



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

EGIS Gyógyszergyár Nyrt. Preklinikai Kutatási Főosztály

Másodlagosan keletkező glutamát kimutatása és hatása *in vitro* neurotoxicitási tesztekben

OTDK Dolgozat

Készítette:

Hámornik Gábor Bence
Biomérnök Msc. II. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Herberth Balázs tudományos főmunkatárs

Kaufmanné Bojti Erzsébet kutató-fejlesztő analitikus

EGIS Gyógyszergyár Nyrt.
Preklinikai Kutatási Főosztály
Molekuláris Farmakológiai Kutatólaboratórium

A dolgozat bemutatását a TÁMOP - 4.2.2.B-10/1--2010-0009 "Új tehetséggondozó programok és kutatások a Műegyetem tudományos műhelyeiben" című program támogatta

Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

I.	Bevezetés.....	3
II.	Rövidítések jegyzéke	5
III.	Irodalmi áttekintés.....	7
1.	A glutamát, mint neurotranszmitter	7
2.	Glutamát homeosztázis és az excitotoxicitás	11
3.	Az excitotoxicitás szerepe a neurodegeneratív megbetegedésekben	14
4.	Endogén glutamát felszabadulás és egyéb celluláris stressz folyamatok kapcsolata	17
5.	Modern gyógyszerkutatás	18
6.	A preklinikai gyógyszerkutatás újításai és a High Content Screening	20
7.	In vitro neurális tenyészetek és felhasználásuk a modern központi idegrendszeri gyógyszerkutatásban	21
8.	Glutamát mennyiségi meghatározásának lehetőségei	24
IV.	Célkitűzés.....	29
V.	Anyagok és módszerek	30
1.	Primer neurális tenyészetek.....	30
2.	Neurotoxikus tesztek.....	31
3.	Életképesség mérések.....	32
4.	A HPLC-s rendszer	33
5.	Felhasznált vegyszerek.....	34
6.	Alkalmazott statisztikai vizsgálatok.....	34
VI.	Eredmények.....	35
1.	Módszer kiválasztása és kidolgozása	35
2.	A kidolgozott analitikai módszer validálása	43
3.	Glutamátszintek változása különböző neurotoxikus kísérletekben.....	49
3.1.	Az excitotoxicitás szerepe oxidatív stressz okozta neurotoxicitási kísérletekben	49
3.2.	Amiloid-béta okozta glutamátszint változások	54
VII.	Diszkusszió	57
1.	Az analitikai HPLC-s módszer kidolgozása	57
2.	A kidolgozott analitikai módszer alkalmazása másodlagosan felszabaduló glutamát igazolására elsődleges oxidatív stressz esetén, in vitro idegsejttenyészeteken	58
3.	A felszabaduló glutamát jelentőségének vizsgálata $A\beta_{1-42}$ kezelés esetén, in vitro idegsejttenyészeteken	60
4.	Az in vitro neurotoxicitási tesztek információ tartalmának növelése a glutamátszint változás analitikai meghatározásának beillesztésével	61
VIII.	Összefoglalás	63
IX.	Köszönetnyilvánítás	64
X.	Irodalomjegyzék.....	65
XI.	Függelékek	699

I. Bevezetés

Az EGIS Preklinikai Kutatási Főosztályának Molekuláris Farmakológiai laboratóriumában célunk neurodegeneratív megbetegedések *in vitro* modellezése, neuroprotektív hatóanyagjelölt molekulák keresésének érdekében. A különböző neurodegeneratív megbetegedésekre specifikus elsődleges hatások, mint tápanyag és oxigén hiánya (stroke), proteopatikus megbetegedéseket okozó toxikus fehérjék koncentrációjának megnövekedése (béta-amiloid, prion), bakteriotoxinok (fertőzések) vagy fizikai sérülések stb., olyan celluláris stressz folyamatokat indítanak be, amelyek további sejtpusztulást előidéző, másodlagos faktorok keletkezését eredményezik.

A sérült szövetből endogén módon felszabaduló másodlagos stresszor ágensek, mint a reaktív oxigén gyökök megnövekedett szintje, gyulladásos faktorok felszabadulása vagy az extracelluláris glutamát koncentráció megnövekedése a toxicitás későbbi fázisaiban elsődlegesen felelősek lehetnek az idegsejtek pusztulásáért. Az elsődlegesen és másodlagosan kialakuló toxikus folyamatok később egymással párhuzamosan és egymást indukálva is lejátszódhatnak, sőt az egyes esetekben közvetlen kiváltó (elsődleges) hatás más kórképben másodlagos tényezőként jelenhet meg. Ezért az egyes hatások kezelésére specifikusan alkalmas gyógyszerek kifejlesztéséhez olyan kísérletes rendszerek szükségesek, ahol az idegsejteket károsító összetett folyamatok egymástól jól elkülöníthetők.

Feladatom az egyik legjellemzőbb másodlagos stresszorként megjelenő molekula a glutaminsav (anionja a glutamát) szintjeinek mérésére alkalmas analitikai módszer kidolgozása volt különböző összetételű és összetettségű extracelluláris oldatokban, lehetővé téve a glutamát felszabadulás mértékének direkt meghatározását.

A glutaminsav egyike a huszonnégy fehérje alkotó aminosavnak, ezenkívül a központi idegrendszerben a legfőbb izgató, azaz excitátoros neurotranszmitter szerepét tölti be. A glutamaterg neurotranszmisszió felelős többek között olyan fontos fiziológias funkciókért, mint amilyenek a tanulási folyamatok és a memórianyom kialakulása. Ugyanakkor a megnövekedett extraszinaptikus koncentrációja az idegsejtek túlingerlését okozza, ami végső soron a neuronok pusztulásához vezet. Ez a folyamat az excitotoxicitás. Az excitotoxicitás szerepet játszik számos olyan napjainkban elterjedt neurodegeneratív megbetegedés patomechanizmusában, mint a stroke, az Alzheimer- vagy a Parkinson-kór.

Az analitikai feladat összetettsége az extracelluláris glutamát koncentráció alacsony szintjében, valamint a tenyésztő médium összetételének komplexitásában rejlik. Ezért a feladat megoldására fordított fázisú nagyhatékonyságú kromatográfiás (RP-HPLC) módszert dolgoztam ki, amely széles koncentráció tartományban alkalmas a tenyésztő médium glutamát szintjének kvantitatív vizsgálatára. Kísérleteimben az így kidolgozott analitikai módszer segítségével sikerült meghatározni a glutamátszint-változást az oxidatív stressz és az Alzheimer-kór asszociálta béta-amiloid okozta *in vitro* idegsejtpusztulásban.

II. Rövidítések jegyzéke

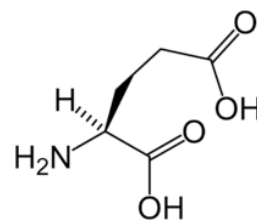
A β ₁₋₄₂	Béta-amiloid 42 aminosavból peptidje
AD	Alzheimer's diseases, Alzheimer-kór
Adv dMEM	Advanced Dulbecco Modified Medium
AMPA	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)-propionsav
CAR	Citozin-arabinóz
CE	Capillar electrophoresis, kapilláris elektroforézis
Ci	Kalibráció alapján visszaszámolt koncentráció
Cn	Nominális koncentráció
DAD	Dióda soros detektor
DAG	Diacil-glicerol
DIV	Days In Vitro, sejtek kiültetésüktől számított ideje
EAAT	Excitátoros aminosav transzporter
FLD	Fluoreszcens Detektor
GFP	Green Fluoreszcent Protein
GluR	Glutamát receptor
GM	Glutamax adalék
HCA	High Content Analysis
HCS	High Content Screening
HPLC	Nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia
HTS	High Troughput Screening
iGluR	Ionotróp glutamát receptorok
IP ₃	Inozitol-trifoszfát
KA	Kainsav
mGluR	Metabotróp glutamát receptor
MS	Tömegspektrometria
MTT	3-(4,5-demetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NAC	N-acetilcisztein
NAD(P)H	Nikotinamid-adenozin-difoszfát
NBA	NeuroBasal-A médium
NMDA	N-metil-D-aszpartát
NO	Nitrogén-monoxid

NOS	Nitrogén-monoxid-szintáz
O/N	Over Night, egy éjszakán át tartó
OPA	orto-Ftálaldehid
PCA	Perklórsav
QC	Minőségellenőrző Kontroll
ROS	Reaktív oxigén származékok
TLC	Vékony réteg kromatográfia

III. Irodalmi áttekintés

1. A glutamát, mint neurotransmitter

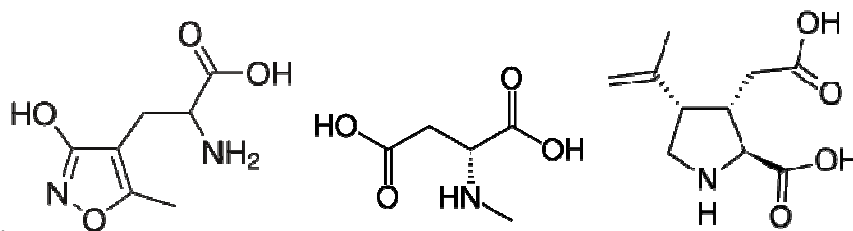
A glutaminsav vagy anionja a glutamát (1. ábra) egyike a huszonnégy fehérjealkotó aminosavnak. Normál fiziológiás, 7,4-es pH-n láncvégi karboxil csoportja deprotonálódik, ezért a molekula savas aminosavak közé sorolandó. A glutamát nátrium sója legelterjedtebben használt ízfokozóként ismert, mint az ún. umami az ötödik íz.



