

**Az akut L kinurenin szulfát kezelés magatartási,
szövetteni és keringési hatásainak komplex vizsgálata
C57Bl/6j egér törzsben**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Varga Dániel Péter



Témavezetők

Prof. Dr. Toldi József
egyetemi tanár

Dr. Gellért Levente
egyetemi adjunktus

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Szeged, 2017

Bevezetés

A triptofán egyike annak a húszféle aminosavnak, amelyből az élő szervezetek fehérjéinek szintézise zajlik. Lebomlása során részben egy monoamin neurotranszmitter a szerotonin keletkezik, ami a központi idegrendszerben a limbikus és autonóm funkciók vezénylésében játszik szerepet. A szerotonin útvonal a triptofán lebontásának csupán elenyésző részét képezi. A triptofán 99%-a ugyanis egy kevésbé ismert kaszkádon, a kinurenin útvonalon keresztül metabolizálódik, mely folyamat során számos biológiailag aktív anyagcseretermék keletkezhet. Az útvonal egyik központi terméke az L-kinurenin (L-KYN). A metabolizmus kezdeti szakasza elsősorban a májban és a vesében zajlik, az L-KYN átalakítása viszont már az agyban is hatékonyan képes végbemenni. A vér-agy gát, mint limitáló tényező, erősen korlátozza a központi idegrendszer és a perifériás kinurenin metabolizmus közötti átjárhatóságot. A kinurenin útvonalon található anyagcseretermékek jelentős része ugyanis csak passzív diffúzióval rendkívül alacsony hatékonysággal képes átjutni a vér-agy gáton. Kivételt képez az L-KYN, ami az L1-típusú semleges aminosav transzportereken keresztül könnyedén közlekedik a periféria és az agyszövet között. A központi idegrendszer kinurenin metabolizmusa tehát a perifériás L-KYN koncentráció változásra különösen érzékeny. Állatkísérletes eredmények sora igazolja, hogy egészséges felnőtt emlősben a szisztémás L-KYN koncentráció kísérletes növelésére a központi idegrendszerben bekövetkező legjellemzőbb és leggyorsabb reakció a kinurénsav (KYNA)-szint dózisfüggő emelkedése.

A KYNA egy szélesspektrumú receptormoduláló, antioxidáns és neuroprotektív potenciállal rendelkező endogén molekula. Összetett pre- és

posztiszinaptikus receptorhatásainak köszönhetően jelentős befolyást gyakorol mind a fejlődő, mind a felnőtt idegrendszer szinaptikus jelátvitelének hatékonyságára. A KYNA képes a glutamát felszabadulásának közvetlen és közvetett mérséklésére egyrészt a preszinaptikus terminálisokon található $\alpha 7$ -nikotinos acetilkolin receptoron kifejtett nem kompetitív gátló hatása, valamint a neuronokon és asztrocitán expresszált G_i -fehérje asszociált receptor 35 aktiválása révén. Az egészséges agyszövetben a KYNA mennyiségében bekövetkező fokozódás elsődleges funkcionális következménye tehát a glutamát extracelluláris koncentrációjának csökkenése. Minden bizonnyal erre másodlagos hatásként jelentkezik a többi neurotranszmitter szintjében megfigyelhető fluktuáció (acetilkolin, dopamin, GABA). Összességében elmondható, hogy az egyes neurotranszmitterek felszabadulása az agyi KYNA-szint fordított arányú kontrollja alatt áll. A KYNA ezen kívül képes csillapítani a serkentő jelátvitelt, a posztiszinaptikus membránrészen található NMDA receptor kompetitív gátlásával. Mindemellett ligandja egy helix-loop-helix fehérje családba tartozó transzkripciós faktornak, az aril-hidrokarbon receptornak, amelyen keresztül gyulladáscsökkentő hatású. A receptormoduláló hatásai mellett antioxidáns tulajdonságát is kimutatták. Ezek tekintetében nem meglepő, hogy az agyi KYNA-szint kísérletes emelése állatkísérletes eredmények alapján ígéretes terápiás lehetőségként mutatkozik a neuroinflammáció, illetve a glutamát excitotoxicitás számos formájában. Kutatócsoportunk korábbi munkájával eredményesen járult hozzá az L-KYN adagolás neuroprotektív hatékonyságának kimutatásához a neurodegeneráció és az ischaemiás stroke kísérletes állatmodelljeiben. Az agyi KYNA-szint emelés terápiás alkalmazhatóságának felmérése során ugyanakkor igen nagy körültekintéssel szabad eljárni, ugyanis a glutamát jelátvitel alulműködése

