

Az utóbbi időben az idegtudományi kutatások terén megkülönböztetett figyelem irányul a neuroprotekciónak kérdéskörére, elméleti háttérének kutatására, gyakorlati-klinikai vonatkozásainak vizsgálatára. Mindez a neurodegeneratív és cerebrovasculáris betegségek gyakoriságának, a statisztikai adatoknak ismeretében valóban kiemelten fontosnak tűnik.

A lezárult OTKA pályázatunk keretében mi is ezen a területen dolgoztunk. A pályázat előkészítésekor annak vizsgálatát tűztük ki célul, hogy miként akadályozhatjuk meg az agyi (kérgi és hippocampalis) neuronok pusztulását (az azt megelőző hiperexcitációt) a serkentő aminosav receptorok (elsősorban NMDA receptorok) tranzienst gátlásával?

Az NMDA receptorok blokkolását természetes, endogén anyagokkal, neuroaktív triptofán metabolitokkal, elsősorban kinurénsavval (KYNA) kívántuk elérni. Célul tűztük ki, hogy szerveskémikusokkal, gyógyszervegyészekkel összefogva, mindent elkövetünk olyan kinurénsav-származékok kifejlesztéséért, mely neuroprotektív hatása mellett átmegy a vér-agy gáton is.

Röviden összefoglalva, **a pályázatban kitűzött célokat teljesítettük**. A pályázatban felvázolt ütemterv szerint, a felvázolt személyi összetételben, az eltervezett kollaborációk segítségével nemcsak elméleti ismeretekre tettünk szert, amit számos **publikációban** ismertettünk, de a kifejlesztett egyik eljárásunkkal a projekt ideje alatt elnyertük az **Innovatív farmakológus I. díjat** is, és egy **szabadalom** is előkészületben van.

Részletesen:

Több mint két évtizede ismert volt már, hogy a különböző szintetikus szerek mellett létezik egy endogén antagonistája is az NMDA receptoroknak (a Mg^{2+} mellett), ez pedig a KYNA. A KYNA a triptofán metabolizmusa során kinureninből (KYN) keletkezik, és az NMDA receptorok glicin kötőhelyén hatva gátolja azt. 2001 óta az is ismert, hogy a KYNA más támadásponton is fékezi a neuronális excitációt, nevezetesen, a glutamaterg preszinaptikus végződéseken lokalizálódó nikotinerger acetilkolin receptorokhoz (nAChR) kötődve, gátolja a glutamát preszinaptikus felszabadulását.

A rendelkezésre álló adatok alapján tehát a KYNA több szempontból is ideális neuroprotektív anyagnak ígérkezett. Egyetlen, de nagy problémát az jeleneti, hogy a KYNA rosszul jut át a vér-agy gáton.

A probléma megoldására több lehetőség is kínálkozott: 1) a triptofán metabolikus útvonalában egy olyan köztiterméket keresünk, mely előanyaga a KYNA-nak, de átmegy a vér-agy gáton, 2) az agy (cerebrospinális folyadék: CSF) természetes KYNA szintjét úgy emeljük meg, hogy olyan szert keresünk, mely fékezi a KYNA ürülését a SCF-ből, 3) ill. ezek kombinációját alkalmazzuk.

Megállapítottuk hogy:

- 1) a kinurenin (KYN) szisztémás adásával, vagy probenecid (PROB) (szerves savak, így a KYNA transzportját, ürülését blokkolja) kezeléssel, különösen pedig a kettő kombinációjával jelentősen emelhető a CSF KYNA szintje, 20-30 nM-ről akár több százszorosára is.
- 2) Nem mellesleg, együttműködést alakítottunk ki az SZTE Szervetlen Kémiai és Analitikai Tanszékén Péter Antal professzor úrral, így lehetőségünk van az agyszövetben ill. a CSF-ben a KYN, KYNA, és KYNA-származékok szintjének pontos meghatározására tömegspektrográfias módszerrel.
- 3) *In vivo* kísérletekben a KYNA szint emelkedését jelzi a hippocampus CA1-es piramis sejtjein a Schaffer-kollaterálisok ingerlésével kiváltott populációs spike-ok amplitúdójának a csökkenése is.

