

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai kar

Biológia Doktori Iskola

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

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

Ph.D. értekezés

Varga Dániel Péter

Témavezetők:

Prof. Dr. Toldi József
egyetemi tanár

Dr. Gellért Levente
egyetemi adjunktus

Szeged, 2017

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	3
2. Bevezetés.....	5
2.1 A kinurenin metabolikus útvonal	6
2.2 Neuroaktív kinurenin metabolitok tulajdonságai	11
2.2.1 A 3-hidroxi-kinurenin (3-HK).....	11
2.2.2 A kvinolénsav (QUIN).....	12
2.2.3 A kinurénsav (KYNA)	12
2.3. A KYNA szabályzó szerepe az idegrendszer működésében.....	16
2.3.1. Szinaptikus jelátvitel befolyásolása.....	16
2.3.2. Neuropatológia és neuroprotekción.....	17
2.4 Kinureninek szerepe a vérkeringés szabályozásában.....	23
3. Célkitűzések	25
4. Anyagok és módszerek.....	27
4.1 Felhasznált állatok.....	27
4.2 Magatartás vizsgálat.....	27
4.2.1 Nyílt porond (OF) teszt	28
4.2.2 Új tárgy felismerés (NOR) teszt.....	29
4.2.3 Emelt keresztpalló (EPM) teszt.....	31
4.3 Szövetteni vizsgálat.....	32
4.3.1 c-Fos fluorescens immunhisztokémia	32
4.3.2 Sejtszámolás	33
4.4 Artériás középvérnyomás és agykérgi vérátáramlás vizsgálat.....	33
4.4.1 Műtéti preparálás.....	33
4.4.2 Kísérleti protokoll és jelfeldolgozás.....	34
4.5 Statisztikai elemzés	36
5. Kísérletekben való részvétel.....	38

6. Eredmények.....	39
6.1 A különböző dózisu L-KYNs kezelés viselkedésre gyakorolt hatásai.....	39
6.1.1 Lokomotoros explorációs aktivitás (OF).....	39
6.1.2 Epizodikus memória teljesítmény (NOR).....	42
6.1.3 Szorongással kapcsolatos viselkedés (EPM).....	44
6.2 Az L-KYNs kezelés c-Fos fehérje kifejeződésre gyakorolt hatásai.....	46
6.2.1 A hippocampusz CA1 régióban.....	46
6.2.2 A dorzális striátum területén.....	47
6.3 Az L-KYNs kezelés vérkeringésre gyakorolt hatásai.....	48
6.3.1 Az artériás közepvényomás (MABP) változása.....	48
6.3.2 Az agykérgi vérátáramlás (CBF) változása.....	49
7. Megbeszélés.....	51
7.1 Viselkedésváltozások.....	52
7.1.1 Lokomotoros explorációs aktivitás.....	53
7.1.2 Epizodikus memória teljesítmény.....	54
7.1.3 Szorongással kapcsolatos viselkedés.....	55
7.2 Szöveti változások.....	55
7.3 Keringési változások.....	59
8. Következtetések.....	63
9. Köszönetnyilvánítás.....	65
10. Irodalomjegyzék.....	66
11. Összefoglalás.....	78
12. Summary.....	82
13. Tudományos közlemények listája.....	86
14. Függelékek.....	87

1. Rövidítések jegyzéke

3-HANA:	3-hidroxi-antranilsav (3-hydroxyanthranilic acid)
3-HAO:	3-hidroxi-antranilsav 3,4-dioxigenáz (3-hydroxyanthranilate oxidase)
3-HK:	3-hidroxi-kinurenin
5-HT:	szerootonin (5-hydroxytryptamine)
$\alpha 7$ nACh:	$\alpha 7$ -nikotinos acetilkolin ($\alpha 7$ nicotinic acetylcholine)
AHR:	aril-hidrokarbon receptor
AMPA:	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav
ANA:	antranilsav (anthranilic acid)
cAMP:	ciklikus adenzin-monofoszfát (cyclic adenosine monophosphate)
CBF:	agyi vérátáramlás (cerebral blood flow)
cGMP:	ciklikus guanozin-monofoszfát (cyclic guanosine monophosphate)
DI:	Diszkriminációs Index
DI _x :	Diszkriminációs teljesítmény
eNOS:	endotéliális nitrogén-monoxid szintáz (endothelial nitric oxide synthase)
EPM:	emelt keresztpalló (elevated Plus-Maze)
GABA:	gamma-amino-vajsav (gamma-aminobutyric acid)
GPR35:	G _i -fehérje asszociált receptor 35 (G _i protein-coupled receptor 35)
IDO:	indolamin-2,3-dioxigenáz
IFN- γ :	interferon- γ
i.m.:	izomba (intramuscular)
i.p.:	hasüregbe (intraperitoneal)
KAT:	kinurenin aminotranszferáz
KMO:	kinurenin 3-monoxigenáz

KYNA: kinurénsav (kynurenic acid)

L-KYN: L-kinurenin

L-KYNs: L-kinurenin szulfát

MABP: artériás középvérnyomás (mean arterial blood pressure)

NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid

NDS: normál számár vérszérum (normal donkey serum)

NMDA: N-metil-D-aszpartát

NO: nitrogén-monoxid (nitric oxide)

NOR: új tárgy felismerés (novel object recognition)

NOS: nitrogén-monoxid szintáz (nitric oxide synthase)

NPY: neuropeptid Y

rCBFx: agyi autóregulációs index (regional cerebrovascular autoregulatory index)

OF: nyílt porond (open field)

PB: foszfát puffer (phosphate buffer)

QPRTáz: kvinolénsav foszforibozil-transzferáz (Quinolinate acid phosphoribosyltransferase)

QUIN: kvinolénsav (quinolinic acid)

sGC: szolubilis guanil-cikláz

TDO: triptofán-2,3-dioxigenáz

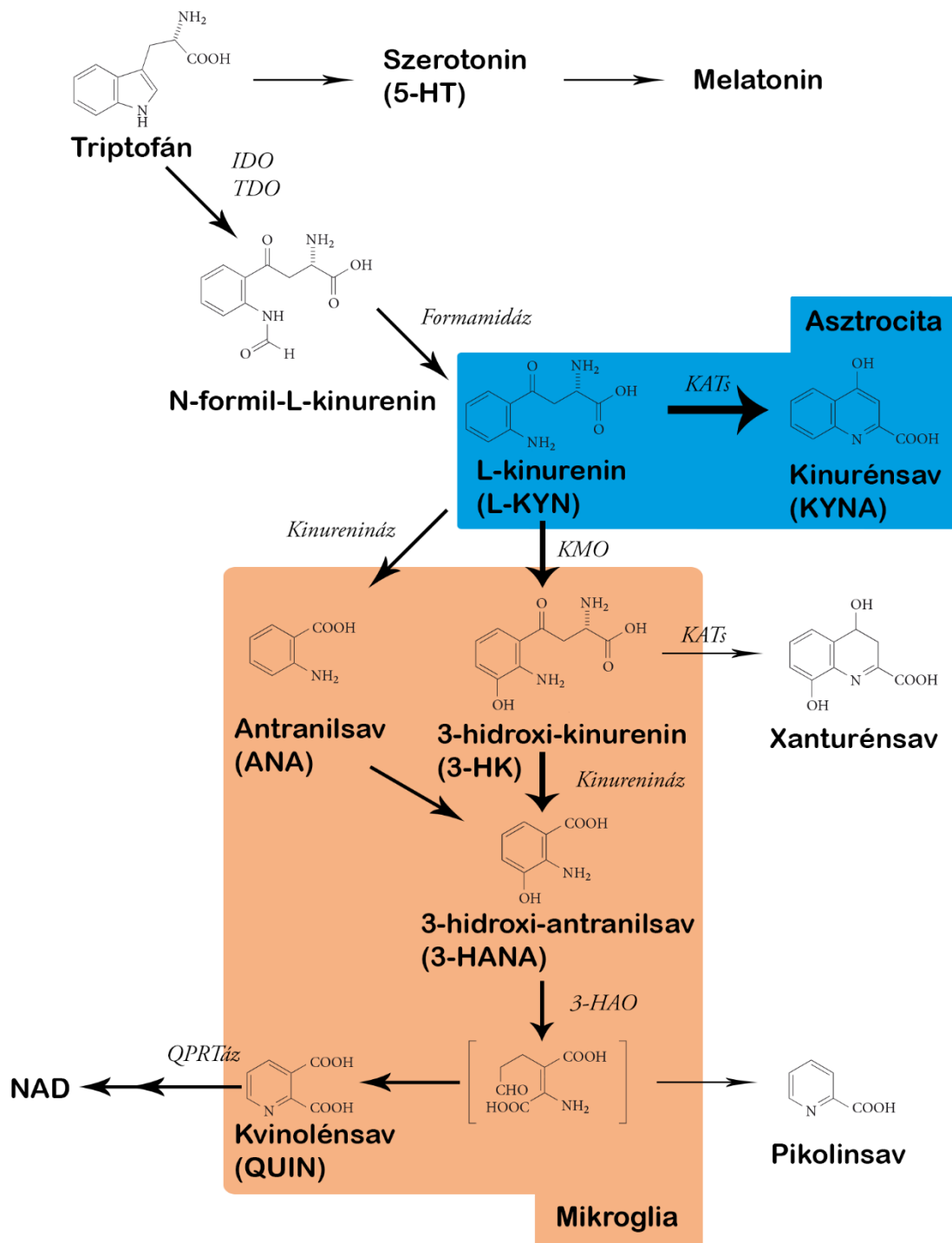
2. Bevezetés

A triptofán egyike annak a húszféle aminosavnak, amelyből az élő szervezetek fehérjéinek szintézise zajlik. A triptofán az emlősökben esszenciális aminosav, vagyis a szervezetük képtelen annak előállítására, ezért azt csak fehérjében gazdag táplálékkal tudják felvenni. Lebomlása során részben egy monoamin neurotranszmitter a szerotonin (5-hidroxitriptamin, 5-HT) keletkezik, ami a központi idegrendszerben a limbikus és autonóm funkciók vezérlésében játszik szerepet. Működése alapvető többek közt a hangulat szabályozásában, a szexuális és a táplálkozással kapcsolatos viselkedések kialakításában. A triptofán egyik további bomlásterméke a melatonin, ami a cirkadián ritmus irányításáért felelős hormon. Képződése közvetlenül 5-HT-ből, az N-acetil transzferáz enzim segítségével történik, mely folyamat az éjszaka során fokozottan aktív. A szerotonin útvonal a triptofán lebontásának csupán elenyésző részét képezi. A triptofán 99%-a ugyanis egy kevésbé ismert kaszkádon, a kinurenin útvonalon keresztül metabolizálódik (Stone és Darlington, 2002). E folyamat eredményeként a triptofán egy részéből nikotinsav-mononukleotid keletkezik, ami a sejtműködés számára nélkülözhetetlen biokémiai kofaktor a nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD⁺) közvetlen előanyaga (Braidy és mtsai., 2011). A kinurenin útvonalon feleslegben keletkező egyéb bomlástermékek pedig aromás gyűrűt tartalmazó szerves savak formájában a vizelettel együtt ürülnek (Heidelberger és Gullberg, 1949). E degradáció során neuroaktív, antioxidáns, vagy éppen szabadgyökképző tulajdonsággal rendelkező anyagcseretermékek is létrejöhetnek. Számos, a központi idegrendszert érintő betegség kialakulása és a tünetek súlyosbodása kapcsolatba hozható a kinurenin útvonal enzimatisz egyensúlyának felborulásával, valamint az egyes kinurenin metabolitok fiziológiás koncentrációjának krónikus megváltozásával. Az intenzív állatkísérletes kutató munkának köszönhetően napjainkra már egyre világosabb, hogy az egyes betegségek során a kinurenin metabolizmus különböző mértékű eltolódása milyen rövid és hosszú távú biokémiai, neuropatológiai és viselkedésben megnyilvánuló következményekkel járhat. Ráadásul, a kinureninek terápiás felhasználását célzó kísérleti eredmények is rendkívül biztatóak. Jóllehet a kinureninek patológiás szerepköre ebből kifolyólag részben tisztázott, arról azonban továbbra is keveset tudunk, hogy a metabolizmus átmeneti megváltozása milyen hatással van az egészséges felnőtt szervezet működésére. Éppen ezért doktori értekezésem témája a fokozott kinurenin metabolizmus magatartási, szövettani és keringési hatásainak tanulmányozására és megértésére irányult, egészséges felnőtt egérben.

2.1 A kinurenin metabolikus útvonal

A kinurenin útvonal nevét az egyik központi anyagcsereterméről, az L-kinureninről (L-KYN) kapta (Botting, 1995). Az L-KYN szintézis a triptofán pirrol gyűrűjének oxidatív lebomlásával kezdődik, amit a triptofán-2,3-dioxigenáz (TDO) és az indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO) enzimek egymástól függetlenül katalizálhatnak. A folyamat eredményeként triptofánból N-formil-L-kinurenin keletkezik, amit a formamidáz enzim alakít tovább L-KYN-né. A TDO-ról sokáig úgy gondolták, hogy kizárólag a májban termelődik, ám jelenlétét később a központi idegrendszerben is igazolták (Kanai és mtsai., 2010). Szerepe különösen az egyedfejlődés korai szakaszában jelentős. A *tdo*^{-/-} egér törzsben ugyanis a hippokampusz rendellenes fejlődése figyelhető meg, amihez felnőtt korra munkamemória romlás és szorongó viselkedés társul (Kanai és mtsai., 2009). A triptofán átalakítását végző másik enzim az IDO, aminek számos izoformája ismert, termelődése pedig leginkább az immunsejtekhez köthető. Megtalálható dendritikus sejtben, monocitában, makrofágban, valamint mikrogliaiban, ami a központi idegrendszer egyedüli reziduális immunsejtje. Az IDO expressziója és aktivitása a gyulladásos folyamatok hatására jelentős mértékben fokozódik. Indukciójában egy proinflammatorikus citokin az interferon- γ (IFN- γ) játszik kulcsszerepet (Campbell és mtsai., 2014). Sejttenyésztési vizsgálatok során kimutatták, hogy IFN- γ hatására IDO termeltethető a mikroglia mellett humán asztrocita (Guillemin és mtsai., 2001), illetve primer idegsejt kultúrában is (Guillemin és mtsai., 2005a). Fiziológiai körülmények között azonban az érett agyszövet TDO és IDO enzim szintjei rendkívül alacsonyak, ezért a kinurenin metabolizmus kezdeti szakasza főként a vesében és a májban zajlik. Az intakt agyban található L-KYN 60%-a a perifériáról, a vér-agy gáton keresztül szállítódik be, és mindössze 40 %-a szintetizálódik lokálisan (Gál és Sherman, 1980). Az L-KYN a vér-agy gáton a nagy affinitású, Na⁺-független, semleges aminosav transzporterek segítségével kerül át (Speciale és mtsai., 1989a). Ez az L1-típusú csatorna szállítja többek között a triptofánt is (Fukui és mtsai., 1991). A kinurenin útvonalon található anyagcseretermékek jelentős része csak passzív diffúzióval, rendkívül alacsony hatékonysággal képes átjutni a vér-agy gáton. Ezért **a központi idegrendszer kinurenin metabolizmusa a perifériás L-KYN koncentráció változására különösen érzékeny.**

Az L-KYN három egymástól független úton metabolizálódhat, aminek eredményeként kinurénsav (KYNA), 3-hidroxi-kinurenin (3-HK), illetve antranilsav (ANA) képződik (1. ábra).



1. ábra. A központi idegrendszer kinurenin metabolizmusa.

A központi idegrendszerben a kinurenin metabolizmus két egymástól jól elkülöníthető ágra osztható. Az útvonal központi anyagcsereterméke az L-kinurenin, amelyből kiindulva KYNA, illetve QUIN keletkezhet. A két átalakulási kaszkád különböző sejttípusokban zajlik, tehát egymástól térben elhatárolt. Az eltérő számú átalakulási lépéseknek köszönhetően pedig jelentős időbeli szegregációt is mutat. A metabolizmusról további részletes magyarázat a 2.1. fejezetben olvasható. 3-HAO, 3-hidroxi-antranilsav 3,4-dioxigenáz; IDO, indolamin-2,3-dioxigenáz; KATs, kinurenin aminosztransferázok; KMO, kinurenin 3-monoxigenáz; TDO, triptofán-2,3-dioxigenáz; QPRTáz, kvinolénsav foszforibozil-transferáz.

A KYNA az L-KYN irreverzibilis transzaminációja során keletkező anyagcsere-végtermék. Ezt az átalakítást a perifériás szervekben többnyire nem specifikus aminoszferáz enzimek végzik (Noguchi és mtsai., 1973; Okuno és mtsai., 1980). A központi idegrendszerben viszont specifikus kinurenin aminoszferáz (KAT) enzimek működésére van szükség. A KAT enzimeknek eddig 4 izoformáját azonosították (Han és mtsai., 2010). Az egyes KAT enzimek expressziója, lokalizációja és aktivitása a különböző emlősfajokban és az egyedfejlődés egyes szakaszaiban eltérő (Baran és Schwarcz, 1993; Fujigaki és mtsai., 1998; Guidetti és mtsai., 2007a). Összességében mégis elmondható, hogy a felnőtt rágcsálók agyában, valamint az emberi agyban a KYNA szintézis kulcsenzime a KAT-2 (Schwarcz, 2016). Egér agy homogenizátumban kimutatták, hogy KAT-2 mellett egy másik enzim a mitokondriális aszpartát aminoszferáz (mitAAT; KAT-4) szintje dominál (Guidetti és mtsai., 2007a). Specifikus enzimblokkolók hiányában ennek *in vivo* szerepét eddig még nem sikerült igazolni. Érdekes felfedezés volt továbbá, hogy *Kat2* géniütiött egerekben a KYNA előállításához szükséges enzimkészlet az ontogenezis során jelentősen átrendeződik. KAT-2 hiány ugyanis felnőtt korra az egyébként alacsony agyi aktivitással rendelkező KAT-1 és KAT-3 enzimek upregulációját eredményezi (Han és mtsai., 2009; Yu és mtsai., 2006). Ez a kompenzációs mechanizmus kiválóan példázza **az agyi KYNA szintézis alapvető fontosságát**.

Az agyi mikroerek 99%-a asztrocita végtalpakkal borított (Iadecola és Nedergaard, 2007). Ez az anatómiai elrendeződés többek között a fiziológias vér-agy gát funkció kialakításáért felelős. Fiziológias körülmények között tehát a vérben keringő L-KYN a perivaszkuláris asztrocitán keresztül fog az agyszövetbe kerülni. A központi idegrendszerben a KYNA termelés fő sejtje az asztrocita (Guidetti és mtsai., 2007b), ugyanis a KAT enzimeken kívül az L-KYN lebontásához szükséges többi enzim hiányzik belőle (Guillemin és mtsai., 2001). Ezért az L-KYN felvételét KYNA szintézis, illetve az L-KYN extracelluláris térbe történő ürítése követi (Guidetti és mtsai., 1995; Speciale és Schwarcz, 1990). Az agyszövetben felhalmozódó L-KYN-t a gliasejtek Na^+ -független, gyors transzporttal, az idegsejtek pedig Na^+ -függő, másodlagosan aktív, lassú transzporttal képesek felvenni (Speciale és mtsai., 1988; Speciale és Schwarcz, 1990). Az asztrocita mellett, sporadikus eloszlású KAT-1-et és KAT-2-t expresszáló neuron populáció mutatható ki a patkány agykéregben, striátumban, hippokampusban, valamint a nyúltvelő területén (Kapoor és mtsai., 1997; Roberts és mtsai., 1992). A neuronális KAT expressziót emberben is igazolták (Guillemin és mtsai., 2007). Kutatócsoportunknak sikerült ezenkívül meghatározni, hogy a KAT-2-t termelő idegsejtek egérben GAD67-immunopozitív interneuronok (Herédi és mtsai., 2016). Figyelembe véve, hogy *in vitro*

a neuronális KYNA szintézis 2,3-szor hatásosabb az asztrocita eredetűhöz képest, továbbá, hogy az idegi KAT működést olyan extrinsic és intrinsic szignálok befolyásolják, mint a glutamát vagy az α -izokaproic sav szintje (Rzeski és mtsai., 2005), ***in vivo* az idegsejtekből felszabadult KYNA jelentős szerepet tölthet be a fiziológiás folyamatok szabályozásában.** Ráadásul IFN- γ hatására mind a neuronális, mind az asztrocita eredetű KYNA szintézis fokozódik (Guillemin és mtsai., 2001, 2007), aminek a gyulladás akut szakaszában lehet szerepe (Campbell és mtsai., 2014; Vécsei és mtsai., 2013).

Az asztrocitában és neuronokban keletkező KYNA sejten belüli raktározása nem ismert. Így az előállítását követően a sejtekből a KYNA egy máig tisztázatlan Ca^{2+} -független transzport mechanizmuson keresztül azonnal felszabadul (Turski és mtsai., 1989). A KYNA visszavétele, illetve további metabolizmusa a központi idegrendszeren belül szintén nem ismert. Ezért az agyi intersticiális térből való eltávolításának egyetlen lehetséges módja, a keringésbe történő kipumpálás, ami probenecid érzékeny nem specifikus szerves sav transzporterekkel keresztül valósul meg (Moroni és mtsai., 1988). A vérből ezt követően a vesetubulusokon található szerves sav transzporterek révén szűrődik ki (Uwai és mtsai., 2012), majd a szervezetből a vizelettel együtt távozik.

Az L-KYN lebontásának másik útvonala, a kinurenin 3-monoxigenáz (KMO) és kinurenináz enzimek termelődésével indul, amik a KAT-okkal versengve, az L-KYN-ből 3-HK-t, illetve ANA-t állítanak elő (Vécsei és mtsai., 2013). Az, hogy *in vivo* az agyban az L-KYN melyik útvonalon metabolizálódik, nagyban függ annak a sejtípusok közötti megoszlásától, valamint az enzimek expressziós szintjétől és kinetikai paramétereitől (Amori és mtsai., 2009; Guillemin és mtsai., 2001, 2007; Lim és mtsai., 2007). Hasonlóan az L-KYN-hez a 3-HK degradációját is több enzim végezheti. A kinurenináz hatására 3-hidroxi-antranilsav (3-HANA), míg az aminosztransferázok működésének eredményeként egy anyagcsere-végtermék, a xanturénsav keletkezik. Ez utóbbi képződése azonban az agyban fiziológiás körülmények között elenyésző (Guidetti és mtsai., 1995). A kinurenináz enzimről szintén elmondható, hogy kifejeződése a perifériás szervekben dominánsabb, ráadásul a 3-HK lényegesen jobb szubsztrátja, mint az L-KYN (Kawai és mtsai., 1988). Ennélfogva az ANA képződés 3-HK jelenlétében erősen korlátozott. Az ANA-ból nem specifikus hidroxiláció következtében 3-HANA jön létre. Érdekes, hogy az emlősök nagy részében az agyi 3-HANA szintéziséhez az ANA sokkal jobb előanyagnak bizonyul, mint a 3-HK. Ezenfelül mindkét progenitorról elmondható, hogy közepes mértékben képes a perifériáról a vér-agy gáton átjutni (Fukui és mtsai., 1991). **Az ANA oldalág szerepe az egyes emlősfajokban rendkívül heterogén.** Patkányban dominál,

emberben közel azonos hatásfokú a 3-HK úttal, **egérben pedig szinte teljesen hiányzik** (Allegrí és mtsai., 2003; Fujigaki és mtsai., 1998). A 3-HANA-t, az agyban relatív nagy feleslegben termelődő 3-hidroxi-antranilsav 3,4-dioxigenáz (3-HAO) enzim azonnal tovább alakítja 2-amino-3-karboximukonik-6-szemialdehiddé (Foster és mtsai., 1986). Az így keletkező anyag azonban instabil, ugyanis nem enzimátikus bomlás következtében spontán átrendeződik kvinolénsavvá (QUIN). Ez az átalakulás a hőmérséklet növekedésével arányosan fokozódik, feleződési ideje pedig a pH⁺-optimum (pH = 6,0) környékén gyors (~20 perc) (Foster és mtsai., 1986). Az átrendeződés mellett lehetőség van még enzimátikus dekarboxilációra, aminek eredményeként pikolinsav keletkezik. Egyébiránt ez a metabolikus oldalág az agyban rendkívül alacsony hatásfokú (Pucci és mtsai., 2007). A NAD⁺ szintéziséhez vezető út egyik utolsó lépése a kvinolénsav foszforibozil-transzferáz (QPRTáz) enzim működéséhez kötött. Hatására QUIN-ból, nikotinsav-mononukleotid jön létre, ami a NAD⁺ egyik közvetlen progenitora. A QPRTáz agyi alap aktivitása azonban rendkívül alacsony, ezért az enzim szintjének szabályozása kulcsfontosságú a NAD⁺ *de novo* előállításában (Braidý és mtsai., 2011; Foster és mtsai., 1985).

A triptofán, QUIN irányába történő lebontása a központi idegrendszerben elsősorban a mikrogliaiban zajlik, jóllehet az útvonalon szereplő egyes enzimek, mint a 3-HAO vagy QPRTáz, megtalálhatók asztrocitában is (Guillemin és mtsai., 2001). Összességében elmondható, hogy fiziológiás körülmények között a QUIN útvonal alap agyi aktivitása alacsony, gyulladáskeltő mediátorok hatására (IFN- γ és a tumor nekrozis faktor- α) viszont lényegesen fokozódhat. Krónikus gyulladással járó neurodegeneratív kórképek során az agyi extracelluláris QUIN szint jelentős mértékben megemelkedik, aminek fő forrása egyrészt az aktiválódott mikroglia, valamint a központi idegrendszerbe behatolt makrofág (Guillemin és mtsai., 2003). Az agyi intersticiális térben felhalmozódó QUIN, a KYNA-hoz hasonlóan probenecid érzékeny szerves sav transzportereken keresztül távozik (Moroni és mtsai., 1984).

Az előzőekből világosan látható, hogy **a központi idegrendszerben a kinurenin metabolikus útvonal két ága különböző sejttípusokhoz kapcsolható, tehát egymástól térben jól elhatárolt folyamat**. Robert Schwarcz munkacsoportja egy elegáns kísérletsorozattal bizonyította, hogy a két kaszkád kulcsenzimeinek (KAT-2; KMO) akut blokkolása patkányban alig befolyásolta a másik útvonalon keletkező anyagcsere-termékek szintjét, pár órás időablakon belül vizsgálva (Amori és mtsai., 2009). Ugyanakkor tartós enzimgátlás során, különböző szájon át adható KMO inhibitorok alkalmazásakor a kinurenin metabolizmus átrendeződése figyelhető meg (Röver és mtsai., 1997; Speciale és mtsai., 1996; Zwilling és mtsai., 2011).

Ekkor először az L-KYN felhalmozódása, majd a KYNA szintézis fokozódása tapasztalható. Hasonló eltolódás jellemző a genetikailag módosított állatokra. Így például *Kmo* génkiütött egérben az agyi KYNA koncentráció szignifikáns mértékű fokozódása látható (Giorgini és mtsai., 2013). Ezenkívül jól ismert, hogy patológiás körülmények között az egyes enzimszintek krónikus megváltozása a kinurenin metabolizmus átrendeződését okozza (Campbell és mtsai., 2014; Schwarcz és mtsai., 2012). Mindent összevetve tehát elmondható, hogy fiziológias körülmények között a kinurenin útvonal két ága egymástól fizikailag elkülönült és független.

A kinurenin útvonal központi anyagcseretermékéből, az L-KYN-ből kiindulva a KYNA illetve a QUIN szintézis az eltérő számú enzimatis átalakulási lépések, valamint az egyes enzimek eltérő kinetikai tulajdonságainak köszönhetően **jelentős időbeli szegregációt is mutat**. A striátumba mikroinfundált, tríciummal jelölt L-KYN-ből, 2 óra elteltével az intakt patkány agyban jelentős mértékű *de novo* szintetizálódott KYNA és 3-HK volt kimutatható, a QUIN elenyésző mértékű változása mellett (Guidetti et al., 1995). Éber patkány agyba infundált L-KYN-t (1mM) követő 4., illetve 7. órában sem lehetett detektálható mennyiségű QUIN-at kimutatni (<20 nM). Ellenben ha az L-KYN-t 3-HANA-ra cserélték, már 4 órával a beadás után dóziszfüggő QUIN-szint fokozódás volt látható (Speciale és mtsai., 1989b).

Összegezve tehát elmondható, hogy **az egészséges felnőtt emlősben a perifériás L-KYN koncentráció növekedésre a központi idegrendszerben a KYNA-szint fokozódás a legprominensebb és leggyorsabb reakció** (Swartz és mtsai., 1990).

2.2 Neuroaktív kinurenin metabolitok tulajdonságai

A kinurenin útvonalon keletkező anyagcseretermékek közül számos rendelkezik neuroaktív tulajdonsággal is. Az értekezésben azokat részletezzük, amik a központi idegrendszert sújtó betegségek kialakulásában, illetve azok gyógyításában szerepet játszhatnak. Így érintjük a szabadgyökképző tulajdonsággal bíró 3-HK-t, tárgyaljuk a pro-oxidatív, görcsrohamokat előidéző, neurotoxikus QUIN-t. Értekezünk továbbá a szélesspektrumú receptormoduláló, antioxidáns és neuroprotektív potenciállal rendelkező KYNA-ról.

2.2.1 A 3-hidroxi-kinurenin (3-HK)

A 3-HK sejtkárosító hatása kizárólag a szabadgyök képzésen keresztül valósul meg, amit részben önmaga, részben bomlásterméke a 3-HANA idéz elő. Autooxidációjuk során hidrogén-peroxid és hidroxil szabadgyököket képeznek. Ez a folyamat azonban csak redox-aktív fémek (Cu, Fe) jelenlétében valósul meg (Goldstein és mtsai., 2000), ezért

fiziológiás körülmények között nincs komolyabb sejtkárosító hatásuk. Ekkor ugyanis a redox-aktív fémek fehérje kötött állapotban vannak. A kinurenin útvonalon gyökfogó tulajdonságú kinureninek is keletkeznek (pld.: xanturénsav, KYNA). Ezek a természetes antioxidáns szubsztrátok mellett képesek redukálni a lipidperoxidációkor képződő peroxi-szabadgyököket (Christen és mtsai., 1990). Szöveti acidózis, gyulladás vagy vírusinfekció során azonban annyira megnőhet az oxidált metabolitok aránya, hogy az már sejtroncsolódáshoz vezet (Campbell és mtsai., 2014).

2.2.2 A kvinolénsav (QUIN)

A kinurenin metabolitok közül elsőnek a QUIN-ról mutatták ki, hogy közvetlenül befolyásolja a központi idegrendszer működését. Az agykamrába fecskendezett QUIN ugyanis görcsrohamokat idézett elő egerekben (Lapin, 1978). Később igazolták, hogy a QUIN a serkentő hatását az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor szelektív stimulálásán keresztül fejt ki, ami NMDA receptor antagonistá jelenlétében teljes mértékben ellensúlyozható (Stone és Perkins, 1981). Jóllehet ez a serkentés viszonylag alacsony hatásfokú ($ED_{50} > 100 \mu M$), és specifikus az NR2A és NR2B alegységeket tartalmazó NMDA receptorokra, amelyek leginkább az előagyban expresszálódnak (Prado De Carvalho és mtsai., 1996). A QUIN excitotoxikus hatása az NMDA receptor túlaktiváláson kívül egyéb mechanizmusokon keresztül is érvényesülhet (Guillemin, 2012). A QUIN ugyanis képes fokozni a glutamát felszabadulását az idegsejtekből és gátolni a visszavételét az asztrocitába. Ismert továbbá, hogy a vas ionnal komplexet alkotva intenzív szabadgyök képződést idéz elő, ami elsősorban a vér-agy gát integritását károsítja. Újabban a QUIN gliotoxikus hatását is leírták (Guillemin és mtsai., 2005b).

2.2.3 A kinurénsav (KYNA)

A KYNA felfedezése a XIX. század közepére nyúlik vissza. A vegyületet elsőként egy német vegyész, Justus von Liebig mutatta ki kutya vizeletéből. A kinurénsav név is innen származik (németül: Kynurensäure), ami tükörfordításban annyit jelent, hogy „sav a kutya vizeletében”. A XX. század elejére már ismerték a molekuláris szerkezetét, nagyvonalakban azonosították a keletkezéséhez vezető metabolikus lépéseket, valamint képesek voltak a mesterséges előállítására (Homer, 1914). Ám egészen a XX. század végéig úgy gondolták, hogy a KYNA csupán a triptofán lebomlása során keletkező biológiailag inaktív végtermék, ami kizárólag a periférián található, ezért különösebb figyelem nem övezte.