éppúgy káros, mint annak túlműködése. Így a kinurenerg-manipuláció következtében nem kívánt mellékhatások megjelenésével is szükséges számolni. Preklinikai tanulmányok során az akut és a krónikus L-KYN adagolás sok esetben hipoaktivitást és a térbeli tájékozódás zavarát okozta, szélsőséges esetekben pedig részben szkizofréniára is jellemző kóros viselkedést idézett elő az állatokban. A pre- és posztnatális L-KYN expozíciót pedig összefüggésbe hozták a felnőtt korra kialakuló tanulás és figyelemzavarral.

Összességében elmondható, hogy a KYNA túltermelés receptorszintű és sejtszintű hatásaival kapcsolatban meglehetősen részletes ismeret áll rendelkezésre, ugyanakkor néhány tanulmányt leszámítva a KYNA-szint emelés intakt, felnőtt idegrendszerre gyakorolt szervezetszintű, viselkedésben megnyilvánuló rövid és hosszú távú hatásai vonatkozásában az irodalom meglehetősen hiányos. Nem készült többek közt olyan átfogó dózis-hatás tanulmány, amely alapján lehetőség nyílna elkülöníteni a hatástalan, a hatékony és a nem kívánt mellékhatásokat kiváltó dózisokat. Ráadásul korlátozott ismeret áll rendelkezésre az esetleges fajok közti különbségekről. Ugyanis az akut viselkedésváltozásokat leíró tanulmányok szinte kizárólag patkányon végzett mérésekből származnak, miközben ismeretes, hogy maga a kinurenin metabolizmus sem egyforma az egyes emlősök között. A C57Bl/6 a genetikai módosításokhoz használt legelterjedtebb egér típus. Ugyanakkor a vad típusban az akut KYNA-szint fokozás szervezetszintű hatásairól semmilyen adat nem áll rendelkezésre. Éppen ezért fontos lenne az egér törzs ilyen irányú karakterizálása, ami később megfelelő viszonyítási alapot nyújthatna a célzott génmanipulációs kísérletekhez, illetve felfedhetné az esetleges fajok közti különbségeket.

A neurofiziológiai hatásokon túl egyre több eredmény szól amellett, hogy a kinurenin metabolitok közül a KYNA, illetve az L-KYN közvetlenül szerepet játszhat a szisztémás vérnyomás és az agyi vérkeringés szabályozásában. Kimutatták, hogy a szisztémás gyulladás (szepszis) során jelentkező hipotenzió kialakulásáért részben az érendotélből nagy mennyiségben felszabaduló L-KYN tehető felelőssé. Egy másik tanulmányban az L-KYN alacsony dózisú intravénás adagolása (1 mg/ttkg) az agykérgi vérátáramlás (CBF) fokozódását okozta éber nyulakban. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy az akut szisztémás L-KYN-koncentráció növekedés befolyással lehet az egészséges felnőtt szervezet vérnyomására, illetve nyugalmi CBF-ére.

Célkitűzések

Az értekezés alapját képző kísérletes munka három feladat köré csoportosult, mely során a következő kérdésekre kerestük a választ, intakt C57Bl/6j egérben:

1. A különböző dózisú perifériás L-KYNs adagolás, hogyan befolyásolja a motoros, a szorongással kapcsolatos és a memória funkciókat?
2. Az L-KYNs kezelés okoz-e szövettani módszerrel kimutatható változást az idegsejtek működésében azokon az agyterületeken, amelyek a viselkedésváltozásokkal összefüggésbe hozhatók?
3. Az L-KYNs kezelés befolyásolja-e a szisztémás keringést, illetve a nyugalmi agykérgi vérátáramlást?

