

Ph.D. értekezés tézisei

# NEUROPROTEKCIÓS LEHETŐSÉGEK KINURENINEKKEL

**Gellért Levente**



Témavezetők:

Dr. Kis Zsolt és Dr. Toldi József  
egyetemi adjunktus egyetemi tanár

**Biológia Doktori Iskola**

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

2013

Szeged

## Bevezetés

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 10mM. Az extracelluláris tér Glu koncentrációja ugyanakkor csak 0,6  $\mu$ M körüli érték. A transzmitter legnagyobb része az idegsejtek végződéseiben, vezikulumokban raktározva található. Hippokampális piramis sejtek és idegsejt tenyészetek esetében a 2-5  $\mu$ 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. Az iszkémiás sértés után alkalmazott NMDA receptor blokádnak neurodegenerációt fokozó hatását számos esetben megfigyelték. A gyógyászati szempontokat figyelembe véve tehát az ideális elvárás a túlzott NMDA receptor funkció gátlása, a fiziológias, szinaptikus

NMDA receptor funkció megőrzése mellett. Az elvárásoknak az endogén kinurénsav (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 dózissal, 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.

## **Célkitűzések**

- i) Kísérleteink során célul tűztük ki egy új KYNA analóg (2-(2-N,N-dimetillaminoetilamine-1-karbonil)-1H-kvinolín-4-on hidroklorid; Patent Application No: 104448-1998/Ky/me) neuroprotektív sajátságainak felmérését teljes előagyi iszkémiában patkányban. A protektív képességet a hippocampus CA1-es régió piramis sejtek degenerációjának változásával követtük nyomon. További célunk volt, hogy a neuroprotektív képességet a szinaptikus jeltovábbítás és a szinaptikus plaszticitás felmérésével is igazoljuk.
- ii) Kísérletünk során célul tűztük ki, hogy felmérjük a neuroprotektív KYNA analóg hippocampus-függő térbeli tájékozódásra és tanulásra gyakorolt hatását a vízi útvesztő segítségével patkányban.
- iii) 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 hippocampus-függő térbeli tájékozódásra és tanulásra gyakorolt hatásának vizsgálata a sugár útvesztő segítségével egérben.
- iv) Kísérletünk során célul tűztük ki a neuroprotektív KYNA analóg neuromodulátoros képességének igazolását a szkopolamin amnézia modell segítségével egérben.

v) Kísérletink során célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy kinurenin útvonal KYNA szintézis irányába történő eltolása neuroprotektív-e átmeneti fokális iszkémiában patkányban.

## **Anyagok és módszerek**

### **Iszkémiás modellek**

A teljes előagyi iszkémiát a négy ér elzárás modell (4VO) segítségével hoztuk létre. A beavatkozás első szakaszában a vertebrális artériákat klorál-hidrát (4%, 1ml/100 ttkg) altatásban az atlasz csigolya foramen alare-jén keresztül elektrokauterrel elégettük, és a karotisz artériákat lazán fonalra vettük. Egy napos regeneráció után a karotisz artériákat felületes éteraltatásban feltártuk, a fonal segítségével kiemeltük, és bennük a véráramlást 10 percre megszakítottuk. A teljes előagyi iszkémia kialakítását sikeresnek ítéltük, ha az állatok éter további adagolása nélkül is komatózus állapotban maradtak és fénymereg pupilla mellett a szaruhártya reflexet nem tudtuk kiváltani. Az iszkémiás sértést követően görcstevékenységet mutató állatokat a kísérletből kizártuk. A hisztológiai és elektrofiziológiai vizsgálatokig az állatokat 10 napig normál körülmények között tartottuk.

A fokális iszkémia kialakításához a középső agyi artéria elzárását Nembutal altatásban végeztük (60mg/ttkg). A koponya temporális régióját megtisztítottuk, és az agyfelszínre a középső agyi artéria felett fogászati fűrő segítségével feltártuk. A következőkben az ér alá mikrosebészeti 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.1200 $\mu$ m). 30 perces érelzárás után a kampót visszaengedtük és az ér alól eltávolítottuk.