Ezt a képet csak az 1980-as évek elején formálták újra, amikor Lapin és munkatársai kimutatták, hogy a QUIN konvulziós tulajdonsággal is rendelkezik (Lapin, 1978). Ez a rendkívüli megfigyelés világított rá arra a tényre, hogy a triptofán lebomlása során keletkező két, addig inertnek vélt endogén bomlástermék, a QUIN és a KYNA képes az állatkísérletek során görcsrohamok előidézésére, illetve megakadályozására az NMDA receptoron kifejtett ellentétes hatásaiknak köszönhetően (Perkins és Stone, 1982, 1985). Ezt a kezdeti felfedezést a kinureninekkel kapcsolatos neurodegenerációs és regenerációs vizsgálatok sora követte. Kimutatták, hogy míg a QUIN fokozza az excitotoxikus idegsejtpusztulás mértékét, addig a KYNA képes mérsékelni azt. Később, amikor jelenlétüket igazolták a központi idegrendszerben rágcsálókban és emberben egyaránt (Moroni és mtsai., 1988), kezdetét vette a neuroaktív hatásaik intenzív feltérképezése. A nyugalmi intersticiális KYNA koncentráció agyi régióként, állatfajonként és korcsoportonként igen eltérő lehet. Összességében azonban elmondható, hogy egészséges felnőtt emlősben az agyi KYNA-szint a nanomoláris tartományba esik (Moroni és mtsai., 1988).

A 2000-es évek elejéig a KYNA egyetlen hatásának az NMDA-receptor gátlást tekintették. Antagonista hatását az NMDA receptor NR1 alegységén található sztrichnin-érzéketlen glicin_B allosztérikus kötőhelyen fejt ki (Birch és mtsai., 1988). Az ionotróp csatorna nyílása glutamát mellett glicin- és D-szerin-függő. A KYNA a glicinnel versengve gátolja annak kötődését a receptor glicin_B kötőhelyére, akadályozva ezzel a csatorna nyílását extracelluláris glutamát jelenlététől függetlenül. *In vitro* kísérletekkel igazolták, hogy a KYNA NMDA receptor antagonistá hatását (IC₅₀: 10 - 450 μM) az extracelluláris glicin koncentráció fokozódás (0 – 30 μM) erősen korlátozza (Hilmas és mtsai., 2001; Kessler és mtsai., 1989; Mok és mtsai., 2009).

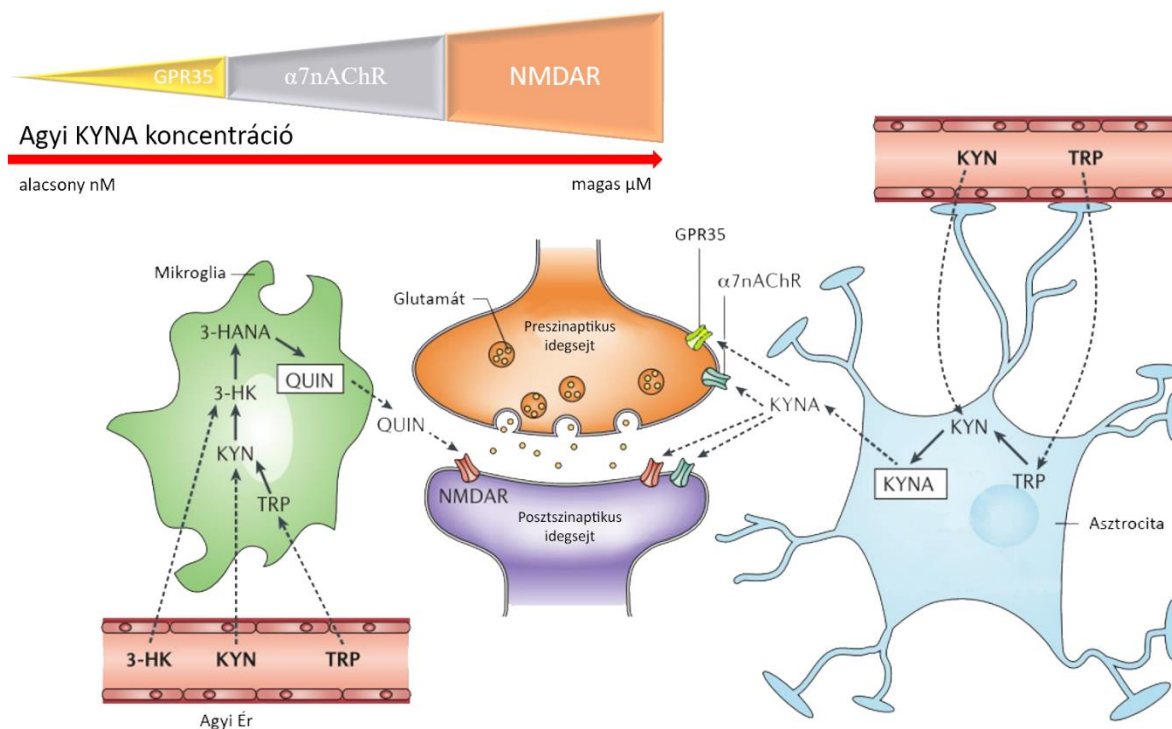
A KYNA szélsőségesen magas koncentrációban (mM) közvetlenül blokkolja az összes ionotróp glutamát receptort. Így az NMDA receptor mellett a kainát és a 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav (AMPA) receptorokon is nem kompetitív antagonistá hatású. Ugyanakkor az AMPA-receptor gátlás csak magas koncentrációnál (mM) valósul meg. Alacsony koncentrációban ugyanis (nM-tól - μM-ig) a receptor működésének potencírozódása figyelhető meg (Prescott és mtsai., 2006), ami a receptor deszenzitizációs idő csökkenésének következménye. A KYNA facilitáló hatását a hippokampusz serkentő posztzinaptikus potenciáljainak vizsgálata során is leírták (Rózsa és mtsai., 2008).

2001-ben a KYNA-közvetített gátlás egy újabb potenciális központi idegrendszeren belüli célpontját azonosították. KYNA a fiziológias koncentrációjához közel nem kompetitív

antagonista hatású az $\alpha 7$ -nikotinos acetilkolin ($\alpha 7$ nACh) receptoron (IC_{50} : 1 -8 μ M) (Hilmas és mtsai., 2001). Az $\alpha 7$ nACh receptort az agykérgi glutamáterg végződések nagy számban expresszálják, ezek gátlásával csökkenthető a preszinaptikus glutamát felszabadulás és a glutamát extracelluláris szintje (Carpenedo és mtsai., 2001). Számos *in vivo* farmakológiai és elektrofiziológiai tanulmány tartja ezt a receptort a KYNA elsődleges endogén célpontjának (Alkondon és mtsai., 2004; Hilmas és mtsai., 2001; Konradsson-Geuken és mtsai., 2010; Notarangelo és Pocivavsek, 2017; Rassoulpour és mtsai., 2005; Wu és mtsai., 2007). Ugyanakkor, olyan *in vitro* eredmények is napvilágot láttak, amelyek erősen kérdésessé teszik a KYNA hatásosságát az $\alpha 7$ nACh receptoron (Dobelis és mtsai., 2012; Mok és mtsai., 2009). A KYNA inhibitoros tulajdonságai rendkívül összetettek, amit többek között olyan körülmények befolyásolnak, mint: a sejt érettségi állapota; az $\alpha 7$ nACh receptor különböző sejtípusok közötti kifejeződése (interneuron vagy piramis sejt); a receptor sejten belüli lokalizációja (dendritikus vagy axonális expresszió); a különféle intracelluláris szabályzó faktorok és receptorasszociált fehérjék jelenléte (Albuquerque és Schwarcz, 2013). Ezek alapján jól látható, hogy a KYNA szintjében bekövetkező fokozódás önmagában nem vetíti előre annak receptorválaszait.

Az ionotróp receptor hatásokon kívül a KYNA endogén ligandja egy metabotróp receptornak, a G_i -fehérje asszociált receptor 35-nek (GPR35). A KYNA affinitása a receptoron igen tág tartományok között mozog (EC_{50} : 0,1-30 μ M) (Wang és mtsai., 2006). A KYNA kötődését követően a sejten belül lecsökken a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP)- és az intracelluláris Ca^{2+} -szint (Moroni és mtsai., 2012). Mind a cAMP, mind az intracelluláris Ca^{2+} rendkívül fontos másodlagos jelátvivő molekula, amin keresztül számos sejtelettani funkció szabályozódik. Így a KYNA a GPR35 aktiválásán keresztül rendkívül heterogén folyamatok modulálásában is részt vehet. A receptor a periférián főként az immunsejteken található, aktiválásával a KYNA gyulladáscsökkentő hatású (Wang és mtsai., 2006). A GPR35 kisebb mennyiségben megtalálható a központi idegrendszerben is. A gerincvelő hátsó szarvában kifejeződő receptorokon a KYNA fájdalomcsillapító hatású (Cosi és mtsai., 2011). Az agyban többek között a hippokampális piramis sejteken és asztrocitán expresszálódik (Alkondon és mtsai., 2015). A KYNA a receptoron keresztül képes csökkenteni a hippokampusz CA3-CA1 régió között a szinaptikus áttevődés hatékonyságát, ezzel pedig befolyásolni az új emlényomok kialakulását és a térbeli tájékozódást (Berlinguer-Palmini és mtsai., 2013). GPR35-öt expresszáló izolált ideg preparátumon kimutatták, hogy a KYNA kötődés gátolta az N-típusú ($Ca_{v2.2}$) Ca^{2+} -csatorna működését (Guo és mtsai., 2008). Ez a feszültségfüggő

Ca²⁺-csatorna jól ismert kulcsmediátor a preszinaptikus neurotranszmitter felszabadulásban (Su és mtsai., 2012).



2. ábra. A QUIN és a KYNA útvonal receptoromoduláló hatásai a központi idegrendszeren belül. Az agyban a KYNA szintézis fő színtere az asztrocita, a QUIN előállításé pedig a mikroglia. A QUIN elsődleges receptorhatásának az NMDA receptor agonizmust tekintik. A KYNA receptoromoduláló hatásai ennél jóval összetettebbek, aminek meghatározó eleme a KYNA lokális koncentrációs szintje. Amíg alacsonyabb koncentrációnál a GPR35 agonizmus és az $\alpha 7nAChR$ antagonizmus jellemző, addig szintjének emelkedésével az NMDA receptor gátló hatás válik dominánssá. A QUIN és a KYNA további hatásairól részletesebb magyarázat a 2.2. fejezetben található. 3-HANA, 3-hidroxi-antranilsav; $\alpha 7nAChR$, $\alpha 7$ nikotinos acetilkolin receptor; GPR35, G-protein asszociált receptor 35; KYN, L-kinurenin; NMDAR, NMDA receptor; TRP, triptofán [(Schwarz és mtsai., 2012) cikk alapján módosítva].

Ráadásul a KYNA endogén ligandja lehet egy helix-loop-helix fehérje családba tartozó transzkripciós faktornak, az aril-hidrokarbon receptornak (AHR) (Moroni és mtsai., 2012). A molekulát, mint xenoszenzort, azaz a környezetből a szervezetbe kerülő policiklikus aromás vegyületek (pld.: dioxinok) elsődleges intracelluláris célpontjaként tartják számon. Az AHR egy sor intracelluláris szignalizációs út aktiválásán keresztül olyan toxikus válaszok kialakításában játszik szerepet, mint a hepatotoxicitás, csökkent termékenység vagy karcinogenezis (Pascussi és mtsai., 2008). A xenobiotikumok okozta toxikus válaszok mediálásán túl egyre elfogadottabb, hogy az AHR-nek a fizioiógias és a gyulladásoos folyamatok szabályozásában is szerepe lehet. A receptorok a KYNA mellett, az L-KYN is potenciális ligandja (Bessede és mtsai., 2014). A receptorhoz való kötődésük a CD4⁺ natív T-sejtek differenciálódást indukálja immunszuppresszív FOXP3⁺ T_{reg}-sejtekké (Mezrich és mtsai., 2010). A periférián kívül az AHR expressziója az agy különböző területein és az agytörzsben is

kimutatható (Petersen és mtsai., 2000). A központi idegrendszerben számos sejttípuson megtalálható, így jelen van endotél sejteken, asztrocitán és neuronokon (Filbrandt és mtsai., 2004). Az agytörzsi kardio-respiratorikus szabályzó központban működését kapcsolatba hozták a szimpatikus idegrendszeri funkciókkal (Sauzeau és mtsai., 2011).

A receptormoduláló hatásai mellett, a KYNA *ex vivo* antioxidáns tulajdonságait korábban már kimutatták (Christen és mtsai., 1990; Lugo-Huitrón és mtsai., 2011). Újabban azonban patkány agy homogenizátumban is sikerült igazolni, hogy dózisfüggő módon csökkenti (10-100 μM) a hidroxil-szabadgyökök által okozott lipidperoxidáció mértékét (Lugo-Huitrón és mtsai., 2011).

2.3. A KYNA szabályzó szerepe az idegrendszer működésében

2.3.1. Szinaptikus jelátvitel befolyásolása

A KYNA az összetett pre- és posztzinaptikus receptorhatásainak köszönhetően jelentős befolyást gyakorol mind a fejlődő, mind a felnőtt idegrendszer szinaptikus jelátvitelének hatékonyságára. Patkány nucleus caudatusba mikrodialízis segítségével bejuttatott KYNA (30-100 nM) dózisfüggő módon csökkentette a glutamát felszabadulást (50-75%), ami részben az $\alpha 7\text{nACh}$ receptoron megvalósuló gátlás következménye (Carpenedo és mtsai., 2001). Patkány prefrontális kéregben az extracelluláris KYNA-koncentráció fokozás az előző kísérlethez hasonlóan a glutamát extracelluláris szintjének csökkenésével párosult. Ez a hatás az $\alpha 7\text{nACh}$ receptor agonista galantamin együttes adagolásával részben ellensúlyozható volt (Alexander és mtsai., 2012). Éber patkány prefrontális kéregében a KYNA-koncentráció két irányú befolyásolása, ellentétes irányú glutamát szignalizációt eredményezett (Konradsson-Geuken és mtsai., 2010). Hasonló jelenséget figyeltek meg a hippokampusban. Intrahippokampális KYNA infúzió dózisfüggő módon csökkentette az extracelluláris glutamát-szintet, míg a szelektív KAT-2 gátlás KYNA-szint csökkenéshez és glutamát-szint fokozódáshoz vezetett (Pocivavsek és mtsai., 2011). A glutamát-szint befolyásolásán kívül a KYNA koncentráció enyhe fokozása hatékonyan mérsékelte az extracelluláris dopamin-szintet mind az altatott (Rassoulpour és mtsai., 2005), mind az éber patkány striátumában (Wu és mtsai., 2007). Ez a hatás szintén függetlennek bizonyult az NMDA receptor működésétől. KAT II génkiütött egerekben pedig a KYNA-szint csökkenés dopamin-szint fokozódással társult (Wu és mtsai., 2007). Ezenkívül patkány prefrontális kéregben kimutatták, hogy már az enyhe KYNA-szint fokozás (100 nM) jelentősen képes mérsékelni az alap, és az amfetaminnal-stimulált acetilkolin felszabadulást. A KYNA keletkezésének megakadályozása pedig emelte az acetilkolin szintet (Zmarowski és mtsai., 2009). Ráadásul a KYNA-szint

mesterséges változtatásával, NMDA receptor független, ellentétes irányú, gamma-amino-vajsav (GABA) szignalizációt figyeltek meg éber patkány prefrontális kéregben (Beggiato és mtsai., 2014).

Az előző példákból világosan látható, hogy **az egyes neurotranszmitterek felszabadulása az agyi KYNA-szint fordított arányú kontrollja alatt áll.** Az egészséges agyszövetben a KYNA mennyiségében bekövetkező ingadozás elsődleges funkcionális következménye a glutamát extracelluláris koncentrációjának csökkenése, illetve növekedése. A többi neurotranszmitter szintjében megfigyelhető fluktuáció minden bizonnyal a megváltozott glutamát koncentráción keresztül létre jövő közvetett hatás (Schwarcz, 2016).

2.3.2. Neuropatológia és neuroprotekción

Számos központi idegrendszert érintő betegség kialakulásában alapvető szerepe van a glutamáterg-tónus fokozódásnak. Az idegsejtek elhúzódó ingerlése ugyanis apoptotikus szignálok felszabadulásához vezet, ami a sejtek programozott halálát okozza. Éppen ezért a glutamát jelátvitel túlműködésének korrigálása kézenfekvő lehetőség a betegségek terápiás kezelése szempontjából. Preklinikai vizsgálatok alapján a **KYNA, mint endogén NMDA receptor antagonist, glutamáterg-szignalizáció mérséklő, immunszuppresszáns és antioxidáns metabolit, ígéretes neuroprotektív anyag a neurotoxicitás számos formájában.** A következőkben különböző példákon keresztül fogjuk megismerni a KYNA-szint változás patofiziológia következményeit, valamint kitérünk a terápiás beavatkozással kapcsolatos kísérletes eredményekre.

2.3.2.1. Ischaemiás stroke

Agyi érelzáródás során az extracelluláris térben a glutamát excitotoxikus mértékű felhalmozódása figyelhető meg. Ez a jelenség az egyik fő okozója a sérülés következtében kialakuló ischaemiás idegsejtpusztulásnak (Brouns és De Deyn, 2009). Az ischaemiás agykárosodás állatkísérletes modelljeiben a KYNA agyi szintjének mesterséges növelése ígéretes neuroprotektív stratégiának mutatkozik. A KYNA azonban a vér-agy gáton csak passzív diffúzióval, rendkívül alacsony hatékonysággal jut át, így perifériás szintjének fokozása az agyi KYNA-koncentrációt alig befolyásolja (Fukui és mtsai., 1991). Ezért **a KYNA központi idegrendszeren belüli terápiás növelése érdekében indirekt farmakológiai megközelítést kell alkalmazni.** Erre az egyik legáltalánosabban használt módszer, amikor a KYNA közvetlen előanyagát az L-KYN-t juttatják a szervezetbe (Vécsei és mtsai., 2013). Számos tanulmány bizonyítja, hogy az L-KYN szisztémás adagolását követően dóziszfüggő

módon emelkedik a központi idegrendszer KYNA-szintje (Guidetti és mtsai., 1995; Schwarcz, 2016; Schwarcz és mtsai., 2012; Schwarcz és Pellicciari, 2002; Swartz és mtsai., 1990; Vécsei és mtsai., 2013). Nagy dózisu (300 mg/ttkg, ip.) egyszeri L-KYN szulfát (L-KYNs) előkezelés jelentős mértékben mérsékelte a fokális ischaemiát követő elsődleges sérülés mértékét és a következményes viselkedészavarok súlyosságát NMRI egér törzsben (Gigler és mtsai., 2007). Patkány globális ischaemia modellben azonos dózisu (300 mg/ttkg, ip.) krónikus (5 nap) L-KYNs elő- és utókezelés probeneciddel együtt szignifikáns mértékben csökkentette a degenerálódott idegsejtek számát (Robotka és mtsai., 2008). Ugyanakkor az L-KYNs kezelés nem minden esetben bizonyult idegvédő hatásúnak. Meglepő módon, amikor az anyagadás a globális ischaemia reperfüzióval egy időben történt, a szöveti sérülés kiterjedése volt megfigyelhető (Gellért és mtsai., 2013). Hasonló szöveti károsodás fokozó hatásról számoltak be NMDA receptor antagonistákkal kapcsolatban, abban az esetben, ha azok hatását közvetlenül a traumás fejsérülés kísérletes kialakítása után vizsgálták (Ikonomidou és mtsai., 2000). Az extraszinaptikus NMDA receptor aktiválás ugyanis olyan intracelluláris Ca^{2+} -függő jelátviteli utakat indíthat el, amelyeknek fontos szerepe van a sejt túlélése szempontjából. Éppen ezért az NMDA receptor túlzott gátlása éppúgy káros, mint a receptor túlműködése (Hardingham és Bading, 2010). Ez a példa remekül mutatja, hogy egy terápiás beavatkozás pozitív kimenetele szempontjából különös tekintettel kell lenni **a megfelelő dózis és időzítés megválasztására**. Ennek elengedhetetlen feltétele, hogy alaposan ismerjük a kezelés sejtszintű hatásait.

2.3.2.2. *Huntington-kór*

A neurodegeneratív Huntington-kór patomechanizmusában központi szerepe van a neostriális neuronpopuláció NMDA-receptor által közvetített krónikus excitotoxikus pusztulásának (Morigaki és Goto, 2017). Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a kinurenin metabolizmus felborulása alapvetően hozzájárul a betegség kialakulásához. Huntington-kór korai stádiumban lévő betegeknél a 3-HK és a QUIN koncentráció fokozódása mutatható ki a cerebrospinális folyadékban és az agy számos területén, legnagyobb mértékben a neostriátumban (Guidetti és mtsai., 2004). Striátumba injektált QUIN, a betegség korai fázisára jellemző anatómiai és viselkedési elváltozásokat idézett elő egészséges felnőtt patkányokban (Shear és mtsai., 1998). Az előrehaladott stádiumban lévő betegek patológiai vizsgálatai rávilágítottak, hogy számos agyi régióban károsodik a KYNA *de novo* szintézis, ami a KYNA-koncentráció jelentős mértékű csökkenéséhez vezet (Beal és mtsai., 1990, 1992). Preklinikai tanulmányok során az agyi KYNA-szint farmakológiai növelése idegvédő hatásúnak bizonyult a betegség

állatkísérletes modelljeiben. Így a KMO és a kinurenináz enzimek mesterséges gátlása (Harris és mtsai., 1998), az L-KYN és a probenecid együttes adagolása (Santamaria és mtsai., 1996), valamint a mesterséges vér-agy gát permeábilis KYNA származék (4-kloro-kinurénsav) adása (Guidetti és mtsai., 2000), külön-külön szignifikáns mértékben mérsékelte a QUIN-val-, illetve malonáttal-előidézett striatális excitotoxikus lézió méretét. Ebbe a sorba illeszkedő megfigyelés, hogy a Huntington-kór egyik transzgenikus egérmodelljén számos vonatkozásban protektívnek bizonyult a KYNA egyik analógja, jelentősen megnövelve ezen KYNA analóggal kezelt transzgenikus egerek élettartamát is (Zádori és mtsai., 2011).

2.3.2.3. Migrén

Annak ellenére, hogy a migrén kialakulásának patomechanizmusa a mai napig nem ismert pontosan, általánosan elfogadott, hogy indukciójában a trigeminovaszkuláris rendszer aktivációja és szenzitizációja kulcsszerepet játszik. A trigeminális nocicepció a glutamát jelátvitel működéséhez szorosan kötődik. Migrén során a glutamáterg neurotranszmisszió fokozódása, valamint a háromosztatú ideg ophthalmicus ágának megnövekedett aktivitása figyelhető meg. Nem meglepő tehát, hogy a migrén állatkísérletes modelljeiben a KYNA-szint emelés antinociceptív hatású. Patkányban L-KYNs és probenecid kombinált kezelés szignifikáns mértékben csökkentette a kaudális trigeminális magcsoportban található másodrendű szenzoros neuronok aktivitását, különböző kísérletes migrén modellekben (Knyihár-Csillik és mtsai., 2007a, 2007b; Vámos és mtsai., 2009). A háromosztatú ideg gerincvelői magjának gátlásával ugyanis mérséklődhet, illetve teljes mértékben meg is szűnhet a fájdalom ingerek továbbítódása a magasabb idegrendszeri központok felé.

A kinurenin metabolizmus kóros megváltozását más, a központi idegrendszert érintő súlyos betegség során is kimutatták. Így többek között leírták Parkinson-kór, szklerózis multiplex és epilepszia során. Ezen kórképek állatkísérletes modelljeiben az agyi KYNA koncentráció mesterséges fokozása, eltérő hatékonysággal ugyan, de ellensúlyozta a tünetek kialakulását, illetve súlyosbodását (Schwarcz és mtsai., 2012; Vécsei és mtsai., 2013). Ezek alapján akár ki is jelenthetnénk, hogy a KYNA a szervezeten belül termelődő, multifaktoriális idegvédő anyag, aminek mesterséges növelése jótékony hatású a különböző neurodegeneratív kórképek kezelésében. Az összkép azonban ennél természetesen jóval összetettebb.

2.3.2.4. Skizofrénia

Évtizedekkel a magas glutamát szint neurotoxikus és konvulzív tulajdonságainak kimutatását követően bebizonyosodott, hogy a glutamát jelátvitel alulműködése éppúgy káros, mint annak

tülműködése (Coyle és mtsai., 2003). Skizofréniával kapcsolatos legelfogadottabb nézet alapján a betegségre jellemző központi tünetek kialakulásában [kognitív diszfunkció (figyelemzavar, munkamemória romlás, dekoncentráltóság); pozitív tünetek (képzeltetés, téveszmék); negatív tünetek (anhedónia, alogia)] az NMDA receptorok alulműködésének alapvető jelentősége van (Coyle és mtsai., 2003). NMDA receptor blokkolók (fenciklidin, ketamin) hatására egészséges felnőtt emberekben a betegségre jellemző tünetek idézhetőek elő, míg skizofrén betegekben a meglévő tünetek súlyosbodása váltható ki (Coyle, 2012). A csökkent NMDA receptorfunkció mellett a dopamin-, az acetilkolin-, a glutamát- és a GABA neurotranszmisszió zavara is hozzájárul e komplex neuropszichiátriai kórkép kialakításához. A betegekben mindeközben a KYNA jelentős mértékű felhalmozódása figyelhető meg az agy-gerincvelő folyadékban és *post-mortem* a prefrontális kéregben (Erhardt és mtsai., 2001; Schwarcz és mtsai., 2001). A KYNA receptorszintű hatásainak ismerete alapján joggal feltételezhető, hogy a kinurenin metabolizmus felborulásának, és a fokozott KYNA termelésnek közvetlen szerepe van a skizofrénia során kialakuló neuropszichológiai tünetek megjelenésében és progressziójában. Az agyi KYNA-szint akut, illetve krónikus fokozódását vizsgáló állatkísérletes eredmények ezt tovább erősítik. Skizofréniára jellemző viselkedészavarok mutatkoznak KYNA túltermeltetett állatokban (Wonodi és Schwarcz, 2010). Patkányban már egyszeri mérsékelt dózisú L-KYN (100 mg/ttkg, ip) kezelés átmeneti teljesítményromlást eredményezett a térbeli tájékozódásban és a munkamemóriában (Chess és mtsai., 2007). Ezenkívül a kezelés nehezítette az állatok kontextus-függő tanulási képességeit (Chess és mtsai., 2009). Az agyi KYNA-szint mesterséges növelése vizuális (Chess és Bucci, 2006), illetve auditoros (Shepard és mtsai., 2003) figyelemzavart okozott éber és altatott patkányban. Az érett, felnőtt idegrendszeren kifejtett akut hatásokon túl érdekesek a KYNA fejlődő idegrendszerre gyakorolt hosszú távú hatásai. Egy friss tanulmány alapján a felnőtt korban manifesztálódó skizofrénia nagy valószínűséggel vezethető vissza az ontogenezis korai szakaszában bekövetkező kinurenin metabolizmus zavarra (Notarangelo és Pocivavsek, 2017). Prenatális krónikus L-KYN adagolás abnormálisan magas KYNA-szintet eredményezett a felnőtt korú állatok hippokampuszában, ami a térbeli tájékozódás és tanulás zavarával társult (Pocivavsek és mtsai., 2014). A gesztáció kései szakaszában KMO gátlással (Ro 61-8084) mesterségesen megnövelt agyi KYNA-szint a felnőtt (60 napos) egyedekben szignifikáns mértékben csökkentette a hippokampusz CA1 régióban a GluN2A alegységet tartalmazó NMDA receptorok számát, valamint gyengítette a hippokampális szinaptikus plaszticitást (Forrest és mtsai., 2013). Posztnatális krónikus L-KYN expozíció a felnőtt korú egerekben (Liu és mtsai., 2014) és patkányokban (Iaccarino és mtsai., 2013) skizofréniára jellemző kóros

viselkedés kialakulását idézte elő. A skizofrénia mellett más neuropszichiátriai kórkép (pld.: Alzheimer kór, depresszió) során is leírták, hogy a kognitív diszfunkciós tünetek kialakításában és progressziójában szerepe lehet a kinurenin metabolizmus egyensúly felborulásának és a KYNA-szintben bekövetkező fluktuációnak (Baran és mtsai., 1999; Schwarcz és mtsai., 2012).

Amíg a KYNA-szint növelés a glutamáterg hipofunkcióval és a kolinerg-rendszer zavarával magyarázható rövid, illetve hosszú távú viselkedési rendellenességeket idéz elő, addig a KYNA-szint mérséklés a különböző kognitív funkciók fellendülését eredményezi (Schwarcz, 2016). *Kat2* génkiütött fiatal egerekben jelentősen csökkent az agyi KYNA szint, ami a korábban ismertetett glutamát jelátvitel fokozódással, valamint kognitív teljesítményjavulással társult (Potter és mtsai., 2010). Az egerek eredményesebben hajtották végre a térbeli tájékozódás és memória vizsgálatára alkalmas teszteket, mint az azonos korú vad típusú társaik. A KYNA manipuláció kognitív hatásainak mélyebb tanulmányozása során Robert Schwarcz és kutatócsoportja remekül szemléltette, hogy a KYNA-szint kétirányú változtatása miként befolyásolja (javítja vagy rontja) a hippocampusz-függő térbeli tájékozódást és tanulást (Pocivavsek és mtsai., 2011). A KYNA-szint növelés ugyanis rontotta a patkányok navigálásának képességét a Morris-féle vízi labirintusban, aminek következtében nehezebben találták meg a menekülést jelentő platformot. Ezzel szemben, a KAT-2 gátlóval (ESBA) kezelt állatok lényegesen rövidebb idő alatt fedezték fel a kiutat a vízi útvesztőből (Pocivavsek és mtsai., 2011). Ezt a prokognitív hatást később egy orálisan adható vér-agy gát permeábilis KAT-2 gátlóval (BFF-816) is sikerült reprodukálni (Wu és mtsai., 2014). Egy másik, szintén szájon át adható vér-agy gát permeábilis KAT-2 inhibitorral (PF-04859989) pedig sikeresen mérsékeltek a mesterségesen előidézett skizofréniára jellemző pszichotikus tünetek súlyosságát patkányokban és rhesus makákókban (Kozak és mtsai., 2014). A KAT enzimek tranziens csökkentése tehát ígéretes terápia lehetőségnek mutatkozik a skizofrénia és más pszichiátriai kórkép során jelentkező mentális hanyatlás kezelésében.

Az előzőekben láthattuk tehát, hogy az agyi KYNA-szintben bekövetkező ingadozás, rendkívül heterogén módon, több szinten képes befolyásolni az idegrendszer és akár az egész szervezet működését. Számos neurodegeneratív betegség során megfigyelhető a kinurenin metabolizmus egyensúlyának felborulása, és az egyes kinurenin metabolitok koncentrációjának különböző mértékű eltolódása. Ennélfogva az egyes betegségek eltérő terápia megközelítést igényelnek. Amíg az egyik esetben a KYNA-szint fokozás, addig máskor ennek ellenkezője, a KYNA-szint csökkentés hatásos. Ugyanakkor egyik esetben sem szabad megfeledkezni a KYNA-szint mesterséges változtatásával járó nem kívánatos mellékhatások megjelenéséről. Láthattuk, hogy

a KYNA-szint fokozás, ami alapvetően ígéretes intervenciónak tűnik a neurotoxicitás számos formájában, intakt állatokban a szellemi teljesítőképesség átmeneti leromlását okozta, szélsőséges esetekben pedig skizofréniára jellemző tüneteket idézett elő. A KYNA termelődésének gátlása, az általános prokognitív hatás mellett, sérülékennyé teszi az idegszövetet az excitotoxicitás, a konvulzió, valamint a gyulladással szemben (Campbell és mtsai., 2014; Sapko és mtsai., 2006). Éppen ezért a humán terápiás eljárások kidolgozása során különösen fontos szem előtt tartani a kinurenin metabolizmus egyensúlyának finom eltolódásával járó sejtszintű és szervezetszintű következményeket. Ezzel megcélozva egy olyan optimális terápiát, ahol megfelelő egyensúly alakítható ki a pozitív hatások és az esetleges nemkívánatos mellékhatások között. Ehhez elengedhetetlen a KYNA túl-, illetve alultermelés rövid és hosszú távú biokémiai, neuropatológiai és viselkedési hatásainak alapos ismerete. Az irodalomban a KYNA túltermelés receptorszintű és sejtszintű hatásaival számos tanulmány foglalkozik, ugyanakkor az intakt, felnőtt idegrendszerre gyakorolt szervezetszintű, viselkedésben megnyilvánuló hatásokkal kevés. Nincs az anyaggal kapcsolatos átfogó, dózis-hatás tanulmány, amely alapján lehetőség nyílna elkülöníteni: küszöb alatti, küszöb feletti, illetve szélsőséges hatásokat. Nem tudjuk továbbá azt sem, hogy egy bizonyos viselkedésváltozás a KYNA-szint növekedésével milyen arányban változik. Ezen kívül, hiányosak az ismereteink az anyaghatás időbeli vonatkozásaival kapcsolatban. A klinikai kísérletezés egyik rohamosan fejlődő új iránya a kondicionális géntűtött egér törzsekkel való vizsgálódás. A korai megnyilvánulás vagy korai génhány sok esetben káros. A szervezet gyakorta kompenzál, így egy gén hiányát más, hasonló funkcióval bíró gének veszik át. Egy gén sok szövet- és sejtfeleségben nyilvánulhat meg, az általános géntűtés pedig elfedheti a specifikus működést. Az indukálható promoterek használatakor azonban a transzgén expresszió szabályozása a vizsgálni kívánt életkorban viszonylag kevés mellékhatás nélkül jól alkalmazható. Segítségükkel a kinurenin metabolizmus sejt-specifikus átmeneti manipulálásának közvetlen hatásai is jól vizsgálhatóvá válnának. Ennek eredményeként a KYNA szintet az agyban úgy lehetne befolyásolni, hogy közben a többi metabolit szintjében nem történne változás. A C57Bl/6 egér törzs a genetikai módosításokhoz használt legelterjedtebb egértípus. Ugyanakkor **a natív C57Bl/6 törzsben a KYNA-szint fokozás akut hatásaival kapcsolatban egyelőre semmilyen adat nem áll rendelkezésre.** Éppen ezért égető szükség lenne az egér törzssel kapcsolatos akut hatások karakterizálására, amelyek később megfelelő viszonyítási alapot nyújthatnának a fókuszált génmanipulációs kísérletekhez.