Módszerek

A kísérletekhez 8-12 hetes, 25-30 g testsúlyú, hím C57Bl/6j egereket használtunk (n = 216), melyeket szabványos ketrecben, külön erre a célra kialakított állatházban tartottuk. Munkánk során minden esetben a Magyar Egészségügyi Bizottság által elfogadott 1986. november 24-i rendelet (86/609/ECC), valamint a laboratóriumi állatok gondozásával kapcsolatos alapelvek (NIH Publikáció No. 85-23) szerint jártunk el. A kísérleteinket XX/015 93/I/2010 számú etikai engedély alapján végeztük.

1. Magatartás vizsgálatok

Viselkedéstesztekkel az L-KYNs akut hatásait mértük fel, ezért az állatokat egyszer oltottuk, a tesztek megkezdése előtt két órával. Az egereket különböző dózsis (25 mg/ttkg, 50 mg/ttkg, 100 mg/ttkg, 200 mg/ttkg, 300 mg/ttkg) L-KYNs-tal vagy a kontroll méréseknél az L-KYNs vivőanyagával (0,1 M PB; pH 7,4) kezeltük. A kísérleteket színes CCD kamera (Sony, SSC-DC378P) segítségével számítógépre rögzítettük és tároltuk. A felvételeket később egy speciális szoftverrel (SMART[®]; Panlab Harvard Apparatus), vagy manuálisan elemeztük.

Az állatok lokomotoros és explorációs aktivitását nyílt porond (OF) teszttel tanulmányoztuk. A vizsgálat során az egereket egy négy oldalról zárt, felülről nyitott dobozba helyeztük, ahol azok 8 percig szabadon mozoghattak. Ez idő alatt mértük az állatok által megtett út hosszát (cm), az immobilitás idejét (s), valamint a sebességüket (cm/s).

Az epizodikus memória teljesítményt az új tárgy felismerés (NOR) paradigmával vizsgáltuk. A teszt lényege, hogy az állatoknak különbséget kell

tenniük egy ismert és egy ismeretlen új tárgy között. Az új tárgy felismerési teljesítményt pedig a diszkrimináció index (DI) meghatározásával értékeltük, amit a következőképp számoltunk: $DI = \frac{\text{új tárgy} \times 100\%}{\text{új tárgy} + \text{ismerős tárgy}}$

A fenti képletben az „új tárgy” és az „ismerős tárgy” a tárgyak felfedezésének idejét (s) jelöli. Az így számítható százalékos érték azt jelzi, hogy az állatok mennyi időt töltöttek az új tárgy feltérképezésével a tárgyakkal töltött teljes időhöz képest.

A szorongással kapcsolatos viselkedést az emelt keresztpalló (EPM) teszttel vizsgáltuk. Az éjszakai életmódot folytató rágcsálók ösztönösen kerülnek a nyílt, erősen megvilágított területeket. Az EPM-mel jól vizsgálható, hogy az egerek mennyi időt töltenek három különböző megvilágítottságú és fedettségű térrész (nyitott, köztes, zárt) között, ezáltal az állatok kockázatvállalási készsége mérhető fel.

2. Szövetteni vizsgálat

Az akut nagy dózisu L-KYNs kezelés (300 mg/ttkg) idegsvöetre gyakorolt hatásait a bazális c-Fos expresszió változásának nyomon követésén keresztül értékeltük. A 4%-os paramformaldehid oldattal fixált agyból 20 µm vastag koronális agyszleteket készítettünk, majd azokon fluoreszcens immunhisztokémiai módszerrel jelöltük a c-Fos fehérjét kifejező sejteket. Vizsgálódásunk célterületeként a lokomotoros aktivitás szabályozásában kulcsfontosságú dorzális striátumot (bregma +0,54 mm; A-P), valamint a térbeli tájékozódással és tanulással szorosan kapcsolatba hozható hippocampusz (bregma -2 mm; A-P) CA1 régiót választottuk. A területek pontos kijelölését egér neuroanatómiai atlasz segítette. A fluoreszcens immunhisztokémiai