- 4) Az emelkedett KYNA szint a magatartási kísérletekben is egyértelmű hatással bírt: nőtt a sztereotípiák száma, még magasabb KYNA szintek esetében pedig akinézia lépett fel.
- 5) Tesztkísérletekben megállapítottuk azt is, hogy a hatást nem közvetlenül a beadott KYN, hanem az agyban (főként a gliális elemekben) *de novo* szintetizálódott KYNA okozza. Ez utóbbi megállapításunk egy jó darabig csak feltételezés volt, és csak a legutóbbi időben sikerült bizonyítanunk (Brain Res. Bull. (2008), doi:10.1016/j.brainresbull. 2007.12.001).
- 6) A KYNA neuroaktív tulajdonságainak elemzése mellett a fő cél a lehetséges neuroprotektív hatás bizonyítása volt. A pályázati tervnek megfelelően, pentiléntetrazol (PTZ) modellen vizsgáltuk a KYNA védő hatását. Megállapítottuk, hogy KYN (300 mg/kg) és PROB (200 mg/kg) előkezelés teljes mértékben kivédi a PTZ (60mg/kg) i.v. adása okozta görcstevékenységet. A védőhatás mindennél ékeesebb bizonyítéka az, hogy a kísérlet 5. napjára a csak PTZ-kezelt állatok mindegyike elpusztult, míg KYN+PROB előkezelés az adott időtartamra vonatkozóan 80%-os túlélést eredményezett. Igazoltuk, hogy a KYN+PROB előkezelés a protektív hatása mellett nem csökkenti a memóriefunkciókat (*Neuropharmacology* 47(6): 916-25., 2004).
- 7) A PTZ modell mellett bevezettünk agyi ischemiás modelleket is. Egyrészt, kísérleteket folytattunk focalis kérgi ischemiás modellen (fototrombotikus úton kialakítva a kérgi léziót), másrészt kidolgoztunk egy focalis traumás modellt (hideglézióval). A hidegléziós modellt 2005-ben mutattuk be (Sfn 35th Annual Meeting, 2005, Washington), majd két évig tökéletesítettük, és 2007-ben részletesen leírtuk (*Acta Neurobiol Exp* 67: 149-154., 2007). A hidegléziós modell széleskörű alkalmazhatóságát a kinureninektől eltérő mechanizmusú, más neuroprotektív vizsgálatokban is bizonyítottuk (*Endocrinology* 147(2): 683-6., 2006).
A focalis kérgi ischemiás modellek mellett kétféle globalis agyi ischemiás modellt is bevezettünk és használtunk: az ún. 2VO-t (a kétoldali carotis communis tranziens leszorításával) és a 4VO-t (kétoldali arteria vertebralis cauterézése, majd a kétoldali carotis communis leszorítása). A 2VO-s modelleken történt kísérletek közben figyeltük meg, hogy ugyanazon patkánytörzsön (Wistar) belül is mennyire másként tolerálják a 2VO okozta agyi hipoperfúziót a Harlan és a Charles-River eredetű állatok (*J. Neurosci. Methods*. 156 (1-2):231-235, 2006).
A neuroprotektív mértékét hisztológiai módszerekkel (Fluoro Jade B-, NeuN-, Gallyas-technika, Nissl-festés, S100-as jelölés), altatott állatok kérgéből és hippocampuszából történő elvezetésekkel (*in vivo* elektrofiziológiai), hippocampus- és kéreg szeletekből történő elvezetésekkel (*in vitro* elektrofiziológia), valamint magatartási kísérletekben (open field, Morris-water maze, radial maze) vizsgáltuk.
Focalis kérgi modelleken a KYN+PROB kezelés egyértelműen neuroprotektívnek bizonyult, csökkentette mind a kérgi lézió kiterjedését (a 10 nap alatti késleltetett sejtpusztulás következtében), mind pedig a penumbrában a területegységre eső sérült sejtek számát (*Eur. J. Pharmacol.* 564(1-3): 116-22., 2007).
2VO-s modelleken az extrém hosszú okklúzió (max. 30 napig vizsgáltuk) sem okozott morfológiailag kimutatható változást, ugyanakkor a funkció egyértelműen károsodott: a CA1-es régió piramis sejtjein a Schaffer-collaterálisok tetanizáló ingerlésével kiváltott LTP nagysága, időtartama jelentősen romlott a kontrollokhoz képest. KYN+PROB kezelés azonban egyértelműen funkciójavulást eredményezett (*Neurobiol. Dis.*, 2008, submitted).
4VO-s modelleken (10 perces carotis okklúzió) komoly sejtpusztulást okozott mind a kéregben (különösen a temporális területeken), mind pedig a hippocampus

