinical expectations, the blockade of excessive NMDA receptor function, along with the conservation of physiological NMDA receptor function, would be ideal. Endogenous kynurenic acid (KYNA) may be able to meet such expectations.

Kynurenic acid (KYNA) is an endogenous metabolite of the tryptophan metabolism. It is produced from its precursor L-kynurenine (KYN) by the enzyme kynurenine-aminotransferase II (KATII), and discharged from the astrocytes in the brain parenchyma. KYNA is a competitive antagonist at the glycine/D-serine co-agonist site of the NMDAR. Furthermore it plays a versatile role, influencing dopaminergic and cholinergic synaptic transmission. Diversion of the kynurenine pathway has been described in several chronic neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. The effect of KYNA has also been characterized in the animal models of these disorders. However, the practical use of KYNA for this purpose can be excluded because it is barely able to cross the blood-brain barrier. To exploit the neuroprotective effect of KYNA the following methods can be employed: one, diversion of the balance of the kynurenine pathway toward the production of KYNA; and, two, the synthesis of kynurenic acid analogs, which can readily cross the blood brain barrier and protect neurons against ischemic injury. Our research group and colleagues have investigated the latter method over several years.

In the first phase of our experiments we investigated the neuroprotective capacity of a newly synthesized KYNA analog in the four-vessel occlusion model of global forebrain ischemia in rats. The effect of the KYNA analog on spatial learning and memory in intact rats and mice has also been tested with behavioural paradigms.

The target of our histological and electrophysiological investigations was the hippocampus, which is particularly and selectively vulnerable to global ischemic insult. Morphological and functional changes of the pyramidal cells in the CA1 sub region of Ammon's horn can be easily estimated. Systemic treatment with the KYNA analog significantly decreased the neurodegeneration in this area. The protective effect has also been proved with electrophysiological measurements. It is important to note that the neuroprotective effect of the KYNA analog emerged not only if administered before, but also after the ischemic insult. The utilized dose of this analog (1 mmol/bwkg) is two-thirds of the KYNA dose, used generally (1,57 mmol/bwkg). In conclusion, the analog passes the blood-brain barrier and is neuroprotective.

We also investigated the effects of the KYNA analog on spatial orientation and learning in intact rats and mice. After performing the Morris Water Maze experiment we can posit that the neuroprotective dose (1mmol/bwkg) of the KYNA analog does not worsen spatial

learning ability. Experiments with mice in the open field, and Radial Arm Maze paradigms, revealed that a higher dose (2 mmol/bwkg) plays a neuromodulatory role, but the lower dose (1 mmol/bwkg) does not worsen spatial learning ability. We proved the neuromodulatory capacity of the lower dose of the KYNA analog (1 mmol/bwkg) with the aid of the “scopolamine amnesia” behavioural paradigm.

In the second phase of our experiments we investigated the effect of L-kynurenin sulphate (L-KYNs) administered systemically after focal permanent brain ischemia. Systemic administration of L-KYNs divert the kynurenine pathway toward the production of endogenous KYNA, so we expected a modest neurodegeneration after its administration. However, we experienced unexpected, contradictory results. The number of degenerated neurons and the extent of reactive gliosis actually increased in the somatosensory cortices of the rat. One possible explanation might be that the concentration of the neurotoxic by-products of the kynurenine pathway, such as quinolinic acid and 3-hydroxy-kynurenic acid, increased as a result of L-KYNs administration. However, these products emerge during inflammatory processes in the first days after the ischemic insult.

During a brief ischemic state the presence of excessive glutamate and concomitant NMDA receptor activation can last only minutes. Yet the emergence of KYNA produced *de novo* from systemically administered L-KYNs takes considerable time from an excitotoxic process viewpoint. Our explanation is that the blocking of NMDA receptor-dependent endogenous neuroprotective processes by KYNA is responsible for the extension of neurodegeneration.

Based on our experiments, we can posit that the development and utilization of KYNA analogs that can readily cross the blood-brain barrier is more advantageous, considering the clinical expectations. These analogs will not be metabolized further, they act rapidly, and can more easily pass through the narrow therapeutic window after brain ischemia. Using analogs we can determine a dose that is neuroprotective but that induces no adverse cardio-respiratory and psychotomimetic side effect, which would be unacceptable in clinical use.

## **14. Függelék**