

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**KINURENINEK ELEKTROFIZIOLÓGIAI
HATÁSVIZSGÁLATA**

Rózsa Éva



Témavezető:

Dr. Toldi József
professzor

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Szeged

2008

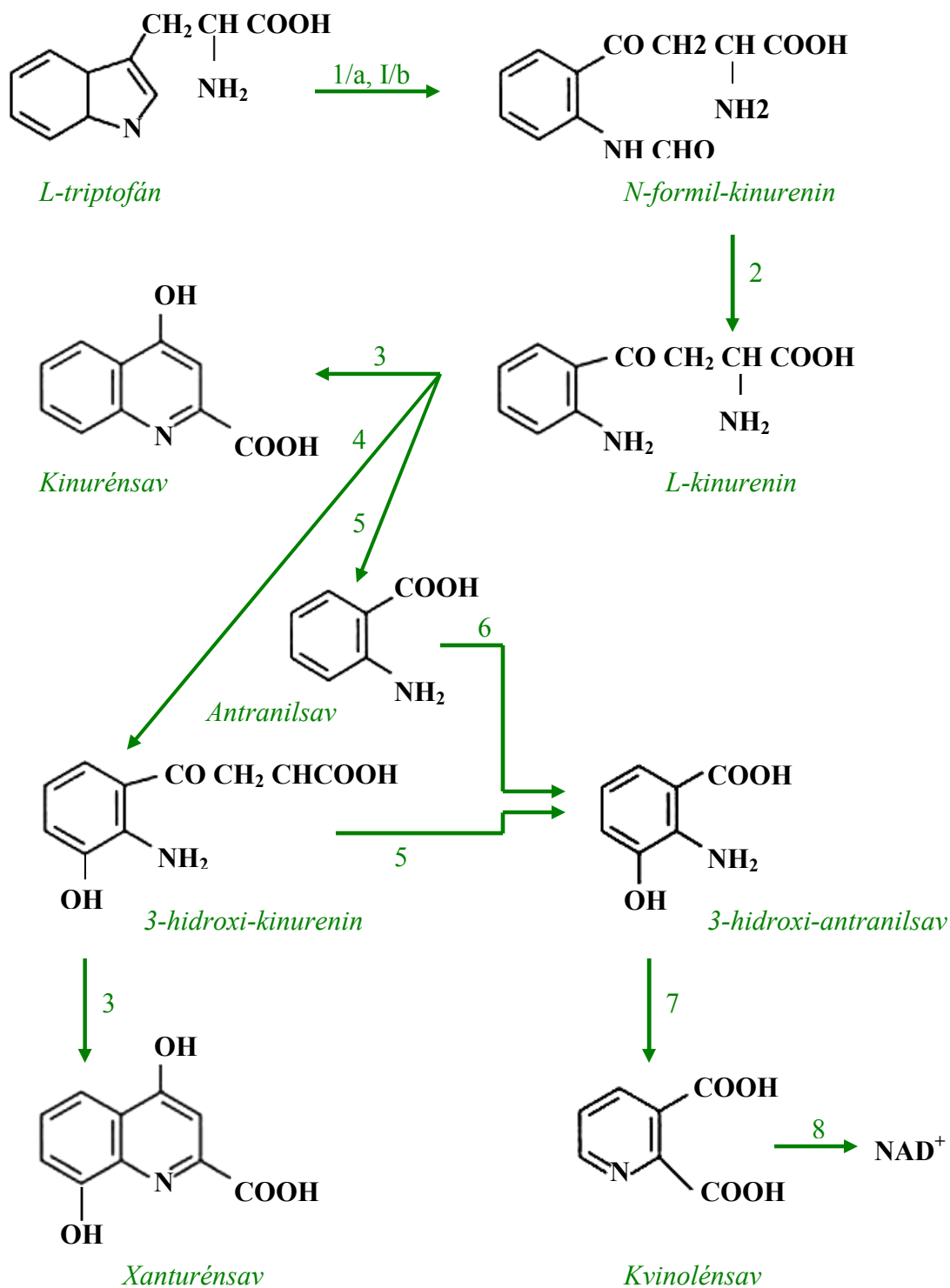
BEVEZETÉS

Az L-triptofán egyike a tíz esszenciális aminosavnak, létfontosságú számos fehérje felépítéséhez. Az L-triptofán a proteinszintézis mellett számos biológiailag aktív anyagcseretermék képződésének kiindulópontja. Az agyban a kinurenin útvonal képezi a triptofán anyagcsere fő ágát. A kinurenin útvonal központi szerepet betöltő molekulája az L-kinurenin, amely jelen van az emlős vérben, agyszövetben és perifériás szervekben. Az L-kinurenin az asztrocitákban irreverzibilisen transzaminálódik és kinurénsavvá alakul. A kinurénsav a glutamáterg szinapszisok közvetlen közelében felszabadulva hatékonyan befolyásolja ezek működését. A kinurénsav abszolút vagy relatív koncentrációjának megváltozása összefüggésben áll számos neurodegeneratív megbetegedéssel, mint pl. az Alzheimer kór, Parkinson kór, sclerosis multiplex, skizofrénia vagy az epilepszia.

Hirtelen fellépő hipoxia vagy iszkémia következtében a neuronokból és glia sejtekből nagy mennyiségű glutamát szabadul fel. A szinapszisokat elárasztó glutamát ionotróp receptorokat, N-metil-D-aszpartát (NMDA) és alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropionsav (AMPA) receptorokat aktivál, melyek túlműködése az intracelluláris kalcium szintet megemelve, reaktív oxigén gyökök felszabadulásához és sejthalálhoz vezethet. A kinurénsav az első, és az eddigi ismeretek szerint az egyetlen endogén NMDA receptor antagonist. A kinurénsav a neurobiológia érdeklődéskörébe elsősorban antikonvulzáns és neuroprotektív tulajdonságai révén került. A kinurénsav terápiás alkalmazásának azonban határt szab a vegyület poláris struktúrája, mely a vér-agy gáton való átjutását nehezíti.