1. ábra A glutaminsav

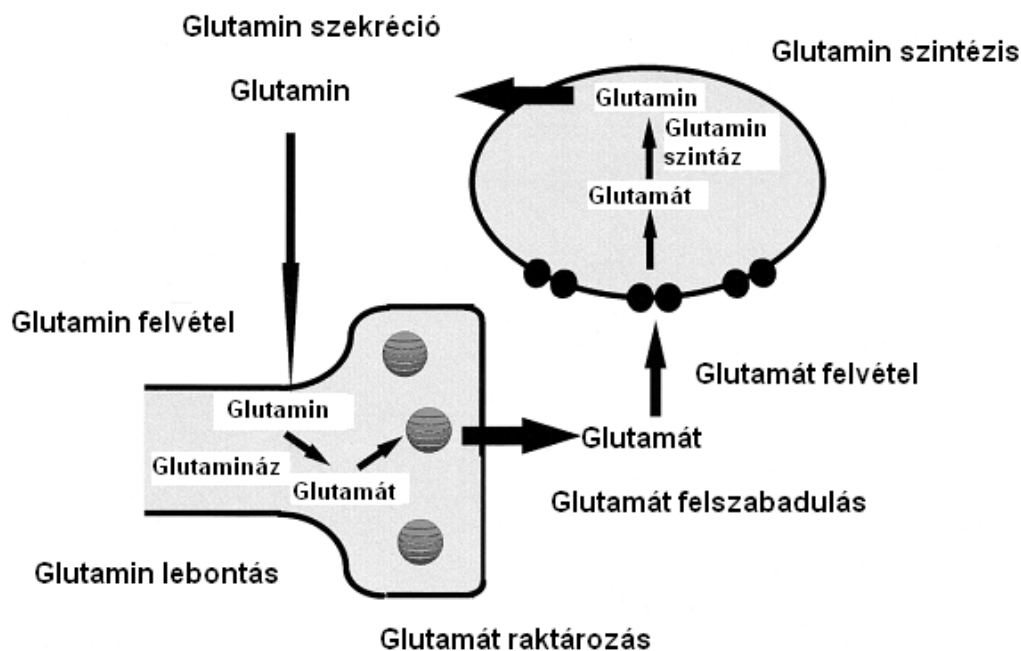
A glutaminsav a nem esszenciális aminosavak közé tartozik, azaz a szervezet képes bioszintetizálni. A glutamát fő bioszintetikus forrása citromsav ciklusban képződő α -ketoglutarát, amelyet a transzamináz enzim alakít glutaminsavvá [1]. Azonban a glutamát nagyrészt a táplálék fehérjetartalmának hidrolizátumából kerül a szervezetbe. A béltraktusból felszívódva a vérkeringésbe jut, onnan a sejtekben kerülve glutamát transzamináz α -ketoglutaráttal alakítja, amely molekula citromsav-ciklusba belépve katabolizálódik tovább [1]. A metabolikus glutamát a vérágygáton keresztül nem jut a központi idegrendszerbe és ott fiziológiás hatást nem fejthet ki. Itt a gliasejtek de novo bioszintézis útján állítják elő.

A glutamátnak igen fontos élettani szerepe van a központi idegrendszerben, ahol a legfőbb izgató, azaz excitátoros neurotransmitter. Az ionotróp glutamát receptorokat (iGluR) szintetikus szelektív agonistáik szerint oszthatjuk, N-metil-D-aszpartátra (NMDA), 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)-propionsavra (AMPA) és kainsavra (KA) érzékeny receptor családokra (2. ábra). Emellett külön csoportot képeznek metabotróp G-fehérjekapcsolt glutamát receptorok (mGluR) [2]



2. ábra A glutamát receptorok szintetikus agonistái: AMPA, NMDA és kainsav

Az ioncsatorna-kapcsolt ligandvezérelt glutamát receptorok egyaránt az excitátoros neurotranszmissziós folyamatokban vesznek részt. A glutamát a sejtekben szinaptikus vezikulákban tárolódik, ezek tartalma Ca^{2+} szignálra (exocitózis) ürül a szinapszisba. Az ioncsatorna-kapcsolt receptorok, amelyek kationokra permeábilisek, ligand okozta aktivációjukkor a kationok a sejtbe áramlanak, ezáltal depolarizációt idézve elő. A depolarizáció a küszöbpotenciált meghaladva akcióspotenciált okoz, amelyet a neuronon az ingerület tovaterjedése követi [3]. A glutamát bontó enzimek az extracelluláris térben nem találhatók, ezért a molekula excitátoros aminosav transzporterek (EAAT) által kerül visszavételre majd glutamátra specifikus intracelluláris transzporterek (VGAT) által újra tárolási helyükre, a szinaptikus vezikulákba. Az EAAT-eknek 5 típusa van, ebből az 1-2. típusok a glia- és endotél-sejtek, míg a 3-4. a neuronok membránjában találhatók és az 5. típus pedig a retinasejtekben. A transzportereket legfőképpen a Na^+ ionok elektrokémiai gradiense hajtja. A glutamát nagy részét a magas affinitású transzporterekkel rendelkező asztrociták veszik vissza, ahol a molekulát glutamát-szintáz enzim alakítja glutaminná. Ez újra az extracelluláris térbe szekretálódik, ahol a SNAT1 (Sodium-coupled neutral amino acid transporter, nátriumfüggő neutrális aminosav transzporter) transzporter fehérje juttatja azt a neuronokba. Itt bekerült glutamint a glutamináz 2 (GLS 2) alakítja ismét glutamáttá és a VGAT-on keresztül kerül a szinaptikus vezikulákba. Ez a transzport körfolyamat az ún. glutamát-glutamin ciklus (3. ábra) [4]. Az asztroglia sejtek szerepét különösen fontos hangsúlyozni a glutamátszint fenntartásába, ezért meg kell jegyezni, hogy az általam is alkalmazott *in vitro* rendszerekben alacsony arányban vannak jelen vagy éppen teljesen hiányoznak az ilyen típusú sejtek.



3. ábra Glutamát-glutamin ciklus sematikus ábrája [5].

A glutamát receptorok közül az AMPA receptorok négyféle alegység típus tetramer kombinációjából jöhetnek létre. A receptort alkothatja a GluR 1,2,3 és 4 alegységek, majd az összeállt receptor az endoplazmatikus retikulumban dimerizálódva legtöbbször heterotetramerként kerül a szinaptikus membránba. Az ioncsatorna permeábilis Na^+ , K^+ kationokra és attól függően, hogy receptor nem tartalmaz GluR2 alegységet akkor Ca^{2+} ionokra is. Az AMPA receptorok az agonista kötődését követően gyors deszenzitivizáció lép fel és az ioncsatorna zárul. Ezáltal az AMPA receptorok a gyors excitátoros ingerületvezetéséért felelősek [2] [3].

A glutamát receptorok másik csoportja az NMDA receptorok családjába. Ezek is tetramer típusú ioncsatornák, amelyeket két-két NR1 és NR2 féle alegység alkotja [6]. A receptor permeábilis mind Na^+ , K^+ és Ca^{2+} ionokra. Az NMDA receptor az agonista kötődésén felül szükség van tovább glicin koagonista jelenlétéhez, továbbá szükséges a feszültségfüggő magnézium blokk megszüntetése is a csatorna nyitáshoz. A receptor nyitáskor a csatornán beáramló kationok további depolarizációt okoznak [3].

A kainát receptorok képviselik a glutamát receptorok harmadik csoportját. A tetramer receptort a GluR5-7 és KA1-2 alegységek alkotják. A receptor depolarizációs folyamatokban vesz részt, mivel a ligand kapcsolódását követően Na^+ és K^+ ionokra lesz permeábilis. Meg kell jegyezni, hogy a léteznek preszinaptikus kainát receptorok,

amelyek a preszinaptikus gátlási folyamatokban vesznek részt. Mindazonáltal az ionotróp glutamát receptorok közül a kainát receptorok élettani szerepe a legkevésbé felderített [7].

Az ioncsatorna-kapcsolt receptorokon kívül léteznek metabotróp glutamát receptorok (mGluR) is, amelyek a G-fehérje kapcsolt receptorok családjába tartoznak. Három csoportjuk közül az I.-es csoport a G_q fehérje intracelluláris felszabadulását okozzák. Ezek aktivációjukkor intracelluláris másodlagos jelátviteli utakat indítanak be, így a foszfolipáz C-t (PLC) hozzák működésbe, amely hirdolizálva a foszfoinizitol-foszfolipideket inizitol-trifoszfát (IP_3) és diacil-glicerol (DAG) képződik. Az IP_3 az endoplazmatikus retikulumba vándorolva a kalcium raktárakat felszabadítva növeli annak intracelluláris szintjét. A DAG a membránban maradv pedig aktiválja a protein kináz C-t (PKC). A mGluR I. csoport tagjai lehetnek különböző kationcsatornákkal kapcsolatban és modulálhatják azok működését. A II. és III. mGluR-ok inhibíciós preszinaptikus eseményekben vesznek részt. Ezek G_o protein felszabadulását mediálják az idegsejtekben, ami az intracelluláris cAMP szint megnövekedését okozza [8].

A glutamát receptorok meghatározó központi idegrendszeri folyamatokban vesznek részt, mint a kognitív funkciók között a tanulási folyamatok vagy a memórianyom kialakulása. Jelenlegi kutatások szerint ennek a háttérében az ún. LTP (Long Term Potention), azaz hosszútávú serkentés jelensége áll. Ez egy rendkívül összetett neuroplasztikus (idegrendszer dinamikus változásain alapuló) folyamat, amely során megnövekedett számú magas frekvenciájú izgató szinaptikus kapcsolat jön létre egyes neuronok között a hippokampuszban, az amigdalában és a kérgi állományban. A létrejövő kapcsolatban és fenntartásában a glutamáterg receptorok kulcsszerepet játszanak [9].

A glutamaterg rendszer meghatározó élettani szerepe miatt sokrétű farmakológiai célpontja számos, elterjedten alkalmazott gyógyszerhatóanyagnak. Ezek legnevesebb képviselői a Memantin, mint Alzheimer-kór vagy az Amantidin, mint Parkinson-kór kezelésére használt vegyületek [2].

Ezen alkalmazott szerek mellett léteznek glutamát receptor típusra szelektív vegyületek is. Az NMDA antagonista vegyületek közé tartozik a dizociplin (MK-801), amelynek markáns neuroprotektív és görcsoldó hatása van, de klinikai fejlesztését a súlyos pszihomimetikus mellékhatásai miatt felfüggesztették. A dizociplin viszont idegrendszeri kutatásokban elterjedten használt referens molekula. Az NMDA receptor glicin kötőhelyét blokkoló vegyületek alkalmazásával jóval szelektívebb

gyógyszerhatást értek el, ilyen vegyület a D-cikloszerin, amely állatkísérletekben javította kognitív funkciókat [2].

Szelektív AMPA receptorra hatóvegyületeket, az erős görcsgátló NBQX és az egyetlen ismert allosztérikus modulátor helyen ható, a magyar Gyógyszerkutató Intézet által felfedezett, GYKI-52466 antagonistá vegyület, de ezek a hatóanyagok is csak állatmodellekben bizonyították hatásukat [2].

A mGluR-ok agonistáinak és antagonistáinak fejlesztésén keresztül a glutamaterg rendszer finom hangolása megvalósítható, illetve a markáns káros mellékhatások is elkerülhetőek lehetnek. Ezért a mGluR-ra tervezett vegyületek keresése intenzíven kutatott terület napjaink gyógyszerkutatásának számára [2].

2. Glutamát homeosztázis és az excitotoxicitás

A glutamát nem csupán a gyors szinaptikus neurotranszmisszióban játszik szignifikáns szerepet, hanem extracelluláris szignál molekulaként is jelentősége van a központi idegrendszer működésében. A glutamát koncentrációja jelentősen változik az egyes agyi területek és celluláris kompartmentek esetén és függ azok aktuális állapotától. A glutamát intracelluláris koncentrációja 10 mM körüli, de további jelentős része neurotranszmitter vezikulákban tárolódik, magas akár 100 mM-os koncentrációban [4]. A szinapszisokban exocitózist követően hirtelen felemelkedhet 1 mM-ig, majd a lecsökken 0,02 μ M-ra köszönhetően a nagyaffinitású neurális és gliális glutamát transzportereknek [10]. Ezzel szemben *in vivo* mikrodialízis technikát alkalmazó kutatások alapján az extraszinaptikus tónusos glutamátszint 1-30 μ M között ingadozhat [11]. A sejt közötti tér glutamát koncentrációjának meghatározása folyamatos vita tárgyát képezi, ami többek között a nagy koncentrációtartományban történő gyors változékonyságának köszönhető.