CA1-es piramis sejtjeiben. KYN+PROB előkezelés nemcsak szignifikánsan, de igen jelentős mértékben csökkentette a sejtpusztulást mind a kéregben (*Life Sciences*, 2008, submitted), mind a hippocampusban (*Neurobiol. Dis.*, 2008, submitted).

Megjegyzendő, hogy míg a hippocampus esetében csak az előkezelés volt hatásos, (ami a hisztológia mellett az elektrofiziológiai vizsgálatokban is megmutatkozott), addig kéreg esetében, ha a KYN+PROB –et a reperfúzió megkezdését követő 10-15 percn belül beadjuk, akkor is szignifikánsan csökkenteni tudjuk az elpusztult kérgi sejtek számát (*Life Sciences*, 2008, submitted).

- 8) A KYN+PROB kezelés protektív hatását kipróbáltuk egy az eddigiektől teljesen különböző modellen is, nevezetesen egy migrén modellen (a nitroglicerinnel migrén modelljén). Közismert, hogy a nitroglicerinnel a migrénhez hasonlóan megemeli a *c-fos* immunreaktivitást a trigeminális ganglion caudális részén lokalizálódó másodrendű szenzoros neuronokban. Minthogy az első és másodrendű szenzoros neuronok közti szinapszisokban a transzmitter a glutamát, ésszerű volt feltételezni, hogy az endogén NMDA receptor blokkoló KYNA alkalmazása eredményes lehet ezen a modellen is. KYNA helyett –a fentebb részletezett okok miatt- itt is KYN+PROB kezelést alkalmaztunk. Feltételezésünk beigazolódt: a KYN+PROB a jól bevált dózisban (KYN: 300 mg/kg; PROB: 200 mg/kg) szignifikánsan csökkentette a nitroglicerinnel indukálta *c-fos* immunreaktivitás-növekedést az agytörzsben (*J Neural Transmission*, 114(4): 417-21., 2006, *Neurosci. Lett.* 418(2): 122-6., 2007).

Eredeti célkitűzésünkben szerepelt az is, hogy megpróbálunk olyan KYNA származékot előállítani (különösen azért, mert a KYN rendkívül drága), mely rendelkezik a KYNA neuroprotektív hatásával, ugyanakkor át is jut a vér-agy gáton. Ennek érdekében szoros együttműködést alakítottunk ki az SZTE ÁOK Orvosvegytani Intézetében Penke Botond akadémikussal, ill. egyik munkatársával (Dr. Somlai Csabával), valamint a Gyógyszerésztudományi Kar professzorával, Fülöp Ferenc akadémikussal. Nagyszámú vegyület létrehozása és tesztelése után két anyag maradt fenn a rostán: a glükózamin-kinurénsav (KYNA-NH-GLUC) valamint az SZR-72 kódjelű molekula.