felvételeket Olympus BX51 mikroszkóppal és az ehhez kapcsolt DP70 digitális képfeldolgozó rendszerrel készítettük, és számítógépen tároltuk. A felvételeken a sejtszámoláshoz használt területeket kézzel jelöltük ki. A c-Fos immunopozitív sejtek mennyiségét MATLAB 7.1 (Mathworks, Natick, MA, USA) környezetben megírt program segítségével automatikusan számoltuk. Ehhez a képeken először threshold és zajsűrészt végeztünk, majd a bináris alakított a felvételeken (fekete, fehér) a 25-400 μm^2 területű objektumokat fogadtuk el jelölt sejteknek.

3. Artériás középvérnyomás (MABP) és agykérgi vérátáramlás (CBF) vizsgálat

Az utolsó kísérletsorozatban a nagy dózisú egyszeri L-KYNs kezelés (300 mg/ttkg) keringésre gyakorolt hatásait vizsgáltuk izoflurán (1,5% bevezetés, 1% fenntartás, 0,5 – 0,8% regisztráció, 5% túlaltatás) gázkeverékkel ($\text{N}_2\text{O}:\text{O}_2$, 70:30%) altatott spontán légző egereken. A MABP-t egy házilag épített vérnyomásérzékelő transzduktor segítségével, a bal artéria femoralisba vezetett kanülön keresztül, közvetlenül véres úton mértük. A nyugalmi CBF változást pedig lézer folt interferencia (lézer speckle) kontrasztanalízisen alapuló eszközzel (PeriCam PSI HR System[®], Perimed, Järfälla, Svédország) intakt koponyán keresztül vizsgáltuk. A CBF-et (PimSoft 1.5.4.8) és a MABP-ot (PeriSoft 2.5.5) specializált szoftverekkel párhuzamosan számítógépre rögzítettük, majd az adatokat MATLAB 2013a (Mathworks, Natick, MA, USA) környezetben megírt programmal elemeztük. A mérést 20 perc stabil alapvonal regisztrálásával indítottuk, amit az anyagbeadás követett, majd a felvételt további 140 percre folytattuk. A CBF kiértékelését egy vizsgálati tartomány meghatározásával kezdtük. Ennek megfelelően a regisztráláshoz használt

programmal (PimSoft 1.5.4.8) az áramlásváltozási képeken a kétoldali szomatoszenzoros kérgi régió egy-egy $2,5 \pm 0,3 \text{ mm}^2$ -es területet jelöltünk ki. Az innen gyűjtött perfúziós értékeket átlagoltuk, majd relatív százalékos áramlásváltozási értékekké alakítottuk úgy, hogy a felvételek első 5 percének átlagát 100%-nak, a túlaltatás utáni 5 perc átlagát pedig 0% (biológiai zéró) referencia értéknek vettük. Annak érdekében, hogy az egyedi CBF változásokat egységesen vizsgálni tudjuk minden felvételre meghatároztunk egy áramlásváltozási-zónát (teljes mérésre vonatkoztatott átlag $\pm 1,5$ stdev), amin belül a CBF ingadozást normálisnak tekintettük. Ha a CBF a küszöbérték alá csökkent (átlag $-1,5$ stdev) hipoémiás áramlásesésnek, ha a küszöbérték fölé emelkedett (átlag $+1,5$ stdev) hiperémiás áramlás növekedésnek ítéltük, és további analízisnek vetettük alá. Minden egyedi CBF eseményre kiszámoltuk a CBF átlagtól való eltérés maximumát (%), a küszöb átlépésének hosszát (s), valamint a görbe alatti területét ($\% * s$).