Az extracelluláris glutamát koncentráció komplex módon befolyásolja, az agyban bekövetkező dinamikus változásokat, azaz a neuroplasztikus folyamatokat. A normál fiziológiás glutamátszintért a már említett gliális és neurális transzport fehérvérsejtek felelősek, azok szintjének érzékelésében pedig az extraszinaptikus NMDA receptorok játszanak kulcsszerepet. Az extracelluláris glutamát koncentráció normál fiziológiás szerepe a neuron-neuron és neuron-glia kommunikációban vesz részt [12]. A

glutamátszint változásainak következménye igen sokrétű, befolyással van a szinapszisok keletkezésére, különböző receptorok expressziós szintjeire, gliotranszmitterek felszabadulására és neuronok túlélésére [13]. Az glutamát, mint extracelluláris szignálmolekula részletes szerepének tisztázása az idegrendszeri kutatásban még ma is részben feltáratlan terület.

Normál fiziológiás állapotokon felül a glutamaterg rendszernek fontos szerepe van az idegrendszert érintő neurotoxikus folyamatokban. Ennek hátterében a kórosan megemelkedett extracelluláris glutamátszint állhat. Ezt a glutamát visszavétel elégtelensége vagy a szinaptikus túlműködés okozhatja. A vegyület visszavételéért, a már említett, EAAT-ek a felelősek, ha ezek működése károsul, akkor a glutamát nem képes távozni a szinapsziszból, valamint onnan kidiffundálva megnöveli az extraszinaptikus glutamátszintet is. Mivel a neurotranszmitter nem távozik a szinapsziszból és szintje megemelkedik az extraszinaptikus térben is, az folyamatosan ingerültben tartja a szinaptikus és extraszinaptikus glutamát receptorokat. Először a szinaptikus működéshez hasonlóan az AMPA csatornák nyílnak, ezek következtében bekövetkező depolarizáció feloldja az NMDA receptorok Mg^{2+} blokkját és további kationok áramolnak a sejtekbe. A normál szinaptikus ingerület vezetés esetén depolarizáció következtében megnyílnak a feszültségfüggő kationcsatornák is, ezt követően a neuron a küszöbpotenciált meghaladva akcióspotenciál állapotába kerül. A megemelkedett glutamátszint esetén, annak ellenére, hogy ugyan az AMPA receptorok gyorsan deszenzitivizálódnak, de a lassan érzéketlenné váló NMDA receptorokon keresztül folyamatos kation áram érkezik az idegsejtekbe, amit a sejt nem képes helyreállítani. Ennek egyik következménye kationokkal passzívan beáramló víz okozta sejttérfogat növekedés, ami a sejtmembrán integritásának károsodásával, azaz a neuron pusztulásával végződhet [14]. Másik hozadéka az NMDA receptor túlműködésnek a megemelkedett, permanens intracelluláris Ca^{2+} szint [15]. A helyre nem álló hosszútávú rendellenesen magas Ca^{2+} szint számos olyan katabolikus enzimet aktivál, mint a kalpainok családja. A kalpain I degradálja az idegsejtek struktúrájáért felelős proteineket, mint a spektrint, a fodrint vagy a mikrotubulus-kapcsolt proteint (MAP2) [16]. A permanens magas sejten belüli Ca^{2+} szint további enzim aktivitásnövekedést okoz. Az aktiválódó foszfolipázok a sejt és a mitokondrium membránjának kettős foszfolipid molekuláit, az endonuklázok pedig a kromatin állományát károsítják, illetve bontják. A mitokondrium károsodása következtében a sejt energiaháztartása összeomlik, sejt nem képes helyreállítani a fiziológiás intracelluláris ionszinteket, ezáltal a

sejtpusztulása felgyorsul. Továbbá a mitokondriális elektrontranszportlánc károsodást szenved. Az elektronátadás tökéletlensége miatt, a sérült elektrontranszport-láncról lecsorgó elektronok magasabb arányban képeznek olyan reaktív oxigén vegyületeket (Reactive Oxygen Species, ROS), mint a hidroxil-gyökök vagy peroxid molekulák [17]. A megemelkedett Ca^{2+} szint olyan enzimeket is aktivál, mint a nitrogén-monoxid-szintáz (NOS), amely nitrogén-monoxidot (NO) termel, megemelkedett szintje ROS tulajdonsága miatt toxikus. A megemelkedett NO szint ugyancsak kémiai módon módosítja a sejteket felépítő biomolekulákat, amelyek ezt követően nem tudják ellátni normál funkciójukat. Az excitotoxicitás során okozta intracelluláris ROS felszabadulás jól példázza, hogy az egyes molekuláris stressz ágensek egymás felszabadulását is indukálják.

Az excitotoxicitást más aspektusba helyezi az ún. lassú excitotoxicitás elmélet, amely alapja a mitokondriális ATP termelés fokozatos leromlás. Az alacsonyabb ATP szintek mellett az ionpumpák nem képesek fenntartani a normális intracelluláris kation szintet, ezért a sejt lassan depolarizálódik. Az NMDA feszültség blokkja feloldódik és az megemelkedett glutamátszint hiányában is aktiválódik beindítva a már taglalt excitotoxikus kaszkádot [18-20]

A neuronokban lezajló excitotoxikus folyamatok eredményeképpen az extracelluláris glutamátszint is növekedni fog, ezzel pozitív visszacsatolásként működve felerősíti a neurotoxicitást. A glutamát koncentráció emelkedése betudható az ozmotikus sokkban elpusztult vagy a nekrotikus sejthalált szenvedett neuronok lízisekor kiszabaduló glutamátnak, a károsodott és megfordult glutamát visszavételi mechanizmusnak vagy az emelkedett Ca^{2+} okozta exocitózisnak, ami a neurotranszmitter vezikulák extracelluláris térbe való ürülését jelenti [21].

A neuronok halála végbemehet mind apoptotikus és mind nekrotikus sejtpusztulási útvonalon. Ezek a degradációs folyamatok a sejt állapotától függően egymással párhuzamosan vagy egymásba alakulva is lejátshódhatnak. Az apoptózisnak nevezik a sejt programozott halálát. Ez egy energiaigényes folyamat, amely során a szervezet a károsnak ítélt sejteik (például fertőzött vagy rákos) megsemmisítik önmagukat. Az apoptózis kulcs szereplői a proteolitikus kaszpáz enzimek, amelyek kaszkád-rendszert alkotva finoman szabályozzák a sejt halálát. A folyamat végeredményeként az idegsejt tartalma nem kerül az extracelluláris térbe, hanem membránnal határolt apoptotikus testekre esik szét, ezáltal megelőzve az idegrendszeri gyulladást okozó faktorok vagy akár a glutamát kiszabadulását az elpusztult idegsejt

környezetébe. Az apoptotikus testeket az agyi falósejtek eliminálják. A neuron túlélése vagy pusztulása pro- és antiapoptotikus fehérjék egyensúlyán nyugszik, amely egyensúly akár legkisebb külső stressz behatásra is felborulhat az apoptózis irányába. Ezzel szemben a nekrozis során a sejtlízisen megy keresztül, tartalma a környezetébe kerül, ahova így olyan toxikus ágensek, mint a ROS-ok, glutamát vagy egyéb gyulladásos faktorok szabadulnak ki. A nekrozis hátterében gyors, krónikus és visszafordíthatatlan markáns behatások, mint ozmotikus sokk, fizikai sérülés vagy más esetekben a sejt akut energiaháánya áll [9].

Az excitotoxicitás sokáig a nekrotikus sejthalál iskolapéldájának hitték, de az utóbbi időkben a glutamát indukálta apoptotikus neurondegradáció élettani szerepére is fényt derítettek [22] [23]. A glutamát indukálta nekrotikus sejthalál főleg az olyan ATP hiányos állapotokban a meghatározó, mint amilyen az isémiás stroke. Ez esetben energiaforrás hiányában nincs lehetőség az aktív apoptotikus folyamatok lezajlásához. Az apoptózis indukálásában a glutamát okozta permanens megemelkedett Ca^{2+} koncentráció áll. A Ca^{2+} szintje a mitokondriumban is megnő, ahol mitokondriális mátrix depolarizálódását okozza [24]. Ez olyan proapoptotikus fehérjék felszabadulását okozza, mint amilyen az AIF (Apoptosis Inducing Factor) vagy a citokróm C [25]. Ezek az anti- és proapoptotikus fehérjék egyensúlyát az utóbbiak felé billentik, ezáltal a sejt apoptotikus pusztulását indukálják [9].

3. Az excitotoxicitás szerepe a neurodegeneratív megbetegedésekben

A neurodegeneráció fogalma magában foglalja a neuronok mind funkcionális mind strukturális leromlását. Ez a jelenség számos napjainkban elterjedt központi idegrendszeret érintő megbetegedésben játszik szerepet, úgymint az Alzheimer-, a Huntington, a Parkinson-kór vagy az amiotrófiás laterális szklerózis (ALS) [26], valamint fontos szerepet tulajdonítanak neki HIV vírus asszociálta demenciában is [20]. Az idegrendszer érintő rákos elváltozások, agyi gliosisok okozta neurodegenerációban is szerepe van az excitotoxicitásnak [27].

Az idegrendszeri neurodegeneratív elváltozások számának növekedésében, többek között az agy előregedése is szignifikáns szerepet játszik, ezért azok legfőképpen az idősebb emberek körében fordulnak elő. A modern nyugati világban az átlag életkor

meghosszabbodásával az említett megbetegedések gyakorisága is megnőtt. Az előzőek miatt az utóbbi időben a neurodegeneratív betegségek intenzív célpontjaivá váltak napjaink gyógyszerkutatásának. A hatóanyag fejlesztést nehezíti, hogy ezen betegségek pontos patomechanizmusai nem minden esetben tisztázottak, ezért a gyógyszerhatóanyag-jelölt vegyületek molekuláris támadáspontjainak meghatározása különösen nehéz feladat.

A neurodegeneratív elváltozások patomechanizmusa komplex folyamat, amelyet számos egymással párhuzamosan vagy egymást követően lezajló toxikus esemény alkot. Az egyes neurodegeneratív megbetegedések molekuláris lefolyásában számos azonos részfolyamat létezik. Tekinthejtük ezt úgy is, hogy a betegségekre jellemző primer stresszor, mint amilyen például az Alzheimer-kór esetében a béta-amiloid vagy a Parkinson-kór esetében az α -szinuklein peptidek okozta primer stresszbehátás, másodlagos celluláris stressz mechanizmusokat indít be, amelyek a betegségre már nem specifikusak és ezek okozzák, vagy legalábbis nagyban járulnak hozzá a neuron végső pusztulásához. Ezen toxikus molekuláris történések közé tartozik többek között a reaktív oxigén származékok megnövekedett koncentrációja, a különböző idegrendszeri gyulladásos folyamatok és a glutamát mediálta excitotoxicitás is.

