

A KINURÉNSAV ÉS AZ SZR-122 HATÁSÁNAK
ELEKTROFIZIOLÓGIAI VIZSGÁLATA
PATKÁNY HIPPOKAMPÁLIS METSZETEKEN

SZTE Eötvös Loránd Kollégium

A triptofán metabolizmus

A triptofán esszenciális aminosav, amely a szervezetben vagy a szerotonin útvonalon, vagy a kinurenin útvonalon keresztül metabolizálódhat. A kinurenin útvonal intermediereit együttesen kinurenineknek nevezzük, melyek nagy része neuroaktív tulajdonságokkal bír [1,2,3].

Az agyszövetben a triptofán nagyrészt L-kinureninné alakul, ami aztán háromféle úton metabolizálódhat tovább: vagy a kinurenin-aminotranszferáz (KAT) enzimek közvetlenül KYNA-t szintetizálnak belőle, vagy a kinurenin-3-monooxygenáz (KMO) által 3-hidroxi-L-kinureninné alakul, melyből szintén KAT enzimek xanturénsavat szintetizálnak, vagy pedig kinureninázok antranilinsavvá alakítják [1]. Ez utóbbi a 3-hidroxi-L-kinureninnel együtt végül kinolinsavvá (QUIN) alakulhat, mely a NAD^+ és NADP^+ szintézis prekurzora [2].

A triptofán metabolizmusa a vér-agy gáton átjutva nagyrészt asztrocitákban történik. A kinurenin útvonalat eleinte csak a perifériás szövetekben tanulmányozták, és csak 1977-ben mutatták ki az L-kinurenin jelenlétét az agyban. Ez egy igen fontos eleme a kinurenin útvonalnak, mivel ebből keletkeznek a további kinurenin metabolitok. Klinikai jelentősége, hogy a KYNA-val ellentétben átjut a vér-agy gáton, így egyes neurológiai kórképekben potenciális farmakoterápiás szer lehet. Az agyszöveti kinurenin mindössze 40%-a keletkezik az agyban, 60%-a viszont a perifériás szervekben (pl.: májban, vesében, tüdőben, lépben) szintetizálódik, majd a vérkeringésből jut az agyba [2].

A kinurenin útvonal intermediereit közül a QUIN, a KYNA és a 3-hidroxi-L-kinurenin fontos szerepet játszik a neurodegeneratív betegségek kialakulásában és az cerebrális ischaemiában. A QUIN és a KYNA is a glutamáterg neurotranszmissziót befolyásolja az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorokon keresztül, míg a 3-hidroxi-L-kinurenin hatása e receptortól független, a reaktív oxigéngyökök termelését fokozza a szövetben [2].

A KYNA és a QUIN ellentétes hatása fontos szempont lehet olyan gyógyszerek fejlesztésében, melyek megváltoztatják e két anyag arányát. Ezen anyagok koncentrációja ugyanis megváltozik a stroke, de főleg a neurodegeneratív betegségek során. Feltételezik, hogy az Alzheimer, a Parkinson- és a Huntington-kór kialakulásában része lehet a glutamáterg transzmisszió fokozódásának a glutamát transzporterek számának csökkenése, vagy glutamát receptorok számának növekedése által; így a KYNA szintjének növelése neuroprotektív lehet ezen betegségeken [1].

Glutamát receptorok

A KYNA egy széles spektrumú glutamát receptor antagonistája. A glutamát az agy egyik legfőbb serkentő neurotranszmittere, melynek fontos ionotróp receptorai az NMDA, az AMPA (2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav) és a kainát receptorok.

Az NMDA receptorokon a KYNA a magnéziumon kívül az egyetlen ismert endogén antagonistája. Ezen receptorokon a glicin a glutamát kötőhelytől eltérő helyen kötődve képes koagonista hatást kifejteni. Így a KYNA ezen, sztrichnin inszenzitív glicinkötő modulátoros helyhez kötődve nemkompetitív glutamát antagonistaként képes gátolni azok működését: glicin nélkül már 10–30 μM , glicin jelenlétében 250 μM koncentrációban. Ugyanakkor magasabb, 300 μM -os illetve mM-os koncentrációban már az NMDA receptorok glutamát kötő helyén is lehet kompetitív antagonistája [3].