2.4 Kinureninek szerepe a vérkeringés szabályozásában

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. Az agytörzs rosztro-ventrális, valamint a kaudálisabban található nucleus tractus solitarii magcsoportokban KAT-ot expresszáló idegsejtek mutathatók ki azokon a területeken, amelyekről ismert, hogy a vérnyomás szabályozásában az NMDA receptorokon keresztül részt vesznek (Kapoor és mtsai., 1997). Egy spontán magas vérnyomást mutató patkány törzsben a fokozott szimpatikus tónus és a hipertónia kialakulása kapcsolatba hozható a *Kat-1* gén missense mutációjával (Kwok és mtsai., 2002), valamint az agytörzs csökkent KYNA-szintjével (Kapoor és mtsai., 1994). Az AHR, amelynek a KYNA és az L-KYN is endogén ligandja, megtalálható a nyúltvelő ventro-laterális magcsoportjaiban. Az *AHR*^{-/-} egér törzsben az agytörzsi szív- és légzőrendszeri szabályzó központok fokozott glutamát érzékenysége és rendellenes működése figyelhető meg, amihez kísérőtünetként hipertónia, hiperventilláció és tachikardia társul (Sauzeau és mtsai., 2011). Egy összetett kísérletsorozattal kimutatták, hogy a szisztémás gyulladás (szepszis) során jelentkező hipotenzio kialakulásáért részben az érendotélből nagy mennyiségben felszabaduló L-KYN tehető felelőssé (Wang és mtsai., 2010). L-KYN az érfalsimaizom-lazító hatását a nitrogén-monoxidhoz (NO) hasonlóan a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP)-függő útvonalon keresztül fejti ki. Azzal a különbséggel, hogy az L-KYN a szolubilis guanil-cikláz (sGC) redukált és oxidált formáját egyaránt aktiválja, összességében viszont fele olyan hatékonysággal, mint az NO. Ebből kifolyólag úgy gondolják, hogy az L-KYN jelátvitelnek akkor van jelentősége, amikor az oxidatív stressz következtében az sGC többnyire oxidált formában van jelen, és az NO már nem képes kifejteni hatását (Stasch és mtsai., 2006). Ez magyarázattal szolgálhat arra, hogy az intravénás L-KYN infundálás miért csak a spontán hipertenz patkányokban csökkentette az artériás középvérnyomást (Wang és mtsai., 2010). A perifériás hatásokon túl az L-KYN, vagy a KYNA az agyi keringés szabályozásában is részt vehet. Egyrészt a KAT pozitív perivaszkuláris asztrociták és interneuronok kiváló anatómiai pozícióban helyezkednek el az agyban ahhoz, hogy részt vegyenek a lokális vérátáramlás szabályozásában (Guidetti és mtsai., 2007b; Herédi és mtsai., 2016). Másrészt éber nyúlban az alacsony dózisu (1 mg/ttkg) intravénás L-KYN infúziót agyi-vérátáramlás fokozódás követte, ami kolinerg- és NO-függő jelátviteli utakon keresztül valósult meg (Sas és mtsai., 2003). Ezenkívül régióspecifikus agyi-vérátáramlás csökkenések figyelhetők meg skizofrén betegeknél akut pszichózis folyamán (Liddle és mtsai., 1992; Mathew és mtsai., 1982),

miközben ismeretes, hogy a betegség során az agyi KYNA-szint rendkívüli mértékben megemelkedik (Schwarcz és mtsai., 2001).

Ezek alapján joggal merülhet fel a kérdés, **hogy az akut szisztémás L-KYN-koncentráció fokozódás befolyásolja-e bármilyen szinten az egészséges felnőtt szervezet vérnyomását, illetve agykérgi vérátáramlását.**

3. Célkitűzések

Az értekezés alapját képező kísérletes munka három feladat köré csoportosul. Ezek során a következő kérdésekre keressük a választ, intakt C57Bl/6j egérben:

- a) A perifériás L-KYNs adagolás, hogyan befolyásolja a motoros, a szorongással kapcsolatos, és a memória funkciókat? (célkitűzések 1-3)
- b) Az L-KYNs kezelés okoz-e szövettani módszerrel megjeleníthető változást az idegsejtek működésében? (célkitűzések 4)
- c) Az L-KYNs kezelés befolyásolja-e a szisztémás keringést, illetve az agykérgi vérátáramlást? (célkitűzések 5)

Célkitűzés 1:

Nyílt porond teszttel meghatározzuk az egyszeri szisztémás L-KYNs kezelés hatásait az intakt C57Bl/6 egerek lokomotoros explorációs aktivitására. Ezenfelül megállapítjuk, hogy a különböző dóziszú L-KYNs kezelés és a viselkedési hatások között milyen kapcsolat áll fenn.

Célkitűzés 2:

Új tárgy felismerés teszttel megvizsgáljuk, hogy az egyszeri szisztémás L-KYNs kezelés, milyen hatást gyakorol az egészséges C57Bl/6 egerek tanulással és epizodikus memória funkcióival kapcsolatos viselkedésére. Leírjuk továbbá a különböző koncentrációjú L-KYNs kezelés és a memória teljesítmény közötti kapcsolatot.

Célkitűzés 3:

Emelt keresztpalló teszttel meghatározzuk, hogy az egyszeri szisztémás L-KYNs kezelés, hogyan befolyásolja az intakt C57Bl/6 egerek szorongással kapcsolatos viselkedését. Definiáljuk a kapcsolatot az L-KYNs-dózis és a szorongással összefüggő viselkedési hatások között.

Célkitűzés 4:

Immunhisztokémiai módszer segítségével kimutatjuk az akut L-KYNs kezelés idegszövetre gyakorolt hatásait, a c-Fos expresszió változásának nyomon követésén keresztül. Azokat az agyterületeket vizsgálva, amik a viselkedésvizsgálatokkal szoros összefüggésbe hozhatók.

Célkitűzés 5:

Felmérjük az egyszeri L-KYNs kezelés befolyását a szisztémás artériás középvérnyomásra. Megvizsgáljuk továbbá, hogy a kezelés hatással van-e az agykéreg, azon belül is a szomatoszenzoros kérgi terület vérátáramlására.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Felhasznált állatok

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. Az állatoknak fordított ciklusú 12-12 órás sötét, illetve világos periódust és 23 ± 1 °C-os hőmérsékletet biztosítottunk, korlátlan hozzáféréssel ivóvízhez és táplálékhoz (CRLT6N rágsálótáp). 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.

4.2 Magatartás vizsgálat

A magatartás vizsgálatokat külön erre a célra kialakított hangszigetelt helyiségben végeztük. A vizsgáló szobában önálló levegőztető rendszer és légkondicionáló berendezés működött, ami külső szagoktól mentes, stabil 23 °C-os levegőt biztosított. A helyiségben szabályozható volt a fény erőssége, amin a kísérleteknek megfelelően változtattunk. A tesztek színes CCD kamera (Sony, SSC-DC378P) segítségével rögzítettük, ami egy másik szobában elhelyezett számítógéphez volt kapcsolva. A mérések során a kísérletező szobában az állatokon kívül nem tartózkodott senki. A felvételeket számítógépen tároltuk és speciális szoftver segítségével (SMART[®]; Panlab Harvard Apparatus), vagy manuálisan elemeztük. A kézi kiértékeléseket, a kísérleti protokollt nem ismerő, független kísérletezők segítették. Az egyes mérések között a magatartás vizsgálati eszközöket 50%-os etanol oldattal áttörültük, hogy megszüntessük a szagnyomokat. A magatartás tesztek megkezdése előtti hetekben az egereket kézhez szoktattuk, csökkentve ezzel a mozgatással és felemeléssel járó stresszt.

A kísérleti csoportokat a kezeléseknek megfelelően alakítottuk, amihez az egereket véletlenszerűen válogattuk. Egy állatot csak egyszer használtunk, a kísérlet végeztével pedig, az állatokat az etikai szabályoknak megfelelően uretánnal (3 g/ttkg, i.p.) túlaltattuk (IACUC staff). A tesztek során az egereket különböző dózisu (25 mg/ttkg, 50 mg/ttkg, 100 mg/ttkg, 200 mg/ttkg, 300 mg/ttkg) L-KYNs-tal [amit 5%-os NaOH-ban oldottunk fel, majd kiegészítettünk

0,1 M foszfát pufferrel (PB) 0,2 ml végtérfogatra; pH 7,4] vagy a kontroll méréseknél az L-KYNs vivőanyagával (0,1 M PB; pH 7,4) fecskendeztük. Kísérleteink során az L-KYNs akut hatását vizsgáltuk, ezért az állatokat egyszer injektáltuk két órával a vizsgálatok megkezdése előtt. Minden állatcsoportnál ugyanakkora térfogatú oldatot használtunk (0,2 ml), amit intraperitonealisan (i.p.) adtunk be. A kísérletekhez a Sigma-Aldrich-től szereztük be (St. Louis, MO, USA) a szükséges anyagokat.

4.2.1 Nyílt porond (OF) teszt

Az OF egy négy oldalról zárt, felülről nyitott doboz (50 x 50 x 50 cm), melynek alját és falait sötétszürke, szálcsiszolt plexilapok alkották (3. ábra). A kísérletező szobában a megvilágítást úgy szabályoztuk, hogy az apparátust egyenletes szórt fény érje (~150 lx).



3. ábra. A nyílt porond (OF) teszthez használt kísérleti doboz.

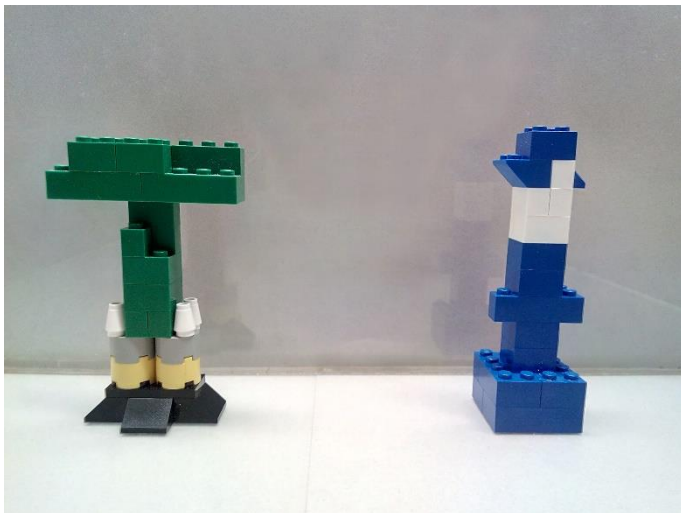
A kísérletben összesen 10 csoportot ($n = 9 - 10$ egér/csoport) képeztünk. Öt csoportot különböző dózisu L-KYNs-tal (25 mg/ttkg, 50 mg/ttkg, 100 mg/ttkg, 200 mg/ttkg, 300 mg/ttkg) fecskendeztük. Mindegyik kezelt állatcsoporthoz tartozott egy-egy kontrollcsoport. Erre azért volt szükség, mert két kezelt csoport vizsgálata között alkalmanként több hónap is eltelt. Ebből kifolyólag mindegyik kezelt csoportot az azonos napon vizsgált kontrollcsoporthoz tudunk viszonyítani úgy, hogy a kísérlet során a kezelt, és a kontroll állatok felváltva kerültek az OF dobozba.

Az egereket az OF egyik fala elé helyeztük, majd az állatok az apparátusban 8 percig szabadon mozoghattak. A mozgásukat egy speciális szoftverrel (SMART[®]; Panlab Harvard Apparatus)

elemeztük. Ennek segítségével vizsgálni tudtuk: az állatok által megtett út hosszát (cm); az immobilitás idejét (s), valamint a sebességüket (cm/s).

4.2.2 Új tárgy felismerés (NOR) teszt

Az NOR tesztet az OF-hez használt dobozban végeztük, melybe két LEGO® építőkockából készített (4. ábra) egyedi tárgyat helyeztünk egymással szembe a fal közepétől 7 cm távolságra. A 7 cm-magas tárgyakat Blue-Tack segítségével a talajhoz rögzítettük. Az egyedi tárgyak kialakításánál fontos szempont volt, hogy azok kellően különbözőek legyenek egymástól, ugyanakkor egyik forma se okozzon az állatokban averzív viselkedést (Dere és mtsai., 2007). Ennek érdekében a tárgyakat előzetes kísérletek alapján szelektáltuk. A kísérleti szobában a megvilágítást úgy szabályoztuk, hogy az apparátus alját egyenletes szórt fény érje (50 lx).



4. ábra. Az új tárgy felismerés (NOR) teszthez használt LEGO építőkockákból készített tárgyak.

A kísérlet során 4 csoportot ($n = 10 - 12$ egér/csoport) képeztünk. Egy kontroll, és három L-KYNs-tal (25mg/ttkg, 100mg/ttkg, 300mg/ttkg) kezelt csoportot vizsgáltunk. A kísérletsorozatot öt egymást követő napon végeztük, egy csoporttal két napig dolgoztunk. A 25 mg/ttkg-mal kezelt csoporttal kezdtünk, majd a kontroll, a 100 mg/ttkg és a 300 mg/ttkg-mal kezelt csoportok következtek. Az egereket a második napon a „minta szakasz” előtt két órával fecskendeztük.

A teszt összesen három részből állt. Először véletlenszerű sorrendben, egyesével az *üres* OF dobozba helyeztük az egereket, ahol 5 percig szabadon mozoghattak (habituációs szakasz). A következő napon (24 óra múlva) az állatokat 4 percre ismét beletettük az OF-be (minta szakasz), ahova immár két identikus tárgyat (A és A') is elhelyeztünk. Két óra elteltével 4 percre visszahelyeztük az állatokat a dobozba (felismerési szakasz), ahol az egyik tárgyat (A1) kicseréltük egy új, az állatok számára ismeretlen tárgyra (B). Tárgy felfedezésnek

(explorációnak) tekintettük, amikor az egér fejével a tárgy felé fordulva, annak 2 cm-es sugarú körén belül tartózkodott. Az explorációs időt stopperóra segítségével mértük.

Az új tárgy felismerési teljesítmény vizsgálatára a Winters és munkatársai által bevezetett mérőszámot, az ún. „diszkriminációs rátát” (Discrimination Rate; Winters, Saksida, & Bussey, 2008) alkalmaztuk. Ezt alapul véve alkottunk egy saját formulát, amit Diszkriminációs Indexnek (DI) neveztünk (DI) (Varga és mtsai., 2015), és a következőképp számoltuk:

$$DI = \text{új tárgy} \times 100\% / (\text{új tárgy} + \text{ismerős tárgy})$$

A fenti képletben az „új tárgy”, a „B” tárgy felfedezésének idejét, az „ismerős tárgy” pedig, az „A” tárgy felfedezésének idejét jelöli. Az így számítható százalékos érték azt jelzi, hogy az állatok mennyi időt töltöttek az új tárgy (B) feltérképezésével a tárgyakkal töltött teljes időhöz képest (A+B). Ha a felismerési szakasz során ez az érték 55%-nál magasabb, akkor az állatok több időt töltöttek az új tárgy (B) felfedezésével, tehát különbséget tettek a korábban látott ismerős tárgy (A) és az előtte még nem látott ismeretlen (B) között. Ha az érték $50 \pm 5\%$, akkor hasonló időt töltöttek mindkét tárgy felfedezésével, tehát nem tettek különbséget a tárgyak között. Ha viszont 45 %-nál kisebb, akkor vagy nem tettek különbséget a tárgyak között, vagy az új tárgy az előzetes szelekció ellenére is szorongást váltott ki az állatokból, ezért azt elkerülték. Ebben az esetben az eredményt pusztán memóriefunkció romlásával magyarázni helytelen lenne. Ezért az ilyen eseteket – ha voltak – kihagytuk a mérésekből. További kritérium volt, hogy az állatok a minta szakasz során legalább 15 mp-et foglalkozzanak a két tárggyal összesen. Amennyiben ez a feltétel nem teljesült, akkor azt az állatot a motiváció hiánya miatt kizártuk a mérésből (Dere és mtsai., 2007; Winters és mtsai., 2008).

A csoportok közötti különbségek egyszerű összehasonlíthatósága kedvéért a minta és a felismerési szakaszra kifejezett DI-kból, minden állatra kiszámoltunk egy normált értéket, amit Diszkriminációs Teljesítménynek neveztünk (DI_x) és a következőképp számoltuk:

$$DI_x = DI_{\text{felismerési szakasz}} / DI_{\text{minta szakasz}}$$

Az így kapott értékek tehát azt mutatják, hogy az állatok tárgyfelismerési teljesítménye a minta szakaszhoz képest, a felismerési szakaszra hogy változott. Az 1-nél nagyobb értékek a teljesítmény potenciózódását, 1-el megegyező értékek változatlan teljesítményt, az 1-nél kisebb pedig a teljesítmény romlását jelöli.

4.2.3 Emelt keresztpalló (EPM) teszt

Az EPM négy azonos méretű (10 cm x 30 cm), derékszögben keresztezett zárt és nyitott folyosókat tartalmazó apparátus, ami egy 60 cm-magas talapzaton helyezkedett el (5. ábra). A két zárt folyosó 15 cm-magas falakkal körbevett alacsony megvilágítású terület (20 lx), a két nyitott folyosó falak nélküli erősen megvilágított (110 lx) terület. Az azonos típusú karok egymással szemben találhatók.

5. ábra. Az emelt keresztpalló (EPM) teszthez használt kísérleti eszköz.



A teszt során 4 csoportot ($n = 10 - 12$ egér/csoport) képeztünk, melyeket azonos napon vizsgáltunk. Így egy kontroll és három L-KYNs-tal kezelt (25 mg/ttkg, 100 mg/ttkg, 300 mg/ttkg) csoporttal dolgoztunk. A kontroll és a kezelt állatokat vegyesen, véletlenszerű sorrendben tettük az apparátusra egyesével.

Az egereket a folyosók keresztezési pontjára helyeztük középre, ahol 5 percig szabadon mozoghattak. Mértük a zárt, és a nyitott karokban eltöltött idő mennyiségét. Számoltuk a különböző folyosókra való belépéseket. Belépésnek tekintettük, amikor az állat teljes testével, azaz mind a négy lábával az adott karon tartózkodott.

4.3 Szövetteni vizsgálat

A szövetteni vizsgálatához 2 csoportot (n = 10/csoport) képeztünk. Az állatok a kézhez szoktatáson ugyan átestek, viszont magatartás vizsgálaton nem vettek részt. Az egyik csoportot 300 mg/ttkg L-KYNs-tal, a másikat 0,1 M PB-vel (kontroll) fecskendeztünk i.p., 3 órával a transzkardiális perfúzió előtt. Az idegsejtekben a c-Fos fehérje kifejeződés maximuma a különböző neuromodulációs befolyást követő 30. – 90. percben mérhető (Kaczmarek, 2002). A pillanatnyi c-Fos kifejeződés tehát hozzávetőlegesen 1 órával korábbi idegrendszeri állapotot tükrözi. Ennek megfelelően az L-KYNs kezelést követően 3 órás várakozási időt iktattunk be, hogy a magatartás vizsgálatokkal összevethető változásokat tudjunk értékelni.

Az állatokat 1,5 g/ttkg uretánnal i.p. altattuk, majd perfúziós pumpa segítségével először ~10°C 0,1 M PB, végül 4 %-os paraformaldehid (pH 7,4) oldattal transzkardiálisan perfundáltuk (30 ml oldatonként, 2 ml/perc sebességgel). A koponyából eltávolított agyat 4 %-os paraformaldehid oldatban 4°C-on egy éjszakán át utófixáltuk. Az ezt követő napon vibratómmal (VT1000S, Leica Biosystems, Nussloch, Németország) 20 µm vastagságú koronális agyszeleteket készítettünk a striátum (bregma +0,54 mm; A-P) és a hippokampusz (bregma -2 mm; A-P) területéről. A területek pontos meghatározását egér neuroanatómiai atlasz segítette (MacKenzie-Graham és mtsai., 2004). Mindkét agyi régióból 100 µm-es léptékben, öt – öt metszetet gyűjtöttünk.

4.3.1 c-Fos fluorescens immunhisztokémia

A 20 µm vastag szabadon úszó agyszeleteket először 0,1M PB-vel átmostuk, majd a nem specifikus kötőhelyeket 1%-os normál szamar vészérummal (NDS) blokkoltuk. A hippokampális és striatális c-Fos immunopozitív sejtek kimutatására a szeleteket először elsődleges antitesttel (nyúl anti c-Fos, 1:2000; Santa Cruz) 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk, a következő napon pedig az elsődleges antitestre specifikus, másodlagos antitesttel 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk (Cy3-al kapcsolt szamar anti-nyúl, 1:500; Jackson ImmunoResearch). Az elsődleges és a másodlagos antitesteket 0,1M PB-ben oldottuk, amihez 0,4% Triton-X100-at és 1%-os NDS-t adagoltunk. Ezt követően a szeleteket zselatinózott (2%) tárgylemezre húztuk, és fakulásgátló fedőanyaggal fedtük (ProLong® Gold, Life Technologies). A fluorescens fotomikroszkópiás felvételeket Olympus BX51 mikroszkóppal és az ehhez kapcsolt DP70 digitális képfeldolgozó rendszerrel készítettük, és számítógépen tároltuk.

4.3.2 Sejtszámolás

Az immunopozitív sejtek számát a hippokampusz CA1 területén 500 x 140 µm-es, 200x-os nagyítással készült felvételeken vizsgáltuk (10. ábra A panel). A dorzális striátumról készült felvételeket 100x-os nagyítással készítettük, amiken a sejtszámoláshoz használt területet kézzel jelöltük ki (11. ábra A panel). A c-Fos immunopozitív sejtek mennyiségét MATLAB 7.1 (Mathworks, Natick, MA, USA) környezetben megírt program segítségével automatikusan számoltuk. Ehhez a fotomikroszkópos képeken először threshold és zajsűrést végeztünk, majd a binárisra alakított felvételeken (fekete, fehér) a 25-400 µm² területű objektumokat fogadtuk el jelölt sejteknek.

4.4 Artériás középvérnyomás és agykérgi vérátáramlás vizsgálat

A vérkeringési paraméterek mérésekor két csoportot (n = 8/csoport) képeztünk, melyhez az egereket véletlenszerűen válogattuk. Az egyik csoportot 300 mg/ttkg L-KYNs-tal, a másikat 0,1 M PB-rel fecskendeztük (0,2 ml, i.p.) egyszer, a műtéti preparálást követően egy 20 perces alapvonal regisztrálása után.

4.4.1 Műtéti preparálás

Az állatokat egy maszkon keresztül izoflurán (1,5% bevezetés, 1% fenntartás, 0,5 – 0,8% regisztráció, 5% befejezés) gázkeverékkel (N₂O:O₂, 70:30%) altattuk, mesterséges lélegeztetés alkalmazása nélkül. Az altatás mélységét a mancsreflex megszűnésével, a stabil spontán légzési frekvencia (~90/perc) valamint az artériás középvérnyomás (MABP) (75±5 Hgmm) változásának nyomon követésével ellenőriztük. A kísérlet végén az egereket túlaltattuk (5% izoflurán). A műtét megkezdése előtt az állatokat atropinnal (0,1%, 0,01ml, i.m.) injektáltuk, hogy megakadályozzuk a légúti nyák (mucus) termelődését. A kísérlet során a testhőmérsékletüket kisállat-melegítő párnával (TMP-5b, Supertech Kft., Pécs, Magyarország) állandó 37°C-on tartottuk. Az állatok MABP értékeit egy házilag épített vérnyomásérzékelő transzduktor segítségével, a bal artéria femoralisba vezetett kanülön keresztül, közvetlenül véres úton mértük (10 Hz). A kanül behelyezését követően az egereket hason fekvő pozícióban sztereotaxiás-fejbefogó segítségével (David Kopf Instruments, CA, USA) rögzítettük. A fejbőrt a szagittális varrat mentén szikével megnyitottuk, majd orvosi cérnával laterálisan finoman kifestítettük. A bemetszés során lidocain (1%) oldattal kezeltük az érintett területet. A periosteumot anatómiai csipesz tompa végével óvatosan eltávolítottuk. A koponyát fiziológiás sóoldattal lemostuk, majd UV fényre kötő adhéziós anyaggal (UV683 Light Curing Adhesive,

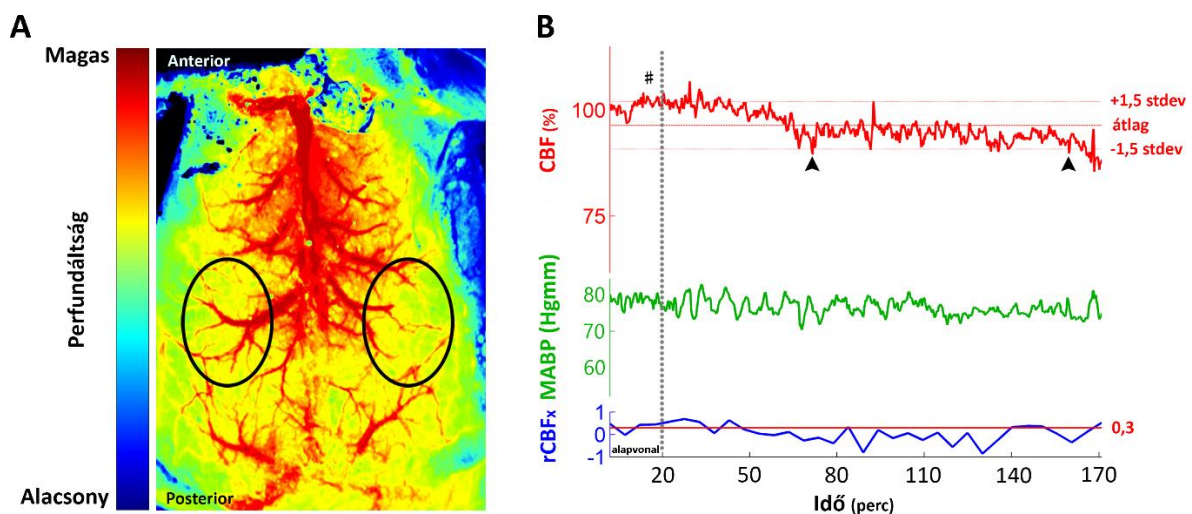
Permabond Ltd., Wessex, UK) vékony rétegben egyenletesen bevontuk, hogy megakadályozzuk a csont száradását a regisztráció során. Az agykérgi vérátáramlás (CBF) változását lézer folt interferencia (lézer speckle) kontrasztanalízisen alapuló eszközzel (PeriCam PSI HR System[®], Perimed, Järfälla, Svédország) intakt koponyán keresztül vizsgáltuk (Ayata és mtsai., 2004). A következő néhány mondatban szeretném röviden bemutatni ennek a működését. 785 nm hosszúságú szórt lézertípussal megvilágítottuk a koponyát úgy, hogy a fény központjába a bregma legyen. A csonton áthaladó lézertípus a felszíntől körülbelül 500-700 μm mélyre hatol. A besugárzott fény egy része – véletlen szóródások sorozata nyomán – visszatérhet a besugárzási felszínre, onnan pedig az adott távolságban (10 cm) a koponya felett elhelyezett nagy teljesítményű CCD kamerába. Mivel a mintában a lézertípus véletlenszerűen szóródik, így a CCD chip felszínén is egy véletlenszerű, sötét és világos pontokból álló mintázat jön létre. Ha a megvilágított minta mozdulatlan, a keletkező lézer speckle kép is állandó, azonban, ha a minta mozog vagy mozgó elemeket (például vörösvértesteket) tartalmaz, akkor a speckle kép időben változik, még hozzá úgy, hogy a változás sebessége egyenesen arányos a mozgó elemek mozgásának sebességével. Ennek eredményeként a kamera által rögzített képek egyes területei a nekik megfelelő agyterületek vérellátottságának megfelelően elmosódnak. Ezt megfelelő algoritmussal feldolgozva pixelekre lebontott áramlási térkép számoltatható, aminek mértékegysége a perfúziós egység (PU). A méréseink során az agy dorzális felszínén egy 10 x 13 mm-es területet vizsgáltunk, amelyen mindkét agyfélteke vérátáramlása jól látszódnak. A nyers áramlási térképből a képképző szoftver (PimSoft 1.5.4.8, Perimed, Järfälla, Svédország) az áramlás intenzitását ábrázoló hamisszínes képeket képzett, amin a piros szín magas áramlású, a kék szín pedig alacsony áramlású területeket jelölt (6. ábra; A panel). A részletgazdag speckle felvételek nagy felbontással (20 μm /pixel) készültek, ezért a mintavételezési frekvencia maximuma 0,33Hz volt. A lézer speckle áramlásmérés tehát egy nem invazív kvantitatív módszer, aminek segítségével kétdimenzióban nyomon követhető az egér dorzális agyfelszínének haemodinamikai változása. A jelfeldolgozás során keletkező PU a fókuszbba helyezett agykérgi régió relatív perfúziós változásait mutatja. A PU érték növekedése vérátáramlás fokozódást azaz hiperémiát, míg az érték csökkenése vérátáramlás esést azaz hipoperfúziót jelöl.

4.4.2 Kísérleti protokoll és jelfeldolgozás

A preparálást követően az izoflurán mennyiségét az elégséges legalacsonyabb szintre csökkentettük (0,7 - 1,1%), még éppen fenntartva az alvó állapotot, majd az állatokat 30 percig ekképp pihentettük. Az adatok regisztrálását ezt követően kezdtük. 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 alapvonal felvételével indítottuk, amit az anyagbeadáskövetően további 140 percig folytattunk. A kísérlet végén az állatokat túlaltattuk, amit a vérnyomás érték csökkenésével (<10 Hgmm, biológiai nulla) ellenőriztünk.

A CBF kiértékelését egy vizsgálati tartomány meghatározásával indítottuk. Ekkor az áramlásváltozási képeken a kétoldali szomatoszenzoros kérgi régió egy-egy $2,5 \pm 0,3 \text{ mm}^2$ -es területet jelöltünk ki (6. ábra, A panel). A PU értékeket ezekről a területekről gyűjtöttük, majd átlagoltuk. Ezt követően azokat relatív százalékos áramlásváltozási értékké alakítottuk. Ehhez a felvételek első 5 percének átlagát 100%-nak, a túlaltatás utáni 5 perc átlagát pedig 0% (biológiai zéró) referencia értéknek vettük, majd az egész idősort a referencia értékek alapján újra skáláztuk. A két agyféltekéről gyűjtött %-os CBF változásokat pedig, Pearson korrelációval vizsgáltuk.



6. ábra. A reprezentatív felvétel egy kontroll egér agykérgi vérátáramlását (CBF) és arétriás középvérnyomását (MABP) jelöli. (A) Az agykéreg dorzális felszínének vérátáramlását (CBF) ábrázoló reprezentatív színes felvételek lézer speckle kontraszt analízisen alapuló berendezés segítségével készültek. Az alszínés képen a melegebb színek (piros) magas áramlású területeket, a hűvösebb színek (kék) alacsony áramlású területeket jelölnek. A képen a fekete ovális alakzat jelöli az érdeklődési területet, ahonnan a CBF változásokat regisztráltuk. (B) A vonaldiagramon egy kontroll állat CBF (piros), artériás középvérnyomás (MABP) (zöld) és autoregulációs index (rCBFx)(kék) értékeinek változását követhetjük nyomon a teljes regisztráció során. A vertikális pontozott vonal az anyag (PB) beadását jelöli. Az ábra felső részén a CBF változás teljes felvételle számolt átlaga és az analízishez használt küszöb: az átlag $\pm 1,5$ szóródása látható. Az ábra alján a piros vízszintes vonal az autoregulációs tartomány határértékét jelöli (0,3).