Eredmények és tárgyalás

1. Viselkedésváltozások

Lokomotoros explorációs aktivitás (OF)

A kontroll állatok átlagosan $9,58 \pm 1,1 \text{ cm/s}$ sebességgel mozogtak és a rendelkezésre álló idő $28 \pm 10\%$ -át töltötték horizontális mozgási aktivitás nélkül (immobilitás). Ennek következtében átlagosan $3390 \pm 630 \text{ cm}$ hosszú utat tettek meg. Az egyes paraméterek a különböző kontroll állatcsoportok esetében kisebb-nagyobb mértékben eltértek egymástól, ezért minden L-KYNs-tal kezelt állatcsoportot az azonos napon vizsgált kontrollhoz viszonyítottunk ($n = 9 - 10/\text{csoport}$). Az alacsonyabb dózisu kezelések (25 mg, 50 mg) összehasonlítása

során egyik vizsgálati paraméter esetében sem találtunk statisztikai különbséget a kontroll csoportokhoz képest. Az egyszempontos MANOVA vizsgálat a 100 mg/ttkg L-KYNs kezelésre, viszont már szignifikáns csoporthatást jelzett (Pillai's trace = 0,419, $F_{(3, 14)} = 3,372$, $p = 0,049$). Az állatok lassabban mozogtak, rövidebb utat tettek meg és hosszabb ideig voltak mozdulatlanok. Érdekes módon a magasabb dózisu kezelésekként ellentétes hatás mutatkozott. Az állatok a 200 mg/ttkg és a 300 mg/ttkg L-KYNs kezelés hatására gyorsabban és többet mozogtak, mint a kontroll csoport egyedei. Ezek alapján tehát elmondható, hogy az L-KYNs kezelésre a dózis növekedésével nem lineárisan változó hatás volt megfigyelhető, ami a 100 mg/ttkg kezelésnél látványosan átfordult. Az állatok az alacsonyabb dózisu kezelésekként következményeként hipoaktivitást, míg a 100 mg/ttkg dózis felett hiperaktivitást mutattak. A legmarkánsabb lokomotoros aktivitásbeli eltérést pedig a 300 mg/ttkg-al kezelt csoport esetén tapasztaltuk. Az eredményeink az irodalmi adatokkal jól korrelálnak. Patkányokon végzett korábbi mérések alkalmával többször kimutatták, hogy az egyszeri mérsékelt L-KYN kezelés (100 mg/ttkg) szignifikáns módon csökkenti az OF tesztben az explorációs aktivitást, ami főként a horizontális mozgás mérséklődésén keresztül nyilvánult meg. A nagy dózisu L-KYNs kezelés lokomotoros hatása újszerű, hiszen korábban azt még nem vizsgálták. Ezen eredményünk azonban nagyfokú hasonlóságot mutat a nem kompetitív NMDA antagonistá MK-801, i.p. adagolását követő viselkedésváltozásokhoz. A C57Bl/6 egér törzsben ugyanis az MK-801 kezelés dózisufüggő módon torzította az egerek sebesség kontrollját, amitől azok hiperaktívvá váltak. Kísérleteinkkel tehát igazoltuk, hogy a mérsékelt dózisu kezelés a patkányokhoz hasonló lokomotoros aktivitás depresszálo hatású

egerekben is. Felfedtük továbbá, hogy a dózis fokozására, az NMDA-receptor gátlással analóg, kontrollálatlan hiperaktív mozgásmintázat válik dominánssá.

Epizodikus memória teljesítmény (NOR)

A kontroll és a 25 mg/ttkg L-KYNs-tal kezelt állatok ($n = 10-12$ /csoport) hosszabb ideig foglalkoztak az új tárgy felfedezésével, ahogyan az a DI alapján látszik ($63 \pm 12,6\%$ és $61,8 \pm 15,9\%$; kontroll és 25 mg/ttkg). A 100 mg/ttkg és 300 mg/ttkg L-KYNs-tal kezelt állatok azonban nem tettek különbséget a régi és az új tárgy között. Az állatok ugyanis közel azonos időt töltöttek a tárgyak felfedezésével ($47,1 \pm 10,7\%$ és $48,1 \pm 12,8\%$; 100 mg/ttkg és 300 mg/ttkg). Ezek alapján azt feltételezzük, hogy a magasabb-dózisú L-KYNs kezelések (100 mg/ttkg; 300 mg/ttkg) hatására felhalmozódó KYNA akadályozta az ismerős tárgyról keletkező emléknym kialakulását, ami a tárgyfelismerési memória teljesítmény romlásához vezetett. Az akut kinurenerg-manipuláció amnesztikus hatása egyáltalán nem új keletű. 8-karú sugárlabirintusban végzett vizsgálatok alapján a szisztémás L-KYNs kezelés (100 mg/ttkg) rontotta a térbeli tájékozódás és memória teljesítményt patkányokban. Eredményeinkkel részben ezt a megfigyelést igazoltuk egerekben, kiegészítve azzal, hogy a 100 mg/ttkg L-KYN-dózis alatt vélhetően nem kell komolyabb memória romlással számolni.