Az 1980-as években HPLC (High Performance Liquid Chromatography) technikával kimutatták, hogy mind a humán, mind a rágszáló agyszövetben a KYNA koncentrációja pikomólos koncentrációban van (humán: 150 pmol/g, egér: 5,8 pmol/g, patkány: 17,8 pmol/g) [4]. Mivel a KYNA NMDA receptorokon kifejtett hatása csak a fiziológiásnál jóval magasabb tartományban látható, azt feltételezték, hogy az endogén KYNA elsődlegesen inkább más receptoron hat.

Az $\alpha 7$ nACh receptorok a glutamáterg sejteken szabályozzák a glutamát felszabadulását a preszinaptikus terminálison [4,5]. A közelmúltban kimutatták, hogy a KYNA az $\alpha 7$ nACh receptorokon keresztül képes gátolni a hippocampusz CA1 régiójában lévő piramis sejtekre érkező GABAerg áramokat [6]. Ennek többek között a skizofréniában lehet jelentősége, ahol a hippocampusz GABAerg interneuronjai sérülnek [7].

Kinurenin aminosztransferáz II (KAT II) nullmutáns egerekben a célzott mutáció következtében az L-kinureninből KYNA átalakulás gátolt volt, és hippocampuszukban a 21. posztnatalis napon alacsonyabb KYNA szintet mértek. Kimutatták, hogy bennük megnövekedett az interneuronok alap $\alpha 7$ nikotinos

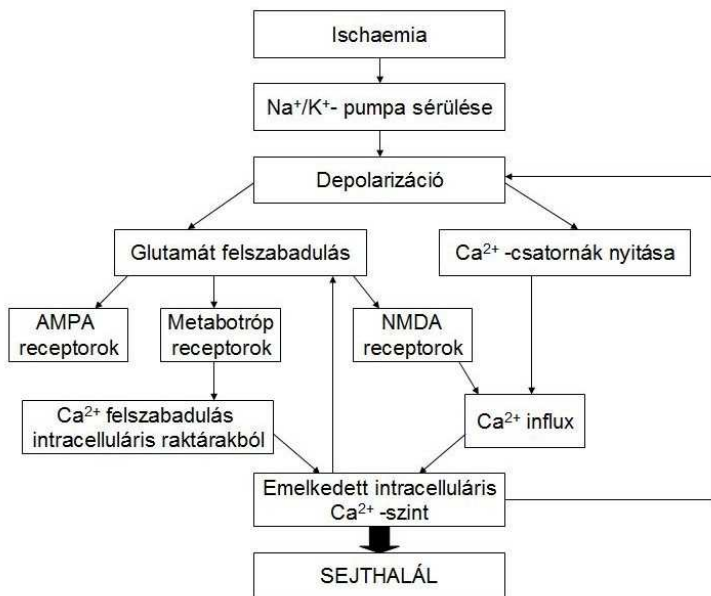
acetilkolin (nACh) receptor aktivitása, ami fokozta a CA1 régió piramissejtjein érvényesülő, interneuronokból eredő GABAerg (gamma-amino-vajsav) gátlást. Ezt 100 nM KYNA csökkenteni tudta. Ugyanakkor a mutáns és a vad típusú ege-
rekben az interneuronokon lévő GABA_A és NMDA receptorok aktivitása, és az ezen sejtekre érkező glutamát felszabadulását szabályozó α 3B4 nACh receptorok aktivitása hasonló volt. Mindezek alapján azt feltételezték, hogy a KYNA gátló hatása elsődlegesen nem az NMDA, hanem az α 7 nACh receptorokon keresztül érvényesül [3,8]. Ezt a feltevést az is valószínűsíti, hogy ezeken a receptorokon a KYNA jóval alacsonyabb mennyisége is elegendő volt a hatás kiváltásához: már 0,1 és 1 μ M koncentrációban jelentősen csökkentette az α 7 nACh receptorok aktivitását, míg az NMDA receptorokét glicin nélkül csak 15 μ M- koncentrációban tudta gátolni [5].

Többek között a mi kutatócsoportunk is kimutatta a KYNA AMPA receptorokon kifejtett kettős hatását, azaz, hogy alacsonyabb μ M-os és nM-os koncentráció tartományban serkentő, míg magasabb μ M-os és mM-os koncentráció tartományban gátló hatást fejt ki [9,10].