Az Alzheimer-kór (AD) a legelterjedtebb krónikus életkorral összefüggő neurodegeneratív megbetegedés. Az AD legfőbb tünetei a leromlott kognitív funkciók és a progresszív memóriavesztés. A betegek agyában a kognitív funkciókért felelős agyterületeken nagyszámba az ún. amiloid plakkok és neurofibrilláris rostok jelennek meg az elhalt agyi állomány helyén. A betegség kiváltásáért jelen kutatások szerint a negyvenkettő aminosavból álló béta-amiloid ($A\beta_{42}$) peptid a felelős. Az $A\beta$ monomer peptid az APP (Amyloid Precursor Protein, idegrendszerben elterjedten jelenlévő transzmembrán fehérje) proteolitikus hasítása révén keletkezik. Ezt az enzimes hasítást az APP-n több helyen végbe mehet, függően a hasító enzimtől. A toxikus $A\beta_{42}$ peptid csak a BACE1 (β -site APP cleaving enzyme 1) és γ -szekretáz közös hasítása révén keletkezik. Ez a peptid molekula hajlamos az oligomerizáció, amely során képződnek a szolúbilis $A\beta_{42}$ oligomerek. Ezek további polimerizációjából oldhatatlan fibrilláris $A\beta_{42}$ oligomerek keletkeznek, amelyek az amiloid plakokat alkotják [9].

A jelenlegi kutatások szerint a neurotoxikus események lefolyásában a legszignifikánsabb szerepe van az oldható $A\beta_{42}$ oligomereknek. Az oligomerek különböző molekuláris útvonalakon keresztül változtatja meg a sejt normál fiziológiai működését, közéjük tartozik a glutamaterg rendszer befolyásolása is. Egyes kutatások

szerint az Alzheimer-kór patomechanizmusában az excitotoxicitás, az NMDA receptorokon keresztül játszik szerepet. Az oligomer direkt aktiválja az NMDA receptorokat, amelyeken keresztül Ca^{2+} áramlik a sejtekbe. A magas intracelluláris Ca^{2+} -szint következtében a már korábban említett neurodegeneratív folyamatok indulnak be [28, 29]. Más kutatások szerint a szolúbilis $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomer az NMDA receptor modulátorok, a különböző poliaminokkal történő kölcsönhatáson keresztül okoznak NMDA receptor túlműködést [30]. Olyan elméletek is léteznek, amelyek szerint a peptid az NMDA receptorokhoz kötődve receptor endocitózist követően a toxikus amiloid az intracelluláris térbe kerül, ahol Fyn kináz aktivitását megváltoztatva hiperfoszforilált tau felgyülemelését eredményezi, amely fehérjék alkotják az oldhatatlan neurofibrilláris rostokat [31]. Az excitotoxicitás és a glutamát receptorok fontos szerepét a betegség patomechanizmusában jól bizonyítja, hogy az eddig ismert leghatásosabb AD elleni hatóanyag a Memantin, amely egy NMDA antagonistá molekula [32] [33].

A stroke-nak nevezzük azt az agyi érkatasztrófát, amely az agyműködés általános vagy gócos zavarával jellemezhető, gyorsan kialakuló tünet együttes és több mint 24 órán át fennáll (WHO definíció). A betegségét két típusra lehet osztani, úgymint az iszkémiás stroke, amely során az agyi vérellátás szenved kárt érszűkület vagy érelzáródás következtében, ezáltal az érintett agyterület tápanyag és oxigén ellátottság csökken, időszakosan megszűnhet. A másik ritkább típus a vérzéses stroke, amely esetén agyi állományvérzés is bekövetkezik. A stroke patomechanizmusában az ún. isémiás kaszkád vesz részt, amelynek kulcs folyamata az excitotoxicitás. A vérellátás megszűnése okozta energiahiány következtében a sejtek a normális ionháztartást nem tudják fenntartani, mert azért energia igényes ionpumpáik a felelősek. Ezek működésének hiányában a sejt depolarizálódik, az intracelluláris Ca^{2+} szint megnő, ami a glutamát vezikulák sejt közti térbe való kiürülését eredményezi [9]. Az extracelluláris glutamátszint az agyi érkatasztrófában érintett területeken megnő. Ennek hátterében a glutamát transzporterek energiahiány okozta működésbeli zavara vagy a már excitotoxikus folyamatok során a neuronokból excitózissal vagy lízis következtében felszabadult glutamát. A megemelkedett glutamátszint további neuronpusztulást okoz a normál energiaszint helyreállásáig [34]. Az NMDA receptor antagonistá hatóanyag sokáig ígéretes stroke ellenes vegyületeknek voltak, de humán klinikai tesztek során kudarcot vallottak, azok nem kívánt és veszélyes mellékhatásai miatt [35]. A jövő kutatóira vár a feladat, hogy igazán hatékony stroke ellenes hatóanyagot hozzanak létre.

Az agyi fertőzések leküzdésében nagy szerepe van a központi idegrendszer fő immunsejtjeinek, a mikroglia sejteknek. Ezek szerepe a fertőzött vagy sérült neuronok eltávolítása, valamint a fertőzés megszüntetése. A mikroglia sejteknek fontos szerepük van az előzőekben említett neurodegeneratív megbetegedések hátterében álló fehérje lerakódások megszüntetésében, azaz az agy 'megtisztításában'. A mikroglia sejteket passzív alakban vannak jelen, aktiválódásukhoz különböző szignálmolekulák szükségesek, ilyenek például a bakteriális lipopoliszacharidok. A sejtek az aktivációjukat követően fagocitáló sejtekké alakulhatnak, amelyek bekebelezéssel távolítják el a gyulladás okait vagy különböző, kis molekula tömegű faktorokat vagy szignál fehérjéket termelnek, amelyek elpusztítják a fertőzött sejteket [9]. Ilyenek lehetnek a különböző reaktív oxigén vegyületek (H_2O_2), a tumor nekrosis faktor alfa protein vagy a glutamát. Az aktiválódott mikroglia sejtek kiürítik glutamát raktáraikat, ezzel növelve az extracelluláris glutamátszintet [36]. A mikroglia aktiválódhat a már említett A β oligomerek, vagy a kicsapódott amiloid polimerek által, ez okozta permanens gyulladásos folyamatok további glutamátszint emelkedést okozhatnak [36]. A mikroglia eredetű glutamát szintén az NMDA receptorokon keresztüli mechanizmuson át okozza az excitotoxikus folyamatokat.

Az említett három leglényegesebb neurodegeneratív elváltozásokon kívül az excitotoxicitás szerepet játszik még a Huntington-kór, a Multiplex Sclerosis, a HIV vírus asszociálta demencia és az Amiotrófiás Laterális Sclerosis patomechanizmusában is [37-40] [41].

4. Endogén glutamát felszabadulás és egyéb celluláris stressz folyamatok kapcsolata

A glutamát felszabadulás nem csupán az egyes neurodegeneratív elváltozásokban specifikus stresszorok következtében jelenthet meg, mint másodlagos neurotoxikus folyamat. Az excitotoxicitást a már említett másodlagos celluláris stressz folyamatok is indukálhatják. Ezt a folyamatot nevezzük a toxicitások közötti ún. „cross-talk”-nak.

A megnövekedett ROS koncentráció okozhat glutamátszint növekedést, köszönhetően a sejtek ROS okozta nekrotikus lízisének, amely során a neuronokban tárolt nagy mennyiségű glutamát a környezetbe kerülve excitotoxikus folyamatok

indíthat be a környező neuronokon. A ROS-ek mediálhatják a glutamát felszabadulását egyéb módokon is [42, 43] [44]. Az egyik legjelentősebb mechanizmus az aktivált mikroglia sejtek által termelt NO hatása, amelyet a gyulladásos folyamatokban a sérült vagy fertőzött neuron elpusztítására termelnek a mikroglia sejtek. A termelt NO a neuronokba jutva Ca^{2+} -függő mechanizmuson keresztül okoz exocitózist, ezzel gyors extracelluláris glutamátszint emelkedést [43].

Az energiahány is megjelenhet, mint másodlagos stressz forrás köszönhetően a primer stressz ágensnek, ami a sejtenergia háztartását különböző módokon teheti tönkre. Az energiahány okozta glutamátszint emelkedést a stroke és az excitotoxicitás kapcsolatának részletezésekor ismertettem.

A különböző gyulladásos folyamatokban megjelenő gyulladásos faktorok, mint amilyenek az interleukinek családja, eltérő módon lehetnek befolyással az extracelluláris glutamátszintre, az idegsejtek és gliasejtek működésének modulálásán keresztül [45, 46]

5. Modern gyógyszerkutatás

Az első gyógyszermolekulák feltalálása óta főleg az elmúlt 30 évben, összhangban a gyors technikai fejlődéssel, a modern gyógyszerkutatás mára egy rendkívül összetett folyamattá vált. Ennek oka a műszeres és tudományos háttér fejlődésén kívül az egyre szélesebbé váló társadalmi igény az idáig gyógyíthatatlan megbetegedések kezelésére.

Napjaink új gyógyszertípusának kiválasztását a piaci igények, azaz a megbetegedés elterjedtsége az adott gyógyszerceg által érdekelt földrajzi egységen szabja meg. Az ezt követően meghatározott elváltozás gyógyszeres kezelésének megoldására megfelelő hatóanyag célpontot, azaz target-et kell találni. Ez az elváltozásban kulcsszerepet játszó biomolekula, ami legtöbb esetben proteint jelent. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy egyre több kísérlet zajlik például a nukleinsav mediálta fiziológiai folyamatok közvetlen befolyásolására is.

A 21. században lezajlott informatikai fejlődést követően a kiválasztott proteomikailag ismert szerkezetű target molekulára számítógépes rendszerek segítségével összetett kötési és energetikai modellek alkalmazásával tervezhető meg a hatóanyagjelölt molekula kémia térszerkezete. Ez a struktúra alapú gyógyszertervezési

megközelítés, amelynek az alapja a target térszerkezetének részletes ismerete. Létezik továbbá a ligand alapú megközelítés, amely szerint a már ismert természetes vagy szintetikus hatóanyaghoz fizikokémiai és szerkezetileg hasonlító új molekula azonosítása a cél. A számítógép segítette gyógyszertervezést követően a számítások által megfelelőnek prediktált vegyületek szintetizálása történik.