### **Hisztológiai feldolgozás**

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

## Fluoro Jade C festés

A degenerálódott sejteket FJ-C festéssel tettük láthatóvá, metszeteinken 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 Xylol bázisú fedőanyaggal fedtük (Fluoromount, Serva).

## Fluoreszcens immunhisztokémia

A szabadon úszó szeleteket 0.1 M PB-ben mostuk, az endogén Fc receptorokat 10 %-os NDS-ben 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 másodlagos antitestben szobahőmérsékleten 2 óráig inkubáltuk. Mosást követően a szeleteket zselatinózott (2 %) tárgylemezre húztuk fel, és vízbázisú fedőanyaggal fedtük (Fluoromount-G<sup>TM</sup> SouthernBiotech).

## Mennyiségi összehasonlítás

Mennyiségi összehasonlítást a FJ-C+ sejtek számának becslésével végeztünk. Előagyai izskémiában a FJ-C+ sejteket az Ammon szarv CA1-es régiója konvex-konkáv átmenetében a 20x-os objektív alatt egy látótérben manuálisan számoltuk.

A szomatoszenzoros kérgi léziót 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- $\mu\text{m}^2$  méretű objektumokat számoltuk bináris képeken.

## **Magatartás vizsgálatok**

### Vízi útvesztő

A kísérletben 250-300 g súlyú hím Wistar patkányok tanulási képességeit mértük fel a vízi útvesztőben (n=10). Vizsgálatainkhoz 1,6 m átmérőjű, 0,35 m mély műanyag medencét használtunk. A vízbe egy 8 cm átmérőjű platformot helyeztünk el úgy, hogy annak felszíne a víz alatt 1,5-2 cm-el legyen. A platformot a kísérlet során következetesen ugyanazon

kvadráns közepén helyeztük el. A medence kerületén 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. 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. A tanulási folyamatok vizsgálta során 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. 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 (kb. 285 mg/ttkg, 1,5 ml 0,1 M PB-ben feloldva) analóggal, a kísérletek előtt 1 órával, ip. kezeltük.

#### Nyílt porond vizsgálat

A vizsgálat során egy 50X50X50 cm-es plexiüveg dobozban mértük fel 9-16 hetes hím CFLP egerek explorációs aktivitását. A vizsgálat során az állatok a porondon 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 (PB-ben feloldva, pH 7,4) KYNA analógot kapott. A kezeléseket a teszt előtt egy órával végeztük el. A vizsgálat során az állatok által megtett összes utat, a maximális sebességet és a mozdulatlanságban eltöltött időt mértük fel.

#### Sugár útvesztő

A kísérletben 9-16 hetes hím CFLP egerek tanulási képességeit mértük fel a sugár útvesztőben. Az útvesztő egy 24,5 cm átmérőjű központi platformból és nyolc 38 cm hosszú, 9 cm széles, 8 cm magas sugár irányú karból állt. A kísérletben állatokat normális testsúlyuk 85-90 %-ra fogyasztottuk. A habituációs időszakban az útvesztőben a táplálékszemetek véletlenszerűen helyeztünk el. A későbbiekben a táplálékszemetek szisztematikusan közelítettük a karok végében lévő tálkákhoz. Végül csak a tálkákban 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 futtattuk és kezeltük ( $n_{\text{kontroll}}=10$  és  $n_{\text{KYNA analóg}}=12$ ; 1 mmol/ttkg (PB-ben feloldva, pH 7,4). A szkopolamin amnézia kísérletben az állatokat az 1-2 referencia memória hiba szám eléréséig tréningeztük. A szkopolamin (0,2mg/ttkg) és a KYNA analóg (1 mmol/ttkg (PB-ben feloldva, pH 7,4) hatását egyetlen tesztben mértük fel. Az állatok teljesítményét a következő paraméterek szerint értékeltük: referencia memória hibaként értékeltük a nem jutalmazott karokba történő első belépést. 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 állatok mozgását minden magatartás kísérletben a „SMART video tracking system” rendszerrel követtük és rögzítettük (Panlab).