Szorongással kapcsolatos viselkedés (EPM)

A kontroll állatok átlagosan 12 ± 3 alkalommal léptek ki az EPM erősen megvilágított, nyílt folyosóira, és a rendelkezésre álló idő (300 s) $15 \pm 7\%$ -át (~ 45 s) töltötték a nyitott karok felfedezésével. Az L-KYNs-dózis emelésével fokozatosan nőtt a nyitott karokban az exploráció aránya ($15 \pm 7\%$, $23 \pm 17\%$, $23 \pm 12\%$, $25 \pm 6\%$; kontroll, 25 mg/ttkg, 100 mg/ttkg, 300 mg/ttkg L-KYNs),

és csökkent a zárt karokban ($75 \pm 8\%$, $61 \pm 21\%$, $60 \pm 19\%$, $58 \pm 7\%$; kontroll, 25 mg/ttkg, 100 mg/ttkg, 300 mg/ttkg L-KYNs) ($n = 10-12$ /csoport). A kontrollhoz viszonyított statisztikai összehasonlítás alapján azonban csak a 300 mg/ttkg L-KYNs kezelés bizonyult szignifikánsnak. Ezek alapján azt láthatjuk, hogy az L-KYNs kezelés a dózis növeléssel egyenes arányban fokozta az állatok kockázatvállalási készségét. Az akut L-KYN-adagolás szorongásra gyakorolt hatását korábban már vizsgálták. Az EPM tesztek során azonban egyik kezelt csoportnál sem tudtak szignifikáns különbséget kimutatni patkányokban. A KYNA egy szintetikus származékának hatására viszont szignifikáns szorongáscsökkentő-hatás mutatkozott mind az EPM teszt, mind a szociális interakción alapuló vizsgálat során. Eredményeinkkel tehát igazoltuk, hogy az egyszeri L-KYNs kezelés szorongásoldó hatású egerekben.

2. Szöveti változások

Az L-KYNs-kezelés olyan dózist választottunk, ami a magtartás tesztek mindegyikében markáns eltérést mutatott (300 mg/ttkg) ($n = 10$ /csoport). A kontroll csoportban nagy számú c-Fos fehérjét kifejező sejtet számoltunk a dorzális striátumban kijelölt területen (485 ± 245), valamint a hippokampális CA1 piramis sejtek rétegében (56 ± 22). Ehhez képest az L-KYNs kezelt csoportban a c-Fos⁺ sejtek száma szignifikáns mértékben csökkent és erősen sporadikus eloszlást mutatott mind a dorzális striátum területén (220 ± 121), mind a hippokampusz CA1 régióban (32 ± 21). Ezzel tehát kimutattuk, hogy az egyszeri nagy dózisu L-KYNs kezelés csökkenti az alap c-Fos expresszió mértékét mindkét vizsgált agyi régióban. Rágcsálókban a dorzális hippokampusz működése kritikus a NOR teszt teljesítésében. A terület c-Fos expressziós-szintjének csökkenése jól összhangba hozható a hippokampusz

működésének zavarával, így az epizodikus memória teljesítmény romlással. A bazális ganglion működése és a c-Fos kapcsolata úgyszintén nyilvánvaló. A dorzális striátumból projektáló közepes-méretű tüskés neuronok normális működése alapvető a mozgás kezdeményezés, mozgási aktivitás és sebesség szabályozásában. Eredményünkkel felfedtük, hogy az L-KYNs kezelés a transzkripciós szabályozás megváltoztatásán keresztül is képes lehet az agyi plasztikus folyamatok befolyásolására, ezzel idézve elő rövid és hosszú távú viselkedésváltozásokat.