Annak érdekében, hogy a CBF regisztrátumokban csökkentsük a jelfeldolgozás során keletkező inherens zajt, először 5-pontos medián szűrést (15 mp-es ablak; median filter) majd 10-pontos átlag simítást (30 mp-es ablak; mean smooth) végeztünk (Mahé és mtsai., 2011). Minden felvételre külön számoltunk agyi autoregulációs indexet (rCBFx), amellyel az agyi áramlási

autoreguláció működése jellemezhető (Hinzman és mtsai., 2014). Ehhez először a MABP adatsort leskáráztuk 0,33 Hz-re, hogy egyezzen a CBF mintavételezési frekvenciával. Ezt követően a MABP és a CBF értékeket, 5-pontos átlag simítás után (15 mp-es ablak; mean smooth), 5 perces (300 s) szakaszokra bontottuk, amiken Pearson (r) keresztkorrelációkat számoltunk. Klinikai tanulmányokból tudjuk, hogy az áramlási autoreguláció intaktnak tekinthető ha az rCBFx kisebb, mint 0,3 (Zweifel és mtsai., 2008).

Annak érdekében, hogy az egyedi CBF változásokat egységesen vizsgálni tudjunk minden felvételre meghatároztunk egy áramlásváltozási-zónát (teljes mérésre vonatkoztatott átlag $\pm 1,5$ stdev), amin belül a CBF ingadozást normálisnak tekintettük. A jelfeldolgozásból fakadó inherens zaj, valamint az egerekben jelentős spontán vazomotor aktivitásnak köszönhetően az alap CBF észrevehetően fluktuált. Az ebből fakadó fals eredményeket véletlenül sem akartuk bevonni az elemzésbe, ezért csak a lassabb komponensű változásokra fókuszáltunk. Ennek eredményeként, azokat a szakaszokat értékeltük egyedi áramlásváltozásnak, amikor a CBF értékek legalább 15 mp-ig (5 egymást követő érték) a normál zónán kívül estek. Egy további kritérium volt, hogy az egyedi áramlásváltozás ideje alatt az rCBFx átlaga ne haladja meg a 0,3 határértéket. Ekkor ugyanis a CBF ingadozás nem függetleníthető a szisztémás vérnyomás változásától (Hinzman és mtsai., 2014), ezért az ilyen eseményeket kihagytuk az elemzésből. 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 tekintettük, és további analízisnek vetettük alá. A továbbiakban a két eseményt egymástól függetlenül vizsgáltuk. Minden egyedi CBF eseményre kiszámoltuk a CBF átlagtól való eltérés maximumát (%), a küszöb átlépésének hosszát (s), valamint a görbe alatti területét ($\% * s$) (13. ábra; jobb felső panel).

4.5 Statisztikai elemzés

Adataink eloszlását a Shapiro-Wilk és Kolmogorov-Szmirnov normalitás tesztekkel, a szórások homogenitását Levene próbával vizsgáltuk. Az outlier értékeket Grubbs-féle teszttel szűrtük. Adatainkat vonal- és oszlopdiagrammal vagy doboz ábrával szemléltettük. A vonal- és oszlopdiagramokon az átlagot és az átlag egyszeres szórását ($1 \times \text{stdev}$), a doboz ábrákon az adatok mediánját, az interkvartilis terjedelmet és a szélső értékeket ábrázoltuk.

A magatartás vizsgálatok során a többszörös összehasonlítást egyenlő variancia esetén egyszempontos variancia analízissel (ANOVA), Tukey és Dunett „post hoc” próbával végeztük. A variancia inhomogenitása esetén Welch egyszempontos ANOVA-t alkalmaztunk,

Games-Howell „post hoc” vizsgálattal. A lokomotoros paraméterek kapcsoltsága miatt a mozgási aktivitás kiértékelésére multivaráns variancia analízist (MANOVA) alkalmaztunk.

A szövettani metszeteken a c-Fos⁺ sejtek számának összehasonlítását lineáris kevert modellel (GLMM) végeztük. Modellünkbe az egyes egerek hatását véletlenszerű hatásként, a kezelést pedig fix hatásként építettük be.

A vérnyomás-változások vizsgálatának ismételt mérésen alapuló összehasonlításához kevert variancia analízist alkalmaztunk (mixed-ANOVA). Csoporton belüli változóként az időt, csoportok közötti változóként a kezelést megadva, 30 perces szakaszokból készített vérnyomás átlagokat vizsgálva. A CBF-ből származtatott adatokat Welch t-próbával vizsgáltuk, az első fajú hiba Bonferroni korrekciója mellett. A korrelációs analízis Pearson-féle teszten alapult.

A statisztikai számításokhoz az SPSS (IBM, SPSS Statistics for Windows, Version 22) programot és a MATLAB (The MathWorks Inc, R2013a) beépített statisztikai funkcióit alkalmaztuk. Az adatok ábrázolása a SigmaPlot (Systat, SigmaPlot for Windows, Version 12.5) és a MATLAB (The MathWorks Inc, R2013a) programokkal készültek.

5. Kísérletekben való részvétel

Az állatok gondozását, kézhez szoktatását, valamint a magatartás kísérletek kivitelezését Bódog Zita Tünde és Gyengéné Ruzska Marian segítette. A szövettani vizsgálatoknál az immunhisztokémiai eljárás kivitelezésében és az eredmények kiértékelésében Dr. Gellért Levente, Herédi Judit és Bódog Zita Tünde segítettek. Az immunhisztokémiai felvételek kiértékeléséhez a MATLAB programot Holczer István és Dr. Gellért Levente készítette. Az artériás középvérnyomás és az agyi vérátáramlás méréseket Dr. Menyhárt Ákos segítette. Az adatok kiértékeléséhez készített MATLAB program megírását Puskás Tamás segítette.

6. Eredmények

6.1 A különböző dózisú L-KYNs kezelés viselkedésre gyakorolt hatásai

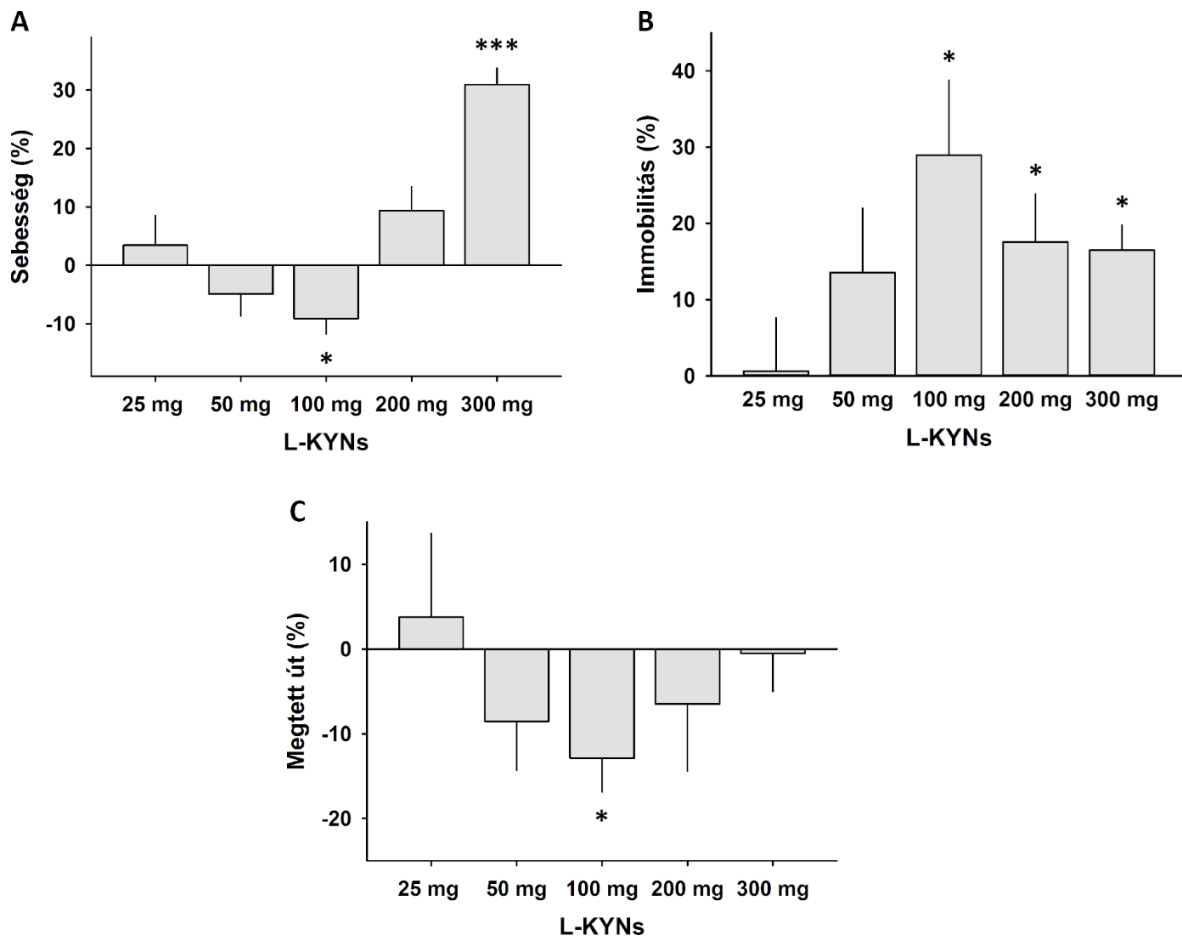
A fordított ciklusú állatok aktív periódusa a kísérleti időszakra esik. Ennek ellenére az L-KYNs-tal kezelt állatok a kezelést követően bágyadtak voltak, illetve esetenként a tesztek megkezdéséig a ketrecben aludtak. A dózis növelésével ez a hatás egyre intenzívebben jelentkezett. A PB-al kezelt kontroll csoportokban nem tapasztaltunk hasonlót.

6.1.1 Lokomotoros explorációs aktivitás (OF)

A teszt 8 perc szabad mozgásból állt, ami alatt az állatok lokomotoros aktivitását vizsgáltuk. A kontroll állatok átlagosan $9,58 \pm 1,1$ cm/s sebességgel mozogtak és a rendelkezésre álló idő $28 \pm 10\%$ -át horizontális mozgás nélkül töltötték (immobilitás). Ennek következtében átlagosan 3390 ± 630 cm hosszú utat tettek meg. Az egyes paraméterek a különböző kontroll állatscsoportok esetében kisebb-nagyobb mértékben eltértek egymástól, ezért minden L-KYNs-tal kezelt állatscsoportot az azonos napon vizsgált kontrollhoz viszonyítottunk. Az eltérő dózissal kezelt csoportok összehasonlítása érdekében az egyes kezelt- és kontrollcsoportok közötti eltérést százalékos értéként is kifejeztük, majd ábráztuk (7. ábra).

Az alacsonyabb dózisú kezelések (25 mg, 50 mg) statisztikai összehasonlítása során egyik vizsgálati paraméter esetében sem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll csoportokhoz viszonyítva. 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 ($p = 0,035$), tovább voltak immobilisak ($p = 0,013$), és kevesebb utat tettek meg ($p = 0,023$) mint a kontroll csoport egyedei. A 200 mg/ttkg dózissal történt kezelés mozgásra gyakorolt hatása szintén szignifikáns volt (Pillai's trace = 0,739, $F_{(3, 13)} = 12,29$, $p < 0,001$). Érdekes módon ez a különbség csak a horizontális mozgással töltött idő csökkenésén jelentkezett, tehát az állatok immobilitása szignifikáns mértékben fokozódott ($p = 0,049$). A legmarkánsabb különbségeket a 300 mg/ttkg L-KYNs kezelés elemzése során tapasztaltuk (Pillai's trace = 0,93, $F_{(3, 15)} = 66,1$, $p < 0,001$). Az állatok gyorsabban mozogtak ($p < 0,001$) ugyanakkor kevesebb időt töltöttek mozgással, így az immobilitás ideje ezeknél is megemelkedett ($p = 0,016$). Ennek következtében közel hasonló mennyiségű utat tettek meg, mint a kontroll csoport.

Egyedül a 300 mg/ttkg L-KYNs-tal kezelt csoportnál figyeltük meg, hogy az állatok mozgásmintázata észrevehetően torzult. Az állatok mozgásában két jól elkülöníthető fázis látszódott. Az egyik fázist sűrű hirtelen irányváltoztatásokkal jellemezhető gyors mozgás, míg a másikat akadozó sztereotip mozgás és tartós mozdulatlanág jellemezett. A két fázis látszólag véletlenszerűen váltakozott.



7. ábra. Az L-KYNs kezelés dóziszfüggő hatása a C57Bl/6j egér törzs lokomotoros explorációs aktivitására a kontroll csoporthoz képesti relatív változásként ábrázolva. **(A)** A különböző dózissal kezelt csoportok mozgási sebessége látható a kontroll csoportokhoz viszonyított százalékos eltérésként megjelenítve. A 100 mg/ttkg dózissal kezelt egerek szignifikánsan lassabban mozogtak a kontroll csoporthoz képest, a 300 mg/ttkg dózissal kezelt egerek pedig szignifikánsan gyorsabbak voltak. **(B)** A különböző dózissal kezelt csoportok kontrollhoz viszonyított immobilitásának százalékos eltérése látható. A 100 mg/ttkg dózissal kezelt csoporttól kezdve mindegyik csoportnál szignifikánsan nőtt az állatok immobilitása a kontroll csoportokhoz viszonyítva. **(C)** A különböző dózissal kezelt csoportok által megtett út mennyisége látható a kontrollhoz viszonyított százalékos változásként ábrázolva. Egyedül a 100 mg/ttkg dózissal kezelt egerek tettek szignifikánsan kevesebb utat meg a kontroll egerekhez képest. Az ábrán az adatok átlagát és szórását (stdev) jelentettük meg (MANOVA, $p^* \leq 0,05$; $p^{***} \leq 0,001$; $n = 9-10$ /csoport).

Az eredményeink alapján 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 dózissal való kezelés 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.**

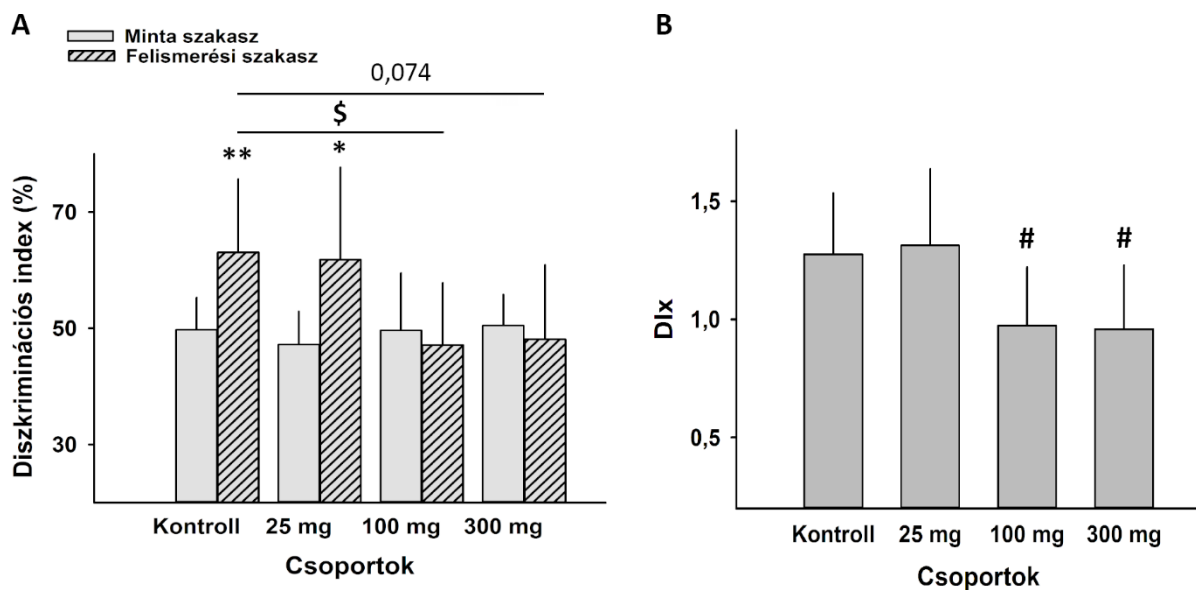
6.1.2 Epizodikus memória teljesítmény (NOR)

Az új tárgy felismerés teszttel az állatok epizodikus memória teljesítményét vizsgáltuk. Az előre felállított kritériumoknak megfelelően az adatelemzés során: a kontrollcsoportból 2 db, a 25 és 100 mg-os csoportból 1-1 db, a 100 mg-os csoportból pedig 2 db egeret kizártunk az elemzésből.

A minta szakasz során mindegyik állatcsoport közel ugyanannyi idő töltött a két azonos tárgy felfedezésével, ahogy az a DI alapján látszik (8. ábra A panel). A felismerési szakaszban egyedül a kontroll és a 25 mg/ttkg L-KYNs-tal kezelt állatok foglalkoztak több ideig az új tárgy felfedezésével mint a régivel, ahogy az a tárgyfelismerési memória teljesítményen alapuló DI értékek változásán is jól követhető (8. ábra; A panel). A minta és a felismerési szakaszok páros-t próbával történő összehasonlítása során a kontroll csoportnál ($t_{(9)} = -3,282$, $p = 0,01$) és a 25 mg/ttkg kezelt csoportnál ($t_{(9)} = -3,13$, $p = 0,012$) szignifikáns fokozódás mutatkozott. A 100 mg/ttkg és 300 mg/ttkg L-KYNs-tal kezelt csoportoknál az állatok nem tettek különbséget a régi és az új tárgy között. Az állatok ugyanis mindkét szakaszban közel hasonló időt töltöttek a tárgyak felfedezésével (8. ábra A panel). Az egyes fázisok csoportok közötti variancia analízisen (ANOVA) alapuló összehasonlítása szignifikáns csoporthatást jelzett a felismerési szakasz során ($F_{(3,34)} = 3,93$, $p = 0,016$). A csoportok közötti Games-Howell „post hoc” vizsgálat szignifikáns különbséget mutatott a 100 mg/ttkg és a kontroll között ($p = 0,047$), valamint a jelentős különbséget a 300 mg/ttkg és a kontroll között ($p = 0,074$).

A Diszkriminációs Teljesítmény (Dix) összehasonlítása szintén jól mutatja, hogy a 100 mg/ttkg és a 300 mg/ttkg dózisú kezelés beavatkozott a tárgyfelismerési memóriába és rontotta az állatok teljesítményét (8. ábra B panel). A csoportok közötti összehasonlítás (ANOVA) szignifikáns csoporthatást jelzett ($F_{(3,34)} = 4,414$, $p = 0,01$). A Dunett féle „post hoc” vizsgálat során a különböző kezelt csoportokat viszonyítottuk a kontrollcsoporthoz. A 25 mg-al kezelt csoport nem különbözött, ellenben a 100 mg-os csoport ($p = 0,036$) és a 300 mg-os csoport ($p = 0,021$) is szignifikáns mértékű eltérést tanúsított.

Az eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a nagyobb dózisú L-KYNs kezelések (100 mg/ttkg; 300 mg/ttkg) rontották az egerek tárgyfelismerési memória teljesítményét.

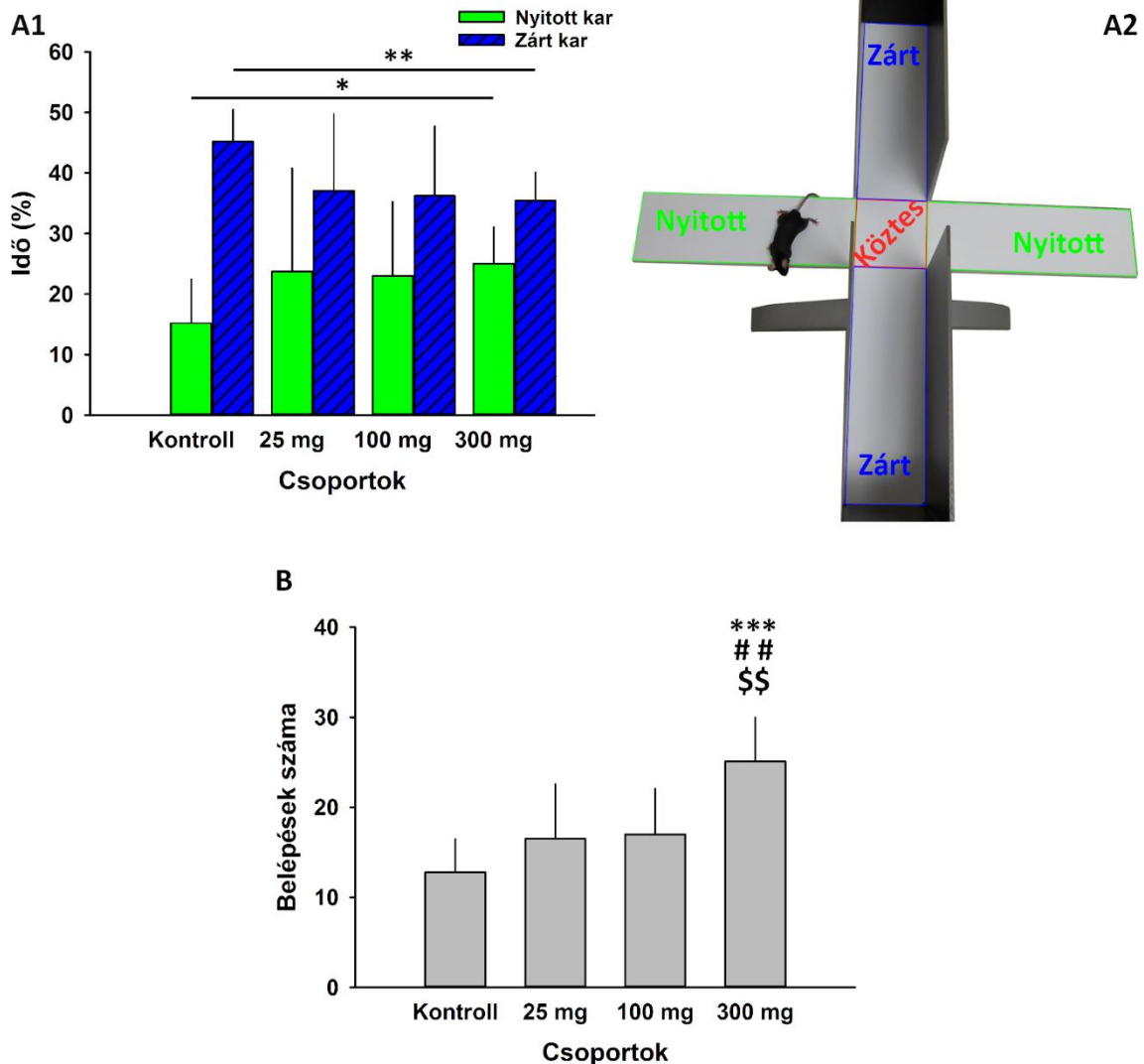


8. ábra. Az L-KYNs kezelés dóziszfüggő hatása a C57Bl/6j egér törzs, diszkriminációs index (DI) és diszkriminációs teljesítmény (DI_x) segítségével jellemezett, tárgy felismerési epizodikus memóriára. **(A)** A különböző dózissal kezelt csoportok DI változása látható a minta és a felismerési szakaszok során. A két szakasz DI értékeinek összehasonlítása során a kontroll és a 25 mg/ttkg dózissal kezelt csoportoknál szignifikáns fokozódás volt megfigyelhető. A felismerési szakaszok összehasonlításakor a 100 mg és a 300 mg csoport mutatott különbséget a kontroll csoport teljesítményéhez képest. **(B)** A diszkriminációs teljesítmény összehasonlítása a különböző dózissal kezelt csoportok között. A kontrollhoz viszonyítva a 100 mg és a 300 mg dózissal kezelt csoportok mutattak szignifikáns különbséget. Az ábrán az adatok átlagát és szórását (stdev) jelenítettük meg (páros t-próba, $p^* \leq 0,05$; $p^{**} \leq 0,01$; ANOVA $p\$$ és $p\# \leq 0,05$; $n = 10-12$ /csoport).

6.1.3 Szorongással kapcsolatos viselkedés (EPM)

Az éjszakai életmódot folytató rágcsálók ösztönösen kerülnek a nyílt, erősen megvilágított területeket. Az EPM teszttel azt vizsgáltuk, hogy az egerek mennyi időt töltenek a három különböző megvilágítottságú és fedettségű térrész (nyitott, köztes, zárt) között, valamint azt, hogy hány alkalommal váltanak helyszínt a rendelkezésre álló idő alatt (9. ábra A2 panel). A szakirodalom alapján a kevésbé szorongó egyedek több időt töltenek az averzív nyitott karokban, és többször látogatják azokat (Walf és Frye, 2007).

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 arányosan nőtt a nyitott karok explorációjának ideje, és csökkent a zárt karoké (9. ábra A1 panel). Tekintettel a variancia nyilvánvaló különbözőségére [Levene teszt szignifikáns a zárt ($p = 0,02$) és a nyitott ($p = 0,021$) karokra egyaránt], a csoportok közötti összehasonlítás vizsgálatára Welch egyszempontos ANOVA-t alkalmaztunk. A zárt karokban töltött idő összehasonlítása során a csoporthatás szignifikáns volt ($F_{(3,19)} = 6,257$, $p = 0,004$). A csoportok közötti Games-Howel „post hoc” vizsgálat pedig (a viszonylag alacsony elemszám mellett is) rendkívül erős szignifikáns különbséget jelzett a kontroll és a 300 mg/ttkg-mal kezelt csoportok között ($p = 0,002$). A nyitott karokban töltött idő összehasonlítása során a csoporthatás szintén szignifikáns volt ($F_{(3,19)} = 3,564$, $p = 0,034$). A csoportok közötti Games-Howel „post hoc” vizsgálat, ismét szignifikáns különbséget jelzett a kontroll és a 300 mg/ttkg-mal kezelt csoportok között ($p = 0,019$). Ezek alapján elmondható, hogy a 300 mg/ttkg-mal kezelt állatok kevesebb időt töltöttek a zárt karokon és inkább a nyitott karokat látogatták. Ezt tovább erősíti a nyílt karokra való kilépések számának összehasonlítása, mely vizsgálat szintén szignifikáns csoporthatást eredményezett ($F_{(3, 36)} = 10,68$, $p < 0,001$) (9. ábra B panel). A csoportok közötti Tukey „post hoc” vizsgálat felfedte, hogy a 300 mg/ttkg L-KYNs-tal kezelt állatcsoportnál a kilépések száma az összes többi csoporthoz képest szignifikánsan magasabb volt ($p < 0,001$ vs kontroll; $p = 0,003$ vs 25 mg; $p = 0,006$ vs 100 mg).



9. ábra. Az L-KYNs kezelés dóziszfüggő hatása a C57Bl/6j egér törzs szorongással kapcsolatos viselkedésére. (A1) Az EPM nyitott és zárt folyosóin eltöltött százalékos idő összehasonlítása látható a különböző dózissal kezelt csoportok között. A dózis fokozatos növekedésével arányosan nő a nyílt karokon eltöltött idő és csökken a zártan, ez a hatás a legnagyobb dózisu kezelésnél válik szignifikánssá. (A2) Az ábra az EPM különböző folyosóit szemlélteti. (B) Az EPM nyílt folyosóira való kilépések mennyiségének számszerű összehasonlítása a különböző L-KYNs-tal kezelt csoportok között. A legmagasabb dózissal kezelt csoport, mindegyik csoporttól szignifikánsan eltért, ugyanis az állatok többször látogatták az apparátus nyílt folyosóit. Az ábrán az adatok átlagát és szórását (stdev) jelenítettük meg (Welch ANOVA, $p^* \leq 0,05$; $p^{**} \leq 0,01$; és $p^{***} \leq 0,001$ vs. Kontroll; $p^{\#\#} \leq 0,01$ vs. 25mg; $p^{\$ \$} \leq 0,01$ vs. 100mg; $n = 10-12$ /csoport).

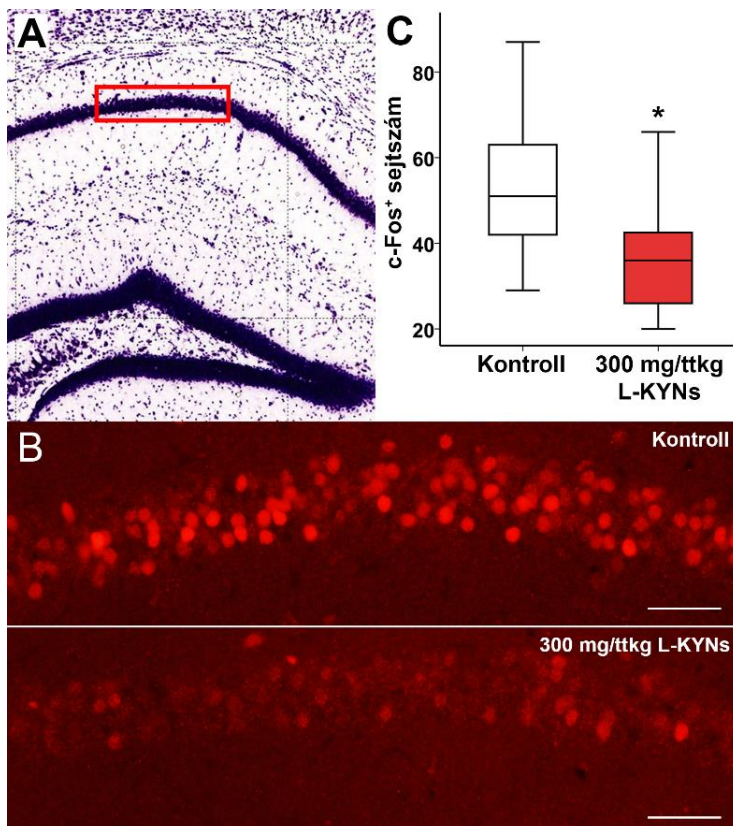
Az L-KYNs kezelés dóziszfüggő módon csökkentette az állatok szorongását, ám ez a hatás egyedül a 300 mg/ ttkg csoport esetében volt szignifikáns.

6.2 Az L-KYNs kezelés c-Fos fehérje kifejeződésre gyakorolt hatásai

Annak érdekében, hogy felmérhessük az L-KYNs kezelés okoz-e változást az alap c-Fos fehérje expressziós szintben, fluoreszcens immunhisztokémiai módszerrel jelöltük a c-Fos-t kifejező sejteket, azokban az agyi régiókban, amik a magatartás vizsgálatokkal összefüggésbe hozhatók (n = 10/csoport, állatonként 5-5 metszet). Az L-KYNs-kezelés olyan dózisát választottuk, ami a vizsgált magtartás tesztek mindegyikében markáns eltérést mutatott (300 mg/ttkg). Vizsgálódásunk célterületeként pedig a térbeli tájékozódással és tanulással szorosan kapcsolatba hozható hippokampusz CA1 régiót, valamint a lokomotoros aktivitás szabályozásában kulcsfontosságú dorzális striátum területet választottuk. Azokat a régiókat, ahol a sejtszámolást végeztük a 10. ábra és 11. ábra A panelei jelölik.

6.2.1 A hippokampusz CA1 régióban

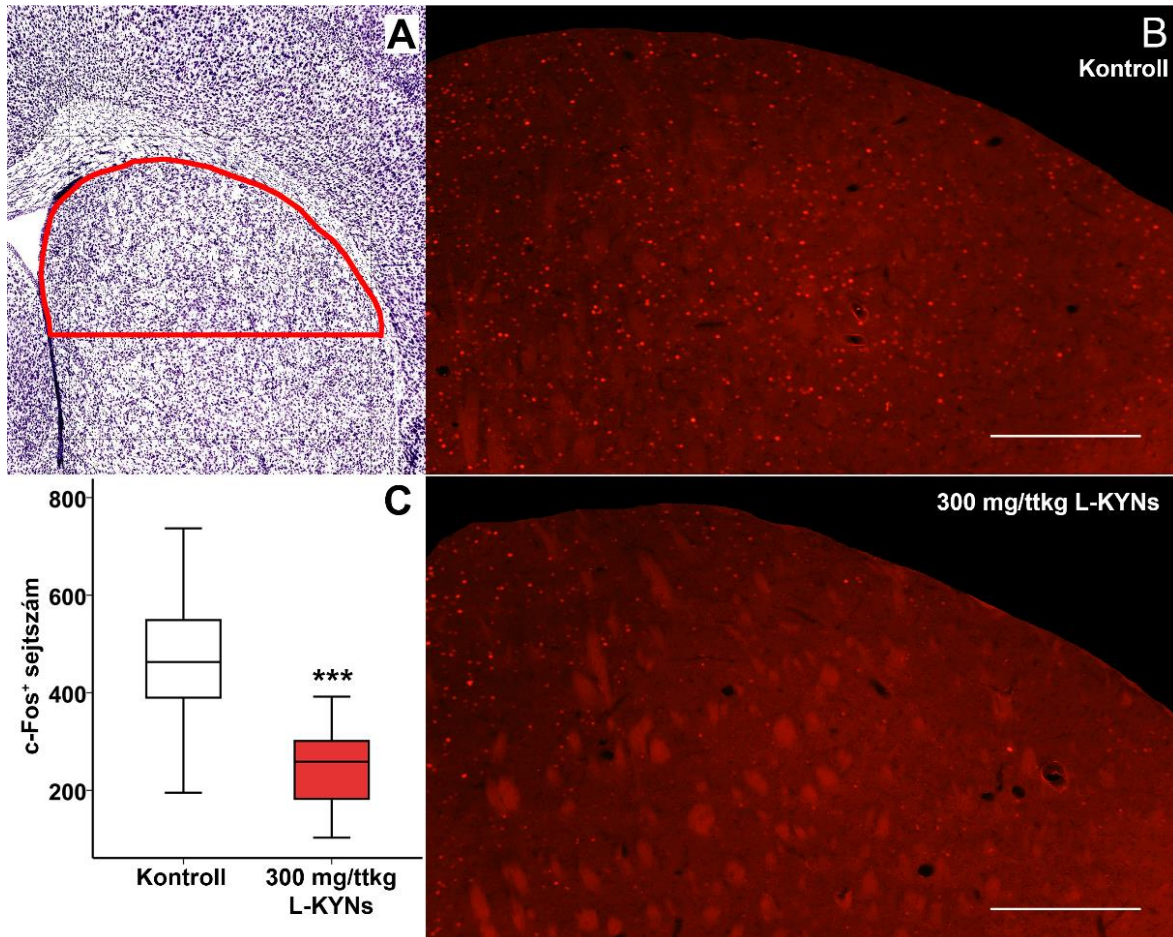
Intenzív sejtmagi c-Fos-immunopozitivitás figyelhető meg a CA1 piramis sejtek rétegében, ahol jelentős számú c-Fos fehérjét kifejező sejt látszódik (10. ábra B panel felső rész). A kezelt csoportban a c-Fos⁺ sejtek száma szignifikáns mértékben kevesebb volt a kontrollcsoportéhoz képest ($F_{(1, 83)} = 6,501$; $p = 0,013$) (10. ábra B panel alsó rész és C panel).