## **Elektrofiziológiai vizsgálatok**

### *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.

### 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 hippocampusz CA1-es régió str. radiatum és str. pyramidale rétegeiből az excitatórikus mezőpotenciálokat (fEPSP) 1-2 M $\Omega$  ellenállású, Ag/AgCl üveg elektródával vezettük el. Az elektródát 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).

### Input-output (I/O) görbék

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

### A szinaptikus potencírozódás indukciója

A hippocampusz CA1-es régió piramiseltjeinek apikális dendritjei és a Schaffer kollaterálisok szinapszisai 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.

### *In vivo* elektrofiziológia

*In vivo* elektrofiziológiai méréseket a dMCAO modell karakterizálásához készítettük. 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. Az elvezetett jeleket 2-20 Hz-es frekvencia tartományra szűrtük, a további elemzést ebben a tartományban végeztük.



## **Eredmények és megbeszélés**

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

Kísérleteink első részében egy új KYNA analóg neuroprotektív sajátosságait mértük fel morfológiai és funkcionális vizsgálatokkal a teljes előagyi iszkémia 4VO modelljében, patkányban. Neuroprotektív vizsgálatunk célpontjává a hippokampuszt választottuk, mert az iszkémiás sértésre kifejezetten érzékeny, és a CA1-es régiója piramis sejtsorában bekövetkező morfológiai és funkcionális változások viszonylag egyszerűen nyomon követhetők. A hatóanyag szisztémás adagolása a hippokampális CA1-es régió FJ-C jelölt, degenerálódott sejtjeinek számát szignifikánsan csökkentette, ha az analógot az iszkémiás sértés előtt és azt követően többször adagoltuk ( $p=0,001$ ). A protektív hatás az analógnak a sértést követő egyszeri adagolása után is megjelent ( $p=0,016$ ).

A protektív hatást a morfológiai vizsgálatok mellett funkcionális vizsgálatokkal is nyomon követtük. A szinaptikus jelátvitelt input-output görbék felvételével vizsgáltuk. A kontroll csoporthoz képest a 4VO csoport állataiban a lépcsőzetesen emelt ingeráramokhoz tartozó fEPSP amplitúdó szignifikánsan alacsonyabb értékeket mutatott ( $p=0,045$ ). Az analóggal többször kezelt csoport fEPSP amplitúdói azonban nem különböztek szignifikánsan a kontroll csoport értékeitől ( $0,997$ ). A szinaptikus potencirozódás vizsgálata során a kontroll állatokban a nagyfrekvenciás ingerlés után mért fEPSP amplitúdók értéke mintegy 30%-os emelkedést mutatott. A 4VO állatokban a fEPSP amplitúdók szignifikánsan alacsonyabb értéket mutattak ( $p=0,0001$ ), a szinaptikus potencirozódást nem sikerült kialakítani. Az analóggal többször kezelt állatokban ez a különbség nem volt szignifikáns ( $p=0,99$ ).

### **A KYNA analóg hatása a térbeli tájékozódásra és tanulásra**

Az analóg intakt állatok kognitív funkcióira gyakorolt hatását a térbeli tájékozódást és tanulást vizsgáló kísérletekkel patkányban és egérben is megvizsgáltuk.

#### Vízi útvesztő

A kísérletben a tréninget megelőző, a célkvadránsra irányuló szignifikáns zóna preferencia a kísérlet első hat napján nem jelent meg. Ugyanakkor a hetedik napon, az 1 mmol/ttkg analóggal történő kezelés hatására szignifikáns zóna preferenciát tapasztaltunk ( $p=0,02$ ).