Ezt követően a gyógyszer a preklinikai kutatási fázisba kerül. A preklinikai gyógyszerkutatók feladata betegségre releváns *in vitro* molekuláris kölcsönhatáson vagy sejtes rendszereken alapuló bioassay-k megalkotása, amelyek alkalmasak a biológiailag valóban aktív vegyületek kiválasztására. Mivel a számítógépes predikció esetén is alacsony a megfelelő hatóanyag-jelöltek találati aránya, ezért nagyáteresztő képességű és ugyanakkor gazdaságos rendszerek megalkotására volt szükség, a nagyszámú gyógyszer-kandidáns vegyület gyors tesztelésére. A 80'-as évek végén ennek megoldására születtek meg a magasan robotizált, miniaturizálásra törekvő, plate alapú HTS (High Throughput Screening) hatóanyagjelölt szűrési rendszerek, amelyek segítségével nagyban csökkenthető a tesztek költségigénye, az alacsony reagens felhasználás- és munkaerőigény következtében. A HTS rendszerekben alkalmazott bioassay-k alapja lehet molekuláris, sejtes vagy szövettenyésztésre épülő rendszer, amelyekben a vegyületek hatékonyságát valamilyen mérhető jel által detektálják. Ez a legtöbb esetben, valamilyen optikai tényezőt (abszorbancia, fluoreszcencia, lumineszcencia, cirkuláris dikroizmus) jelent. A HTS-ek kapacitása napjainkra elérte 100 000 vegyület napi szűrését is. Az elsődleges szűréskor a vegyületeket csak néhány koncentrációban tesztelik a hatékonyság növelése érdekében, majd az itt hatékonynak talált molekulák kerülnek immár nagyobb koncentráció tartományban és több párhuzamos mintában a másodlagos szűrésre. Az itt is hatékonynak ítélt molekulák lesznek a találatok, az angolszász kifejezéssel a Hit molekulák. Ezt követik a bonyolultabb sejtes és szövetes rendszereken, majd *in vivo* állatmodelleken végzett kísérleteket. Az ezeken is hatásosnak bizonyult vegyületek lesznek a vezér, avagy a Lead molekulák. Ezeket további *in vitro* és *in vivo* farmakokinetikai és toxikológiai vizsgálatok követik. Ezt nevezik a hatóanyagjelölt molekulák Lead optimalizálási szakaszának, ahol a hatásosságon felül a vegyület ADME (adszorpció, azaz felszívódás, disztribúció, a szervezetbeli eloszlás, metabolizmus és kiválasztás, azaz exkréció) tulajdonságainak javítása is cél, ennek érdekében a vegyület kémiai módosítása is történik. A módosított molekuláknak újra át kell esni a biológiai hatásosságot igazoló preklinikai teszteken. A lead molekulák fejlesztésében olyan tulajdonságok is bele

tartoznak, mint a megfelelő méretű szintézisük megoldása vagy a megfelelő gyógyszerforma kiválasztása. A minden teszten megfelelt gyógyszerjelölt molekulák kerülhetnek emberi kipróbálásra, azaz a humán klinika I, II és majd III. fázisába. Az itt is hatásosnak és biztonságosnak bizonyult gyógyszerek kerülhetnek törzskönyvezésre, majd jutnak kereskedelmi forgalomba.

A leírtakból is látszik, hogy az originális hatóanyag kifejlesztése egy rendkívül komplex idő- és költségigényes folyamat. A találatától a gyógyszerforgalomba kerüléséig eltelt idő akár 10-15 évet is felölelhet. A gyógyszerfejlesztés folyamatának előrehaladtával egyre nő a költségigény, valamint a fejlesztett hatóanyag kudarcának valószínűsége is. Ezért a találati hatékonyság növelésének érdekében nagy szerepet kapnak preklinikai kutatások fejlesztése.

6. A preklinikai gyógyszerkutatás újításai és a High Content Screening

Az előzőekben leírtak miatt, a találati arány növelésének és a későbbiekben megbukó molekulák számának csökkentése érdekében a preklinikai vizsgálatokra egyre nagyobb hangsúly került. A HTS rendszerek taláatainak túl nagy része nem bizonyult a további vizsgálatok során megfelelőnek, ezért a rendszer nem bizonyult elég hatékonynak a jelenlegi igényeknek megfelelően. A probléma megoldására a 90'-es évek végén jelentek meg az ún. HCS (High Content Screening, magas tartalmú szűrés) eljárások. A módszer ötvözi a fejlett mikroszkópos vizsgálatok előnyeit és a HTS rendszerek nagyáteresztő képességét [47] [48].

A HCS rendszerek elvi alapja az, hogy egy mintapontból minél több, részletesebb és relevánsabb információt nyerhessünk ki, ezáltal csökkentve a fals találatok számát. A HCS rendszerek a már a HTS esetén megismert plate alapú molekuláris rendszerekre, sejtekre vagy szövettenyészetekre épülő, miniatürizált bioassay-k. De míg a HTS esetén egy tulajdonság változását követhettük nyomon, a HCS esetén modern mikroszkópos képalkotás és speciális festékek vagy genetikai módosítások (például GFP jelölés) segítségével a rendszerben párhuzamosan lezajló számos történést monitorozhatunk az időben a HTS-nél részletesebben. Az optikai jelenségek megváltozásán alapuló detektálás azonban így rendkívüli mennyiségű adatot képez, amely kiértékelése

meghaladná a humán-erőforrásokat. Ezért a kapott jelhalmazt modern szoftveres analízisnek vetik alá, amely megfelelően programozott algoritmusok szerint mutatja meg a sejten történt változások mértékét. A HCS rendszerek alkalmazásával nagyban csökkenthető a találati hiba aránya, valamint a részletes mikroszkópos analízis által részletesebben megismerhető a Hit vegyület hatásmechanizmusa is [47, 49] [50, 51].

A leírtakból látható, hogy a modern gyógyszerkutatás célja a nagy áteresztőképesség mellett, a minél több és pontosabb információ kinyerése egy adott mintapontból, hogy ezáltal növelhető legyen a biztos találati arány, azaz a hatóanyag-fejlesztés kudarcának valószínűsége csökkenjen. A hasznos információ kinyerésének lehetőségei közé tartozik, az olyan kis mólsúlyú szignálmolekulák koncentráció szintjeinek meghatározása, mint amelyek közé a glutamát is tartozik.

7. *In vitro* neurális tenyészetek és felhasználásuk a modern központi idegrendszeri gyógyszerkutatásban

A gyógyszerkutatók számára számos modell áll rendelkezésre egészen a molekuláris méretektől az összetett kísérleti állatokban vizsgált betegség modellekig. A megfelelő hatóanyag-szűrési feladatra komplex kihívás a megfelelő modell vagy teszt és az annak alapját képező organizmus kiválasztása.

A gyógyszerkutatásban celluláris szinten való vizsgálatokra elterjedten alkalmazhatóak az immortalizált sejtvonalak vagy a differenciálódni képes őssejt vonalak is. Ezek különböző induktor vegyületek hatására képesek homogén sejtenyészetet vagy akár heterogén szövet tenyészetet is létre hozni.

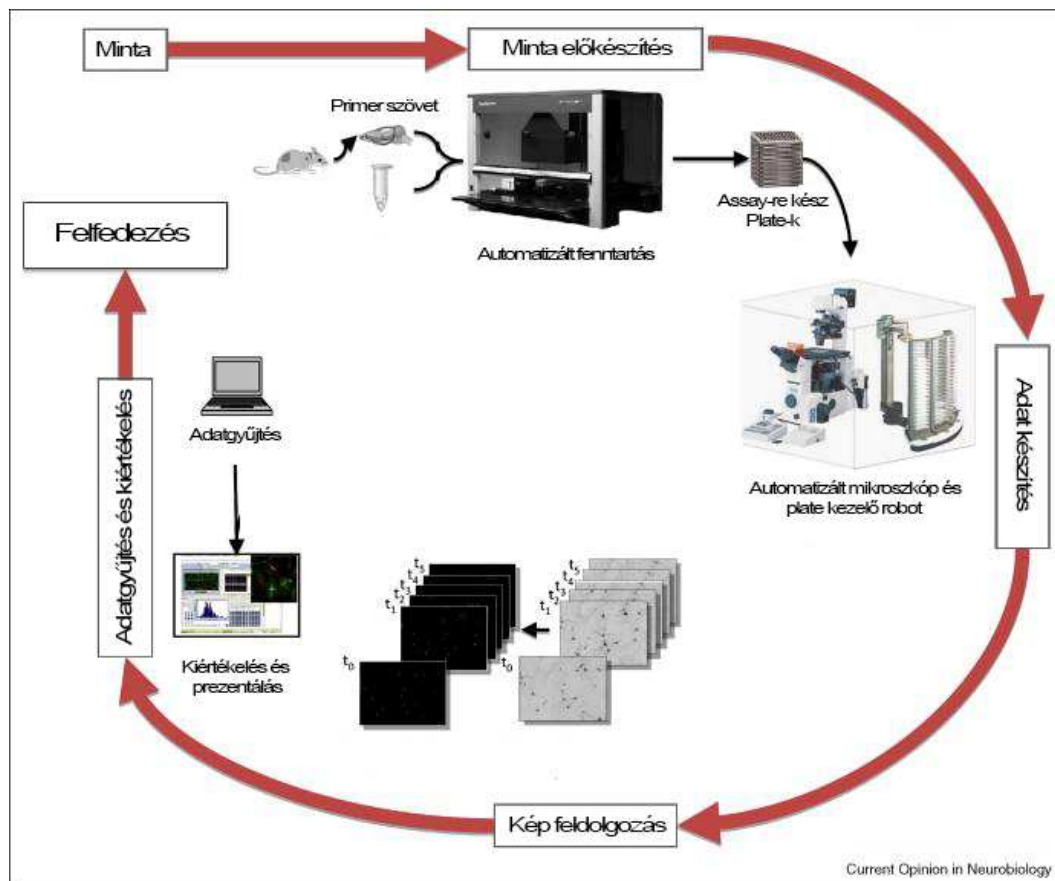
Másik lehetőség a primer tenyészetek használata. A primer tenyészeteket alkotó szöveti részek adott vizsgálati állatból, ritkább esetekben emberi forrásból preparálhatóak és *in vitro* kontrollált körülmények között tenésztethetőek. Az így létrehozott sejt vagy szövettenyészetek a sejtek telomeráz aktivitásuknak és már meghatározott differenciációs programjuknak köszönhetően korlátozott ideig tarthatóak csak fenn, de ez az idő szövettípustól és tenyésztési körülményektől függően változhat.

A HCS rendszerekben használt sejt alapú vizsgálatok esetén el kell dönteni, hogy primer kultúrák, sejtvonalak vagy differenciálódásra készíthető őssejtvonalak képezzék-e a vizsgálat alanyát. Mindegyik esetben számos előny és hátrány említhető

meg [52]. A HCS és egyéb hatóanyag-szűrési módszerekhez hatékonyabban alkalmazhatóak a különböző sejtvonalak, hiszen azok kezelése egyszerűbb és könnyen automatizálható. Ezáltal költség, idő és laboratórium kapacitás szempontjából is előnyösebbek. Továbbá a korlátlanul szaporíthatóak, ezáltal bármekkora mennyiségben rendelkezésre állnak, hosszú ideig ugyanolyan minőségben fenntarthatóak, valamint a sejtvonalak bármikor lefagyaszthatóak, tárolhatóak majd felvehetőek. Ezzel szemben a primer, azok közül is az általam alkalmazott neurális tenyészetek kiültetése és fenntartása komplex feladat, amelyhez gyakorlott labor személyzetre, speciális tenyésztő edényekre és médiumokra van szükség. A tenyészetek is csak korlátozott ideig tarthatóak fent, azokat alkotó neuronok előregedése miatt. Az idegsejtek vizsgálatához sokszor olyan tenyészeteket kell létrehozni, amelyek asztroglia tartalma igen kicsi, mivel az asztroglia sejtek nagy metabolikus kapacitásuk révén igen nagy mértékben, és csak nagyon nehezen ellenőrizhető módon, befolyásolhatják a tenyészetek kezelését. A gliasejtek átalakíthatják a kezelés során használt molekulákat vagy attól független neuroprotektív hatásukkal befolyásolhatják a teszteket. Az asztroglia sejtek fenti hatásainak vizsgálatára külön kísérletes (általában *in vivo*) teszteket kell kidolgozni.