3. Keringési változások

A kezelés a MABP-t nem befolyásolta, ugyanis az mindkét állatcsoportban ($n = 8$ /csoport) az egész mérés során egyenletes és stabil volt (69 ± 4 Hgmm és 73 ± 6 Hgmm; kontroll és kezelt). Ellenben a parietális agykérgi vérátáramlásban az L-KYNs beadását követő 60 - 120 percben $22 \pm 6\%$ -os, 7 ± 3 percig tartó hipoémiás CBF csökkenéseket tapasztaltunk. Kísérleteink során kimutattuk, hogy az egyszeri nagy dózisú L-KYNs kezelés destabilizálja a nyugalmi CBF-et, a szisztémás vérnyomás befolyásolása nélkül. A kapott eredményeink látszólag nincsenek összhangban a korábbi L-KYN kezeléssel kapcsolatos értágító, illetve vérnyomáscsökkentő megfigyelésekkel. Az ellentmondás háttérében számos mechanizmus állhat: kezdve az eltérő koncentrációban alkalmazott L-KYN-től, a fajok közti heterogenitáson át, az altatás különbözőségéig. A KYNA-szint fokozódás CBF befolyásoló hatásának pontos mechanizmusa ugyan nem ismert, mégis - a KYNA komplex receptormoduláló hatásait figyelembe véve - számos lehetséges magyarázat fogalmazható meg. Ilyenformán a KYNA többek közt képes lehet az asztrocita tónusos aktivitásának mérséklésére a nem-neuronális, Mg^{2+} -érzékeny NMDA receptor

és a GPR35 receptoron kifejtett összetett hatásai révén. Ennek következtében csökkenhet a nyugalmi értónus szabályozásban kulcsfontosságú vazodilatátor arachidonsav metabolitok szintje, ami CBF-hipoperfúziós tranziensek megjelenését eredményezheti. A kinurenin-manipulációval kapcsolatos vizsgálatok között az L-KYNs kezelés CBF mérséklő hatása mindenképp újszerű. Az eredményeink alapján azonban egyértelmű, hogy a kinurenin-szint fokozásával járó beavatkozások során számolni kell annak agyi keringésre gyakorolt hatásával is.

Összefoglalás

Egyre elfogadottabbá válik, hogy a kinurenin metabolizmus felborulása szoros összhangban áll számos neurodegeneratív betegség során fellépő neurofiziológiai működészavar kialakulásával és súlyosbodásával. A terápiás beavatkozási lehetőségek keresése kapcsán ezért széles körben elterjedt a kinurenin-metabolitok elérhetőségének mesterséges manipulálásán alapuló módszerek feltérképezése. **Jóllehet számos közlemény foglalkozik a kinurenerg-manipuláció neuroprotekción kívüli hatásaival, átfogó dózis-hatás tanulmány a témában korábban még nem készült. Az eredményeink alapján világosan látszik, hogy a mérsékelt L-KYNs kezeléstől kezdve számos viselkedési funkciózavar jelentkezhethet, ami a dózis fokozással egyre kiterjedtebbé és intenzívebbé válik. A nagy dózisú kezelés eredményeként pedig génexpressziós változással és a nyugalmi agyi vérátáramlás destabilizálódásával is számolni kell. Ezeket a jelenségeket fontos lehet bármilyen jövőbeli kísérletes, illetve terápiás kinurenerg-manipuláción alapuló beavatkozás kapcsán számításba venni.**

Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm Dr. Toldi József Professzor Úrnak, hogy megtisztelt bizalmával és biztosította számomra az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszéken a tudományos munkához szükséges feltételeket. Továbbá köszönöm a szakmai és erkölcsi tanácsait, a végtelen türelmét, valamint a mindenkori pozitív, segítőkész hozzáállását.

Köszönöm Dr. Gellért Leventének, hogy szakmai fejlődésem a kezdetektől fogva segítette, és kérdéseimmel, tudományos problémáimmal bármikor fordulhattam hozzá.

Köszönöm továbbá Dr. Kis Zsoltnak, hogy elméleti és gyakorlati tudásával mindenkor készségesen segítette kutatói munkámat.