10. ábra. A nagy dózísú L-KYNs kezelés hatása a C57Bl/6j egér törzs hippokampusz CA1 régiójában található c-Fos⁺ sejtek mennyiségére. (A) A koronális síkban készített sematikus kép a C57Bl/6j egér dorzális hippokampuszának egy részét mutatja. A piros téglalap (500 x 140 μm) a CA1-es régióba jelöli, ahol a sejtszámolást végeztük. (B) A reprezentatív fotomikroszkópiás felvételeken egy kontroll (felső panel) és egy L-KYNs-tal (alsó panel) kezelt egér CA1-es régiója látható, c-Fos immunofestést követően. A c-Fos jelölt sejtek piros pontokként látszódnak. Jól megfigyelhető, hogy a kontroll állatnál lényegesen több jelölt sejt különíthető el, mint a kezeltnél. A fehér skála 50 μm hosszúságot mutat. (C) A doboz ábrán a sejtszámolás eredményeit tekinthetjük meg. Az L-KYNs-tal kezelt csoportban szignifikánsan kevesebb c-Fos⁺ sejtet számoltunk, mint a kontrollban. Az ábrán az adatok mediánját, interkvartilis terjedelmét és szélső értékeit (minimum/maximum) jelenítettük meg. (GLMM, * $p \leq 0,05$; n = 10/csoport; állatonként 5-5 metszet).

6.2.2 A dorzális striátum területén

A 11. ábra B panelén látható világító piros pontok a c-Fos-t expresszáló sejteket jelölik. A kontrollcsoportban a c-Fos⁺ sejtek a dorzális striátum egészén nagy számban láthatók (11. ábra B panel felső rész). Ehhez képest az L-KYNs kezelt csoportban a c-Fos⁺ sejtek száma szignifikáns mértékben alacsonyabb ($F_{(1, 83)} = 12,701$; $p = 0.001$) (11. ábra C panel), és azok elhelyezkedése is erősen sporadikus (11. ábra B panel alsó rész).



11. ábra. A nagy dózisú L-KYNs kezelés hatása a C57Bl/6j egér törzs dorzális striátumában található c-Fos⁺ sejtek mennyiségére. (A) A koronális síkban készített sematikus kép a C57Bl/6 egér törzs dorzális striátumát jeleníti meg. A piros vonallal határolt rész azt a területet jelöli, ahol a sejtszámolást végeztük. (B) A reprezentatív fotomikroszkópiás felvételeken egy kontroll (felső panel) és egy L-KYNs-tal kezelt egér (alsó panel) dorzális striátuma látható, c-Fos immunofestést követően. A c-Fos-jelölt sejtek apró piros pontokként látszanak. Jól látható, hogy a c-Fos⁺ sejtek a látótérben sporadikusan oszlanak el, valamint a kontroll egérben lényegesen több van belőlük. A fehér vonal 200 μm hosszúságot mutat. (C) A doboz ábrán a sejtszámolás eredményeit tekinthetjük meg. Az L-KYNs-tal kezelt csoportban szignifikánsan kevesebb c-Fos⁺ sejtet számoltunk, mint a kontrollban. Az ábrán az adatok mediánját, interkvartilis terjedelmét és szélső értékeit (minimum/maximum) jelenítettük meg. (GLMM, *** $p \leq 0.05$; $n = 10$ /csoport, állatonként 5-5 metszet).

Az eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az L-KYNs-kezelés szignifikáns mértékben csökkentette a c-Fos⁺ idegsejtek számát mindkét vizsgált agyi régióban.

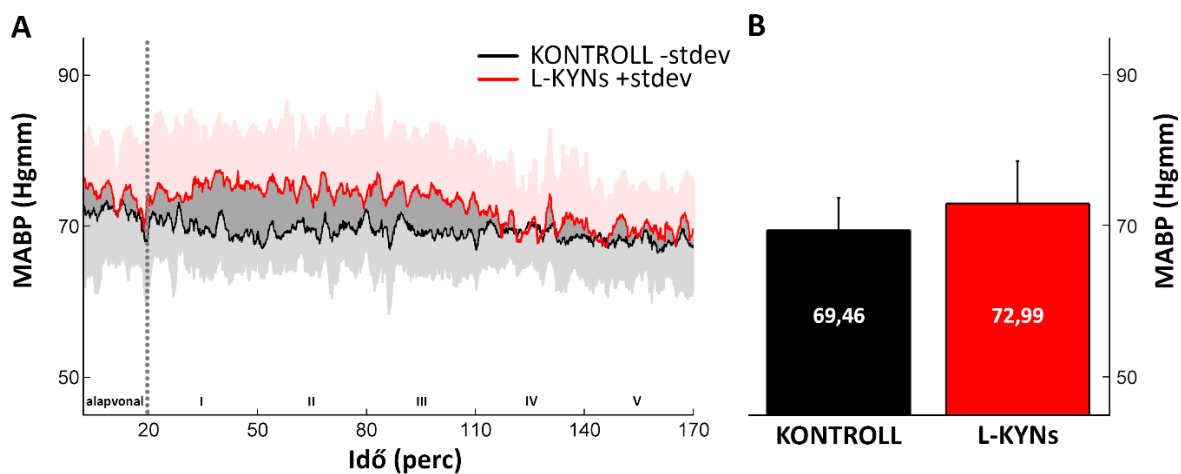
6.3 Az L-KYNs kezelés vérkeringésre gyakorolt hatásai

A mérés során az altatás fenntartásához mindkét csoport esetében $0,9 \pm 0,2\%$ izoflurán altatógázt alkalmaztunk. Az altatás potenciózásában a csoportok között nem volt különbség.

6.3.1 Az artériás középvérnyomás (MABP) változása

A MABP mindkét állatcsoportban az egész mérés során egyenletes és stabil volt (12. ábra A panel). A teljes mérésre kifejezett átlagok a kontrollcsoport esetében $69,46 \pm 4,24$ Hgmm, az L-KYNs-tal kezelt csoportnál pedig $72,99 \pm 5,63$ Hgmm volt (12. ábra B panel). Az átlagok statisztikai összehasonlítása nem mutatott különbséget a két csoport között ($t_{(14)} = -1,41$, $p = 0,18$). Habár a kezdeti vérnyomás a kezelt csoportban enyhén emelkedettebb volt, az idősorok részletesebb összehasonlítása során, a csoporton belüli és csoportok közötti események nem különböztek egymástól.

Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a 300 mg/ttkg L-KYNs kezelés az artériás középvérnyomást jelentősen (szignifikánsan) nem befolyásolta.



12. ábra. Az L-KYNs kezelés hatása az artériás középvérnyomásra. (A) A vonaldiagrammon a kontroll (fekete) és az L-KYNs-tal kezelt (piros) csoportok artériás középvérnyomás (MABP) értékeinek változása látható a teljes mérésre feltüntetve. Az adatok a csoportok átlagát \pm szórását jelölik. Az x tengely feletti jelölések (alapvonal, I, II, III, IV, V) az ismételt mérések kevert ANOVA vizsgálathoz kijelölt szakaszokat mutatják. A vertikális pontozott vonal az anyagbeadást jelöli. (B) A teljes felvételtől számolt MABP összehasonlítása a kontroll és a kezelt csoportok között. A statisztikai vizsgálat alapján nem volt különbség a vizsgált csoportátlagok között. Az ábrán az adatok átlagát és szórását (stdev) jelenítettük meg (ismételt mérések mixed-ANOVA és független t-próba; $n = 8$ /csoport).

6.3.2 Az agykérgi vérátáramlás (CBF) változása

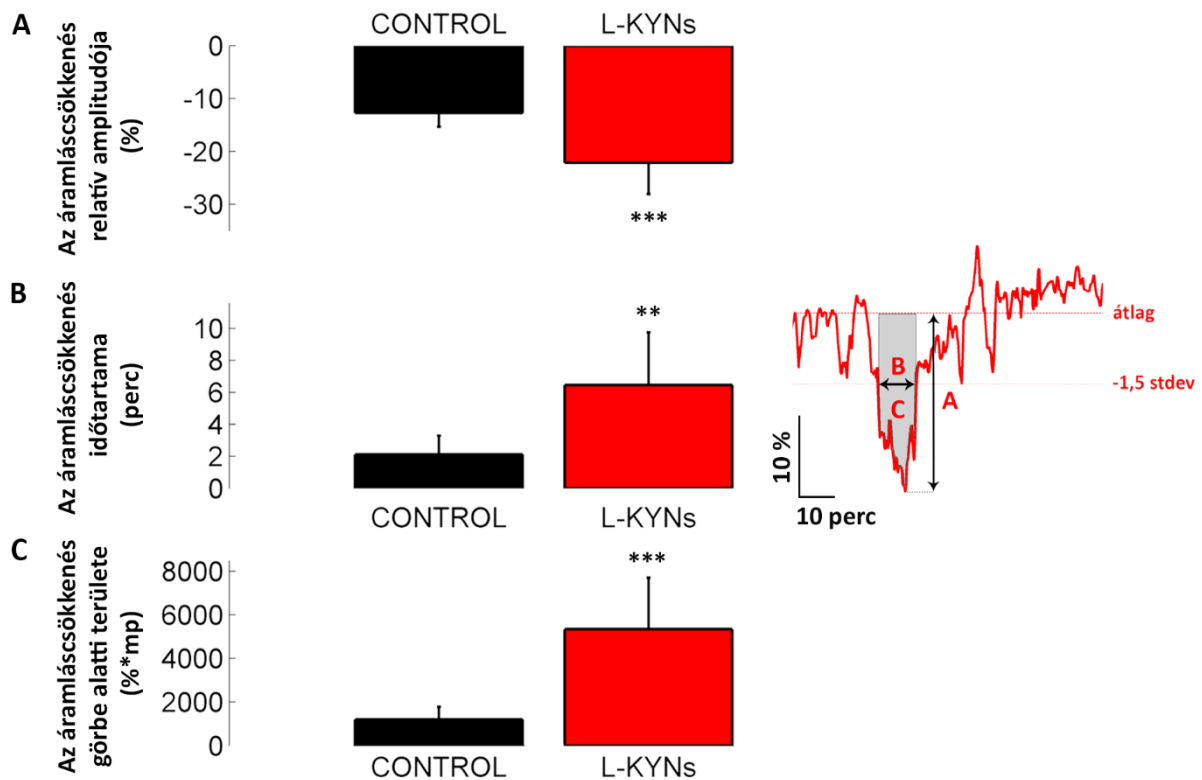
A bal és jobb agyféltekéről származó %-os CBF értékek összehasonlítása során erős pozitív korreláció mutatkozott ($r \geq 0,95^{***}$), ezért a két oldalról származó értékeket állatonként átlagoltuk, és egy adatként kezeltük.

A CBF áramlásváltozások előfordulása	Hipoperfúziós tranziens		Hiperémiás tranziens	
	KONTROLL	L-KYNs	KONTROLL	L-KYNs
Állatcsoportokon belül	6/8	8/8	4/8	1/8
Állatonként	0-6	1-2	0-1	0-2
Összesen	18	12	4	2

1. táblázat. Az egyedi CBF áramlásváltozások előfordulási gyakorisága az egyes kísérleti csoportok között.

Az összehasonlíthatóság szempontjából elégtelen mennyiségű hiperémiás áramlásváltozást detektáltunk (1. táblázat), ezért azok összehasonlítását nem végeztük. A kontrollcsoportban a CBF csökkenések véletlenszerűen jelentkeztek. Ezzel szemben a kezelt állatok mindegyikénél láttunk áramlás csökkenéseket (1. táblázat) az anyag beadását követő 60-120 percben. Az L-KYNs-tal kezelt csoportban ez az áramlásváltozás minden vizsgált paraméter alapján szignifikáns mértékben nagyobb volt, mint a kontrollcsoportban (13. ábra). Ennek megfelelően az átlagtól való eltérés fokozottabb volt a kezelt csoportban ($-22,16 \pm 5,9\%$), mint a kontrollban ($-12,74 \pm 2,6\%$), $t_{(14,07)} = 5,18$, $p < 0,001$ (13. ábra A panel). Az áramlásesés tovább tartott a kezelt csoportban ($6,5 \pm 3,2$ perc), mint a kontrollban ($2,1 \pm 1,2$ perc), $t_{(11,55)} = -4,20$, $p = 0,003$ (13. ábra B panel). Ráadásul a CBF-esés méretét jellemző görbe alatti terület szintén terjedelmesebb volt a kezelt csoportban ($5348 \pm 2350\% \times s$), mint a kontrollban ($1199 \pm 580\% \times s$), $t_{(9,69)} = -5,48$, $p < 0,001$ (13. ábra C panel).

Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a 300 mg/ttkg L-KYNs-kezelés szignifikáns mértékű hipoémiás CBF csökkenéseket okozott az egér parietális agykérgi vérátáramlásában.



13. ábra. A hipoperfúziós áramlás változások kvantitatív összehasonlítása az L-KYNs és a kontroll csoportok között. (A) A hipoperfúziós tranziensek maximális amplitúdójának csoportok közötti összehasonlítása látható. Az L-KYNs kezelt csoportban szignifikánsan nagyobb volt a relatív áramláscsökkenés amplitúdója, mint a kontrollban. **(B)** A hipoperfúziós tranziensek küszöbátlépési idejének csoportok közötti összehasonlítása látható. Az L-KYNs kezelt csoportban a CBF csökkenés szignifikánsan tovább tartott, mint a kontrollban. **(C)** A hipoperfúziós tranziensek görbe alatti területének csoportok közötti összehasonlítása látható. Az L-KYNs kezelt csoportban szignifikánsan nagyobb volt az áramláscsökkenés görbe alatti területe, mint a kontrollban. Az ábrán az adatok átlagát és szórását (stdev) jelenítettük meg (Welch t-próba Bonferroni korrekcióval, $p^* \leq 0,05$; $p^{***} \leq 0,001$, $n = 8$ /csoport).

7. Megbeszélés

A KYNA vér-agy gát penetranciája rendkívül kis hatásfokú, ugyanis azon csak passzív diffúzióval képes átjutni (Fukui és mtsai., 1991). Ezért az agyi KYNA-szint fokozódás központi idegrendszeri hatásainak vizsgálatához közvetett farmakológiai megközelítést érdemes alkalmazni. Erre számos lehetőség adott, melyek közül az általunk választott előanyag-adagolás egy jól bevált, széleskörben használt módszer (Schwarcz és mtsai., 2012; Vécsei és mtsai., 2013). Ennek lényege, hogy a KYNA helyett, annak közvetlen előanyagát, a jó vér-agy gát permeabilitással rendelkező L-KYN-t juttatjuk be a szervezetbe. Miután az L-KYN a vérkeringésből az agyba szállítódik, az agy magas KAT-enzim aktivitásának köszönhetően, elsősorban KYNA-vá alakul. Preklinikai tanulmányok sora igazolta, hogy az L-KYN perifériás adagolásával dóziszfüggő módon növelhető az agyi KYNA-szint (Alexander és mtsai., 2012; Scharfman és mtsai., 2000; Swartz és mtsai., 1990; Wu és mtsai., 2000; Zmarowski és mtsai., 2009). Patkánykísérletekből szintén jól ismert adat, hogy az L-KYN i.p. adását követően az agyi KYNA-koncentráció növekedés maximuma 2 óra elteltével jelentkezik (Swartz és mtsai., 1990). Kísérleteinket ehhez mérten úgy időzítettük, hogy a perifériás L-KYNs-adminisztráció és az anyaghatás-vizsgálat között pontosan 2 óra teljen el. Az L-KYN adagolást követően természetesen a kinurenin útvonalon keletkező egyéb neuroaktív metabolitok (3-HK, QUIN) kismértékű fokozódása is megtörténhet. Ugyanakkor, ezek aránya a fiziológiailag intakt agyban – a vizsgált 2 órás időablakon belül – a KYNA-szint változáshoz képest elenyésző (Guidetti és mtsai., 1995). Az agyban ugyanis a QUIN és a 3-HK fő forrása az aktiválódott mikroglia, valamint a gyulladás során infiltrálódó makrofág (Guillemin és mtsai., 2005a; Wonodi és Schwarcz, 2010). Kísérleteinket egészséges felnőtt állatokon végeztük, ahol gyulladás nem befolyásolta a kísérlet menetét. Ennek függvényében tehát, a perifériára bevitt L-KYN átjutva a vér-agy gáton felhalmozódik az agyban, ahol rövid időn belül telíti az alacsony katabolikus aktivitással rendelkező KMO enzimet, aminek következtében a kinurenin metabolizmus a KYNA *de novo* szintézis irányába tolódik el (Guillemin és mtsai., 2001). Természetesen az L-KYN a perifériás szervekben is metabolizálódik, ahol átalakulhat 3-HK-né, ami visszakerülve a vérkeringésbe szintén képes átjutni a vér-agy gáton. Az agyba szállítódott 3-HK pedig már kiváló előanyag a QUIN szintézishez. Ugyanakkor ehhez a folyamathoz 2 óránál lényegesen több időre van szükség (Foster és mtsai., 1986; Fukui és mtsai., 1991; Guidetti és mtsai., 1995).

Külön említést érdemel az AHR receptor, aminek az L-KYN közvetlen ligandja. Így az L-KYNs adagolást követően nem zárható ki, hogy AHR receptor az L-KYN hatására közvetlenül aktiválódik. Ugyanakkor a receptornak a KYNA is agonistája. A vizsgált 2 órás időablakban a KYNA szintje mind a periférián, mind a központi idegrendszerben jelentős mértékben emelkedik. Ezért ha a vizsgált paramétereket befolyásolja is az AHR aktiválás, ez a hatás nem különíthető el a két metabolit között.

Összességében tehát elmondható, hogy **a kísérleteinkhez megválasztott rövid időablak (2 óra), a perifériára bólusban bejuttatott L-KYNs, valamint a gyulladásoz folyamatoktól mentes egészséges felnőtt állatmodell, mind a KYNA előállításnak kedvezett.** Ugyan nem zárható ki a 3-HK és QUIN esetleges befolyása, sem az L-KYN közvetlen hatása az AHR receptoron. Ezek szerepe viszont elhanyagolható a KYNA-szint fokozódással járó neuromodulátoros hatások mellett. **A tapasztalt viselkedési, szövettani és keringési hatásokat ezért a KYNA koncentráció változással magyarázhatjuk.**

7.1 Viselkedésváltozások

A kísérleteinket fordított ciklusú állatokon végeztük. Jobb teljesítményt nyújtanak ugyanis azok az állatok, amelyek aktív periódusa a viselkedéstezt kivitelezésével egybe esik (Kopp és mtsai., 1998). A kiegyensúlyozottabb teljesítménynek köszönhetően lényegesen csökkenthető a csoporton belüli variancia, ezzel pedig egy farmakológiai beavatkozás hatása jobban követhetővé válik.

KYNA az összetett receptorhatásainak köszönhetően változatos módon befolyásolta az egerek mozgási aktivitását, epizodikus tárgyfelismerési memória teljesítményét és szorongással kapcsolatos viselkedését. A megfigyelhető hatások az L-KYNs dózis fokozásával sokszor nem lineáris kapcsolatban álltak. Az eredményeink alapján azonban nem lehet a dózis növekedés és a megfigyelt viselkedésváltozások háttérében zajló folyamatok viszonyáról messze menő következtetéseket levonni. Annak ellenére sem, hogy igen vonzó lenne a KYNA-val kapcsolatban már ismertett változatos receptor-affinitásbeli hatások, és a KYNA-koncentráció fokozódásra megjelenő egyre intenzívebbé váló viselkedéstorzulások közötti párhuzam feltételezése. Ennek megfelelően feltételezhetnénk, hogy alacsonyabb koncentrációban főként az $\alpha 7nACh$ receptor és a GPR35 érintett, míg a dózis emelésével egyre kifejezettebb NMDA-receptor moduláció, illetve egyéb aspecifikus receptor hatások érvényesülésének viselkedési következményeit látjuk. Ugyanakkor addig, amíg a C57Bl/6 egér törzsben nem ismerjük pontosan, hogy a perifériás L-KYNs kezelésre milyen mértékű

régióspecifikus KYNA-szint fokozódás következik be, valamint ez a koncentrációváltozás *in vivo* az adott agyi régióban miként befolyásolja a neurális hálózati működést, minden erre irányuló következtetés csak spekuláció maradhat.

7.1.1 Lokomotoros explorációs aktivitás

Az alacsonyabb dózisú szisztémás L-KYNs kezelésnél ugyan már látszódtott tendenciózus változás, a lokomotoros aktivitás mérséklő hatás azonban csak a 100 mg/ttkg koncentrációjú kezelésnél vált szignifikánssá. Az eredményeink az irodalmi adatokkal jól korrelálnak. Patkányokon végzett korábbi mérések alkalmával többször kimutatták, hogy az egyszeri L-KYN kezelés (100 mg/ttkg) szignifikáns módon csökkenti a nyílt porond tesztben az explorációs aktivitást, ami főként a horizontális mozgás mérséklődésén keresztül mutatkozott (Chess és mtsai., 2007; Vécsei és Beal, 1990). E kísérleteket a KYNA intracerebroventrikuláris adagolása mellett is reprodukálták. Ekkor a KYNA-koncentráció növeléssel arányos dózisfüggő mozgási aktivitás-csökkenést, valamint a sztereotip mozgások, mint a tartós mozdulatlanság, fokozódását figyelték meg (Vécsei és Beal, 1991). A magasabb koncentrációjú kezelések hatására az állatok mozgásmintázatának teljes megváltozását tapasztaltuk. Egyrészt a kisebb dózisú kezelésekhöz hasonlóan az állatok mozgása szakaszossá vált, mely során változó ideig sztereotip mozdulatlanság volt megfigyelhető (Függelék 1. ábra B panel). Másrészt a sztereotip mozgással tarkított lassú fázist sűrű, hirtelen irányváltatásokkal teli, gyors mozgás követte, ami a legmagasabb (300 mg/ttkg) dózisonál volt a legkifejezettebb. Ilyen nagy dózisú L-KYN kezelés viselkedésre gyakorolt hatásait korábban még nem vizsgálták. Az eredményeink azonban nagyfokú hasonlóságot mutatnak a nem kompetitív NMDA antagonisták MK-801, i.p. adagolását követő viselkedésváltozásokhoz. A C57Bl/6 egér törzsben ugyanis az MK-801 kezelés dózisfüggő módon fokozta a sztereotip viselkedés formák kifejeződését, valamint torzította a sebesség-kontrollt, amitől az állatok hiperaktívabbá váltak, ugyanakkor a vertikális mozgási aktivitásuk csökkent (Wu és mtsai., 2005). Ezek a viselkedés torzulások a nagy dózisú L-KYNs kezelt állatoknál is megfigyelhetők voltak (Függelék 1. ábra). **Ezek alapján úgy tűnik, hogy az agyi KYNA-szint mérsékelt fokozódásakor a lokomotoros irányításért és a mozgás kezdeményezésért felelős agyi régiók szelektív csendesítése és gátlása érvényesülhet, míg fokozottabb agyi KYNA-szint esetén az NMDA-receptor moduláció egyre intenzívebb kifejeződésének eredményeképpen olyan diszinhibíciós hatások juthatnak érvényre, ami a teljes motoros szabályozás felborulását okozza.**

7.1.2 Epizodikus memória teljesítmény

A tárgyfelismerési paradigma egy igen gyors és egyszerű modell bármilyen neuromodulátoros tulajdonságokkal rendelkező anyag amnesztikus hatásainak feltárására (Bertaina-Anglade és mtsai., 2006). A klasszikus hippocampusz funkciók mellett a régió integratív működése is kiemelten fontos a nem-térbeli tárgy felismerési memória kialakításában, mind az emléknym bevésésnél, mind a memória konszolidáció során (Assini és mtsai., 2009; Bertaina-Anglade és mtsai., 2006; Cohen és mtsai., 2013; Dere és mtsai., 2007; Hammond és mtsai., 2004; Winters és mtsai., 2008). Ebből adódóan az egereket a NOR teszt megkezdése előtt 2 órával kezeltük. Ily módon az agyi KYNA szint a „minta szakasz” (bevésődés) és a 2 órás várakozási idő (memória konszolidáció) alatt tetőzik. Az ezt követő „felismerési szakaszra” (visszahívás) viszont, az eliminálódás következtében már kellően lecsökkenhetett (Swartz és mtsai., 1990; Winters és mtsai., 2008) ahhoz, hogy azt már közvetlenül ne befolyásolja.

A kísérletünk során a 100 mg/ttkg és a 300 mg/ttkg L-KYNs-tal kezelt állatok nem tudtak különbséget tenni a korábban látott és az ismeretlen tárgy között, tehát a „felismerési szakaszban” nem ismerték fel az új tárgyat. Azt feltételezzük, hogy az agyban felhalmozódó KYNA megakadályozta az ismerős tárgyról keletkező emléknym kialakulását (bevésés és memória konszolidáció). Az akut kinurenerg-manipuláció memóriazavaró 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 (Chess és mtsai., 2007). Eredményeinkkel részben ezt a megfigyelést igazoltuk egerekben, kiegészítve azzal, hogy a 100 mg/ttkg L-KYN-dózis alatt vélhetően nem kell komolyabb memória befolyással számolni. A NOR teljesítményt azonban szenzorimotoros, figyelmi és motivációs problémák is befolyásolhatják (Dere és mtsai., 2007). Ebből kifolyólag megvizsgáltuk, hogy az egerek az egyes szakaszok során összesen mennyi időt töltek a tárgyak felfedezésével. Nem találtunk statisztikai különbséget a tárgy explorációs idő csoportok közötti összehasonlítása során egyik kísérleti fázisban sem (Függelék 2. ábra). Ezért az, hogy a tárgyfelismerési teljesítményben jelentkező eltérés a szenzorimotoros rendszer zavarából, illetve motivációs hiányból fakadjon, kizárható. **Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a csoportok közötti különbségek a visszahívási szakaszban a megfelelő emléknym kialakulásának hibájára vezethető vissza.**

7.1.3 Szorongással kapcsolatos viselkedés

Az EPM teszt eredményei alapján egyértelmű, hogy a dózis növekedéssel egyenes arányú szorongás oldódás jelentkezett. Ez az eredmény természetesen nem választható el tökéletesen a mozgási aktivitás megváltozásától. A legmagasabb dózissal kezelt csoport ugyanis szignifikánsan gyorsabban mozgott és több utat tett meg, mint a kontroll. A túlmozgás ellenére ezek az állatok az idő jelentős részét az erősen-megvilágított, averzív, nyitott karok területén töltötték, ami az állatok kockázatvállalási készségének fokozódását mutatja. Az L-KYN-adagolás szorongásra gyakorolt hatását korábban már vizsgálták. Az EPM tesztek során azonban egyik kezelt csoportnál sem tudtak szignifikáns különbséget kimutatni patkányokban (Vécsei és Beal, 1990). A KYNA egy szintetikus származékának hatására viszont szignifikáns szorongáscsökkentő-hatás mutatkozott mind az EPM teszt, mind a szociális interakción alapuló vizsgálat során (Corbett és Dunn, 1993). Egy másik kutatócsoport hasonló hatásokról számolt be a KYNA akut hatásainak felmérése során, egerekben (Lapin, 1998). A kolinerg jelátvitel és a szorongás kapcsolata már régóta kutatott (Brioni és mtsai., 1993; Carrasco és mtsai., 2006). Nagy dózisu nikotin adagolás, illetve az $\alpha 7$ nACh-receptor szelektív agonista (PNU-282987) jelentősen fokozta a szorongással kapcsolatos viselkedés kifejeződését patkányban (Ouagazzal és mtsai., 1999; Pandya és Yakel, 2013). Mindemellett különböző nikotinos-ACh-receptor gátlással kapcsolatban kimutatták, hogy a C57Bl/6j egér törzsből szignifikáns mértékben növeli az EPM teszt során a nyitott karok látogatásának idejét, ami a receptor antagonizmus és a szorongás oldódás szoros kapcsolatára utal (Roni és Rahman, 2011). Ezenfelül az NMDA receptor legkülönbözőbb gátlásával kapcsolatban is számtalanszor igazolták, hogy szorongás csökkentő hatású, amit többek között EPM teszttel mutattak ki (Ates-Alagoz és Adejare, 2013; Corbett és Dunn, 1993; Guimarães és mtsai., 1991; Poleszak és mtsai., 2011). Végezetül, egy depresszív viselkedést vizsgáló kísérletsorozat során kimutatták, hogy az intenzív szorongást mutató egyedekben az agyi KYNA-szint rendkívül alacsony (Laugeray és mtsai., 2011). **Ezek alapján azt feltételezzük, hogy a fokozódó szorongásoldódás hátterében az agyi KYNA-koncentráció növekedéssel járó, egyre intenzívebb és kiterjedtebb receptorgátló hatások állnak.**

7.2 Szöveti változások

Az egyszeri, nagy dózisu (300 mg/ttkg) i.p. L-KYNs kezelés minden vizsgált viselkedési paramétert jelentős mértékben befolyásolt. Ez sejtszinten a c-Fos fehérje kifejeződésének csökkenéseként nyilvánult meg a striátum és a hippokampusz régiókban. A c-Fos a közvetlen

korai gének családjába tartozó transzkripciós faktor, ami az idegtudományban általánosan elterjedt, mint neuronális aktivitási marker. A c-Fos fehérje a fokozott serkentő neurotranszmisszió hatására behatol a posztszinaptikus neuron sejtmagjába, ahol többek között a hosszú távú szinaptikus potencirozódás kialakításához szükséges gének átíródását segíti (Kaczmarek, 2002). A *c-fos* génexpresszió egyik legfontosabb szabályzója az intracelluláris Ca^{2+} -szint változás. Az aktivitásfüggő szinaptikus plaszticitás kulcslépése az AMPA és a Ca^{2+} -permiábilis NMDA receptorok aktiválódása (Rebola és mtsai., 2010), valamint a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák nyílása. Ezenfelül számos integratív működés során jelentős szerepe lehet az $\alpha 7nACh$ receptornak, ami szintén mutat Ca^{2+} -permeabilitást (Mishima és mtsai., 2000; Séguéla és mtsai., 1993). Patkány hippocampális idegsejt-kultúra vizsgálatokból jól ismerjük, hogy az NMDA és a nem-NMDA glutamát receptorok aktiválása, gyors és markáns intracelluláris Ca^{2+} -szint fokozódást eredményez. Ez a Ca^{2+} -koncentráció változás egyúttal erős pozitív korrelációt mutat a *c-fos* mRNS szintjével (Lerea és mtsai., 1992). Ismeretes továbbá, hogy a nem-osztódó neuronális PC12 sejtvonalon a nikotinos-acetilcolin-receptorok szelektív aktiválásával gyors intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedés és *c-fos* mRNS fokozódás indukálható (Greenberg és mtsai., 1986). Összességében elmondható, hogy a c-Fos fehérje expressziós szintje rendkívül jól kíséri az idegi aktivitás változását, legyen az fiziológias ingerre bekövetkező, vagy patológiásra. Rövid féléletidejének köszönhetően (30-90 perc) pedig igen jól tükrözi az aktuális idegrendszeri állapotot (Kaczmarek, 2002). Ugyan transzkripciós hatásai rendkívül szerteágazóak lehetnek, az idegi aktivitásra való fokozott érzékenysége, valamint dinamikus megjelenése és lebomlása révén általánosan elterjedt, mint neuronális aktivitás marker. Az idegrendszer állandó plasztikus működése folytán a c-Fos fehérje alap, agyi expressziós-szintje a hálózati aktivitás függvényében meglehetősen heterogén (Sagar és mtsai., 1988). A magas integratív funkciókat ellátó területeken, mint amilyen a hippocampusz vagy a striátum, általánosan magasabb c-Fos expressziós-szint mutatható ki.