A fentieknek megfelelően mi is és más laboratóriumok törekednek arra, hogy ahol ez lehetséges sejtvonallakkal pótolják a primer kultúrákat.

A primer idegsejt kultúrák ugyanakkor fiziológiásan sokkal relevánsabb modellt alkotnak az agyban sejt szintjén lezajló eseményeikről. Ez a szempont a legfontosabb, ahhoz hogy hatékony, az elváltozást a valósághoz legjobban modellező bioassay-t alkothassunk meg. Ezért a központi idegrendszeri kutatásokban sok esetben megtérülő befektetés primer tenyészeteket alkalmazni, a biológiailag kevésbé releváns sejt- vagy őssejtvonalak helyett, ezzel növelve a későbbi vizsgálatokban is sikeres Hit molekulák találati valószínűségét. Továbbá a műszaki megoldások rohamos fejlődésével (az automatizálhatóság és a képalkotás területén) a primer kultúrák HCS szintű alkalmazása is egyre hatékonyabbá és elterjedtebbé válik (4. ábra) [48, 52].



4. ábra Primer tenyészet alapú HCS sematikus folyamat ábrája [52].

Az elmúlt évtizedben az elmondott okok miatt megnövekedett a primer neurális tenyészetek alkalmazása a modern gyógyszerkutatásban, az idegsejt-tenyészetek megjelentek a modern HCS rendszerekben is. Közülük a legjelentősebb alkalmazásuk a különböző neuron morfológiai változásokon alapuló vizsgálatok. Ezeknek a méréseknek az alanyai lehetnek, az axonok növekedése vagy hossza és száma, lehet a neuronok morfológiájának patológiás megváltozása, azaz a neuronok degradációja [48]. Léteznek már nagy áteresztőképességű módszerek, amelyek a neurodegeneratív megbetegedésekben kulcs szerepet játszó kóros protein aggregációk kialakulásán vagy a már kialakult aggregációk számának csökkenésén alapulnak, illetve olyan módszerek is, amelyek a sejt fenotípusának komplex megváltozásán alapulnak [53]. Ezenfelül meg kell említeni a primer neurális kultúrákon HCS és HCA (High Content Analysis, nem hatóanyagszűrésre használt HCS rendszer) technikákkal végzett akadémiai kutatásokat is, amelyek legfontosabb példája az interferencia RNS-ek keresése, ezáltal gén csendesítések vizsgálata [54].

8. Glutamát mennyiségi meghatározásának lehetőségei

Az előzőekben leírtaknak megfelelően, a glutamátszint változása fontos szerepet játszik számos normál fiziológiás vagy patológiás központi idegrendszeri eseményben. Ezért már korán felmerült az igény a glutamát mennyiségi meghatározására különböző neurális közegekből. A mintavétel történhet preparált agyszöveti mintákból, *in vivo* mikrodialízis alapú kísérletek eredményeként vagy, ahogy az általam végzett kísérletekben, neurális tenyészetek felülszójából. A kvantifikálás mindegyik esetben igen komplex analitikai feladat, hiszen a glutamát mellett számos zavaró kis és nagy molekulatömegű vegyület is alkotja a biológiai mátrixot. Továbbá a glutamát koncentráció várható értéke is széles, μM alatti és a mM-os tartományban változhat. Ezen okok miatt nagy hangsúlyt kell fektetni a meghatározás szelektivitására és érzékenységére, a valós értékek determinálásának érdekében.

A gyakorlatban számos eltérő módszer alkalmaznak a glutamát mennyiségi meghatározására. Ezek között találunk enzimes reakción alapuló technikákat. Ezek a biokitek tartalmaznak L-glutamát-dehidrogenáz enzimet, ami megfelelő reakció körülmények között nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD^+) adása mellett, az L-glutamátot α -ketoglutaráttá oxidálja, emellett NH_4^+ és NADH keletkezik. A NADH mennyisége pedig fotometriásan mérhető [55]. Másik lehetőség az enzimes reakció során képződött H_2O_2 detektálása fluoreszcens Amplex Red® reagenssel (Invitrogen), továbbá lehetséges képződött α -ketoglutarát glutamát-piruvát transzamináz általi visszaalakítása glutamáttá, a létrehozott körfolyamat eredményeképpen a fluoreszcens jel felerősíthető.

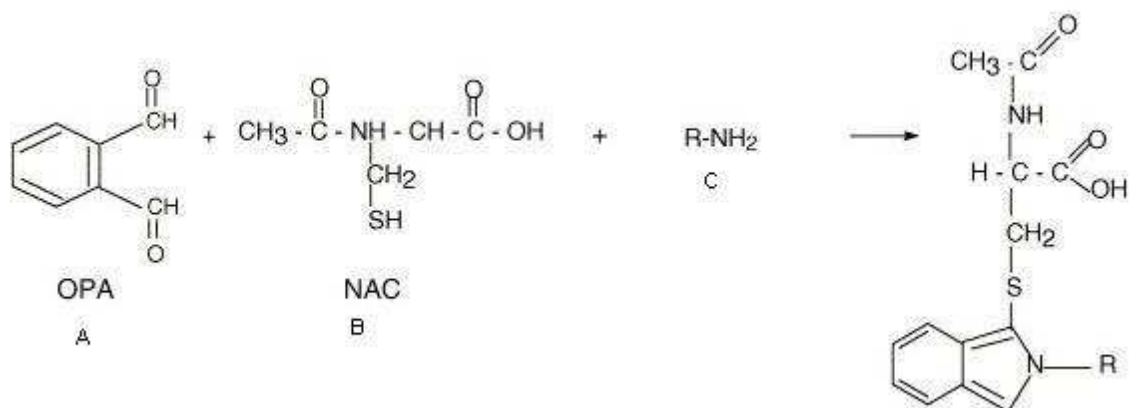
Komplex *in vivo* mérésekre érzékeny elektrokémiai bioszenzorokat fejlesztettek ki. Ezek közé tartoznak az enzim alapú elektródás technikák, amelyek segítségével helyben például *in vivo* állatmodellek vizsgálni kívánt agyterületein vagy *in vitro* idegsejtenyészetek tetszőleges környezetében mérhetővé válik a glutamát koncentrációja. Az enzim reakció során a glutamátot oxigén jelenlétben a glutamát-oxidáz enzim oxo-glutaráttá alakítja és H_2O_2 is keletkezik, aminek mennyiségét az elektróda mérni képes [56, 57].

Az *in vitro* idegsejtenyészetek vizsgálatára léteznek genetikailag kódolható nanoszenzorok is, ez esetben a neuronok genetikai állományába transzfekcióval kell bejuttatni a bioszondát kódoló DNS szakaszt. A glutamátra érzékeny szonda tartalmaz egy mGluR eredetű glutamát kötőszakaszt, valamint a glutamát kötődése után

bekövetkező térszerkezet változás miatt FRET (fluoreszcens energia transzfer) elven aktiválódó fluorofór molekulát [58]. Ez a modern technika alkalmas a neurális kultúrák glutamát szintjének HCS szintű vizsgálatára is.

A különböző kromatográfiás módszereket is elterjedten használtak a glutamát koncentráció mérésére különböző biológiai minták esetén. A kromatográfiás eljárásokat feloszthatjuk származékképzéses és anélküli módszerekre. A származékképzés nélküli módszerek esetében a rutin fordított fázisú, azaz RP-HPLC-s megoldások nem alkalmazhatók, mivel a poláros aminosavak, mint a glutaminsav az eluens fronttal együtt, t_0 időpontban eluálódnak. Ezért ezek elválasztására normál fázisú (NP-HPLC) vagy ioncserélő (IEX-HPLC) kromatográfiás oszlopokat alkalmazása terjedt el. További problémát jelent detektálás is, hiszen a nem aromás aminosavaknak alacsony UV elnyelése van, amely hullámhosszon a szennyező komponensek nagytöbbsége is abszorbanciát mutat, ezért a detektálás szelektivitása nehezen biztosított. A detektálás és az azonosítás a legszelektívebben tömegspektrometriás (MS) és tandem MS módszerekkel oldható meg, ugyanakkor az aminosavak ikerionos tulajdonsága miatt származékképzés nélküli ionizációjuk sokszor nehézségekbe ütközik [59].

A szelektivitás növelésére a gyakorlatban különböző származékképzéses technikákat léteznek. A származékképzés történhet az oszlop előtt vagy után. Az oszlop utáni technikák hátránya, hogy speciális műszerezettséget igényel (speciális termosztát és pumpa, amely hozzá keveri a reagenst az oszlopról érkező mintához) és nem kívánt csúcsszélesedést és ismételhetőségi problémákat is okoz. Ezért az oszlop előtti származékképzés vált elterjedté az aminosavak kromatográfiás meghatározásában. A származékképzés felé számos követelményt kell támasztanunk, köztük hogy a reakció gyors és kvantitatív legyen és lehetőleg vizes közegben is lejátsszódjon, a képzett származék stabil legyen, a reagens feleslege és mellékreakciói ne zavarják az elválasztást vagy a detektálást, a származékképzés lehetőleg automatizálható legyen és, hogy érzékeny, lehetőleg fluoreszcensen gerjeszthető származék képződjön. Az egyik legelterjedtebb megoldás erre az orto-ftálaldehiddel (OPA) és eltérő oxidálható kénvegyülettel képzett izoindol vázas terméket képző reakció (5. ábra).



5. ábra O-ftálaldehid reakciója primer aminosavakkal N-acetilcisztein jelenlétében

A származékok stabilitását figyelembe véve a merkaptotanol és szulfid anion alapú származékképzést felváltotta a sokkal stabilabb terméket képző N-acetilcisztein (NAC) reagenssel végzett eljárás [60]. Ez továbbá lehetővé tette az aminosavak kiralitás szerinti további elválasztását is. A glutamát koncentráció meghatározására a stabil és intenzív fluoreszcenciájú termékképzése miatt elterjedten alkalmazzák az NAC/OPA alapú származékképzést fluoreszcens vagy elektrokémiai detektálással.

Aminosavak elválasztására még használhatóak egyéb kromatográfiai módszerek, mint a gázkromatográfia (GC), ahol az aminosavak könnyen elpárologtatható formába alakítását két lépéses származékképzéssel oldják meg, illetve a detektálásra lángionizációs vagy elektronbefogásos detektorokat alkalmaznak [61]. Egyszerűsége miatt kvalitatív és szemi-kvantitatív mérésekre használhatóak a vékony réteg kromatográfiai (TLC) módszerek is, amelyek általában ninhidrines előhívószer segítségével UV fényben detektálható színes jelet adnak.