Excitotoxicitás

Az excitotoxicitás az NMDA receptorok túlműködéséből adódó túlzott sejtvál-
lasz, mely az idegsejtek pusztulását okozhatja. A sejtihal oka leginkább az intracelluláris kalcium felhalmozódása, ami a sejtben proteázokat és foszfolipázokat aktivál, valamint indukálja a lipidperoxidációt és reaktív oxigén-
gyökök termelődésével járó folyamatokat [11–13]. Az intracelluláris kalciumszint növekedése történhet egyrészt az intracelluláris raktárakból való kalcium felsza-
badulásával, másrészt az extracelluláris térből ioncsatornákon (NMDA és AMPA receptorok) keresztüli kalciumáramokkal [12,13,14] (1. ábra). Normál körülmé-
nyek között a glutamát receptoroknak fontos szerepe van az agyi plaszticitásban, a hosszútávú potencírozódás (LTP, long term potentiation) és a hosszútávú de-
presszió (LTD, long term depression) kialakításában. Hipoxia és egyéb traumás körülmények hatására azonban az asztrocitákból és neuronokból főlegesen fel-
szabaduló glutamát az NMDA receptorok túlműködését okozza.

A KYNA az NMDA receptorok gátlásával megakadályozza az azok túlműkö-
déséből adódó, túlzott kationbeáramlást és sejtpusztulást. A KYNA klinikai al-
kalmazása terén akadályt jelent, hogy csak nehezen jut át a vér-agy gáton. Ennek leküzdésére alapvetően háromféle módszer ismert. Az első a KYNA előanya-
gával, az L-KYN-el történő kezelés, mely már ígéretesnek bizonyult számos kí-
sérleti elrendezésben [16].



1. ábra: Az excitotoxicitás folyamata (Lyden & Wahlgren, 2000 alapján módosítva).

Egy másik megközelítés a triptofán metabolizmus megváltoztatása enzimgátlók, mint például KMO gátlók, kinurenináz gátlók és 3-HAO gátlók használatával, amelyekkel a 3-hidroxi-L-kinurenin, az antranilinsav és a QUIN keletkezése helyett a KYNA szintézis felé lehet eltolni a folyamatot.

A harmadik módszer olyan KYNA-analógok szintézise, melyek átjutnak a vér-agy gáton. Jelen tanulmányban az utóbbi megközelítésben használandó, újonnan szintetizált KYNA amid, az SZR-122 hatását vizsgáltam meg a patkány hippocampusban.

Célkitűzés

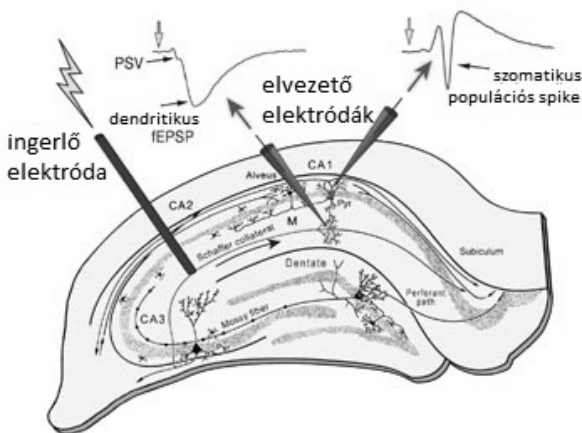
Kísérleteim célja az volt, hogy megvizsgáljam a KYNA és az SZR-122 neuromodulátoros hatását hippocampális preparátumon. Adatokat gyűjtöttem arról, hogy adott kísérleti elrendezésben, 100 μM-os koncentrációban az SZR-122 hatása összemérhető-e a KYNA hatásával. A serkentő posztszinaptikus mezőpotenciálok (fEPSP) és a populációs spike-ok (PS) amplitúdóinak változása információt ad az ingerületbe került sejtek számáról, és így a sejtek ingerelhetőségének változásáról.

Kísérleti elrendezés

Kísérleteimhez fiatal felnőtt, hím Wistar patkányokat használtam. Dekapitálás és agyszelet-preparálás után az *in vitro* elektrofiziológiai mérésekhez az ingerlő elektródát a hippocampusz CA3 régiójának stratum radiatum részébe helyeztem, ezzel ingerelve a CA3-ból CA1 régióba futó rostokat.