A kinurénsav előnyös tulajdonságainak kiaknázására több megoldás is kínálkozik. Az egyik alternatíva, a kinurénsav helyett az előanyagának, az L-kinureninnek az alkalmazása. Az L-kinurenin könnyedén átjut a vér-agy gáton, és a kinurenin-aminotranszferázok segítségével az asztrocitákban kinurénsavvá alakulva szabadul fel a glutamáterg szinapszisok közelében. Egy másik alkalmas megközelítés, a kinurenin útvonalon szereplő különböző enzimek működésének befolyásolása, enzim inhibitorok alkalmazása. Az enzim inhibitorok a kinurenin útvonal egyes komponenseinek arányát megváltoztatva, lehetőséget biztosítanak a kinureninek relatív koncentrációjának helyreállítására.

A kinurenin útvonal



1/a: indolamin-2,3-dioxigenáz, 1/b: triptofán-2,3-dioxigenáz, 2: Kinurenin formamidáz, 3: Kinurenin aminotranszferáz I, II, 4: Kinurenin-3-hidroziláz, 5: Kinurenináz, 6: 3-hidroxi-antranilsav hidroziláz, 7: 3-hidroxi-antranilsav dioxigenáz, 8: Kvinolénsav foszforibozil-transzferáz.

A kinurénsav szintjének emelésére a különböző szintetikus kinurénsav analógok nyújthatnak további lehetőséget. A szintetikus származékokkal szembeni alapvető elvárások egyike, hogy az egyes analógok a kinurénsav NMDA receptor blokkoló hatását megőrizzék, és a vér-agy gáton sikeresen átjussanak. A kinurénsav alapvázának megtartása mellett, különböző kémiai csoportok csatolásával hatékony származékok állíthatók elő.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A kinurénsav hatása

Kísérleteinkben az *in vitro* alkalmazott kinurénsav hatásait a hippocampus CA1-es régiójából elvezetett mezőpotenciálok változásain követtük nyomon. Vizsgálatainkkal a kinurénsav koncentráció-hatás görbéjét, valamint a különböző koncentrációknál fellépő eltérő hatásokat kívántuk meghatározni. Ezen kísérletek képezték további vizsgálataink alapját, melyekben az L-kinurenin valamint a szintetikus kinurénsav származék hatását tanulmányoztuk.