A töltéssel rendelkező aminosavak elválasztására alkalmasak a különböző kapilláris elektroforézisen (CE) alapuló technikák [62]. Ezek közül a legelterjedtebben közülük a kapilláris zónaelektroforetikus (CZE) és a micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfiai módszerek terjedtek el. A detektálásra megfelelő lehetőséget nyújtanak a lézerindukált fluoreszcens (LIF) detektorok, illetve a tömegspektrometriás megoldások is.

A felsorolt módszerek mindegyike mellett számos előny és hátrány szól, ezért a módszer kiválasztásához pontosan meg kell határoznunk a mérés egyéni, meghatározó igényeit. A kiválasztásnál szempontként kell figyelembe venni az olyan kritériumokat,

mint érzékenység, szelektivitás, robusztusság, reprodukálhatóság, költség-, személyzet- és laboratóriumigény, valamint az elérhető legnagyobb áteresztőképesség.

A legérzékenyebb és legprecízebb módszernek az enzim elektróda és a bioszonda alapú technikák mondhatóak, hiszen ezek segítségével lokális glutamátszint változásokról kaphatunk közvetlen és gyors jelet. Ugyanakkor hátrányuk, hogy új technológiákról lévén szó költségigényük egyelőre jelentős. Az áteresztőképesség szempontjából az enzim elektróda csak egyedi sejtek vagy tenyészetek lokális környezetének glutamát mérésére alkalmas. A bioszonda módszer korlátja a szonda transzfekciója az adott cél organizmusba, ami főleg primer neuronok esetén alacsony hatásfokú lehet. A szondát stabilan expresszáló sejtvonalak esetén is kérdéseket vet fel a szonda jelenléte okozta sejtműködés megváltozása, amely akár fals eredményekhez is vezethet. Viszont ha ennek ellenkezőjéről megbizonyosodtunk, akkor az így kapott sejtvonalra alapozott glutamát mérési technika alkalmazható lehet akár a modern HCS képalkotó rendszerekben is.

Az enzimes rendszerek hátránya szintén költség igényükben és szelektivitásuk alacsony hatásfokában rejlik. Mivel az enzimes reakciót követően kapott NADH detektálása fotometriásan történik 220 nm-en, ahol számos magas koncentrációban lévő zavaró ágens is elnyelést mutat. Ugyanakkor ez a módszer kivitelezése és az eredmények monitorozása könnyen automatizálható, ezzel eleget téve a nagy áteresztőképesség követelményének.

A kromatográfiás módszereknek előnye a szelektivitásban van, hiszen itt a glutamátot hatékonyan el lehet választani a többi a mintákban fellelhető zavaró komponenstől. A hatékony szeparáció az érzékenységre is pozitív hatással van. Az érzékenység és a szelektivitás a rendelkezésre álló detektorok variációs lehetőségeivel tovább növelhető. A módszer hátránya a készülékigény, illetve a mintavétel és az offline történő minta-előkészítés és az ebből következő stabilitási és reprodukálhatósági kérdések.

A gyakorlatban használt módszerek előnyeit illetve hátrányait a 1. táblázat összegzi.

Módszer	Előny	Hátrány
Elektrokémiai módszer	Érzékenység, szelektivitás	Áteresztőképesség, gazdaságosság, elérhetőség
Bioszonda	Érzékenység, szelektivitás,	Transzfekciós hatékonyság, élősejtes mikroszkópos analízist igényel
HPLC	Szelektivitás, érzékenység, automatizálhatóság	Műszerigény, offline mintavételezés
Enzim alapú kit	Online mintaelemzés, alacsony munka- és műszerigény	Szelektivitás, érzékenység, költségigény

1. Táblázat Glutamát mennyiségi analízisének lehetőségeinek összehasonlítása

IV. Célkitűzés

Az EGIS Gyógyszergyár Molekuláris Farmakológiai Kutatócsoportban célunk olyan komplex neurotoxicitási tesztek megalkotása, amelyek alkalmazásával neuroprotektív hatóanyagjelölt molekulák kiválasztása történhet. A hatóanyagjelölt molekulák hatásmechanizmusáról és a kidolgozott modell sajátosságairól a találati arány maximalizálása érdekében minél több információt szeretnénk kapni. Végző soron a modern gyógyszerkutatási trendnek megfelelő High Content Screening rendszert létrehozni.

A kidolgozott neurotoxicitási tesztekben az excitotoxicitás szerepének vizsgálatára az extracelluláris glutamát koncentráció változás meghatározása adhat magyarázatot, hiszen a primer stresszor okozta endogén glutamát felelős lehet a mért citotoxicitás akár jelentős részéért. A különböző neurotoxikus kezeléseknek kitett tenyészetek glutamát szintjének meghatározásához a következő célokat tűztük ki:

- A glutamát koncentráció változásának detektálásra alkalmas analitikai mérési eljárás kidolgozása, amely alkalmas a komplex, magas fehérjetartalmú médiumból történő glutamát meghatározására is. A meghatározási módszer kidolgozásánál előzetesen analitikai követelményeket támasztottam (ismételhetőség, érzékenység, szelektivitás, stabilitási) a mérés megbízhatóságának biztosítására. Cél továbbá, hogy az új információ kinyerése ne zárja ki más, már korábban kidolgozott mérési módszer eredményeként kapott információ elérését.
- A kidolgozott analitikai módszer segítségével jellemezzem az általunk kidolgozott *in vitro* neurotoxicitási tesztekben felszabaduló glutamát szerepét, hogy az egyes betegségek *in vitro* modelljei hatékonyabbá tehetőek legyenek: meghatározhatóvá váljanak azok a mérési körülmények, amelyeket alkalmazva az elsődleges toxikus hatást a másodlagosan megjelenő additív excitotoxicitástól elkülönítve tudjuk vizsgálni.

V. Anyagok és módszerek

1. Primer neurális tenyészetek

A kísérleteim vizsgálati alanyául primer patkány neurális tenyészeteket alkalmaztam. Az 17-18 napos korú embriók prefrontális kérgi állománya került preparálásra. Az agyszövetet egyedi sejtekre mind mechanikusan, mind enzimatikusan is disszociáltam. A triturált sejteket összetartó fehérje molekulák elbontására tripszines emésztést alkalmaztam. A preparálás során elhalt sejtekből kiszabadult DNS a sejtsuszpenziót viszkózus masszává alakítja, ezen állapot megszüntetésre DN-áz I. (Sigma) enzimátikus bontást végeztem. A sejtörmelékeket a centrifugálással (300g, 10 perc), a nagyobb nem disszociált struktúrákat (érfonatok) szűrővel távolítottam el a preparátumból. A homogén sejtsuszpenziót $40\,000$ sejt/cm² sűrűségben ültettem ki 24-es és 96 lyukú tenyésztő edényekbe (Grenier).

A sejteket első két napig 10% főtális borjú szérum (FCS, Sigma), B27 adalék (Invitrogen), Glutamax (Sigma) és antibiotikum (penicillin és sztreptomycin, Sigma) tartalmú NeuroBasal-A (Invitrogen) médiumban tartjuk, majd a harmadik naptól a szérumot elhagyjuk a médiumból. Ahhoz, hogy a neuronokat elkülönítve vizsgálni tudjuk neuronokban gazdag ugyanakkor asztroglia sejtekben szegény tenyészeteket szükséges létrehozni. Ehhez citozin-arabinóz (CAR, Sigma) nukleozid analógot adunk $10\,\mu\text{M}$ végkoncentrációban a tenyészetekhez az első napon (DIV1, Days In Vitro). A kezelés az osztódásban lévő gliasejteket elpusztítja. DIV2-on a tenyészeteken teljes tápcsere történik a CAR eltávolításának érdekében, mivel az hosszabb távon a neuronokat is károsítja. Ezt követően a tenyésztő médium felének levétele és újjal való pótlása történik két naponta. Ezzel a tápcserélési stratégiával megfelelő hatékonysággal távolítjuk el a káros anyagcsere termékeket és pótoljuk a kimerült tápanyagforrásokat anélkül, hogy a tenyészet által beállított kémiai környezetet megbontanánk, illetve így nem tesszük ki a teljes tápcsere okozta mechanikus stressznek sem az idegsejteket. A neurális kultúrákat 37°C-on, 100%-os páratartalmú és 5% CO₂ tartalmú termosztátban (Thermo Scientific HERAcell 150i) tartottuk. A sejtek DIV14-DIV21 között jutnak el abba az érési szakaszba, amikor már az általunk modellezni kívánt elváltozásokban

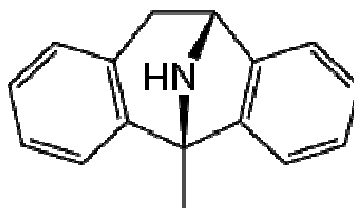
szerepet játszó receptorok (például az NMDA receptor) megfelelő mennyiségben megjelennek, illetve az élettanilag fontos neuron-neuron kapcsolatok kialakulnak.

2. Neurotoxikus tesztek

Az idegsejt-tenyészeteket különböző stressz faktorok általi kezeléseknak tettük ki, ezzel modellezve a különböző neurodegeneratív elváltozásokat és azok részfolyamatait. A stressz források közül első lépésben az oxidatív stressz modellezését tűztem ki célul, amelyet a hidrogén-peroxid (H_2O_2) oldat a médiumban történő hígításával értem el. A H_2O_2 oldat az oxidatív stressz modellezésére alkalmas, hiszen az a víz molekulához nagyon hasonló fizikokémiai tulajdonságokkal rendelkezve, a vízre permeábilis sejtmembrán csatornákon át a sejtbe diffundálhatnak, ahol az egyébként intracellulárisan képződő ROS molekulák hatását imitálhatják [63]. A H_2O_2 oldatot 12500 és 100 μM között vizsgáltam, ügyelve, hogy az oldat frissen a kísérlet előtt készüljünk, így elkerülve a reagens bomlása okozta fals eredményeket. A stresszor oldat hozzáadása mindig 50% végtérfogat mellett történt, ezáltal biztosítva a könnyebb keveredést, hogy megakadályozzuk a lokálisan magasabb oxidatív ágens okozta toxicitást

A β -amyloid 1-42 ($A\beta_{1-42}$) (SZBK) kezeléshez 25 μM PBS (Foszfát puffer) oldatban peptid törzsoldat [64, 65] felező hígítását 10 % végtérfogatban adtam hozzá.