A hippocampuszban a CA3-ból induló rostok alkotják a Schaffer-kollaterálist, melyek a CA1 stratum radiatum részében végződve adják át az ingerületet az ott lévő apikális dendriteknek. Itt a szinaptikus áttevődés hatására létrejövő posztszinaptikus potenciálok összeadódnak, és ez adja az elvezetett serkentő posztszinaptikus mezőpotenciálokat (fEPSP). Az apikális dendritekben létrejövő ingerület a stratum piramidaleban lévő piramisisejtek sejttestjein összegződik, mely az axon iniciális szegmentumon a küszöbpotenciál elérése esetén akciós potenciált vált ki; ezen akciós potenciálok összegződését mérjük populációs spike-ok (PS) formájában. Az elvezetett PS-ek amplitúdó-növekedése vagy -csökkenése nem az ingerület intenzitásának növekedését vagy csökkenését jelenti az egyedi sejteken, hiszen a „mindent vagy semmit” elve alapján a sejt küszöbpotenciáljának elérése után a létrejött akciós potenciálok mértéke már ugyanakkorra lesz, hanem arról ad információt, hogy az ingerlés következtében egyszerre hány sejt tüzelt.

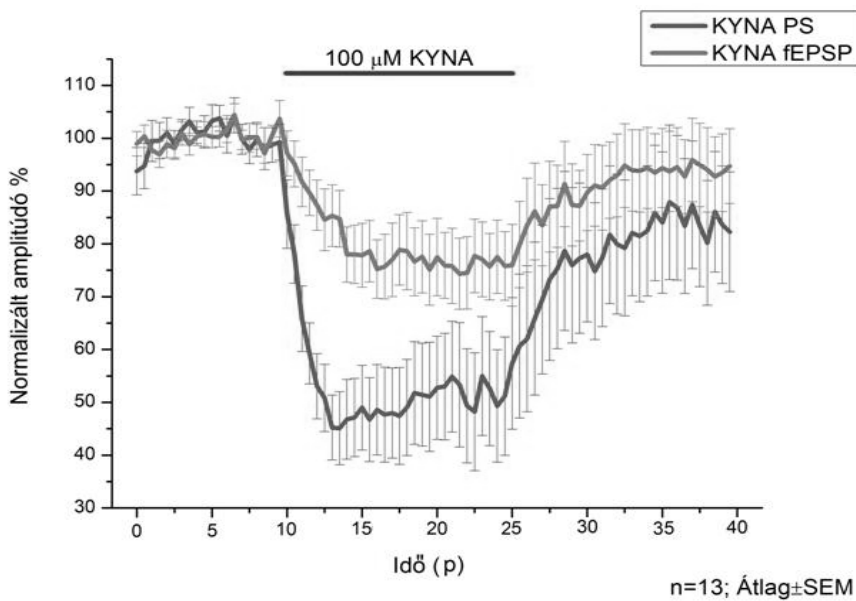
A fEPSP-k esetében viszont a növekedés összefügg az ingerület nagyságával, hiszen a küszöbpotenciál eléréseig a posztszinaptikus membránpotenciál fokozatosan növekedik a növekvő ingerlés hatására.



2. ábra: Kísérleti elrendezés (Gruol és mtsai., 2008).

Eredmények értékelése

Eredményeim azt mutatják, hogy a KYNA 100 μM koncentrációban a negyed órás rámosás ideje alatt $26,2 \pm 2,6\%$ -kal csökkentette a fEPSPk, míg jóval nagyobb mértékben, $59,2 \pm 3,7\%$ -kal a PS-ok amplitúdóját a kontrollszakaszhoz képest (3. ábra). A KYNA hatása igen gyors volt, már a rámosás után 2–3 perccel elérte a maximális hatást, majd kimosás után lassabban, 7–8 perc alatt az amplitúdók visszaálltak az eredetinel alacsonyabb szintre, a fEPSP-k esetében $87,5 \pm 4,3\%$, a PS-oknál pedig $67,4 \pm 5,1\%$ -os átlagos értékre.