2. Pentiléntetrazol modell és a kinurénsav előkezelés hatása

Elektrofiziológiai vizsgálatainkkal a pentiléntetrazol hatásait tanulmányoztuk *in vitro* körülmények között patkány agyszeleten. A modell kidolgozásával célunk az volt, hogy a kinurénsav neuromodulátoros tulajdonságát vizsgáljuk, konvulzív hatásnak kitett, túlélő hippocampus preparátumokon.

3. L-kinurenin

A pentiléntetrazol modellen vizsgálni kívántuk a kinurénsav előanyagának, az L-kinureninnek viselkedését. Ismeretes, hogy túlélő agyszelet preparátumok is képesek az exogén úton hozzáadott L-kinureninből kinurénsavat szintetizálni. Kísérleteinkkel azt vizsgáltuk, hogy a pentiléntetrazol modellben a kinurenin-kinurénsav transzformáció hatékony-e a pentiléntetrazol kiváltotta konvulzív hatások ellensúlyozásában.

4. SZR-72

Az SZR-72 egy szintetikus kinurénsav származék, melyet a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerkémiai Intézetében állítottak elő. A pentiléntetrazol modellen azt vizsgáltuk, hogy a szintetikus származék képes-e a kinurénsavval összemérhető antikonvulzáns hatást mutatni.

5. A kinurénsav pozitív neuromodulátoros hatása

A kinurénsav a neurobiológia érdeklődéskörébe elsősorban antikonvulzív hatása révén került. NMDA receptorokon keresztül kifejtett neuroprotektív hatása mikromólos értékeken érvényesül. Fiziológias körülmények között betöltött szerepéről azonban kevés adat áll rendelkezésünkre. A kinurénsav fiziológias koncentrációja patkány agyszövetben ~ 20 nM. *In vitro* kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a kinurénsav milyen változásokat idéz elő a fiatal állatok hippocampusában a fiziológias koncentráció fölött, de még nanomólos koncentráció értékeken.

MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez fiatal (3-4 hetes) Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat standard körülmények (hőmérséklet, világítás) között tartottuk. A patkányok csapvizet *ad libitum* kaptak és standard granulált patkánytápot (LATI, Gödöllő) fogyasztottak. A kísérletek során az állatok gondozását és laboratóriumi felhasználását az EU szabványaival összhangban, és a SZTE Etikai Bizottságának jóváhagyásával végeztük.

Túlélő agyszelet preparátum

A hippocampus preparálását 2°C-os, csökkentett kalcium tartalmú, emelt magnézium tartalmú mesterséges cerebrospinális folyadékban (továbbiakban aCSF) végeztük. Az állat dekapitációját követően sagittális metszést ejtettünk a fejbőrön. Ezután átmetsztük a craniális nyakcsigolyák ívét, majd a koponyán egy sagittális és egy, a két orbitát összekötő coronális irányú metszést végeztünk. A koponyatetőt ezen metszések mentén szétnyitottuk, majd a bulbusok mögött és a kisagy előtt ejtett coronális metszésekkel eltávolítottuk az agy hippocampust tartalmazó régióját. Vibratómmal (Campden Instruments) 400 µm-es hippocampális metszeteket készítettünk, a szeleteket egy órán át inkubáltuk szobahőmérsékletű, karbogénnel oxigenált aCSF-ben. A várakozási idő letelte után az egyes agyszeleteket interface típusú kamrába helyeztük. A kamra hőmérséklete (34°C), páratartalma állandó volt.

In vitro elektrofiziológia

Elektrofiziológiai kísérleteink során a hippocampus Schaffer collaterálisait ingereltük (0.2 ms pulzus szélesség, 0.333 Hz), a mezőpotenciálok elvezetése a CA1-es régió stratum radiatumából történt. Az ingerléshez bipoláris ezüst elektródot használtunk, az üveg mikropipettákat (~1,5 MΩ) aCSF-el töltöttük fel. A stimulus intenzitását a félmaximális válasz kiváltásának megfelelően választottuk meg (15-40 µA). A regisztrálás pClamp8 rendszerrel történt (Axon Instruments, USA, Digidata 1320 A/D board). Az adatok

kiértékeléséhez az OriginPro7.0 (Microcal Software, USA) és az Axoscope 10.1 (Axon Laboratory, Molecular Devices Corporation, USA) programokat használtuk.

Mezőpotenciálok

Elektrofiziológiai kísérleteink során extracelluláris mezőpotenciálokot vezettünk el a hippocampus CA1-es régiójából. Az egyes anyaghatások vizsgálata során a mezőpotenciálok amplitúdójának változását követtük nyomon.