Egyértelmű kapcsolat áll fent a hippocampális c-Fos expresszió változás és a memória konszolidáció között (Vanelzakker és mtsai., 2011). A hippocampusz CA1 régió piramis sejtjeinek működése nélkülözhetetlen a térbeli tájékozódás és az epizodikus memória funkció kialakulásában, különös tekintettel az emléknymok (engram) kialakítására (Battaglia és mtsai., 2011). Rágcsálókban a hippocampusz épsége kritikus a NOR teszt teljesítésében (Cohen és mtsai., 2013). A terület c-Fos expressziós-szintjének csökkenése jól összhangba hozható a hippocampusz működésének zavarával, így az epizodikus memória teljesítmény romlással. A

bazális ganglion működése és a c-Fos kapcsolata úgyszintén nyilvánvaló (Freeze és mtsai., 2013). A dorzális striátumból projektáló közepes-méretű tüskés neuronok normális működése alapvető a mozgás kezdeményezés, mozgási aktivitás és sebesség szabályozásában (Yin, 2014). A terület c-Fos expressziós-szintjének csökkenése ezáltal jól összhangba hozható a lokomotoros aktivitás zavarával. Az emocionális szabályozásért alapvetően a limbikus rendszer felel. A szorongással kapcsolatos viselkedésváltozások azonban ritkán vezethetők vissza egyetlen agyterület aktivitásának változására. Sokkal inkább multifaktoriális eredetű, amely során számos agyterület érintett, úgy mint: a hippokampusz, az amigdala, a cinguláris kéreg, a putamen, vagy a különböző asszociációs agykérgi területek (Troakes és Ingram, 2009). Ezért az EPM szorongással kapcsolatos viselkedési eredményeinkhez c-Fos vizsgálatot nem társítottunk.

A kinurenerg-manipuláció c-Fos expressziót mérséklő hatását már számos korábbi tanulmány igazolta. Így többek között az L-KYN adagolás szignifikáns mértékben csökkentette a principális trigeminális magcsoport c-Fos szintjének fokozódását a különböző kísérletes módon előidézett migrénmodellekben (Knyihár-Csillik és mtsai., 2007a, 2007b). Ezenkívül egy hiperalgéziás-patkánymodellben, az intraplantáris KYNA-adagolás szignifikáns módon csökkentette a spinális (L₄-L₅) c-Fos⁺-sejtek számát (Zhang és mtsai., 2003). A kinurenerg-manipuláció hatását az alap c-Fos fehérje expresszióra azonban korábban még nem vizsgálták. Jóllehet a fokozott agyi KYNA-koncentráció a neurotranszmisszióra gyakorolt összetett hatásai révén nemcsak a neurális hálózati működést és a viselkedést befolyásolja, hanem jelentős hatással bírhat az idegsejtek génexpressziós mintázatára is.

A nagy dózisu L-KYNs kezelés mellett, hogy torzította az egerek mozgás kezdeményezését és sebességét, irreguláris mozgásmintázatot idézett elő, valamint szignifikáns mértékben mérsékelte a c-Fos⁺-sejtek számát a dorzális striátum területén. Az akaratlagos mozgásszervezés és a sebesség kontroll a szenzomotoros kéreg és a bazális ganglion összeköttetéseitől és összehangolt hálózati működésétől függ. A dorzális striátum dopamin-szintjének fluktuációja ugyanis finomhangol egy referencia jelet, ami a mozgás sebességét határozza meg, a kéregből érkező glutamaterg bemenetek intenzitásának befolyásolásán keresztül (Beninger és Olmstead, 2000; Bonsi és mtsai., 2011; Yin, 2014). A dorzális striátum dopamin-szintjének kísérletes manipulálása a mozgás kezdeményezés és sebesség torzulását okozza rágcsálókban. Ez alapján világos, hogy a dorzális striátum a mozgás időzítésében és kezdeményezésében alapvető fontossággal bír (Cousins és mtsai., 1993; Yin, 2014). A striátumban már nanomoláris KYNA-szint fokozódás is jelentősen csökkentette a

régió dopamin-koncentrációját éber patkányokban, a preszinaptikus glutamát felszabadulás gátláson keresztül (Bonsi és mtsai., 2011; Rassoulpour és mtsai., 2005). Ebből adódóan feltételezhető, hogy az L-KYNs kezelt állatokban **a dorzális striátum csökkent c-Fos expressziója jelezheti a terület glutamáterg bemenetének mérséklődését és a régió neuronális aktivitásának csökkenését, ami a lokomotoros aktivitás megváltozásával, valamint az abnormális mozgásmintázattal jól párhuzamba állítható.**

A nagy dózisu L-KYNs kezelés egyrészt zavarja a tárgyfelismeréshez szükséges epizodikus memória funkciót, másrészt szignifikáns mértékben csökkentette a c-Fos expressziót a hippokampusz CA1 régió piramis sejtek rétegében. Hippokampális *in vitro* elektrofiziológiai mérésekből jól ismert, hogy a KYNA-szint fokozódás gátolja a CA1 régió glutamáterg bemenetének intenzitását, ami főként az $\alpha 7$ nACh-receptoron kifejtett antagonistá hatásának következménye (Banerjee és mtsai., 2012). Ezenkívül a KYNA a kolinerg bemenetek mérséklésén keresztül képes csökkenteni a CA1 stratum radiatum interneuronok ingerlékenységét, ezáltal pedig a piramis sejtekre érkező GABAerg jelátvitel intenzitását (Alkondon és mtsai., 2011). A CA1 régió normális interneuronális működése kritikus számos tanulási és memória folyamat kialakításában (Chalovich és Eisenberg, 2005). Elektrofiziológiai tanulmányok sora bizonyítja, hogy a CA1 régió NMDA-receptor működése nélkülözhetetlen a szinaptikus plaszticitás különböző formáinak kialakításához (Tsien és mtsai., 1996). Egy hippokampusz CA1 régió specifikus NMDA-receptor ko törzsben a térbeli orientáció és memória funkciók zavara figyelhető meg (McHugh és mtsai., 1996). Ezenkívül kimutatták, hogy a hippokampális neuronok posztzinaptikus membrán felületén az $\alpha 7$ nACh receptor és az NMDA receptor komplexeket alkotnak. Ez a speciális kapcsolat pedig az egérben kulcsfontosságú a tárgyfelismerési epizodikus memória működéséhez (Li és mtsai., 2013). **Ezek alapján feltételezhető , hogy a CA1 régió piramis sejtek rétegében a redukált c-Fos expresszió jelezheti a fokozott KYNA koncentráció következtében mérséklődő neurális hálózati aktivitást, ami a NOR teljesítménybeli romlással jól párhuzamba állítható.**

Érdekes, hogy már az egyszeri L-KYNs kezelés jelentősen mérsékelte a c-Fos fehérje kifejeződését a különböző integratív funkciókat ellátó kéreg alatti agyterületeken. Az eredményeink alapján tehát azt feltételezzük, hogy **a KYNA-szint markáns növekedése a transzkripciós szabályozás megváltoztatásán keresztül is képes lehet az agyi plasztikus folyamatok befolyásolására**, ezzel rövid és hosszú távú viselkedésváltozásokat idézve elő.

7.3 Keringési változások

Kísérleteink során kimutattuk, hogy az egyszeri magas koncentrációjú (300 mg/ttkg) i.p. L-KYNs kezelés átmeneti csökkenéseket okozott az izoflurán-altatott egerek nyugalmi agykérgi vérátáramlásában úgy, hogy az eközben a szisztémás vérnyomást jelentős mértékben nem befolyásolta. A CBF mérséklődés tehát az agyi autoreguláció hibájára nem vezethető vissza. A kapott eredményeink látszólag nincsenek összhangban a korábbi L-KYN kezeléssel kapcsolatos értágító, illetve vérnyomáscsökkentő megfigyelésekkel (Sas és mtsai., 2003; Wang és mtsai., 2010). Az eltérés hátterében számos mechanizmus állhat: kezdve az eltérő koncentrációban alkalmazott L-KYN-től, a fajok közti heterogenitáson át, az altatás különbözőségéig. Méréseink során végig törekedtünk arra, hogy az izoflurán altatógáz koncentrációját olyan alacsony szinten tartsuk (~1%), aminek keringési mellékhatásai minimálisak (Janssen és mtsai., 2004). Ugyanakkor a szinergistaként használt N₂O vivőgázzal együtt már elképzelhető, hogy elfedte az L-KYN esetleges vérnyomáscsökkentő hatását (DiSesa és mtsai., 1987). Másrészt ezt a hatást csak szisztémás gyulladás, illetve hipertenzió során figyelték meg (Kwok és mtsai., 2002; Wang és mtsai., 2010). Ezért joggal feltételezhető, hogy egészséges felnőtt állatokban az L-KYN-szint változásnak a szisztémás vérnyomásra egyáltalán nincs befolyása.

Egy korábbi tanulmány során kimutatták, hogy az L-KYN alacsony dózisu intravénás adagolása (1 mg/ttkg) a nyugalmi CBF fokozódását váltotta ki éber nyulakban (Sas és mtsai., 2003). A jelenleg bemutatott eredményeink ezzel ellentétesek, hiszen altatott egerekben a magas koncentrációjú L-KYNs kezelés a nyugalmi CBF átmeneti mérséklődését okozta. Ahogy azt a viselkedés tesztek eredményeiből is jól láthattuk, a kinurenerg-manipulációt követő dóziszfüggő válaszok rendkívül változatosak lehetnek, így esetenként akár ellentétesek egymással. A KYNA neuromodulátoros befolyásaival kapcsolatosan is ismeretes ellentétes dóziszfüggő válasz. Alacsonyabb koncentrációban a szinaptikus aktivitás serkentése, addig magasabb koncentrációban a posztzinaptikus-válaszok gátlása figyelhető meg, amiért részben az AMPA receptoron kifejtett kettős hatás tehető felelőssé (Prescott és mtsai., 2006; Rózsa és mtsai., 2008). Ennélfogva okszerű az L-KYN, illetőleg a KYNA-szint fokozódás és a CBF változások között nem lineáris dóziszfüggő kapcsolatot feltételezni.

Kísérleti körülményeink a KYNA átalakulásnak kedveztek, egyúttal az L-KYNs beadását követő két és fél órás nyomon követés folyamán egyéb downstream kinurenin metabolit szintjében is bekövetkezhetett különböző mértékű fokozódás. A szakirodalom alapján azonban

nincs okunk feltételezni, hogy az L-KYN-en vagy a KYNA-on kívül bármelyik másik kinurenin metabolit hatással lehetne a vérkeringés szabályozására. Ezen kívül a CBF áramlás-csökkenések az L-KYNs beadását követő 60-120 percben jelentkeztek. Ez az időablak tökéletesen megfelel az L-KYN agyi penetrációjának és a KYNA *de novo* szintézisének. A többi downstream metabolit szignifikáns mértékű felhalmozódásához viszont kevés (Swartz et al., 1990; Zmarowski et al., 2009). **Következésképpen a tapasztalt CBF diszregulációt az emelkedett agyi extracelluláris KYNA-koncentráció következményének tulajdoníthatjuk.** Miközben a KYNA-szint fokozódással járó receptorszintű hatások, sejtszintű következmények, neurotranszmitter-szintbeli változások, illetve az ezek eredményeként kialakuló viselkedésmintázatbeli eltérések az intenzív kísérletes kutatómunkáknak köszönhetően egyre inkább feltártak, kapcsolataik egyre jobban megértettek (Schwarcz, 2016; Schwarcz és mtsai., 2012; Vécsei és mtsai., 2013), addig az érátmérő-változásokhoz vezető folyamatok a mai napig tisztázatlanok. Jóllehet számos jelátviteli úton keresztül képes lehet az extracelluláris KYNA-szint fokozódás befolyásolni az agyi vérátáramlást.

In vitro érpreparátum vizsgálat során kimutatták, hogy az agykérgi arteriolák működőképes Mg^{2+} -érzékeny NMDA receptort expresszálnak az endotéliális felszínükön (LeMaistre és mtsai., 2012). A KYNA kötődése a receptorhoz gátolta a glutamát-indukált, endotéliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS)-függő vazodilatációt (LeMaistre és mtsai., 2012). Jóllehet, e jelátvitel szerepét *in vivo* eddig még nem igazolták. Emellett valószínűsíthető, hogy csak olyan patológiás körülmények során lép érvényre, amikor az extracelluláris glutamát-szint kórosan megemelkedik (ischaemia, epilepszia). Ettől függetlenül kísérleti modellünkben az endotéliális NMDA-receptorok gátlódása a megemelkedett KYNA-koncentráció következtében egészen valószínű. A perifériás L-KYN-metabolizáció során ugyanis, jelentős mennyiségű KYNA keletkezik, ami a vérkeringésbe kerülve elegendő a receptorok tartós gátlásához. Tekintettel arra, hogy a nyugalmi CBF szabályozás egyik központi szereplője az eNOS-függő vazodilatáció (Attwell és mtsai., 2010), **elképzeltető, hogy az általunk látott hipoperfúziós CBF változások hátterében az eNOS-jelátvitel közvetett befolyásolása szerepel.**

Számos asztrocita-eredetű vazodilatátor prosztaglandin szintézisének és felszabadulásának irányítója az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változás (Attwell és mtsai., 2010; Howarth, 2014). Az agykérgi perivaszkuláris asztrociták felszínén található többek között nem-neuronális, Mg^{2+} -érzékeny NMDA receptor (Lalo és mtsai., 2006) és GPR35 (Moroni és mtsai., 2012). A KYNA kötődése a receptorokhoz egyaránt képes csökkenteni az intracelluláris Ca^{2+} -szintet. Ennek következtében elképzeltető, hogy mérséklődik a vazoaktív arachidonsav

metabolitok szintézise és károsodik a CBF szabályozás. Az asztrocitákra ugyanis a gyakori spontán Ca^{2+} hullámzás következtében jellemző a magas alap intracelluláris Ca^{2+} -szint (Haustein és mtsai., 2014). Ennek köszönhetően a klasszikus, fázisos érátmérő szabályozás mellett fontos szereplőivé válnak a nyugalmi értónusos szabályozásnak is (Rosenegger és mtsai., 2015). Patkány szenzorimotoros kérgi területéről készített koronális agyszeleteken, a perivaszkuláris asztrociták intracelluláris Ca^{2+} -szintjének megkötése a szomszédos arteriolák átmérőjének csökkenéséhez, azaz vazokonstrikciónhoz vezetett (Rosenegger és mtsai., 2015). Ezt a hatást egyedül a ciklooxygenáz enzimek gátlásával lehetett megakadályozni, tehát a változás prosztaglandin-függő. Hasonló vazokonstrikciónt éber egérben is sikerült reprodukálniuk, még hozzá az asztrocitában konstitutív-termelő ciklooxygenáz-1 enzim szelektív gátlásával (Rosenegger és mtsai., 2015). Ráadásul a ciklooxygenáz-1 enzim farmakológiai gátlása hasonló intenzitású (21 ± 4 %) CBF-csökkenést eredményezett uretán-altatott egér parietális kérgében, mint amiket mi is tapasztaltunk (Niwa és mtsai., 2001). Ezek alapján feltételezhetnénk, hogy a nagy dózisú L-KYNs-adagolást követő **CBF hipoperfúziós-tranziensek háttérében az asztrocita tónusos aktivitásának csillapítása, illetve a vazodilatátor arachidonsav metabolitok szintjének csökkenése áll.**

Érdekes azonban, hogy az agyfelszínre közvetlenül rámosott KYNA nem befolyásolta a halotánal altatott patkány nyugalmi cerebelláris CBF-ét (Li és Iadecola, 1994), sem az α -kloralózzal altatott újszülött malac piális arterioláinak átmérőjét (Bari és mtsai., 2006). Ugyanakkor az NMDA-receptor-függő vazodilatációt és hiperémiát dózisfüggő módon csökkentette mindkét kísérlet során (Bari és mtsai., 2006; Li és Iadecola, 1994). Mindamellet érdemes megjegyezni, hogy a kísérletek közötti különbségek számos okból fakadhatnak: anatómia (cerebellum vagy cerebrum); életkor (újszülött vagy felnőtt); faj (rágcsáló vagy malac), illetve az anyag bejuttatásának módja (periféria vagy topikális). Az általunk tapasztaltakhoz hasonló nyugalmi CBF-csökkenésekről számoltak be NMDA-receptor antagonistá MK-801 iv adagolását követően, halotán-altatott patkány szenzorimotoros kérgét vizsgálva (Park és mtsai., 1989). Ezek a megfigyelések megerősítik azt az elképzelést, miszerint a KYNA-indukált hipoperfúzió egyik támadáspontja az NMDA-receptor gátláson keresztül valósul meg. A lehetséges mechanizmusokat már részben taglaltunk (nem neuronális NMDA-receptorok). **A szakirodalom alapján elképzelhető, hogy az agyban nagy mennyiségben keletkező KYNA, a neuronális NMDA-receptorok gátlásán keresztül, általánosan mérsékeli az idegi működést, csendesítve az agyi hálózati aktivitást és glükóz metabolizációt.** Ennek következtében jelentősen mérséklődik a vazodilatáns metabolitok

szintje, aminek eredményeként lecsökken, illetve erősen fluktuál a nyugalmi CBF (Attwell és mtsai., 2010; Bari és mtsai., 2006; Birch és mtsai., 1988; Busija és mtsai., 2007; Péter és Benyó, 2016; Schwarcz, 2016; Schwarcz és mtsai., 2012). Ezt az elképzelést támasztja alá az a megfigyelés, hogy az agykamrába juttatott KYNA mérsékelten depresszálja az elektrokorikogram aktivitást, altatott patkányban (Yokoi és mtsai., 1998). Kimutatták, hogy a patkány szomatoszenzoros kéreg neuronális aktivitásának csökkenése jól korrelál a piális arteriolák vazokonstrikciónak (Devor és mtsai., 2007). Ennek függvényében feltehetnénk a kérdést, hogy: a kezelés következtében kialakuló agykérgi vérátáramlás-csökkenések tükrözhetik-e az agykérgi neurális hálózati működés és metabolizmus mérséklődését? Ennek megválaszolásához azonban, a szöveti oxigén- és glükózfelhasználást, valamint a kérgi aktivitást vizsgáló kísérletsorozatot kellene kivitelezni.

A KYNA-indukált CBF hipoperfúziós tranziensek mindkét agyféltekén egyszerre alakultak ki, ami inkább enged a KYNA-fokozódásra kialakuló globális hatásra következtetni, mint a mikrocirkulációs szabályozásban fellépő lokális mechanizmusra. Limitáló tényező volt természetesen, hogy a CBF-változásokat csak a kamerára merőleges síkban, a koponya dorzális felszínéről, azon belül is a parietális kéreg területéről gyűjtöttük. Ettől függetlenül számításba kell venni annak a lehetőségét, hogy valamilyen kéreg alatti neuronális bemenet perivaszkuláris szabályzó mechanizmusán keresztül megvalósuló kiterjedt hatást láttunk. A parietális kéreg bőséges bemenetei közül a bazális előagy Meynert magcsoportból felszálló kolinerg rostok azok, amik az egész parietális kérget diffúzan ellátják (Hamel, 2006). Efferens rostjai gazdagon innerválnak piális arteriolákat, nitrogén-monoxid szintáz (NOS) és neuropeptid Y (NPY)-immunopozitív interneuronokat, valamint perivaszkuláris asztrocitákat (Sato és mtsai., 2002). E felszálló kéreg alatti pálya tónusos aktiválása nikotinos-acetil-kolin-receptor mediált vazodilatációt és CBF-fokozódást okoz a kéregben. A kolinerg-neuronok szelektív inaktiválása pedig szignifikáns globális hipoperfúzióhoz (24-40%) vezet a kéreg egészén, legjelentősebb mértékben a poszterior parietális és temporális kérgi területeken (Waite és mtsai., 1999). A KYNA-ról tudjuk, hogy szignifikáns mértékben képes csökkenteni a prefrontális kéreg kolinerg bemenetét azzal, hogy gátolja az acetilkolin felszabadulását a kolinerg terminálisokból, valamint gátolja az α_7 nACh receptorokon keresztül megvalósuló posztszinaptikus kolinerg hatást (Zmarowski és mtsai., 2009). **Ezek alapján elképzelhető, hogy a fokozott agyi KYNA-szint csökkenti a bazális előagy agykérgi kolinerg bementének intenzitását, ami a tapasztalt CBF hipoperfúziós áramlás-változásokat eredményezi.**

8. Következtetések

Eredményeink rövid összefoglalása és a belőlük levonható következtetések

Kísérleteink során az agyi KYNA-szint fokozódás magatartási, szövettani és vérátáramlási hatásait mértük fel, C57Bl/6j egér törzsben.

Célkitűzés 1-re kapott eredmények:

Igazoltuk az egyszeri L-KYNs kezelés lokomotoros explorációs aktivitást befolyásoló hatását egerekben. Bizonyítottuk, hogy a mérsékelt dózisú kezelés a patkányokhoz hasonló lokomotoros aktivitás depresszálo hatású egerekben is. Kimutattuk továbbá, hogy a dózis fokozással a mérsékelt NMDA-receptor gátlással analóg hiperaktív mozgásmintázat válik dominánssá. Ezzel feltártuk az L-KYN-dózis és a mozgásiaktivitás közötti nem lineáris kapcsolatot.

Célkitűzés 2-re kapott eredmények:

Igazoltuk az egyszeri L-KYNs kezelés amnesztikus hatását egerekben. Kimutattuk, hogy az alacsony dózisú kezelés nem befolyásolja az epizodikus memóriát, míg a mérsékelt dózisú kezeléstől kezdve már amnesztikus hatással is számolni kell. Ez a hatás a vizsgálataink során függetlennek bizonyult a szenzorimotoros és motivációs érintettségétől.

Célkitűzés 3-ra kapott eredmények:

Igazoltuk az egyszeri L-KYNs kezelés szorongásoldó hatását egerekben. Kimutattuk, hogy ez hatás a dózis növeléssel egyenes arányos, és a lokomotoros befolyástól részben független.

Célkitűzés 4-re kapott eredmények:

Kimutattuk, hogy az egyszeri nagy dózisú L-KYNs kezelés csökkenti az alap c-Fos expresszió mértékét a dorzális striátum és a hippocampusz CA1 régió területén. Ezzel rávilágítottunk arra, hogy a KYNA markáns fokozódása a transzkripciós szabályozás megváltoztatásán keresztül is képes lehet az agyi plasztikus folyamatok befolyásolására, ezzel idézve elő rövid és hosszú távú viselkedésváltozásokat. Ezenkívül, az itt bemutatott módszertan értékes alapot szolgálhat a kinurenin manipulációval kapcsolatos jövőbeni kísérletekhez.

Célkitűzés 5-re kapott eredmények:

Kimutattuk, hogy az egyszeri nagy dózisú L-KYNs kezelés mérsékelt CBF áramláscsökkenéseket okoz a szisztémás vérnyomás befolyásolása nélkül. A kinurenin-manipulációval kapcsolatos vizsgálatok között az L-KYNs kezelés CBF mérséklő hatása újszerű. Eredményeink alapján egyértelmű, hogy a kinurenin-manipulációval kapcsolatos beavatkozások során számolni kell annak keringésre gyakorolt hatásával is.

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 is, átfogó dózis-hatás tanulmány a témában korábban még nem készült. Az eredményeink alapján világosan látszik, hogy a mérsékelt dózisú 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.**

9. 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 munkámat.

Köszönöm Vécsei László Professzornak, hogy támogatta munkacsoportunk kinureninével 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 Kutatócsoport minden tagjának a vidám légkört, a sok-sok támogatást, segítséget és hasznos tanácsot. Köszönöm Bódog Zitának, Herédi Juditnak és Gyengéné Ruszka 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, biztattak és átsegítettek a nehéz pillanatokon.

10. Irodalomjegyzék

1. Albuquerque, E. X., és Schwarcz, R. (2013). Kynurenic acid as an antagonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the brain: facts and challenges. *Biochem. Pharmacol.* 85, 1027–32. doi:10.1016/j.bcp.2012.12.014.
2. Alexander, K. S., Wu, H. Q., Schwarcz, R., és Bruno, J. P. (2012). Acute elevations of brain kynurenic acid impair cognitive flexibility: Normalization by the $\alpha 7$ positive modulator galantamine. *Psychopharmacology (Berl)*. 220, 627–637. doi:10.1007/s00213-011-2539-2.
3. Alkondon, M., Pereira, E. F. R., és Albuquerque, E. X. (2011). Endogenous activation of nAChRs and NMDA receptors contributes to the excitability of CA1 stratum radiatum interneurons in rat hippocampal slices: Effects of kynurenic acid. *Biochem. Pharmacol.* 82, 842–851. doi:10.1016/j.bcp.2011.06.004.
4. Alkondon, M., Pereira, E. F. R., Todd, S. W., Randall, W. R., Lane, M. V, és Albuquerque, E. X. (2015). Functional G-protein-coupled receptor 35 is expressed by neurons in the CA1 field of the hippocampus. *Biochem. Pharmacol.* 93, 506–519. doi:10.1016/j.bcp.2014.12.009.
5. Alkondon, M., Pereira, E. F. R., Yu, P., Arruda, E. Z., Almeida, L. E. F., Guidetti, P., és mtsai. (2004). Targeted deletion of the kynurenine aminotransferase ii gene reveals a critical role of endogenous kynurenic acid in the regulation of synaptic transmission via $\alpha 7$ nicotinic receptors in the hippocampus. *J. Neurosci.* 24, 4635–48. doi:10.1523/JNEUROSCI.5631-03.2004.
6. Allegrì, G., Bertazzo, A., Biasiolo, M., Costa, C. V. L., és Ragazzi, E. (2003). Kynurenine pathway enzymes in different species of animals. *Adv. Exp. Med. Biol.* 527, 455–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15206763>.
7. Amori, L., Guidetti, P., Pellicciari, R., Kajii, Y., és Schwarcz, R. (2009). On the relationship between the two branches of the kynurenine pathway in the rat brain in vivo. *J. Neurochem.* 109, 316–25. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05893.x.
8. Assini, F. L., Duzzioni, M., és Takahashi, R. N. (2009). Object location memory in mice: Pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behav. Brain Res.* 204, 206–211. doi:10.1016/j.bbr.2009.06.005.
9. Ates-Alagoz, Z., és Adejare, A. (2013). NMDA Receptor Antagonists for Treatment of Depression. *PharmaceuticalsZ.A.-A* 6, 480–499. doi:10.3390/ph6040480.
10. Attwell, D., Buchan, A. M., Charkpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B. a, és Newman, E. a (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468, 232–243. doi:10.1038/nature09613.
11. Ayata, C., Dunn, A. K., Gursoy-Özdemir, Y., Huang, Z., Boas, D. A., és Moskowitz, M. A. (2004). Laser Speckle Flowmetry for the Study of Cerebrovascular Physiology in Normal and Ischemic Mouse Cortex. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 744–755. doi:10.1097/01.WCB.0000122745.72175.D5.
12. Banerjee, J., Alkondon, M., és Albuquerque, E. X. (2012). Kynurenic acid inhibits glutamatergic transmission to CA1 pyramidal neurons via $\alpha 7$ nAChR-dependent and -independent mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* 84, 1078–1087. doi:10.1016/j.bcp.2012.07.030.
13. Baran, H., Jellinger, K., és Deecke, L. (1999). Kynurenine metabolism in Alzheimer’s disease. *J. Neural Transm.* 106, 165–181. doi:10.1007/s007020050149.
14. Baran, H., és Schwarcz, R. (1993). Regional differences in the ontogenetic pattern of kynurenine aminotransferase in the rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 74, 283–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8403387>.
15. Bari, F., Nagy, K., Guidetti, P., Schwarcz, R., Busija, D. W., és Domoki, F. (2006). Kynurenic acid attenuates NMDA-induced pial arteriolar dilation in newborn pigs. *Brain Res.* 1069, 39–46. doi:10.1016/j.brainres.2005.11.033.
16. Battaglia, F. P., Benchenane, K., Sirota, A., Pennartz, C. M. A., és Wiener, S. I. (2011). The hippocampus: Hub of brain network communication for memory. *Trends Cogn. Sci.* 15, 310–318. doi:10.1016/j.tics.2011.05.008.
17. Beal, M. F., Matson, W. R., Storey, E., Milbury, P., Ryan, E. A., Ogawa, T., és mtsai. (1992). Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington’s disease cerebral cortex. *J. Neurol. Sci.* 108, 80–87.

doi:10.1016/0022-510X(92)90191-M.