- 1) A KYNA-NH-GLUC esetében úgy okoskodtunk, hogy a KYNA-ra egy aminkötésen keresztül glukózt kapcsolunk, bízva abban, hogy a glukóztranszporter átviszi a KYNA-t is a vér-agy gáton. Ebben az esetben a feltételezésünk beigazolódt. A KYNA-NH-GLUC-ot i.p./i.v. adva is bejutott a központi idegrendszerbe, és kifejtette hatását, ami mind elektrofiziológiai, mind a magatartási kísérletekben megmutatkozott. Maga az i.p./i.v. adott KYNA-NH-GLUC ugyan olyan hatású volt, mint az icv. adott KYNA (*Pharmacol. Biochem. Behav.* 77(1): 95-102, 2004), és ez a hatás neuroprotektívnek bizonyult (*Eur. J. Pharmacol.* 513(1-2): 75-80., 2005).
- 2) Az SZR-72 minden korábbi beavatkozásnál hatékonyabbnak bizonyult. Erről beszámoltunk a MITT 2007. évi szegedi konferenciáján, azonban publikációt nem tudok prezentálni, de még a molekula képletét sem tudom megadni, ui. szabadalmi eljárást kezdtünk ezzel kapcsolatban.
- 3) Projekt-tervünkben olyan kísérleti megközelítés is szerepelt, hogy enzimgátló alkalmazásával próbáljuk meg a metabolikus útvonalat a KYN → kvinolénsav (QUIN) helyett, fokozott mértékben a KYN → KYNA irányba terelni. Végeztünk ilyen jellegű kísérleteket, azonban, miután az agyban a metabolikus útvonal eleve a KYN → KYNA irányban van eltolódva, ezek a kísérletek nem hoztak átütő eredményt. Más kísérleteinkben kinurenin aminoszféraz (KAT) gátlót (N-omega-nitro-L-arginint: L-NNA-t) alkalmaztunk a KYN → KYNA útvonal, azaz a KYN alkalmazásakor *de novo*

képződő KYNA bizonyítására (Brain Res. Bull. (2008), doi:10.1016/j.brainresbull.2007.12.001).

A kimondottan kísérleti eredményeket bemutató publikációk mellett több elméleti jelentőségű munkánk is születet ebben a témában (*Curr. Neurovasc. Res.* 2(3): 249-260., 2005; *J Neural Transm.* 70:285-304., 2006.; *J Neurol Sci.* 257(1-2): 221-39., 2007; *Future Medicine: Future Neurology*, 2008. accepted).

Nagyon fontosnak és értékesnek tartjuk azt a legutóbbi időben tett megfigyelésünket, hogy a kinurénsav nemcsak az eddig ismert hatásokkal rendelkezik: 1) az NMDA receptor glicin kötőhelyén hatva, gátolja a receptort. Ezt μM –os tartományban fejt ki, 2) a preszinaptikus nAChR –on keresztül gátolja a glutamát felszabadulást. Ezt néhány száz nM-os koncentrációtartományban fejt ki. Mindkét hatás eredménye az agyi serkentő folyamatok csökkentése, a hiperexcitáció mérséklése. A legutóbbi időben tett megfigyeléseink szerint azonban a KYNA 200-250 nM-os koncentráció mellett serkentő hatásúnak bizonyult. Ez a hatás valószínűleg AMPA receptorokon keresztül érvényesül, ennek bizonyítása azonban még további munkát igényel. Mivel ez a koncentrációtartomány nagyon közel van a normál, egészséges patkány agy KYNA koncentrációjához (30-180 nM), épp csak valamivel van felette, mindez felveti a KYNA neuromodulátor szerepét, különösen pathológiás esetekben. A jelenséget „A Janus-arcú KYNA” címen írtuk le (*J of Neural Transmission*, 2008, submitted).

Munkacsoportunknak hosszú ideig fő témája volt a perifériás idegi sérüléseket követő központi idegrendszeri plaszticitás vizsgálata. Bár ebben a témában semmiféle anyagi támogatást nem kaptunk az utóbbi 5 évben, a munkát hirtelen teljesen abbahagyni ezen a téren még sem tudtuk (nem akartuk). A jelen beszámolási időszak alatt született pár közlemény is (ezen OTKA támogatás feltüntetésével) az idegi plaszticitás területen. Ezek a következők:

Cereb. Cort. 15(4): 378-84., 2005; *J Neurovirol.* 12(3): 161-170., 2006; *Acta Physiologica Hungarica*, (2008, in press).