Statisztikai analízis

A statisztikai analíziseket SPSS for Windows version 9.0 szoftverrel végeztük. Az egyes eredmények amplitúdó változásokat jelentenek, melyek %-ban értendők, a paramétereket átlag \pm S.D.-vel adtuk meg. Az analízisekhez Student-féle t-tesztet és Oneway ANOVA-t használtunk post hoc Bonferroni teszttel. A különbségeket ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ esetén, ill. Student-féle t-teszteknel a * $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Kísérleteink során a Schaffer kollaterálisokat stimulálva, a hippocampus CA1-es régiójából vezettünk el mezőpotenciálokat. A kinureninek hatásvizsgálatára a pentiléntetrazol modellt alkalmaztuk. A pentiléntetrazol egy konvulzáns anyag, melyet gyakran alkalmaznak rohamtevékenységek vizsgálatában. A pentiléntetrazol a GABA_A receptorok gátlása révén hiperexcitabilitás kialakulását indukálja. A pentiléntetrazol *in vitro* alkalmazása 1 mM-os koncentrációban a mezőpotenciálok amplitúdójának erőteljes növekedéséhez vezetett a hippocampus CA1-es régiójában. Lokálisan, az előbbi értékhez képest húszszoros koncentrációban használva, repetitív mezőpotenciálok megjelenését tapasztaltuk. Ezzel szemben a kinurénsav előkezelés megakadályozta a pentiléntetrazol okozta kóros facilitáció kialakulását és a mezőpotenciálok amplitúdóját a kontroll szintjéhez közeli értékeken tartotta.

Hasonlóképpen, a kinurénsav előanyagának, az L-kinureninnek az alkalmazása szintén hatékonyan bizonyult a pentiléntetrazol modellben. Az N-omega-nitro-L-arginin (L-NNA) megakadályozza a kinurénsav transzaminációját, ezáltal az L-kinurenin-kinurénsav átalakulást gátolja. Kísérleteinkben az L-NNA enzim inhibitor segítségével bizonyítottuk, hogy *in vitro* rendszerünkben az L-kinurenin kinurénsavvá alakulva fejtette ki antikonvulzáns hatását. Megvizsgáltuk továbbá egy szintetikus kinurénsav származék, az SZR-72 elektrofiziológiai hatásait. Alkalmazása a pentiléntetrazol modellben a kinurénsav analóg antikonvulzáns hatását bizonyítja.

További kísérleteinkben kimutattuk, hogy a kinurénsav nanomólos koncentráció tartományokban nem a megszokott NMDA receptor gátló hatását mutatja fiatal állatokban, hanem ellenkezőleg, szignifikáns növekményt generál a hippocampus CA1-es régiójából elvezetett mezőpotenciálok amplitúdójában. A nanomólos tartományban kifejtett facilitáló hatás AMPA receptor gátló jelenlétében nem érvényesül.

KÖVETKEZTETÉSEK

A Célkitűzésekben megfogalmazott kérdésekre vizsgálataink alapján az alábbi válaszokat adhatjuk:

1; A kinurénsav - mikromólos tartományban – *in vitro* kísérletekben is gátlóan hat a hippocampus CA1-es régiójának mezőpotenciáljaira.

2; A pentiléntetrazol *in vitro* modellben is eredményesen alkalmazható konvulzáns, és alkalmas a kinureninek neuromodulátoros hatásának vizsgálatára. A pentiléntetrazol modellben a kinurénsav előkezelés képes kivédeni a pentiléntetrazol által generált kóros facilitációt.

3; A kinurenin-kinurénsav konverzió *in vitro* körülmények között is végbemegy, és optimális paraméterek – megfelelő perfúziós sebesség - mellett kellően hatékony a pentiléntetrazol kiváltotta konvulzív hatások ellensúlyozásában.

4; Elsőként írtuk le, hogy az SZR-72, az új szintetikus kinurénsav származék, a kinurénsavval összemérhető antikonvulzív hatással bír.