A menekülési latenciát tekintve az ötödik napon a teljesítmény szignifikáns javulását tapasztaltuk ( $p=0,001$ ). A tendenciát sem a vivőanyaggal, sem az analóggal történő kezelés nem rontotta. A konszolidálódó emléknym kialakulását vizsgáló átlagos menekülési latencia a kísérlet hatodik napján szignifikáns csökkenést mutatott ( $p=0,001$ ). Az analóg nem rontotta a tendenciát. A rövid távú, munkamemóriaként értelmezett teljesítmény alakulását a tréningek után egy platform nélküli úsztatással vizsgáltuk. Szignifikáns zóna preferencia minden kísérleti napon megjelent. Sem a vivőanyag, sem a KYNA analóg nem befolyásolta a teljesítményt ( $p=0,008$ ). Az analóg neuroprotektív adagja patkányban tehát a vizsgált paraméterek egyikében sem okozott teljesítményromlást.

### Nyílt porond vizsgálat

A kísérletben az analóg két dózisének egerek explorációs aktivitásra gyakorolt hatását vizsgáltuk (vivőanyag, 1 ill. 2 mmol/ttkg KYNA analóg). A vivőanyaggal történő kezeléshez képest az 1 mmol/ttkg analóg az állatok nyílt porondban megtett összes útját tekintve elhanyagolható csökkenést okozott. 2 mmol/ttkg hatására ez az érték szignifikánsan csökkent ( $p=0,001$ ). Az állatok maximális sebességét a vivőanyaghoz képest az analóg mindkét dózisa egyenlő mértékben csökkentette, a változás azonban nem volt szignifikáns ( $p=0,069$ ). Az immobilitás idejének szignifikáns emelkedését ugyanakkor csak az analóg nagyobb dózisa váltotta ki ( $p=0,035$ ). 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 a nyílt porond feltérképezése során megtett utat, és az immobilitás növekedését is kiváltotta.

### Sugár útvesztő

A kísérletben a krónikusan adagolt KYNA analóg térbeli tájékozódásra és tanulásra gyakorolt hatását vizsgáltuk vivőanyaggal és 1 mmol/ttkg KYNA analóggal kezelt egerekben. A kísérlet hatodik napjára az emléknym 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 ( $p=0,523$ ).

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 ( $p=0,356$ ).

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 ( $p=0,121$ ).

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 ( $p=0,001$ ). A csoportok között szignifikáns eltérést itt sem találtunk ( $p=0,753$ ).

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, a KYNA analóggal történő krónikus kezelés nem okozott teljesítmény csökkenést vagy eltérést a vivő anyaggal kezelt csoport eredményéhez képest.

### Szkopolamin amnézia

A kísérletben az analóg ún. szkopolamin amnéziában kifejtett hatását vizsgáltuk. A szkopolamint a sugár útvesztőben 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 ( $p=0,029$ ) és a teljesítéshez szükséges idő ( $p=0,003$ ) tekintetében tapasztaltunk. A páronkénti összehasonlítás során a munkamemória hiba tekintetében a kontroll és szkopolamin+analóg csoport teljesítménye között a különbség nem volt szignifikáns ( $p=0,530$ ). 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. Bár a

sugár útvesztő vizsgálat alapján a KYNA analóg 1 mmol/ttkg adagja egészséges egerekben a tanulási folyamatokat nem befolyásolja, a szkopolamin amnézia kísérletben bizonyítottuk az analóg 1 mmol/ttkg-os adagjának neuromodulátoros hatását.