18. Beal, M. F., Matson, W. R., Swartz, K. J., Gamache, P. H., és Bird, E. D. (1990). Kynurenine pathway measurements in Huntington's disease striatum: evidence for reduced formation of kynurenic acid. *J. Neurochem.* 55, 1327–1339. doi:10.1111/j.1471-4159.1990.tb03143.x.
19. Beggiato, S., Tanganelli, S., Fuxe, K., Antonelli, T., Schwarcz, R., és Ferraro, L. (2014). Endogenous kynurenic acid regulates extracellular GABA levels in the rat prefrontal cortex. *Neuropharmacology* 82, 11–18. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.02.019.
20. Beninger, R., és Olmstead, M. (2000). „The role of dopamine in the control of locomotor activity and reward-related incentive learning”, in *Brain dynamics and the striatal complex.*, szerk. R. Miller és J. Wickens (Amsterdam: Harwood Academic Press), 29–50.
21. Berlinguer-Palmini, R., Masi, A., Narducci, R., Cavone, L., Maratea, D., Cozzi, A., és mtsai. (2013). GPR35 activation reduces Ca²⁺ transients and contributes to the kynurenic acid-dependent reduction of synaptic activity at CA3-CA1 synapses. *PLoS One* 8, e82180. doi:10.1371/journal.pone.0082180.
22. Bertaina-Anglade, V., Enjuanes, E., Morillon, D., és Drieu la Rochelle, C. (2006). The object recognition task in rats and mice: A simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 54, 99–105. doi:10.1016/j.vascn.2006.04.001.
23. Bessede, A., Gargaro, M., Pallotta, M. T., Matino, D., Servillo, G., Brunacci, C., és mtsai. (2014). Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature* 511, 184–190. doi:10.1038/nature13323.
24. Birch, P. J., Grossman, C. J., és Hayes, a G. (1988). Kynurenic acid antagonises responses to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 154, 85–87. doi:10.1016/0014-2999(88)90367-6.
25. Bonsi, P., Cuomo, D., Martella, G., Madeo, G., Schirinzi, T., Puglisi, F., és mtsai. (2011). Centrality of striatal cholinergic transmission in Basal Ganglia function. *Front. Neuroanat.* 5, 6. doi:10.3389/fnana.2011.00006.
26. Botting, N. P. (1995). Chemistry and Neurochemistry of the Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism. *Chem. Soc. Rev.* 24, 401–412. doi:10.1039/cs9952400401.
27. Braidy, N., Guillemin, G. J., és Grant, R. (2011). Effects of kynurenine pathway inhibition on NAD⁺ metabolism and cell viability in human primary astrocytes and neurons. *Int. J. Tryptophan Res.* 4, 29–37. doi:10.4137/IJTR.S7052.
28. Brioni, J. D., O'Neill, A. B., Kim, D. J., és Decker, M. W. (1993). Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze test. *Eur. J. Pharmacol.* 238, 1–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8405072>.
29. Brouns, R., és De Deyn, P. P. (2009). The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 111, 483–95. doi:10.1016/j.clineuro.2009.04.001.
30. Busija, D. W., Bari, F., Domoki, F., és Louis, T. (2007). Mechanisms involved in the cerebrovascular dilator effects of N-methyl-d-aspartate in cerebral cortex. *Brain Res. Rev.* 56, 89–100. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.05.011.
31. Campbell, B. M., Charych, E., Lee, A. W., és Möller, T. (2014). Kynurenines in CNS disease: Regulation by inflammatory cytokines. *Front. Neurosci.* 8, 1–22. doi:10.3389/fnins.2014.00012.
32. Carpenedo, R., Pittaluga, A., Cozzi, A., Attucci, S., Galli, A., Raiteri, M., és mtsai. (2001). Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release. *Eur. J. Neurosci.* 13, 2141–2147. doi:10.1046/j.0953-816X.2001.01592.x.
33. Carrasco, M. C., Vicens, P., Vidal, J., és Redolat, R. (2006). Effects of co-administration of bupropion and nicotinic agonists on the elevated plus-maze test in mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 30, 455–462. doi:10.1016/j.pnpbp.2005.11.018.
34. Chalovich, J. M., és Eisenberg, E. (2005). Learning increases intrinsic excitability of hippocampal interneurons. *Biophys. Chem.* 257, 2432–2437. doi:10.1523/JNEUROSCI.4068-12.2013.
35. Chess, A. C., és Bucci, D. J. (2006). Increased concentration of cerebral kynurenic acid alters stimulus processing and conditioned responding. *Behav. Brain Res.* 170, 326–332. doi:10.1016/j.bbr.2006.03.006.
36. Chess, A. C., Landers, A. M., és Bucci, D. J. (2009). L-kynurenine treatment alters contextual fear

- conditioning and context discrimination but not cue-specific fear conditioning. *Behav. Brain Res.* 201, 325–31. doi:10.1016/j.bbr.2009.03.013.
37. Chess, A. C., Simoni, M. K., Alling, T. E., és Bucci, D. J. (2007). Elevations of endogenous kynurenic acid produce spatial working memory deficits. *Schizophr. Bull.* 33, 797–804. doi:10.1093/schbul/sbl033.
 38. Christen, S., Peterhans, E., és Stocker, R. (1990). Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: Possible implication for inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 2506–2510. doi:10.1073/pnas.87.7.2506.
 39. Cohen, S. J., Munchow, A. H., Rios, L. M., Zhang, G., Ásgeirsdóttir, H. N., és Stackman, R. W. (2013). The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. *Curr. Biol.* 23, 1685–1690. doi:10.1016/j.cub.2013.07.002.
 40. Corbett, R., és Dunn, R. W. (1993). Effects of 5,7 dichlorokynurenic acid on conflict, social interaction and plus maze behaviors. *Neuropharmacology* 32, 461–6.
 41. Cosi, C., Mannaioni, G., Cozzi, A., Carl, V., Sili, M., Cavone, L., és mtsai. (2011). G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: Studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. *Neuropharmacology* 60, 1227–1231. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.11.014.
 42. Cousins, M. S., Sokolowski, J. D., és Salamone, J. D. (1993). Different effects of nucleus accumbens and ventrolateral striatal dopamine depletions on instrumental response selection in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46, 943–951. doi:10.1016/0091-3057(93)90226-J.
 43. Coyle, J. T. (2012). NMDA receptor and schizophrenia: A brief history. *Schizophr. Bull.* 38, 920–926. doi:10.1093/schbul/sbs076.
 44. Coyle, J. T., Tsai, G., és Goff, D. (2003). Converging Evidence of NMDA Receptor Hypofunction in the Pathophysiology of Schizophrenia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1003, 318–327. doi:10.1196/annals.1300.020.
 45. Dere, E., Huston, J. P., és De Souza Silva, M. a (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31, 673–704. doi:10.1016/j.neubiorev.2007.01.005.
 46. Devor, A., Tian, P., Nishimura, N., Teng, I. C., Hillman, E. M. C., Narayanan, S. N., és mtsai. (2007). Suppressed neuronal activity and concurrent arteriolar vasoconstriction may explain negative blood oxygenation level-dependent signal. *J. Neurosci.* 27, 4452–4459. doi:10.1523/JNEUROSCI.0134-07.2007.
 47. DiSesa, V. J., Mark, J. B., Gold, J. P., Kidwell, F., Shemin, R. J., Collins Jr., J. J., és mtsai. (1987). Nitrous oxide for blood pressure control after coronary artery surgery: a dose-response hemodynamic study in postoperative patients. *Ann Thorac Surg* 44, 189–191. doi:10.1016/S0003-4975(10)62039-5.
 48. Dobelis, P., Staley, K. J., és Cooper, D. C. (2012). Lack of modulation of Nicotinic Acetylcholine alpha-7 receptor currents by Kynurenic acid in adult hippocampal interneurons. *PLoS One* 7, 1–6. doi:10.1371/journal.pone.0041108.
 49. Erhardt, S., Blennow, K., Nordin, C., Skogh, E., Lindström, L. H., és Engberg, G. (2001). Kynurenic acid levels are elevated in the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. *Neurosci. Lett.* 313, 96–98. doi:10.1016/S0304-3940(01)02242-X.
 50. Filbrandt, C. R., Wu, Z., Zlokovic, B., Opanashuk, L., és Gasiewicz, T. A. (2004). Presence and functional activity of the aryl hydrocarbon receptor in isolated murine cerebral vascular endothelial cells and astrocytes. *Neurotoxicology* 25, 605–616. doi:10.1016/j.neuro.2003.08.007.
 51. Forrest, C. M., Khalil, O. S., Pizar, M., McNair, K., Kornisiuk, E., Snitcfsky, M., és mtsai. (2013). Changes in synaptic transmission and protein expression in the brains of adult offspring after prenatal inhibition of the kynurenine pathway. *Neuroscience* 254C, 241–259. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.09.034.
 52. Foster, A. C., White, R. J., és Schwarcz, R. (1986). Synthesis of Quinolinic Acid by 3-Hydroxyanthranilic Acid Oxygenase in Rat Brain Tissue In Vitro. *J. Neurochem.* 47, 23–30. doi:10.1111/j.1471-4159.1986.tb02826.x.
 53. Foster, A. C., Zinkand, W. C., és Schwarcz, R. (1985). Quinolinic Acid Phosphoribosyltransferase in Rat Brain. *J. Neurochem.* 44, 446–454. doi:10.1111/j.1471-4159.1985.tb05435.x.
 54. Freeze, B. S., Kravitz, A. V., Hammack, N., Berke, J. D., és Kreitzer, A. C. (2013). Control of basal ganglia output by direct and indirect pathway projection neurons. *J. Neurosci.* 33, 18531–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.1278-13.2013.

55. Fujigaki, S., Saito, K., Takemura, M., Fujii, H., Wada, H., Noma, A., és mtsai. (1998). Species differences in L-tryptophan-kynurenine pathway metabolism: quantification of anthranilic acid and its related enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 358, 329–335. doi:10.1006/abbi.1998.0861.
56. Fukui, S., Schwarcz, R., Rapoport, S. I., Takada, Y., és Smith, Q. R. (1991). Blood-Brain Barrier Transport of Kynurenines: Implications for Brain Synthesis and Metabolism. *J. Neurochem.* 56, 2007–2017. doi:10.1111/j.1471-4159.1991.tb03460.x.
57. Gál, E. M., és Sherman, a D. (1980). L-kynurenine: its synthesis and possible regulatory function in brain. *Neurochem. Res.* 5, 223–239. doi:10.1007/BF00964611.
58. Gellért, L., Knapp, L., Németh, K., Herédi, J., Varga, D., Oláh, G., és mtsai. (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.
59. Gigler, G., Szénási, G., Simó, A., Lévy, G., Hársing, L. G., Sas, K., és mtsai. (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. doi:10.1016/j.ejphar.2007.02.029.
60. Giorgini, F., Huang, S. Y., Sathyaikumar, K. V., Notarangelo, F. M., Thomas, M. A. R., Tararina, M., és mtsai. (2013). Targeted deletion of kynurenine 3-Monooxygenase in mice a new tool for studying kynurenine pathway metabolism in periphery and brain. *J. Biol. Chem.* 288, 36554–36566. doi:10.1074/jbc.M113.503813.
61. Goldstein, L. E., Leopold, M. C., Huang, X., Atwood, C. S., Saunders, A. J., Hartshorn, M., és mtsai. (2000). 3-Hydroxykynurenine and 3-Hydroxyanthranilic Acid Generate Hydrogen Peroxide and Promote a-Crystallin Cross-Linking By Metal Ion Reduction. *Biochemistry* 39, 7266–7275. doi:10.1021/bi992997s.
62. Greenberg, M. E., Ziff, E. B., és Greene, L. A. (1986). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* 234, 80–83. doi:10.1126/science.3749894.
63. Guidetti, P., Amori, L., Sapko, M. T., Okuno, E., és Schwarcz, R. (2007a). Mitochondrial aspartate aminotransferase: a third kynurenate-producing enzyme in the mammalian brain. *J. Neurochem.* 102, 103–111. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04556.x.
64. Guidetti, P., Eastman, C. L., és Schwarcz, R. (1995). Metabolism of [5-3H]kynurenine in the rat brain in vivo: evidence for the existence of a functional kynurenine pathway. *J. Neurochem.* 65, 2621–2632. doi:10.1046/j.1471-4159.1995.65062621.x.
65. Guidetti, P., Hoffman, G. E., Melendez-Ferro, M., Albuquerque, E. X., és Schwarcz, R. (2007b). Astrocytic localization of kynurenine aminotransferase II in the rat brain visualized by immunocytochemistry. *Glia* 55, 78–92. doi:10.1002/glia.20432.
66. Guidetti, P., Luthi-Carter, R. E., Augood, S. J., és Schwarcz, R. (2004). Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 17, 455–461. doi:10.1016/j.nbd.2004.07.006.
67. Guidetti, P., Wu, H. Q., és Schwarcz, R. (2000). In situ produced 7-chlorokynurenate provides protection against quinolinate- and malonate-induced neurotoxicity in the rat striatum. *Exp. Neurol.* 163, 123–30. doi:10.1006/exnr.1999.7284.
68. Guillemain, G. J. (2012). Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS J.* 279, 1356–1365. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08485.x.
69. Guillemain, G. J., Cullen, K. M., Lim, C. K., Smythe, G. A., Garner, B., Kapoor, V., és mtsai. (2007). Characterization of the kynurenine pathway in human neurons. *J. Neurosci.* 27, 12884–92. doi:10.1523/JNEUROSCI.4101-07.2007.
70. Guillemain, G. J., Kerr, S. J., Smythe, G. a, Smith, D. G., Kapoor, V., Armati, P. J., és mtsai. (2001). Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: A paradox for neuronal protection. *J. Neurochem.* 78, 842–853. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00498.x.
71. Guillemain, G. J., Smith, D. G., Smythe, G. A., Armati, P. J., és Brew, B. J. (2003). Expression of the kynurenine pathway enzymes in human microglia and macrophages. *Adv. Exp. Med. Biol.* 527, 105–12. doi:10.1007/978-1-4615-0135-0_12.
72. Guillemain, G. J., Smythe, G., Takikawa, O., és Brew, B. J. (2005a). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia* 49, 15–23. doi:10.1002/glia.20090.

73. Guillemin, G. J., Wang, L., és Brew, B. J. (2005b). Quinolinic acid selectively induces apoptosis of human astrocytes: potential role in AIDS dementia complex. *J. Neuroinflammation* 2, 16. doi:10.1186/1742-2094-2-16.
74. Guimarães, F. S., Carobrez, A. P., De Aguiar, J. C., és Graeff, F. G. (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. doi:10.1007/BF02244080.
75. Guo, J., Williams, D. J., Puhl, H. L., Ikeda, S. R., Iii, H. L. P., és Ikeda, S. R. (2008). Inhibition of N-Type Calcium Channels by Activation of GPR35 , an Orphan Receptor , Heterologously Expressed in Rat Sympathetic Neurons. *Alcohol* 324, 342–351. doi:10.1124/jpet.107.127266.
76. Hamel, E. (2006). Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J. Appl. Physiol.* 100, 1059–1064. doi:10.1152/jappphysiol.00954.2005.
77. Hammond, R. S., Tull, L. E., és Stackman, R. W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82, 26–34. doi:10.1016/j.nlm.2004.03.005.
78. Han, Q., Cai, T., Tagle, D. a, és Li, J. (2010). Structure, expression, and function of kynurenine aminotransferases in human and rodent brains. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 353–68. doi:10.1007/s00018-009-0166-4.
79. Han, Q., Robinson, H., Cai, T., Tagle, D. a, és Li, J. (2009). Biochemical and structural properties of mouse kynurenine aminotransferase III. *Mol. Cell. Biol.* 29, 784–93. doi:10.1128/MCB.01272-08.
80. Hardingham, G. E., és Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 682–696. doi:10.1038/nrn2911.
81. Harris, C. A., Miranda, A. F., Tanguay, J. J., Boegman, R. J., Beninger, R. J., és Jhamandas, K. (1998). Modulation of striatal quinolinic neurotoxicity by elevation of endogenous brain kynurenic acid. *Br. J. Pharmacol.* 124, 391–399. doi:10.1038/sj.bjp.0701834.
82. Haustein, M. D., Kracun, S., Lu, X. H., Shih, T., Jackson-Weaver, O., Tong, X., és mtsai. (2014). Conditions and constraints for astrocyte calcium signaling in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 82, 413–429. doi:10.1016/j.neuron.2014.02.041.
83. Heidelberger, C., és Gullberg, M. E. (1949). Tryptophan metabolism; concerning the mechanism of the mammalian conversion of tryptophan into kynurenine, kynurenic acid, and nicotinic acid. *J. Biol. Chem.* 179, 143–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18125967>.
84. Herédi, J., Berkó, A. M., Jankovics, F., Iwamori, T., Iwamori, N., Ono, E., és mtsai. (2016). Astrocytic and neuronal localization of kynurenine aminotransferase-2 in the adult mouse brain. *Brain Struct. Funct.*, 1–10. doi:10.1007/s00429-016-1299-5.
85. Hilmas, C., Pereira, E. F., Alkondon, M., Rassoulpour, A., Schwarcz, R., és Albuquerque, E. X. (2001). The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J. Neurosci.* 21, 7463–7473. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567036>.
86. Hinzman, J. M., Andaluz, N., Shutter, L. a, Okonkwo, D. O., Pahl, C., Strong, A. J., és mtsai. (2014). Inverse neurovascular coupling to cortical spreading depolarizations in severe brain trauma. *Brain* 137, 2960–2972. doi:10.1093/brain/awu241.
87. Howarth, C. (2014). The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow. *Front. Neurosci.* 8, 1–9. doi:10.3389/fnins.2014.00103.
88. Iaccarino, H. F., Suckow, R. F., Xie, S., és Bucci, D. J. (2013). The effect of transient increases in kynurenic acid and quinolinic acid levels early in life on behavior in adulthood: Implications for schizophrenia. *Schizophr. Res.* 150, 392–397. doi:10.1016/j.schres.2013.09.004.
89. IACUC staff Recommended Methods of Anesthesia , Analgesia , and Euthanasia for Laboratory Animal Species.
90. Iadecola, C., és Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat. Neurosci.* 10, 1369–1376. doi:10.1038/nn2003.
91. Ikonomidou, C., Stefovská, V., és Turski, L. (2000). Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12885–90. doi:10.1073/pnas.220412197.

92. Janssen, B. J. a, De Celle, T., Debets, J. J. M., Brouns, A. E., Callahan, M. F., és Smith, T. L. (2004). Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H1618-24. doi:10.1152/ajpheart.01192.2003.
93. Kaczmarek, L. (2002). „c-Fos in learning: beyond the mapping of neuronal activity”, in *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, szerk. L. Kaczmarek és H. A. Robertson (Stockholm), 189–215. doi:10.1016/S0924-8196(02)80019-7.
94. Kanai, M., Funakoshi, H., és Nakamura, T. (2010). Implication of tryptophan 2,3-dioxygenase and its novel variants in the hippocampus and cerebellum during the developing and adult brain. *Int. J. Tryptophan Res.* 3, 141–149. doi:10.4137/IJTR.S4372.
95. Kanai, M., Funakoshi, H., Takahashi, H., Hayakawa, T., Mizuno, S., Matsumoto, K., és mtsai. (2009). Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. *Mol. Brain* 2, 8. doi:10.1186/1756-6606-2-8.
96. Kapoor, R., Okuno, E., Kido, R., és Kapoor, V. (1997). Immuno-localization of kynurenine aminotransferase (KAT) in the rat medulla and spinal cord. *Neuroreport* 8, 3619–3623. doi:10.1097/00001756-199711100-00039.
97. Kapoor, V., Kapoor, R., és Chalmers, J. (1994). Kynurenic Acid, an Endogenous Glutamate Antagonist, in Shr and Wky Rats: Possible Role in Central Blood Pressure Regulation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 21, 891–896. doi:10.1111/j.1440-1681.1994.tb02460.x.
98. Kawai, J., Okuno, E., és Kido, R. (1988). Organ distribution of rat kynureninase and changes of its activity during development. *Enzyme* 39, 181–9. doi:10.1016/j.neuron.2014.12.009.
99. Kessler, M., Terramani, T., Lynch, G., és Baudry, M. (1989). A glycine site associated with N-methyl-D-aspartate acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. *J. Neurochem.* 52, 1319–1328.
100. Knyihár-Csillik, E., Toldi, J., Krisztin-Péva, B., Chadaide, Z., Németh, H., Fenyó, R., és mtsai. (2007a). Prevention of electrical stimulation-induced increase of c-fos immunoreaction in the caudal trigeminal nucleus by kynurenine combined with probenecid. *Neurosci. Lett.* 418, 122–126. doi:10.1016/j.neulet.2007.03.007.
101. Knyihár-Csillik, E., Toldi, J., Mihály, A., Krisztin-Péva, B., Chadaide, Z., Németh, H., és mtsai. (2007b). Kynurenine in combination with probenecid mitigates the stimulation-induced increase of c-fos immunoreactivity of the rat caudal trigeminal nucleus in an experimental migraine model. *J. Neural Transm.* 114, 417–421. doi:10.1007/s00702-006-0545-z.
102. Konradsson-Geuken, Å., Wu, H. Q., Gash, C. R., Alexander, K. S., Campbell, A., Sozeri, Y., és mtsai. (2010). Cortical kynurenic acid bi-directionally modulates prefrontal glutamate levels as assessed by microdialysis and rapid electrochemistry. *Neuroscience* 169, 1848–1859. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.05.052.
103. Kopp, C., Vogel, E., Rettori, M., Delagrange, P., Guardiola-Lemaître, B., és Misslin, R. (1998). Effects of a Daylight Cycle Reversal on Locomotor Activity in Several Inbred Strains of Mice. *Physiol. Behav.* 63, 577–585. doi:10.1016/S0031-9384(97)00491-5.
104. Kozak, R., Campbell, B. M., Strick, C. a., Horner, W., Hoffmann, W. E., Kiss, T., és mtsai. (2014). Reduction of Brain Kynurenic Acid Improves Cognitive Function. *J. Neurosci.* 34, 10592–10602. doi:10.1523/JNEUROSCI.1107-14.2014.
105. Kwok, J. B. J., Kapoor, R., Gotoda, T., Iwamoto, Y., Iizuka, Y., Yamada, N., és mtsai. (2002). A missense mutation in kynurenine aminotransferase-1 in spontaneously hypertensive rats. *J. Biol. Chem.* 277, 35779–35782. doi:10.1074/jbc.C200303200.
106. Lalo, U., Pnkratov, Y., Kirchoff, F., North, R. A., és Verkhratsky, A. (2006). NMDA Receptors Mediate Neuron-to-Glia Signaling in Mouse Cortical Astrocytes. *J. Neurosci.* 26, 2673–2683. doi:10.1523/JNEUROSCI.4689-05.2006.
107. Lapin, I. P. (1978). Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice. *J. Neural Transm.* 42, 37–43. doi:10.1007/BF01262727.
108. Lapin, I. P. (1998). Antagonism of kynurenic acid to anxiogens in mice. *Life Sci.* 63, PL231-6. doi:10.1016/S0024-3205(98)00404-4.
109. Laugeray, A., Launay, J.-M., Callebort, J., Surget, A., Belzung, C., és Barone, P. R. (2011). Evidence for a key role of the peripheral kynurenine pathway in the modulation of anxiety- and depression-like behaviours

- in mice: focus on individual differences. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 98, 161–8. doi:10.1016/j.pbb.2010.12.008.
110. LeMaistre, J. L., Sanders, S. a, Stobart, M., Lu, L., Knox, J. D., Anderson, H. D., és mtsai. (2012). Coactivation of NMDA receptors by glutamate and D-serine induces dilation of isolated middle cerebral arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 537–547. doi:10.1038/jcbfm.2011.161.
 111. Lerea, L. S., Butler, L. S., és McNamara, J. O. (1992). NMDA and non-NMDA receptor-mediated increase of c-fos mRNA in dentate gyrus neurons involves calcium influx via different routes. *J. Neurosci.* 12, 2973–2981.
 112. Li, J., és Iadecola, C. (1994). Nitric oxide and adenosine mediate vasodilation during functional activation in cerebellar cortex. *Neuropharmacology* 33, 1453–1461. doi:10.1016/0028-3908(94)90049-3.
 113. Li, S., Nai, Q., Lipina, T. V, Roder, J. C., és Liu, F. (2013). $\alpha 7$ nAChR/NMDAR coupling affects NMDAR function and object recognition. *Mol. Brain* 6, 58. doi:10.1186/1756-6606-6-58.
 114. Liddle, P. F., Friston, K. J., Frith, C. D., Hirsch, S. R., Jones, T., és Frackowiak, R. S. J. (1992). Patterns of cerebral blood flow in schizophrenia. *Br. J. Psychiatry* 160, 179–186. doi:10.1192/bjp.160.2.179.
 115. Lim, C. K., Smythe, G. A., Stocker, R., Brew, B. J., és Guillemin, G. J. (2007). Characterization of the kynurenine pathway in human oligodendrocytes. *Int. Congr. Ser.* 1304, 213–217. doi:10.1016/j.ics.2007.07.011.
 116. Liu, X. C., Holtze, M., Powell, S. B., Terrando, N., Larsson, M. K., Persson, A., és mtsai. (2014). Behavioral disturbances in adult mice following neonatal virus infection or kynurenine treatment - Role of brain kynurenic acid. *Brain. Behav. Immun.* 36, 80–89. doi:10.1016/j.bbi.2013.10.010.
 117. Lugo-Huitrón, R., Blanco-Ayala, T., Ugalde-Muñiz, P., Carrillo-Mora, P., Pedraza-Chaverrí, J., Silva-Adaya, D., és mtsai. (2011). On the antioxidant properties of kynurenic acid: Free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 538–547. doi:10.1016/j.ntt.2011.07.002.
 118. MacKenzie-Graham, A., Lee, E. F., Dinov, I. D., Bota, M., Shattuck, D. W., Ruffins, S., és mtsai. (2004). A multimodal, multidimensional atlas of the C57BL/6J mouse brain. *J. Anat.* 204, 93–102. doi:10.1111/j.1469-7580.2004.00264.x.
 119. Mahé, G., Rousseau, P., Durand, S., Bricq, S., Leftheriotis, G., és Abraham, P. (2011). Laser speckle contrast imaging accurately measures blood flow over moving skin surfaces. *Microvasc. Res.* 81, 183–188. doi:10.1016/j.mvr.2010.11.013.
 120. Mathew, R. J., Duncan, G. C., Weinman, M. L., és Barr, D. L. (1982). Regional cerebral blood flow in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 39, 1121–1124.
 121. McHugh, T. J., Blum, K. I., Tsien, J. Z., Tonegawa, S., és Wilson, M. a (1996). Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell* 87, 1339–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8980239>.
 122. Mezrich, J. D., Fechner, J. H., Zhang, X., Johnson, B. P., Burlingham, W. J., és Bradfield, C. A. (2010). An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J. Immunol.* 185, 3190–8. doi:10.4049/jimmunol.0903670.
 123. Mishima, K., Iwasaki, K., Tsukikawa, H., Matsumoto, Y., Egashira, N., Abe, K., és mtsai. (2000). The scopolamine-induced impairment of spatial cognition parallels the acetylcholine release in the ventral hippocampus in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 84, 163–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11128039>.
 124. Mok, M. H. S., Fricker, A. C., Weil, A., és Kew, J. N. C. (2009). Electrophysiological characterisation of the actions of kynurenic acid at ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 57, 242–249. doi:10.1016/j.neuropharm.2009.06.003.
 125. Morigaki, R., és Goto, S. (2017). Striatal Vulnerability in Huntington’s Disease: Neuroprotection Versus Neurotoxicity. *Brain Sci.* 7, 63. doi:10.3390/brainsci7060063.
 126. Moroni, F., Cozzi, A., Sili, M., és Mannaioni, G. (2012). Kynurenic acid: a metabolite with multiple actions and multiple targets in brain and periphery. *J. Neural Transm.* 119, 133–139. doi:10.1007/s00702-011-0763-x.
 127. Moroni, F., Lambardi, G., Carlá, V., és Moneti, G. (1984). Studies on the content, synthesis and disposition of quinolinic acid in physiology and pathology. *Clin. Neuropharmacol.* 7, 448–449.

128. Moroni, F., Russi, P., Lombardi, G., Beni, M., és Carlà, V. (1988). Presence of Kynurenic Acid in the Mammalian Brain. *J. Neurochem.* 51, 177–180. doi:10.1111/j.1471-4159.1988.tb04852.x.
129. Niwa, K., Haensel, C., Ross, M. E., és Iadecola, C. (2001). Cyclooxygenase-1 participates in selected vasodilator responses of the cerebral circulation. *Circ Res* 88, 600–608. doi:10.1161/01.RES.88.6.600.
130. Noguchi, T., Nakamura, J., és Kido, R. (1973). Kynurenine pyruvate transaminase and its inhibitor in rat intestine. *Life Sci.* 13, 1001–1010. doi:10.1016/0024-3205(73)90091-X.
131. Notarangelo, F. M., és Pocivavsek, A. (2017). Elevated kynurenine pathway metabolism during neurodevelopment: Implications for brain and behavior. *Neuropharmacology* 112, 275–285. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.03.001.
132. Okuno, E., Minatogawa, Y., Nakamura, M., Kamoda, N., Nakanishi, J., Makino, M., és mtsai. (1980). Crystallization and characterization of human liver kynurenine--glyoxylate aminotransferase. Identity with alanine--glyoxylate aminotransferase and serine--pyruvate aminotransferase. *Biochem J* 189, 581–590. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6783036>.
133. Ouagazzal, A. M., Kenny, P. J., és File, S. E. (1999). Modulation of behaviour on trials 1 and 2 in the elevated plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)*. 144, 54–60. doi:10.1007/s002130050976.
134. Pandya, A. a, és Yakel, J. L. (2013). Activation of the $\alpha 7$ nicotinic ACh receptor induces anxiogenic effects in rats which is blocked by a 5-HT_{1a} receptor antagonist. *Neuropharmacology* 70, 35–42. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.01.004.
135. Park, C. K., Nehls, D. G., G.M., T., és J., M. (1989). Effect of the NMDA Antagonist MK-801 on Local Cerebral Blood Flow in Focal Cerebral Ischaemia in the Rat. *J. Cereb. blood flow Metab.* 9, 617–622. doi:9:617--Q22.
136. Pascussi, J.-M., Gerbal-Chaloin, S., Duret, C., Daujat-Chavanieu, M., Vilarem, M.-J., és Maurel, P. (2008). The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 1–32. doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105349.
137. Perkins, M. N., és Stone, T. W. (1982). An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res.* 247, 184–187. doi:10.1016/0006-8993(82)91048-4.
138. Perkins, M. N., és Stone, T. W. (1985). Actions of kynurenic acid and quinolinic acid in the rat hippocampus in vivo. *Exp. Neurol.* 88, 570–579. doi:10.1016/0014-4886(85)90072-X.
139. Péter, S., és Benyó, Z. (2016). *Az agyi vérkeringés élettani alapjai: önszabályzó mechanizmusok.*, szerk. Vincze Judit Budapest: Semmelweis Kiadó.
140. Petersen, S. L., Curran, M. A., Marconi, S. A., Carpenter, C. D., Lubbers, L. S., és McAbee, M. D. (2000). Distribution of mRNAs encoding the arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-2 in the rat brain and brainstem. *J. Comp. Neurol.* 427, 428–439. doi:10.1002/1096-9861(20001120)427:3<428::AID-CNE9>3.0.CO;2-P.
141. Pocivavsek, A., Thomas, M. A. R., Elmer, G. I., Bruno, J. P., és Schwarcz, R. (2014). Continuous kynurenine administration during the prenatal period, but not during adolescence, causes learning and memory deficits in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 231, 2799–2809. doi:10.1007/s00213-014-3452-2.
142. Pocivavsek, A., Wu, H. Q., Potter, M. C., Elmer, G. I., Pellicciari, R., és Schwarcz, R. (2011). Fluctuations in endogenous kynurenic acid control hippocampal glutamate and memory. *Neuropsychopharmacology* 36, 2357–2367. doi:10.1038/npp.2011.127.
143. Poleszak, E., Socała, K., Szopa, A., Wróbel, A., Szewczyk, B., Kasperek, R., és mtsai. (2011). Involvement of NMDA receptor complex in the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide in mice. *J. Neural Transm.* 118, 857–864. doi:10.1007/s00702-011-0585-x.
144. Potter, M. C., Elmer, G. I., Bergeron, R., Albuquerque, E. X., Guidetti, P., Wu, H.-Q., és mtsai. (2010). Reduction of endogenous kynurenic acid formation enhances extracellular glutamate, hippocampal plasticity, and cognitive behavior. *Neuropsychopharmacology* 35, 1734–42. doi:10.1038/npp.2010.39.
145. Prado De Carvalho, L., Bochet, P., és Rossier, J. (1996). The endogenous agonist quinolinic acid and the non endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunits. *Neurochem. Int.* 28, 445–452. doi:10.1016/0197-0186(95)00091-7.

146. Prescott, C., Weeks, A. M., Staley, K. J., és Partin, K. M. (2006). Kynurenic acid has a dual action on AMPA receptor responses. *Neurosci. Lett.* 402, 108–112. doi:10.1016/j.neulet.2006.03.051.
147. Pucci, L., Perozzi, S., Cimadamore, F., Orsomando, G., és Raffaelli, N. (2007). Tissue expression and biochemical characterization of human 2-amino 3-carboxymuconate 6-semialdehyde decarboxylase, a key enzyme in tryptophan catabolism. *FEBS J.* 274, 827–840. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05635.x.
148. Rassoulpour, A., Wu, H. Q., Ferre, S., és Schwarcz, R. (2005). Nanomolar concentrations of kynurenic acid reduce extracellular dopamine levels in the striatum. *J. Neurochem.* 93, 762–765. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03134.x.
149. Rebola, N., Srikumar, B. N., és Mulle, C. (2010). Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. *J. Physiol.* 588, 93–99. doi:10.1113/jphysiol.2009.179382.
150. Roberts, R. C., Du, F., McCarthy, K. E., Okuno, E., és Schwarcz, R. (1992). Immunocytochemical localization of kynurenine aminotransferase in the rat striatum: a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 326, 82–90. doi:10.1002/cne.903260107.
151. Robotka, H., Sas, K., Agoston, M., Rózsa, E., Szénási, G., Gigler, G., és mtsai. (2008). Neuroprotection achieved in the ischaemic rat cortex with L-kynurenine sulphate. *Life Sci.* 82, 915–9. doi:10.1016/j.lfs.2008.02.014.
152. Roni, M. A., és Rahman, S. (2011). Neuronal nicotinic receptor antagonist reduces anxiety-like behavior in mice. *Neurosci. Lett.* 504, 237–241. doi:10.1016/j.neulet.2011.09.035.
153. Rosenegger, D. G., Tran, C. H. T., Wamsteeker Cusulin, J. I., és Gordon, G. R. (2015). Tonic Local Brain Blood Flow Control by Astrocytes Independent of Phasic Neurovascular Coupling. *J. Neurosci.* 35, 13463–13474. doi:10.1523/JNEUROSCI.1780-15.2015.
154. Rózsa, É., Robotka, H., Vécsei, L., és Toldi, J. (2008). The Janus-face kynurenic acid. *J. Neural Transm.* 115, 1087–1091. doi:10.1007/s00702-008-0052-5.
155. Röver, S., Cesura, a M., Huguenin, P., Kettler, R., és Szente, a (1997). Synthesis and biochemical evaluation of N-(4-phenylthiazol-2-yl)benzenesulfonamides as high-affinity inhibitors of kynurenine 3-hydroxylase. *J. Med. Chem.* 40, 4378–4385. doi:10.1021/jm970467t.
156. Rzeski, W., Kocki, T., Dybel, A., Wejksza, K., Zdzisińska, B., Kandefer-Szerszeń, M., és mtsai. (2005). Demonstration of kynurenine aminotransferases I and II and characterization of kynurenic acid synthesis in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* 80, 677–682. doi:10.1002/jnr.20505.
157. Sagar, S. M., Sharp, F. R., és Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240, 1328–1331. doi:10.1126/science.3131879.
158. Santamaría, A., Ríos, C., Solís-Hernández, F., Ordaz-Moreno, J., González-Reynoso, L., Altagracia, M., és mtsai. (1996). Systemic DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology* 35, 23–28. doi:10.1016/0028-3908(95)00145-X.
159. Sapko, M. T., Guidetti, P., Yu, P., Tagle, D. A., Pellicciari, R., és Schwarcz, R. (2006). Endogenous kynurenate controls the vulnerability of striatal neurons to quinolinate: Implications for Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 197, 31–40. doi:10.1016/j.expneurol.2005.07.004.
160. Sas, K., Csete, K., Vécsei, L., és Papp, J. G. (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, 403–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960686>.
161. Sato, A., Sato, Y., és Uchida, S. (2002). Regulation of cerebral cortical blood flow by the basal forebrain cholinergic fibers and aging. *Auton. Neurosci.* 96, 13–19. doi:10.1016/S0736-5748(01)00017-X.
162. Sauzeau, V., Carvajal-González, J. M., Riobobos, A. S., Sevilla, M. a., Menacho-Márquez, M., Román, Á. C., és mtsai. (2011). Transcriptional factor Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) controls cardiovascular and respiratory functions by regulating the expression of the Vav3 proto-oncogene. *J. Biol. Chem.* 286, 2896–2909. doi:10.1074/jbc.M110.187534.
163. Scharfman, H. E., Goodman, J. H., és 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. doi:10.1007/s007260070060.
164. Schwarcz, R. (2016). *Kynurenines and Glutamate. Multiple Links and Therapeutic Implications.* 1. kiad. Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.apha.2016.01.005.