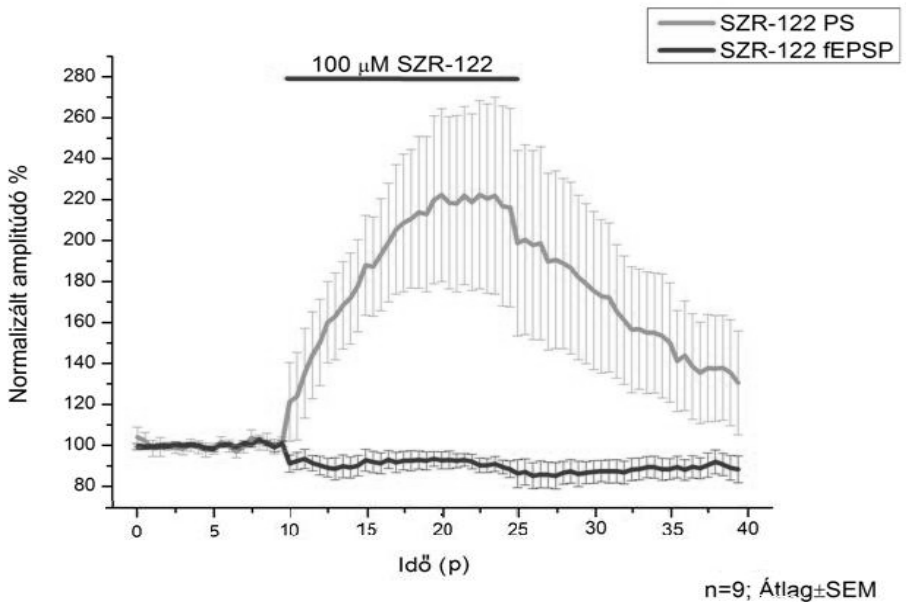


3. ábra: A KYNA 100 μM -os koncentrációban csökkentette mind a fEPSP-k, mind a PS-ok amplitúdóját, de a PS-okra jelentősebb hatással volt.

Az SZR-122 esetében azt látjuk, hogy a KYNA-val ellentétesen hatott a PS-ok amplitúdójára: a rámosás ideje alatt átlagosan $130,4 \pm 31\%$ -kal megnövelte azokat (4. és 5. ábra). A hatása ennek az anyagnak is hamar megjelent, a maximális hatást a rámosás kb. 10. percében érte el, majd kimosás után fokozatosan közelítettek az amplitúdó értékek a kontrollszinthez, de a regisztrálás 15 perce alatt nem érték el azt, mindössze $192,6 \pm 17,8\%$ -ra csökkentek vissza. Érdekes módon az

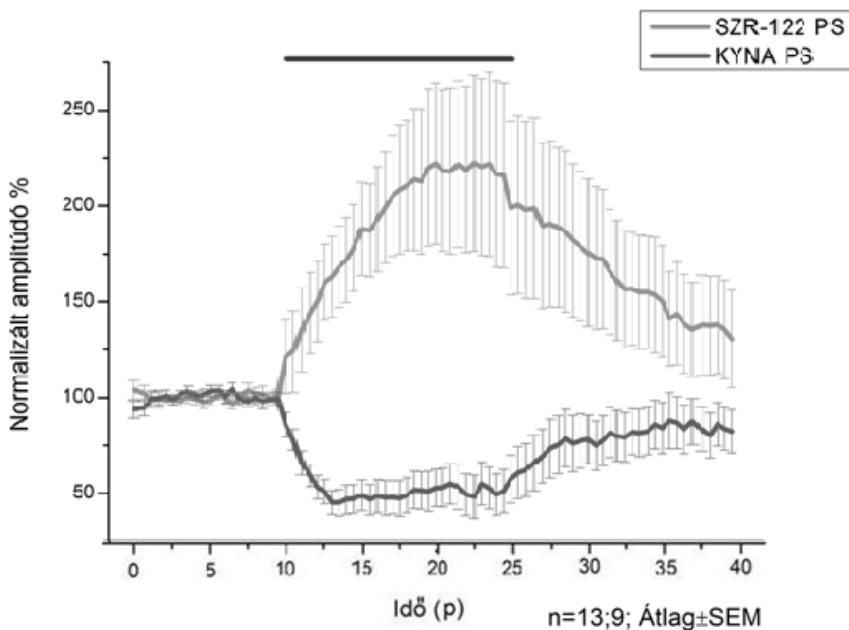
SZR-122 100 μM -os koncentrációban nem változtatta jelentősen a fEPSP-k amplitúdóját (4. ábra).