5; Elsőként írtuk le, hogy 3-4 hetes állatokban, nanomólos tartományban a kinurénsav AMPA receptor serkentő hatással rendelkezik. A mesterségesen előállított kinurénsav analóg esetén szintén kimutatható ez a facilitáló hatás, ami azt mutatja, hogy az SZR-72 nemcsak a kinurénsav antikonvulzáns tulajdonságával rendelkezik - hanem alacsonyabb koncentrációk esetén (nM) a kinurénsavhoz hasonlóan - a pozitív neuromodulátoros effektussal is. A kinurénsav AMPA receptorokon kifejtett pozitív neuromodulátoros hatása felhívja a figyelmet arra, hogy a kinurénsav koncentrációjának változása az ontogenezis során vélhetőleg fontos szerepet játszik az idegrendszer fejlődésének szabályzásában. A hippocampus szinaptikus hálózatainak kialakulásában a funkcionális AMPA receptorok megjelenése nagy jelentőséggel bír. Mindezek alapján, felmerül annak a lehetősége, hogy a fejlődés kezdeti szakaszában még nyugvó AMPA receptorok aktiválásában a kinurénsav szerepet játszik. A kinureninek antikonvulzáns hatásának tanulmányozása mellett a jövőben a kinurénsav fiziológias körülmények között betöltött szerepének vizsgálata is figyelmet érdemel.

AZ ÉRTEKEZÉS SZEMPONTJÁBÓL KIEMELT FONTOSSÁGÚ KÖZLEMÉNYEK

Rozsa E, Robotka H, Nagy D, Farkas T, Sas K, Vecsei L, Toldi J: **The pentylenetetrazole-induced activity in the hippocampus can be inhibited by the conversion of l-kynurenine to kynurenic acid: An *in vitro* study.** *Brain Res Bull* 2008, 30;76(5):474-9
IF: 1.684

Rózsa E, Robotka H, Vecsei L, Toldi J: **The Janus-face kynurenic acid.** *J. Neural Transm.* 2008, DOI 10.1007/s00702-008-0052-5
IF: 2.938

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK

Nemeth H, Robotka H, Kis Z, **Rozsa E**, Janaky T, Somlai C, Marosi M, Farkas T, Toldi J, Vecsei L: **Kynurenine administered together with probenecid markedly inhibits pentylenetetrazol-induced seizures. An electrophysiological and behavioural study.** *Neuropharmacology* 2004, 47(6):916-925.
IF: 3.734, Független idéző: 2

Robotka H, Sas K, Agoston M, **Rózsa E**, Szénási G, Gigler G, Vecsei L, Toldi J.: **Neuroprotection achieved in the ischaemic rat cortex with L-kynurenine sulphate** *Life Sci* 2008, 82(17-18):915-9.
IF: 2.257

Katalin Sas, Hermina Robotka, **Éva Rózsa**, Márta Ágoston, Gábor Szénási, Gábor Gigler, Máté Marosi, Zsolt Kis, Tamás Farkas, László Vecsei and József Toldi: **Kynurenine diminishes the ischemia-induced histological and electrophysiological deficits in the rat hippocampus.** *Neurobiol of disease* 2008, (Article in press).
IF: 4,377

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Szegedi V, Fulop L, Farkas T, **Rózsa E**, Robotka H, Kis Z, Penke Z, Horvath S, Molnar Z, Datki Z : **Pentapeptides derived from Abeta 1-42 protect neurons from the modulatory effect of Abeta fibrils--an in vitro and in vivo electrophysiological study.** *Neurobiol Dis* 2005, **18**(3):499-508.

IF: 4.048, Független idéző: 3

Juhász-Vedres G, **Rózsa E**, Rakos G, Dobszay MB, Kis Z, Wolfling J, Toldi J, Parducz A, Farkas T: **Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective when administered either before or after injury in a focal cortical cold lesion model.** *Endocrinology* 2006, **147**(2):683-686.

IF: 5.236, Független idéző: 5

Szegedi V, Juhász G, **Rózsa E**, Juhász-Vedres G, Datki Z, Fulop L, Bozso Z, Lakatos A, Laczko I, Farkas T : **Endomorphin-2, an endogenous tetrapeptide, protects against Abeta1-42 in vitro and in vivo.** *Faseb J* 2006, **20**(8):1191-1193.