165. Schwarcz, R., Bruno, J. P., Muchowski, P. J., és Wu, H.-Q. (2012). Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 465–477. doi:10.1038/nrn3257.
166. Schwarcz, R., és Pellicciari, R. (2002). Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 1–10. doi:10.1124/jpet.102.034439.
167. Schwarcz, R., Rassoulpour, A., Wu, H. Q., Medoff, D., Tamminga, C. a, és Roberts, R. C. (2001). Increased cortical kynurenate content in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 50, 521–30. doi:10.1016/S0006-3223(01)01078-2.
168. Séguéla, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J. a, és Patrick, J. W. (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci.* 13, 596–604. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678857>.
169. Shear, D. A., Dong, J., Gundy, C. D., Haik-creguer, Kr. L., Dunbar, G. L., Shear, A., és mtsai. (1998). Comparison of Intrastratial, Injections of Quinolinic Acid and 3-Nitropropionic Acid for Use in Animal Models of Huntington'S Disease. *Prog. Nemo-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat* 22, 1217–1240.
170. Shepard, P. D., Joy, B., Clerkin, L., és 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. doi:10.1038/sj.npp.1300188.
171. Speciale, C., Hares, K., Schwarcz, R., és Brookes, N. (1989a). High-affinity uptake of L-kynurenine by a Na⁺-independent transporter of neutral amino acids in astrocytes. *J. Neurosci.* 9, 2066–2072.
172. Speciale, C., és Schwarcz, R. (1990). Uptake of Kynurenine into Rat Brain Slices. *J. Neurochem.* 54, 156–163. doi:10.1111/j.1471-4159.1990.tb13296.x.
173. Speciale, C., Turski, W., Gramsbergen, J. B., és Schwarcz, R. (1988). Uptake and metabolism of L-kynurenine in the rat brain: Studies in vitro and in vivo. *Pharmacol. Res. Commun.* 20, 368. doi:10.1016/S0031-6989(88)80498-3.
174. Speciale, C., Ungerstedt, U., és Schwarcz, R. (1989b). Production of extracellular quinolinic acid in the striatum studied by microdialysis in unanesthetized rats. *Neurosci. Lett.* 104, 345–350. doi:10.1016/0304-3940(89)90601-0.
175. Speciale, C., Wu, H. Q., Cini, M., Marconi, M., Varasi, M., és Schwarcz, R. (1996). (R,S)-3,4-dichlorobenzoylalanine (FCE 28833A) causes a large and persistent increase in brain kynurenic acid levels in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 315, 263–267. doi:10.1016/S0014-2999(96)00613-9.
176. Stasch, J., Schmidt, P. M., Nedvetsky, P. I., Nedvetskaya, T. Y., H.S., A. K., Meurer, S., és mtsai. (2006). Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J. Clin. Invest.* 116, 2552–2561. doi:10.1172/JCI28371.
177. Stone, T. W., és Darlington, L. G. (2002). Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 1, 609–620. doi:10.1038/nrd870.
178. Stone, T. W., és Perkins, M. N. (1981). Quinolinic acid: A potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur. J. Pharmacol.* 72, 411–412. doi:10.1016/0014-2999(81)90587-2.
179. Su, S. C., Seo, J., Pan, J. Q., Samuels, B. A., Rudenko, A., Ericsson, M., és mtsai. (2012). Regulation of N-type Voltage-Gated Calcium Channels and Presynaptic Function by Cyclin-Dependent Kinase 5. *Neuron* 75, 675–687. doi:10.1016/j.neuron.2012.06.023.
180. Swartz, K. J., During, M. J., Freese, A., és Beal, M. F. (1990). Cerebral synthesis and release of kynurenic acid: an endogenous antagonist of excitatory amino acid receptors. *J. Neurosci.* 10, 2965–2973. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2168940>.
181. Troakes, C., és Ingram, C. D. (2009). Anxiety behaviour of the male rat on the elevated plus maze: associated regional increase in c-fos mRNA expression and modulation by early maternal separation. *Stress* 12, 362–369. doi:10.1080/10253890802506391.
182. Tsien, J. Z., Huerta, P. T., és Tonegawa, S. (1996). The Essential Role of Hippocampal CA1 NMDA Receptor-Dependent Synaptic Plasticity in Spatial Memory. *Cell* 87, 1327–1338. doi:10.1016/S0092-8674(00)81827-9.
183. Turski, W. A., Gramsbergen, J. B. P., Traitler, H., és Schwarcz, R. (1989). Rat Brain Slices Produce and Liberate Kynurenic Acid upon Exposure to L-Kynurenine. *J. Neurochem.* 52, 1629–1636. doi:10.1111/j.1471-4159.1989.tb09218.x.

184. Uwai, Y., Honjo, H., és Iwamoto, K. (2012). Interaction and transport of kynurenic acid via human organic anion transporters hOAT1 and hOAT3. *Pharmacol. Res.* 65, 254–260. doi:10.1016/j.phrs.2011.11.003.
185. Vámos, E., Párdutz, A., Varga, H., Bohár, Z., Tajti, J., Fülöp, F., és mtsai. (2009). l-kynurenine combined with probenecid and the novel synthetic kynurenic acid derivative attenuate nitroglycerin-induced nNOS in the rat caudal trigeminal nucleus. *Neuropharmacology* 57, 425–9. doi:10.1016/j.neuropharm.2009.06.033.
186. Vanelzakker, M. B., Zoladz, P. R., Thompson, V. M., Park, C. R., Halonen, J. D., Spencer, R. L., és mtsai. (2011). Influence of Pre-Training Predator Stress on the Expression of c-fos mRNA in the Hippocampus, Amygdala, and Striatum Following Long-Term Spatial Memory Retrieval. *Front. Behav. Neurosci.* 5, 30. doi:10.3389/fnbeh.2011.00030.
187. Varga, D., Herédi, J., Kánvási, Z., Ruzska, M., Kis, Z., Ono, E., és mtsai. (2015). Systemic L-Kynurenine sulfate administration disrupts object recognition memory, alters open field behavior and decreases c-Fos immunopositivity in C57Bl/6 mice. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 1–11. doi:10.3389/fnbeh.2015.00157.
188. Vécsei, L., és Beal, M. F. (1990). Influence of kynurenine treatment on open-field activity, elevated plus-maze, avoidance behaviors and seizures in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37, 71–76. doi:10.1016/0091-3057(90)90043-H.
189. Vécsei, L., és Beal, M. F. (1991). Comparative behavioral and pharmacological studies with centrally administered kynurenine and kynurenic acid in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 196, 239–246. doi:10.1016/0014-2999(91)90436-T.
190. Vécsei, L., Szalárdy, L., Fülöp, F., és Toldi, J. (2013). Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 64–82. doi:10.1038/nrd3793.
191. Waite, J. J., Holschneider, D. P., és Scremin, O. U. (1999). Selective immunotoxin-induced cholinergic deafferentation alters blood flow distribution in the cerebral cortex. *Brain Res.* 818, 1–11. doi:10.1016/S0006-8993(98)01174-3.
192. Walf, A. A., és Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* 2, 322–328. doi:10.1038/nprot.2007.44.
193. Wang, J., Simonavicius, N., Wu, X., Swaminath, G., Reagan, J., Tian, H., és mtsai. (2006). Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J. Biol. Chem.* 281, 22021–22028. doi:10.1074/jbc.M603503200.
194. Wang, Y., Liu, H., McKenzie, G., Witting, P. K., Stasch, J.-P., Hahn, M., és mtsai. (2010). Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. *Nat. Med.* 16, 279–85. doi:10.1093/cercor/bhi008.
195. Winters, B. D., Saksida, L. M., és Bussey, T. J. (2008). Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1055–1070. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.04.004.
196. Wonodi, I., és Schwarcz, R. (2010). Cortical kynurenine pathway metabolism: A novel target for cognitive enhancement in schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 36, 211–218. doi:10.1093/schbul/sbq002.
197. Wu, H.-Q., Rassoulpour, a, és Schwarcz, R. (2007). Kynurenic acid leads, dopamine follows: a new case of volume transmission in the brain? *J. Neural Transm.* 114, 33–41. doi:10.1007/s00702-006-0562-y.
198. Wu, H. Q., Guidetti, P., Goodman, J. H., Varasi, M., Ceresoli-Borroni, G., Speciale, C., és mtsai. (2000). Kynurenergic manipulations influence excitatory synaptic function and excitotoxic vulnerability in the rat hippocampus in vivo. *Neuroscience* 97, 243–251. doi:10.1016/S0306-4522(00)00030-0.
199. Wu, H. Q., Okuyama, M., Kajii, Y., Pocivavsek, A., Bruno, J. P., és Schwarcz, R. (2014). Targeting kynurenine aminotransferase II in psychiatric diseases: Promising effects of an orally active enzyme inhibitor. *Schizophr. Bull.* 40. doi:10.1093/schbul/sbt157.
200. Wu, J., Zou, H., Strong, J. a, Yu, J., Zhou, X., Xie, Q., és mtsai. (2005). Bimodal effects of MK-801 on locomotion and stereotypy in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology (Berl).* 177, 256–263. doi:10.1007/s00213-004-1944-1.
201. Yin, H. H. (2014). Action, time and the basal ganglia. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369, 20120473. doi:10.1098/rstb.2012.0473.
202. Yokoi, I., Nishijima, Y., Uchida, A., Kabuto, H., Yamamoto, N., és Ogawa, N. (1998). Effects of kynurenine metabolites on the electrocorticographic activity in the rat. *J. Neural Transm.* 105, 147–160.

doi:10.1007/s007020050044.

203. Yu, P., Li, Z., Zhang, L., Tagle, D. a, és Cai, T. (2006). Characterization of kynurenine aminotransferase III, a novel member of a phylogenetically conserved KAT family. *Gene* 365, 111–8. doi:10.1016/j.gene.2005.09.034.
204. Zádori, D., Ilisz, I., Klivényi, P., Szatmári, I., Fülöp, F., Toldi, J., és mtsai. (2011). Time-course of kynurenic acid concentration in mouse serum following the administration of a novel kynurenic acid analog. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55, 540–3. doi:10.1016/j.jpba.2011.02.014.
205. Zhang, Y. Q., Ji, G. C., Wu, G. C., és Zhao, Z. Q. (2003). Kynurenic acid enhances electroacupuncture analgesia in normal and carrageenan-injected rats. *Brain Res.* 966, 300–307. doi:10.1016/S0006-8993(02)04228-2.
206. Zmarowski, a, Wu, H. Q., Brooks, J. M., Potter, M. C., Pellicciari, R., Schwarcz, R., és mtsai. (2009). Astrocyte-derived kynurenic acid modulates basal and evoked cortical acetylcholine release. *Eur. J. Neurosci.* 29, 529–538. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06594.x.
207. Zweifel, C., Lavinio, A., Steiner, L. a., Radolovich, D., Smielewski, P., Timofeev, I., és mtsai. (2008). Continuous monitoring of cerebrovascular pressure reactivity in patients with head injury. *Neurosurg. Focus* 25, E2. doi:10.3171/FOC.2008.25.10.E2.
208. Zwillig, D., Huang, S. Y., Sathyaikumar, K. V., Notarangelo, F. M., Guidetti, P., Wu, H. Q., és mtsai. (2011). Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. *Cell* 145, 863–874. doi:10.1016/j.cell.2011.05.020.

11. Összefoglalás

A triptofán több mint 95%-a a kinurenin útvonalon keresztül metabolizálódik, mely folyamat során számos biológiailag aktív anyagcseretermék keletkezik. 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 csak passzív diffúzióval rendkívül alacsony hatékonysággal képes átlépni 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. Ezért a központi idegrendszer kinurenin metabolizmusa a perifériás L-KYN koncentráció változásra különösen érzékeny. Állatkísérletes eredmények sora igazolja, hogy egészséges felnőtt emlősben a szisztémás L-KYN koncentráció mesterséges növelésére a központi idegrendszerben bekövetkező legjellemzőbb és leggyorsabb reakció a kinurénsav (KYNA)-szint dóziszfüggő emelkedése.

A KYNA szélesspektrumú receptormoduláló, antioxidáns és neuroprotektív potenciállal rendelkező endogén molekula. Összetett pre- és poszt-szinaptikus 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 továbbá képes csillapítani a serkentő jelátvitelt, a poszt-szinaptikus membránrészen található NMDA receptor kompetitív gátlásával. Ezenkívül ligandja egy helix-loop-helix fehérje családba tartozó transzkripciós faktornak, az aril-hidrokarbon receptornak, melyen keresztül gyulladáscsökkentő hatású. A receptormoduláló hatásai mellett pedig antioxidáns tulajdonságát is kimutatták.

Ezek alapján 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 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 csak eljárni, ugyanis a glutamát jelátvitel alulműködése éppúgy káros lehet, mint annak túlműködése. Ennélfogva a kinurenerg-manipuláció következtében nem kívánt mellékhatások megjelenésével is szükséges számolni. Preklinikai tanulmányok során az akut és krónikus L-KYN adagolás sok esetben hipoaktivitást és a térbeli tájékozódás zavarát okozta, szélsőséges esetekben pedig részben skizofréniára is jellemző kóros viselkedést idézett elő a vizsgált 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: küszöb alatti, küszöb feletti, illetve szélsőséges hatásokat. 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 karakterizálására, ami később megfelelő viszonyítási alapot nyújthatna a célzott génmanipulációs kísérletekhez, illetve felfedheti az esetlegese 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 hipotenzio kialakulásáért részben az érendotéltől 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 joggal feltételezhető, hogy az akut szisztémás L-KYN-koncentráció növekedés befolyással lehet az egészséges felnőtt szervezet vérnyomására, illetve nyugalmi CBF-ére.

Ennek megfelelően célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a C57Bl/6j egér törzsben milyen viselkedésváltozásokat okozhat a különböző dózisú (25 mg/ttkg – 300 mg/ttkg) szisztémás akut L-KYNs kezelés. Ezenfelül immunhisztokémiai módszer segítségével kimutatjuk az akut L-KYNs kezelés idegszövetre gyakorolt hatásait, a bazális c-Fos expresszió változásának nyomon követésén keresztül. Azokat az agyterületeket vizsgálva, amik a viselkedésvizsgálatokkal szoros összefüggésbe hozhatók. Elhatároztuk továbbá, hogy felmérjük az egyszeri L-KYNs kezelés befolyását a szisztémás artériás középvérnyomásra (MABP) és az agykéreg, azon belül is a szomatoszenzoros kérgi terület vérátáramlására.

A viselkedéstesztekkel az L-KYNs akut hatásait mértük fel, ezért az állatokat egyszer kezeltük, két órával a vizsgálatok megkezdése előtt. Kísérleteink során az állatok mozgási aktivitását (nyílt porond teszt), epizodikus memória funkcióját (új tárgy felismerés teszt) és a szorongással kapcsolatos viselkedését (emelt keresztpalló teszt) vizsgáltuk. Az állatok az alacsonyabb dózisú kezeléseket következményeként hipoaktivitást, míg a 100 mg/ttkg dózis felett hiperaktivitást mutattak. A legmarkánsabb lokomotoros aktivitásbeli eltérést a 300 mg/ttkg-al kezelt csoport esetén tapasztaltuk. Ezzel igazoltuk, hogy a mérsékelt koncentrációjú kezelés a patkányokhoz hasonló lokomotoros aktivitás depresszálo hatású egerekben is. A koncentráció fokozással azonban, az NMDA-receptor gátlással analóg, hiperaktív mozgásmintázat válik dominánssá. Ezzel feltártuk az L-KYN-dózis és a mozgási aktivitás közötti nem lineáris kapcsolatot. Az új tárgy felismerési teszt során a magasabb dózisú L-KYNs kezeléseket (100 mg/ttkg; 300 mg/ttkg) rontották az egerek tárgyfelismerési memória teljesítményét. Ez alapján elmondható, hogy az alacsony dózisú kezelés nem befolyásolja az epizodikus memóriát, míg a mérsékelt koncentrációjú kezeléstől kezdve már amnesztikus hatással is számolni kell. Az állatok a dózis növelésével arányosan több időt töltöttek az emelt keresztpalló erősen megvilágított nyílt karjaiban. Kísérleteink során tehát kimutattuk, hogy az egyszeri L-KYNs kezelés a dózis növeléssel egyenes arányú szorongásoldó hatású egerekben. A szövettani vizsgálatok során kimutattuk, hogy az egyszeri magas koncentrációjú (300 mg/ttkg) L-KYNs kezelés csökkenti az alap c-Fos expresszió mértékét a dorzális striátum és a hippocampusz CA1 régió területén. Eredményünkkel felfedtük, hogy a KYNA markáns fokozódása a transzkripciós szabályozás megváltoztatásán keresztül is képes lehet az agyi plasztikus folyamatok befolyásolására, ezzel idézve elő rövid és hosszú távú viselkedésváltozásokat.

Az utolsó kísérletsorozatban a magas koncentrációjú (300 mg/ttkg) egyszeri L-KYNs kezelés keringésre gyakorolt hatásait mértük fel izoflurán altatott egereken, az adagolást követő két és fél órás időablakban. A MABP-t a bal artéria femoralisba vezetett kanülön keresztül közvetlenül véres úton mértük. A nyugalmi CBF-et pedig lézer folt interferencia (lézer speckle) kontrasztanalízisen alapuló eszközzel intakt koponyán keresztül vizsgáltuk. A kezelés a MABP-t nem befolyásolta, ugyanis az, mindkét állatcsoportban az egész mérés során egyenletes és stabil volt (69 ± 4 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. Kísérletünk során tehát kimutattuk, hogy az egyszeri magas koncentrációjú L-KYNs kezelés destabilizálja a nyugalmi CBF-et, a szisztémás vérnyomás befolyásolása nélkül. A kinurenin-manipulációval kapcsolatos vizsgálatok között az L-KYNs kezelés CBF mérséklő hatása újszerű. Eredményeink alapján egyértelmű, hogy a kinurenin-manipulációval kapcsolatos beavatkozások során számolni kell annak keringésre gyakorolt hatásával is.

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 kinurenin-manipuláció neuroprotekción kívüli hatásaival is, átfogó dózis-hatás tanulmány a témában korábban még nem készült. Az eredményeink alapján világosan látszik, hogy a mérsékelt dózisú L-KYNs kezeléstől kezdve számos viselkedési funkciózavar jelentkezik, 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 kinurenin-manipuláción alapuló beavatkozás kapcsán számításba venni.

12. Summary

L-Kynurenine (L-KYN) is a central metabolite of tryptophan degradation: known as kynurenine pathway, it is a cascade of enzymatic steps generating biologically active compounds, through which more than 95% of the tryptophan is catabolized. The early phase of the catabolic steps takes place mainly in the liver and the kidneys. However, the metabolization of L-KYN can effectively proceed in the brain. The blood brain barrier strongly limits the penetrability of the kynurenine metabolites from the periphery to the central nervous system, since most of them can only be transferred by passive diffusion with a very low efficacy. One clear exception is the L-KYN, which can enter the brain with the aid of a large neutral amino acid transporter. Thus, the cerebral kynurenine metabolism is very responsive to the peripheral level of the L-KYN. Preclinical studies have shown that growth in the level of systemic L-KYN is particularly associated with a dose-dependent increase of its direct downstream metabolite kynurenic acid (KYNA) in the central nervous system. Evidence suggests that in the physiologically intact brain the most prominent and rapid change after peripheral L-KYN administration is the peak elevation of KYNA.

KYNA is a complex neuromodulator, antioxidant and neuroprotective endogenous molecule. Elevation of brain KYNA content is correlated with attenuation in the concentration of extracellular glutamate, dopamine and acetylcholine in distinct cortical and subcortical brain regions. KYNA influences neurotransmission through multiple actions at the pre- and postsynaptic site. KYNA directly attenuates neurotransmitter release, partly by inhibiting $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine ($\alpha 7$ nACh) receptor located on presynaptic terminals, and partly by stimulating G-protein-coupled receptor 35 (GPR35) localized on neurons and astrocytes. Thus, even the modest fluctuations in endogenous KYNA can bi-directionally control the extracellular levels of glutamate. KYNA hinders postsynaptic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents by competitive antagonism at allosteric glycine binding site of NMDA receptor. Moreover, in the periphery and in the brain during neuroinflammation, KYNA promotes anti-inflammatory responses due to activation of aryl hydrocarbon receptor and GPR35 receptor expressed by immune-cells, as well as it presumably also modulates neuronal survival through extrasynaptic NMDA receptor blockade. Besides its receptor-mediated actions, KYNA itself is a potent antioxidant.

Therefore, elevation of brain KYNA level, either by administration of L-KYN or pharmacological manipulation of the availability of the kynurenine pathway enzymes, has become an attractive strategy to attenuate neuroinflammatory responses and to protect against glutamate induced excitotoxicity associated with ischemic brain injury. Accordingly, we and our collaborators achieved neuroprotection by the administration of L-KYN sulfate (L-KYNs) in experimental models of neurodegenerative diseases and ischemic stroke. Decades after the discovery of the neurotoxic and convulsant properties of glutamate, it has become clear that glutamate hypofunction is also pathogenic and therefore undesirable. Accordingly, in preclinical studies acute or chronic elevation of brain KYNA content, achieved partly by the peripheral administration of L-KYN, has been suggested to trigger alteration in the behavior of rodents: animals expressed hypoactivity or spatial working memory deficit. Moreover, pre- and postnatal chronic L-KYN exposure provoked long-lasting neurochemical and behavioral abnormalities manifested in adulthood. However, the results assessing the behavioral effects of the kynurenergic manipulations emerged from studies that focused mainly on rats, after various-dose of L-KYNs treatment. Implementing similar experiments in mice is of particular importance, because such data is almost absent from the literature. Additionally, the available information concerning the effects of kynurenergic manipulation beyond neuroprotection is quite incomplete, since study on dose-dependent responses to various L-KYNs treatment is not available.

On a top of these, L-KYN and KYNA were attributed a direct role in the regulation of the systemic circulation. Namely, L-KYN was identified as an endothelium-derived vasodilator, contributing to peripheral arterial relaxation and regulation of blood pressure during systemic inflammation in rats. Furthermore, intravenous administration of low-dose L-KYN (1 mg/kg) has been shown to increase cerebral blood flow (CBF) in conscious rabbits. Therefore, we hypothesized that acute elevation of systemic L-KYN concentration may exert potential effects on mean arterial blood pressure (MABP) and on resting CBF in the adult mouse brain.

Consequently, we set out to investigate the dose-dependent (25 mg/bwkg – 300 mg/bwkg) behavioral effects of the systemic administration of L-KYNs in naïve C57Bl/6j mice. To evaluate the changes in neuronal activity after L-KYNs treatment, in a separate group of animals we estimated c-Fos expression levels in the corresponding subcortical brain areas by means of immunohistochemical technique. Moreover, we decided to determine the influences of L-KYNs treatment on the systemic blood pressure and the cerebral vasoregulation of the adult mice.

In the first set of experiments, we wanted to assess the acute effects of L-KYNs treatment on the behavior of the freely moving animals, thus the mice were administered intraperitoneally 2 h before the experiments. The ambulatory activity was assessed in an open field (OF) paradigm. Episodic-like memory performance was tested in an object recognition (OR) paradigm. Anxiety-like behavior was measured in elevated plus-maze (EPM) paradigm. In an OF paradigm the C57Bl/6j mice expressed hypoactivity owing to the lower-dose L-KYNs treatment, whereas the animals become hyperactive as the dose was raised over 100 mg/bwkg. The most prominent locomotor disturbances were seen in the 300 mg/bwkg treated group. On the one hand we verified that moderate L-KYNs treatment hinders the locomotor activity of mice just as it was reported in rats. On the other hand, our data revealed that the high-dose L-KYNs treatment impairs further the controls of voluntary movement by inducing an irregular hyperactive state. Thus we uncovered a non-linear dose-dependent characteristic of the L-KYNs treatment on the locomotor activity of mice. Besides the changes in the moving pattern, the moderate to high-dose L-KYNs treatments (100 mg/bwkg, 300 mg/bwkg) completely abolished the formation of object recognition episodic memory. Thus the amnesic properties of the kynurenerg manipulation was verified in mice. Additionally, in the EPM paradigm the animals spent more time in the aversive open spaces of the platform. Consequently, the treatment dose-dependent anxiolytic effect was uncovered. There is an unequivocal relationship between hippocampal c-Fos expression and memory formation. The relationship between basal ganglia activity and c-Fos expression is also described. For this reason, we targeted the hippocampus, which definitely corresponds to memory formation, and the striatum, which regulates movement velocity. The high-dose L-KYNs treatment (300 mg/bwkg) decreases the number of c-Fos-immunopositive-cells in both areas. Thus our data revealed that behavioral abnormalities owing to a single exposure of high-dose L-KYNs may emerges related to the altered basal c-Fos protein expression and the imbalance of the striatal and hippocampal neuronal activity.

In the last set of experiment, we set out to obtain comparable information about the potential vascular effects of L-KYNs. MABP was monitored in the femoral artery, while CBF was assessed through the intact parietal bone with the aid of laser speckle contrast imaging. L-KYN sulfate (L-KYNs) (300 mg/kg, i.p.) or vehicle was administered intraperitoneally. Subsequently, MABP and CBF were continuously monitored for 2.5 h. In the control group, MABP and CBF were stable (69 ± 4 mmHg and $100 \pm 5\%$, respectively) throughout the entire data acquisition period. In the L-KYNs-treated group, MABP was similar to that, of control

group (73 ± 6 mmHg), while hypoperfusion transients of $22 \pm 6\%$, lasting 7 ± 3 min occurred in the cerebral cortex over the first 60 – 120 min following drug administration. In conclusion, the systemic high-dose of L-KYNs treatment destabilizes resting CBF by inducing a number of transient hypoperfusion events. Until recently the possibility that this manipulation might interfere with the cerebrovascular regulation was not taken into account.

The impairment of the kynurenine pathway metabolism is increasingly considered to be involved in the occurrence and the progression of neurophysiological dysfunctions observed in various neurodegenerative diseases. Thus, manipulation of the availability of kynurenine metabolites with the aim of therapy has been extensively investigated recently. Although, up to this point a detailed dose-response study related to the kynurenine manipulation effects beyond neuroprotection was not done. We have demonstrated that a single moderate L-KYNs administration can provoke numerous behavioral disturbances, whereas these effects become more dominant with the increase of L-KYNs concentration. Therefore, a single high-dose L-KYNs treatment next to the behavioral influences, could also alter gene expression and destabilizes resting CBF, a phenomenon that should be considered by interpreting the effect of kynurenergic manipulation on brain function. By planning clinical trials basing on kynurenergic manipulation possible behavioral and vascular side effects should also be considered.

13. Tudományos közlemények listája

Összesített tudománymetria

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

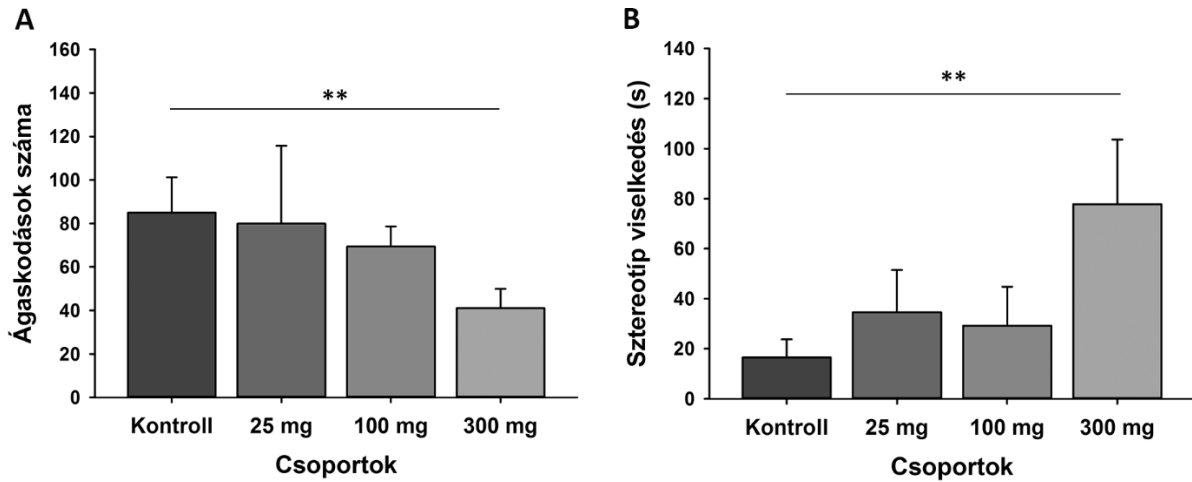
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

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**

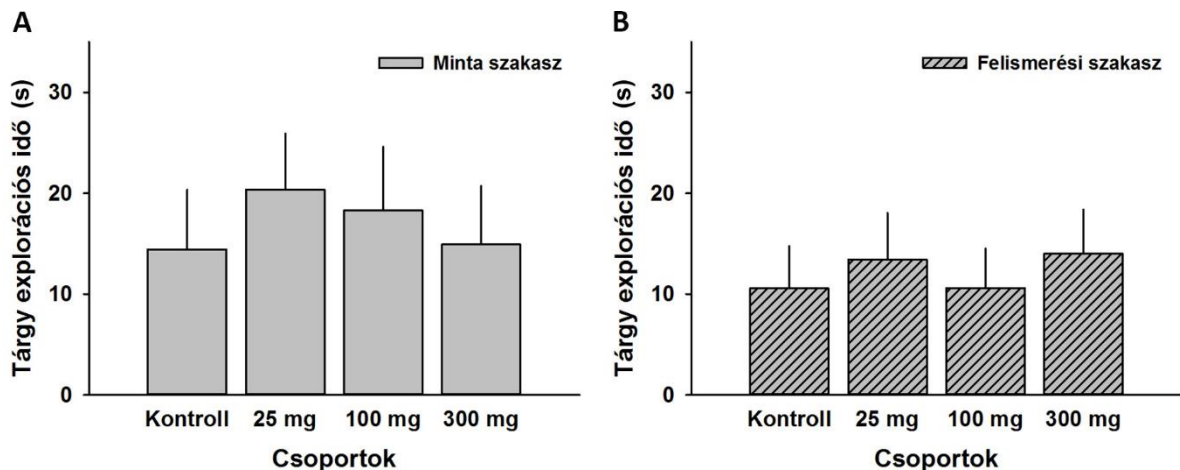
Egyéb közlemények

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**

14 Függelék



1. ábra. A vertikális mozgási aktivitás és a sztereotíp viselkedés csoportok közötti összehasonlítása a nyílt porond (OF) tesztben. Az ágaskodások mennyiségét, valamint a sztereotíp viselkedés idejének meghatározását az OF mérések során rögzített videófelvelek segítségével utólag elemeztük. Ilyen felvétel két kontroll csoportról (n=18), valamint a 25 mg (n = 9), a 100 mg (n = 10) és a 300 mg/ttkg L-KYNs (n = 10) kezelt csoportokról készült. A két kontroll csoportot a számolás és az ábrázolás során együtt kezeltük. **(A)** Az ágaskodások számának összehasonlítása kimutatta, hogy a 300 mg/ttkg L-KYNs-tal kezelt egerek szignifikánsan kevesebbszer ágaskodott, mint a kontroll csoport. Ez a vertikális mozgási aktivitás csökkenését jelezte. **(B)** Sztereotíp viselkedésnek tekintettük, amikor az állat tartósan mozdulatlanul, dermedt állapotban volt (freezing), illetve a bundáját tisztogatta (grooming). A sztereotíp viselkedés idejének csoportok közötti összehasonlítása során a 300 mg/ttkg csoport szignifikáns mértékben eltért a kontroll csoporthoz képest. Ez alapján a legnagyobb kezelési dózis fokozta a sztereotipikus viselkedés formák kifejeződését. Az ábrán az adatok átlagát és szórását (stdev) jelenítettük meg (ANOVA, $p^{**}<0,01$).



2. ábra. A teljes tárgyexplorációs idő csoportok közötti összehasonlítása az új tárgy felismerés teszt (NOR) minta és a felismerési szakaszai során. A teljes tárgy explorációs idő számításánál az egyes szakaszok alkalmával a két tárggyal töltött időket állatonként összeadtuk és csoportonként átlagoltuk. A csoportok közötti statisztikai összehasonlítás nem eredményezett szignifikáns különbséget sem a minta **(A)**, sem a felismerési szakasz során **(B)**. Az ábrán az adatok átlagát és szórását (stdev) jelenítettük meg (ANOVA).