Köszönöm Dr. Vécsei László Professzor Úrnak, hogy támogatta munkacsoportunk kinureninekkel kapcsolatos kísérleteit.

Kiemelten köszönöm Dr. Bari Ferenc Professzor Úrnak, hogy helyet biztosított az Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézetben, ahol további tudományos munkám folytathattam. Köszönöm Dr. Farkas Eszternek a rengeteg szakmai támogatást, segítséget, iránymutatást és baráti hozzáállását. Külön köszönet Dr. Menyhárt Ákosnak, hogy megtisztelt baráti bizalmával, valamint tudásával és elhivatottságával motiválta és segítette mindennapi munkám. Köszönöm a Kísérletes Agyi Képző Keresztény Kutatócsoport minden tagjának a vidám légkört, a sok-sok támogatást, segítséget és hasznos tanácsot. Köszönöm Bódog Zita Tündének, Herédi Juditnak és Gyengéné Ruzska Mariannak a kísérletekben nyújtott segítséget, és a közreműködést valamennyi tudományos munkámban. Köszönettel tartozom továbbá az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék valamennyi munkatársának, különösen Veketyné Váradi Margónak a rengeteg segítségért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek, kedvesemnek és barátaimnak, hogy végig mellettem voltak, támogattak, bíztattak és átsegítettek a nehéz pillanatokon.

Összesített tudománymetria

1. Szakmai közlemények: 7
2. Összesített impact factor: 18,921
3. Független idézők: 43
4. *h*-index: 4

Az értekezés eredményeit tartalmazó közlemények

1. **Varga, D.**, Herédi, J., Kánvási, Z., Ruzska, M., Kis, Z., Ono, E., Iwamori, N., Iwamori, T., Takakuwa, H., Vécsei, L., Toldi, J., Gellért, L. (2015) Systemic L-Kynurenine sulfate administration disrupts object recognition memory, alters open field behavior and decreases c-Fos immunopositivity in C57Bl/6 mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 1-15.
doi: 10.3389/fnbeh.2015.00157.
IF.:3,104
2. Gellért, L., and **Varga, D.** (2016) Locomotion Activity Measurement in an Open Field for Mice. *Bio-protocol*, 6(13): e1857.
doi:10.21769/BioProtoc.1857. (**Online protokoll**)
3. **Varga, D.P.**, Menyhárt, Á., Puskás, T., Bari, F., Farkas, E., Kis, Z., Vécsei, L., Toldi, J., Gellért, L. (2017) Systemic administration of L-kynurenine sulfate induces cerebral hypoperfusion transients in adult C57Bl/6 mice. *Microvascular Research*, 114, 19-25.
doi:10.1016/j.mvr.2017.05.006.
IF.:2,371

Egyéb közlemények

4. 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. (2011) Synthesis and biological effects of some kynurenic acid analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19, 7590-6. doi:10.1016/j.bmc.2011.10.029.
IF.:2,930
5. Gellért, L., **Varga, D.**, Ruzska, M., Toldi, J., Farkas, T., Szatmári, I., Fülöp, F., Vécsei, L., Kis, Z. (2011) Behavioural studies with a newly developed neuroprotective KYNA-amide. *Journal of Neural Transmission*, 119, 165-72. doi:10.1007/s00702-011-0692-8.
IF.:2,392
6. Gellért, L., Knapp, L., Németh, K., Herédi, J., **Varga, D.**, Oláh, G., Kocsis, K., Menyhárt, A., Kis, Z., Farkas, T., Vécsei, L., Toldi, J. (2013) Post-ischemic treatment with L-kynurenine sulfate exacerbates neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience*, 247, 95-101. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.04.063.
IF.:3,277
7. **Varga, D.P.**, Puskás, T., Menyhárt, Á., Hertelendy, P., Zölei-Szénási, D., Tóth, R., Ivánkovits-Kiss, O., Bari, F., Farkas, E. (2016) Contribution of prostanoid signaling to the evolution of spreading depolarization and the associated cerebral blood flow response. *Scientific Reports*, 6, 31402. doi:10.1038/srep31402.
IF.:4,847