IF: 6.721, Független idéző: 2

KONFERENCIA ABSZTRAKTOK

Rózsa Éva, Penke Zsuzsa, Farkas Tamás, Kis Zsolt, Horváth Szatmár, Soós Katalin, Penke Botond, Toldi József: **Comparative electrophysiological study of pentapeptides in the neurotoxicity produced by beta-amyloid peptide**

IBRO International Workshop, 29-31 January, 2004, Budapest, Hungary

Éva Rózsa, Gabriella Juhász-Vedres, Marton Dobszay, Gabriella Rákos, Zsolt Kis, Tamás Farkas and József Toldi: **Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a focal cortical cold lesion model**

Congress of the Hungarian Neuroscience Society, January 27th, 2005, Pécs, Hungary

Gabriella Juhász-Vedres, Éva Rózsa, Zsolt Kis, Katalin Soós, Livia Fülöp, Marta Zarándi, Tamas Farkas, Botond Penke and József Toldi: **Comparative electrophysiological study of aggregation inhibitors on the neuromodulatory effects produced by beta-amyloid peptide**

Congress of the Hungarian Neuroscience Society, January 27th, 2005, Pécs, Hungary

Szegedi Viktor, Juhász Gábor, Rózsa Éva, Juhász-Vedres Gabriella, Datki Zsolt, Fülöp Livia, Farkas Tamás, Kis Zsolt, Soós Katalin, Zarándi Márta, Budai Dénes, Toldi József, Penke Botond: **Endomorphin II protects against Ab1-42 induced neuromodulatory effect on CA1 hippocampal neuron *in vivo* and in motor cortical slices *in vitro***

Congress of the Hungarian Neuroscience Society, January 27th, 2005, Pécs, Hungary

Rózsa Éva, Robotka Hermina, Sas Katalin, Vécsei László, Toldi József: **Az L-kinurenin neuroprotekciónban betöltött szerepe *in vitro* hippocampális agyszelet preparátumon**

Magyar Élettani Társaság LXX. Vándorgyűlése, Szeged, 2006. június 7-9

Robotka Hermina, Németh Hajnalka, Rózsa Éva, Sas Katalin, Toldi József és Vécsei László: **Az L-kinurenin neuroprotektív hatásának vizsgálata *in vivo* kísérletekben**

Magyar Élettani Társaság LXX. Vándorgyűlése, Szeged, 2006. június 7-9

Farkas Tamás, Juhász-Vedres Gabriella, Rózsa Éva, Soós Katalin, Datki Zsolt, Fülöp Livia, Kis Zsolt, Penke Botond és Toldi József: **Különböző pentapeptidek vizsgálata az 1-42 β -amiloid által okozott szinaptotoxicitásban**

Magyar Élettani Társaság LXX. Vándorgyűlése, Szeged, 2006. június 7-9

Robotka Hermina, Rózsa Éva, Kopcsányi Tamás, Berkecz Róbert, Péter Antal, Szatmáry István, Fülöp Ferenc, Vécsei László és Toldi József: **Egy új kinurensav származék vizsgálata *in vivo* és *in vitro* módszerekkel**

Magyar Idegtudományi Társaság XI. konferenciája, Szeged, 2007. január 24-27,

Vécsei László, Knyihár Erzsébet, Klivényi Péter, Robotka Hermina, Rózsa Éva, Toldi József: **Neurodegeneráció, neuroprotekción és kinureninek**

Magyar Idegtudományi Társaság XI. konferenciája, Szeged, 2007. január 24-27

NYILATKOZAT

Kijelentjük, hogy Rózsa Éva

Rózsa E, Robotka H, Nagy D, Farkas T, Sas K, Vecsei L, Toldi J: **The pentylenetetrazole-induced activity in the hippocampus can be inhibited by the conversion of l-kynurenine to kynurenic acid: An *in vitro* study.** *Brain Res Bull* 2008, 30;76(5):474-9
IF: 1.684

Rózsa E, Robotka H, Vecsei L, Toldi J: **The Janus-face kynurenic acid.** *J. Neural Transm.* 2008, DOI 10.1007/s00702-008-0052-5
IF: 2.938

címmel megjelent közleményekben végzett munkája meghatározó jelentőségű, s ezen közleményeket mindeddig nem használtuk fel tudományos fokozat (Ph.D.) megszerzésére, mint ahogyan azt a jövőben sem fogjuk megtenni.

Szeged, 2008. szeptember 10.

Dr. Toldi József

Robotka Hermina

Nagy Dávid