Az SZR-122 egy KYNA amid, melyről kísérletem kezdetén azt feltételeztem, hogy a KYNA-val hasonló hatást fog mutatni. Azonban a kezdeti hipotézissel ellentétes eredményt kaptam: a fEPSP-re az analóg nem volt jelentős hatással, míg a PS amplitúdóit a KYNA-val ellentétben jelentősen megnövelte. Felmerül a kérdés, hogy egyazon agyszövetben mérve hogyan kaphattam mégis eltérő eredményt a kétféle kiváltott válaszon. Elképzelhető, hogy az SZR-származék valamilyen mechanizmussal depolarizálja a sejteket. Ebben az esetben azok nyugalmi membránpotenciálja közelebb kerülne a küszöbpotenciáljukhoz, így az anyag rámosásakor ugyanakkora ingerlésre több sejt kerülhet ingerületbe, és így a több sejt tüzelése nagyobb PS amplitúdót eredményez. Ezzel párhuzamosan a sejtek nyugalmi membránpotenciál értékének növekedése nem befolyásolná a fEPSP-k amplitúdóját, mert ez az ingerületátvitelt nem érintené, csak lecsökkenne a küszöbpotenciál eléréséhez szükséges feszültségkülönbség.



4. ábra: SZR-122 hatása a fEPSP-k és PS-ok amplitúdóira. 100 μM koncentrációban jelentősen megnövelte a PS-ok amplitúdóját, míg a fEPSP-re nem volt hatással.

Méréseim alapján az SZR-122 nem bizonyult hatékony KYNA-analógnak, mert inkább serkentő semmint gátló karakterű molekuláról van szó; ugyanakkor mindenképpen érdemes lenne tisztázni, milyen folyamat állhat a fent leírt hatás hátterében, ezzel elősegítve újabb KYNA-analógok kémiai tervezését.



5. ábra: A KYNA és az SZR-122 PS-ra gyakorolt hatása: a KYNA csökkentette, míg az analóg látványosan megnövelte az amplitúdókat. A hatás mindkét anyag esetében gyorsan megjelent.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Vécsei L., Szalárdy L., Fülöp F., J. Toldi J.; *Nature Reviews Drug Discovery* **12**, 64–82., 2013
- [2] Stone T. W.; *Pharmacological Reviews* **45**, 309–379., 1993
- [3] Moroni F., Cozzi A., Sili M., Mannaioni G.; *Journal of Neural Transmission* **119**, 133–139., 2012
- [4] Marchi M., Risso F., Viola C., Cavazzani P., Raiteri M.; *Journal of Neurochemistry* **80**, 1071–1078., 2002
- [5] Hilmas C., Pereira E. F., Alkondon M., Rassoulpour A., Schwarcz R., Albuquerque E. X.; *Journal of Neuroscience* **21**, 7463–7473., 2001
- [6] Banerjee J., Alkondon M., Pereira E. F. R., Albuquerque E. X.; *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **341**, 500–509., 2012
- [7] Benes F. M., Lim B., Matzilevich D., Walsh J. P., Subburaju S., Minns M.; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **104**, 10164–10169., 2007
- [8] Alkondon M., Pereira E. F. R., Yu P., Arruda E. Z., Almeida L. E. F., Guidetti P., Fawcett W. P., Sapko M. T., Randall W. R., Schwarcz R., Tagle D. A., Albuquerque E. X.; *Journal of Neuroscience* **24**, 4635–4648., 2004
- [9] Trump B., Berezsky I.; *FASEB Journal*, 219–228., 1995
- [10] Kristian T., Siesjo B. K.; *Stroke* **29**, 705–718., 1998
- [11] Van Reempts J., Borgers M.; *Annals of Emergency Medicine* **14**, 736–742., 1985
- [12] Zhou X., Ding Q., Chen Z., Yun H., Wang H.; *Journal of Biological Chemistry* **288**, 24151–24159., 2013
- [13] MacDermott A., Mayer M., Westbrook G.: NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones, 1986
- [14] Krishnamurthy K., Mehta B., Singh M., Tewari B. P., Joshi P. G., Joshi N. B.; *Brain Research* **1529**, 143–153., 2013
- [15] Lyden P., Wahlgren N. G.; *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* **9**, 9–14., 2000
- [16] Nozaki K., Beal M. F.; *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **12**, 400–407., 1992