### **A poszt-iszkémiás L-kinurenin szulfát adagolás hatása fokális iszkémia modellben**

Neuroprotektív kísérleteink második szakaszában az utókezelésben alkalmazott L-kinurenin szulfát hatását vizsgáltuk átmeneti, fokális agyi iszkémiában. Modellünk elektrofiziológiai jellemzéséhez elektro-encefalogramot vettünk fel az állatok ipszilaterális, szomatoszenzoros kéreg feletti koponyaterületéről a 30 perces ér okklúzió előtt és az iszkémiás periódusban. A két periódus teljesítmény spektrumában jelentős különbséget tapasztaltunk. A 2-20 Hz tartományban szűrt EEG az iszkémiás periódusban szignifikánsan alacsonyabb teljesítmény spektrum értéket adott ( $p=0,0001$ ). Az EEG mérések alapján elmondhatjuk, hogy modellállataink minden esetben 30 perces iszkémiás sértésen estek át. Az L-kinurenin szulfát 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, FJ-C jelölt idegsejtek száma ( $p=0,023$ ), és a reaktív gliózis mértéke is megnőtt. Elképzeléseink szerint a neurodegeneráció fokozásáért a KYNA excesszív NMDA receptor működést követő NMDA receptor-függő endogén neuroprotektív folyamatokra kifejtett gátlása a felelős.

### **Összefoglalás**

Kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy a vér-agy gáton átjutó és neuroprotektív sajátsgot 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 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 neuroprotektív mellett nem fejt ki a klinikum szempontjából elfogadhatatlan kardio-respiratórikus és pszihotomimetikus mellékhatásokat.

## Publikációs lista

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

**Gellért L**, Varga D, Ruzska M, Toldi J, Farkas T, Szatmári I, Fülöp F, Vécsei L, Kis Z. **Behavioural studies with a newly developed neuroprotective KYNA-amide.** *J Neural Transm.* 2012 Feb;119(2):165-72.  
If:2,730

**Gellért L**, Fuzik J, Göblös A, Sárközi K, Marosi M, Kis Z, Farkas T, Szatmári I, Fülöp F, Vécsei L, Toldi J. **Neuroprotection with a new kynurenic acid analog in the four-vessel occlusion model of ischemia.** *Eur J Pharmacol.* 2011 Sep 30;667(1-3):182-7.  
If:2,516

**Gellért L**, Knapp L, Németh K, Herédi J, Varga D, Oláh G, Kocsis K, Menyhárt A, Kis Zs, Farkas T, Vécsei L, Toldi J. **Post-ischemic treatment with L-kynurenine sulfate exacerbates neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion.** *Neuroscience* 2013 (közlésre elfogadva, Ms. No.: NSC-13-300R2)  
If:3,380

### Egyéb közlemények:

Fuzik J, **Gellért L**, Oláh G, Herédi J, Kocsis K, Knapp L, Nagy D, Kincses ZT, Kis Z, Farkas T, Toldi J. **Fundamental interstrain differences in cortical activity between Wistar and Sprague-Dawley rats during global ischemia.** *Neuroscience.* 2013 Jan 3;228:371-81.  
If:3,380

Demeter I, Nagy K, **Gellért L**, Vécsei L, Fülöp F, Toldi J. **A novel kynurenic acid analog (SZR104) inhibits pentylenetetrazole-induced epileptiform seizures. An electrophysiological study: special issue related to kynurenine.** *J Neural Transm.* 2012 Feb;119(2):151-4.  
If:2,730

Nagy K, Plangár I, Tuka B, **Gellért L**, Varga D, Demeter I, Farkas T, Kis Z, Marosi M, Zádori D, Klivényi P, Fülöp F, Szatmári I, Vécsei L, Toldi J. **Synthesis and biological effects of some kynurenic acid analogs.** *Bioorg Med Chem.* 2011 Dec 15;19(24):7590-6.  
If:2,921

Prandovszky E, Horváth S, **Gellért L**, Kovács SK, Janka Z, Toldi J, Shukla D, Vályi-Nagy T. **Nectin-1 (HveC) is expressed at high levels in neural subtypes that regulate radial migration of cortical and cerebellar neurons of the developing human and murine brain.** *J Neurovirol.* 2008 Apr;14(2):164-72.  
If: 1,858