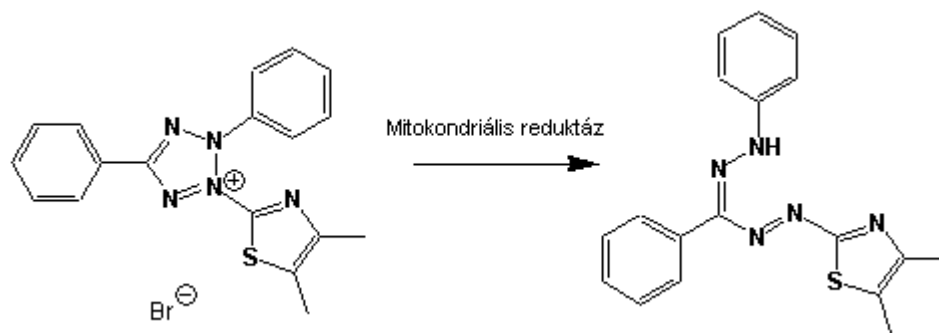
Az excitotoxicitás létrejöttének bizonyítására exogén glutamát kezelést alkalmaztam, amely a során kálium-glutamát só (Sigma) különböző koncentrációit adagoltam a tenyészetekhez, ezzel viszonyíthatóvá téve az endogén és az exogén glutamát felszabadulás okozta sejtpusztulást. Az excitotoxicitás blokkolására MK-801-et (dizociplin, 6. ábra) adtam 2-1000 μM koncentrációban a tenyészetekhez, ezzel indirekt bizonyítva az endogén glutamát felszabadulás okozta toxicitást. Az MK-801 sejtbiológiai vizsgálatokban elterjedten használt NMDA receptor antagonist (ioncsatorna blokkoló), amely az excitotoxikus folyamatokat a túlzott Ca^{2+} beáramlás megakadályozásán keresztül blokkolja.



6. ábra MK-801

3. Életképesség mérések

A neuronok életképességi vizsgálatához és a toxicitás vizsgálatához MTT, azaz 3-(4,5-demetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromidot (Sigma) alkalmaztam. A sárga tetrazol forma redukálódva lila formazánná alakul (7. ábra), ami oldhatatlan kristályokat képez a sejtek belsejében. A reagens segítségével a sejtek életképességét azok redox kapacitása (NAD(P)H szintek) alapján lehet mérni, mivel a sejt mitokondriális redukáz enzimeinek kapacitása összefügg az idegsejtek életképességével.

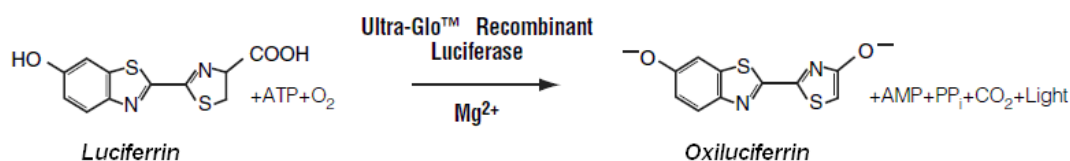


7. ábra MTT reagens enzimatiszus redukciója

A mérést 96-lyukú tenyészt edényekben végeztem, amelyekbe az MTT reagens 0,3 mg/ml végkoncentrációban került, majd ezt követően a tenyészetet 37°C-on 1 órán keresztül, gyakori mikroszkópos kontroll mellett, termosztátban inkubáltam.

Ezt követően a sejtekben képződött kristályokat tenyésztési médiumnál háromszoros mennyiségű izopropanol (Thomasker) hozzáadásával oldjuk fel. A méréseket 570nm mért hullámhosszon (630nm referencia) abszorbancia (Optical Density O.D.) alapján fotométer (BioRad Microplate Reader) és szoftver (Microplate Manager) alkalmazásával végeztem.

A $\text{A}\beta_{1-42}$ toxicitási kísérletekhez az MTT teszt nem alkalmazható, mivel az amiloid oligomer befolyásolja az MTT reagens redukcióját életképesség csökkenés hiányában is [66]. Ezért más életképesség mérési eljárást kellett keresnünk, hogy az amiloid okozta a neurotoxicitást mérni tudjuk. Erre elterjedten használt módszerek a különböző adenzin-trifoszfát (ATP) szint kvantifikáló kit-ek, mivel az intracelluláris ATP szintje jól korrelál a neuronok életképességével. Munkám során a Promega vállalat kit-jét használtam (CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay). A kit működési elve: a sejt lizálása, hogy az intracelluláris ATP oldatba kerüljön, az ATP mennyiségének detektálása rekombináns luciferáz enzim reakció alapján. Az enzim a szubsztrátot, a luciferint átalakítja oxiluciferinné, amely reakció során ATP-AMP átalakulás során fény szabadul fel melynek mennyisége lumineszcensen detektálható (8. ábra). A detektáláshoz FlexStation 3 (Molecular Devices) multifunkciós spektrofotométert használtam.



8. ábra ATP assay enzimes működésének elve

4. A HPLC-s rendszer

Glutamát felszabadulás méréséhez Agilent Technologies 1200-as típusú HPLC rendszert használtam. Ennek része egy kvaterner pumpa, egy online gázmentesítő egység, egy kolonna termosztát és egy termosztálható automata mintavevő egység. A detektáláshoz diódasoros 1200-es Agilent fluoreszcens és UV-VIS detektort használtam. Az elválasztás biztosításához Zorbax Eclipse XDB 4,6 mm átmérőjű és 150 mm hosszú 5 mikron szemcse átmérőjű C18-as reverz fázisú kolonnát (Agilent Technologies) 22C°-os kolonna termosztálás mellett alkalmaztam. A mintákat a fényérzékenységük miatt fényszűrő polipropilén vial-okban (VWR International) tartottam. A HPLC-s mérés vezérlését és mérési eredmények kiértékelését is Agilent ChemStation szoftver segítségével végeztem. A HPLC-s elválasztás kidolgozását részleteiben az Eredmények c. részben ismertetném.

5. Felhasznált vegyszerek

A felhasznált vegyszereket Sigma Aldrich-től szereztük be, kivéve a kromatográfiás eluensek készítéséhez használt szerves oldószereket és vegyszereket (Na_2HPO_4 , Metanol, Acetonitril, Merck).

6. Alkalmazott statisztikai vizsgálatok

A kapott eredmények kiértékelésekor a szórásokat és az átlagokat ábrázoltam és a kísérlet tulajdonságainak megfelelő statisztikai próbákat végeztem. Annak igazolására, hogy két különböző minta azonos tekinthető-e Student-féle két mintás t-próbát alkalmaztam, ugyanerre kérdése több mérés esetén egy utas ANOVA tesztet végeztem és 95%-os konfidencia szinten vettem szignifikánsnak az eredményeket. A statisztikai vizsgálatok elvégzésére és az eredmények ábrázolására Graphpad Prism 5.00 szoftvert használtam.

VI. Eredmények

1. Módszer kiválasztása és kidolgozása

A neurális tenyészetekben toxikus kezelés következtében felszabaduló glutamát mennyiségi meghatározására alkalmas technikát glutamát mennyiségének determinálására gyakorlatban használt módszerek közül, azok eltérő előnyeit és korlátait mérlegelve kellett kiválasztanom.

A módszer kiválasztásánál figyelembe vettem az irodalmi adatok alapján várható glutamát koncentrációt, ami normál fiziológiás és patológias körülmények között 0,5 és 200 μM között változhat [67-69]. A vizsgálataim során használt idegsejt-tenyészetek asztroglia tartalma igen alacsony (1-2% asztroglia), amely kis számuk mellett is jelentős változékonyságot tudnak generálni (5-15% metabolikus háttér produkálása). Mivel ez a különbség a glutamát koncentrációkban is megjelenhet, az összehasonlíthatóság érdekében a glutamát tartalom kísérletenkénti %-os változását hasonlítottuk össze.

A médium megadott összetételét tanulmányozva, valamint számításba véve a tenyészetek által a felülrúszóba szekretált kémiai komponenseket, feltételezhető, hogy a végső felhasználás során alkalmazott mátrix (tenyésztő folyadék) tartalmaz számos kis és nagy molekulású zavaró komponenst (NBA-B27 Függelékek). Ezért és mivel alacsony koncentráció szinteket is kimutatni kívánok a megfelelő szelektivitás elérése kulcskérdése a mérésnek.

A kísérletek sok párhuzamos mintaponttal végzett nagy elemszáma miatt a mérés megfelelő áteresztőképességére és gazdaságosságára is nagy hangsúlyt kell fektetni. A nagyszámú minta miatt ezek egyidejű mérését vagy, ha az nem lehetséges a megfelelő tárolását meg kell oldani.

A különböző módszerek közül a legérzékenyebb és legszelektívebb a nanoszenzor és a bioszonda nem állt rendelkezésemre. A nanoszenzor enzimelektrodás rendszer sok minta egy idejű mérésére csak igen nagy anyagi befektetés árán lehet alkalmas. A bioszonda használata a primer neurális tenyészetek alacsony transzfekciós hatékonysága miatt korlátozott. A hatékonyabb vírus alapú transzfekcióhoz szükséges megfelelő vírus vektor előállítása igen költség-, laboratórium- és szakképzett személyzetigényes, amely feltételek jelenleg még szintén nem álltak rendelkezésemre.

Az áteresztőképesség szempontjából az enzimes technikák a legalkalmasabbak a modern nagy elemszámú plate alapú kísérletekre. Viszont a forgalomban lévő kit-ek szelektivitása azok közvetett válaszele miatt kevésbé ideális. Legtöbbjük működésének alapja egy glutamátot konvertáló enzim produkálta NAD(P)H vagy annak valamilyen tovább alakításán keresztül keletkezett reakciótermék (például ATP) fotometriás kvantifikálása. Ugyanakkor az így képzett molekulák jelentős mennyiségben megtalálhatóak a tenyészetek felülúszójába, ezáltal jelentős háttérrel adva a mérésnek. A kit-ek felhasználása ellen szól továbbá azok magas piaci ára is. Ugyanakkor a tenyészetek glutamát változását enzimes módszer alkalmazásával élő sejtes kultúrákban folyamatosan is lehet monitorozni, ami részletesebb információt adhat a glutamát szintváltozásairól.

A szelektivitás a HPLC-s rendszerek legnagyobb előnye, ezt a különböző elválasztási módszerek és a felhasználható detektorok széles skálája biztosítja. A hatékony szelektivitással összefüggésben a módszer érzékenysége is maximalizálható. Hátránya a hosszas minta-előkészítésben, mintavételezésben és az áteresztőképesség korlátaiban rejlik. A levett minták lemérése és tárolása ismételtetőségi és stabilitási feltételeket állít, amelyeknek az analitikai módszert meg kell feleltetni. Az áteresztőképességet megszabja a minták előkészítési és lemérési ideje.

Mérlegelve az említett módszerek előnyeit illetve korlátait, a glutamát mennyiségi meghatározására kolonna előtti származékképzést és fordított fázisú HPLC-s elválasztást és a termék fluoreszcens detektálást találtam a legalkalmasabbnak a feladat megoldására. A módszer mellett szólt a hatékony kromatográfiás elválasztás okozta szelektivitás maximalizálása, illetve az ebből következő mérési érzékenység megnövekedése. Előny, hogy a minták futtatása és származékképzés is automatizálható ezzel csökkentve az emberi hibákat és növelve az ismételtetőség megbízhatóságát. Az is fontos szempont volt, hogy a laboratóriumunk jól felszerelt kromatográfiás műszerekkel rendelkezik, illetve tapasztalt és nagy szakértelmű analitikus munkatársak segítették munkámat.

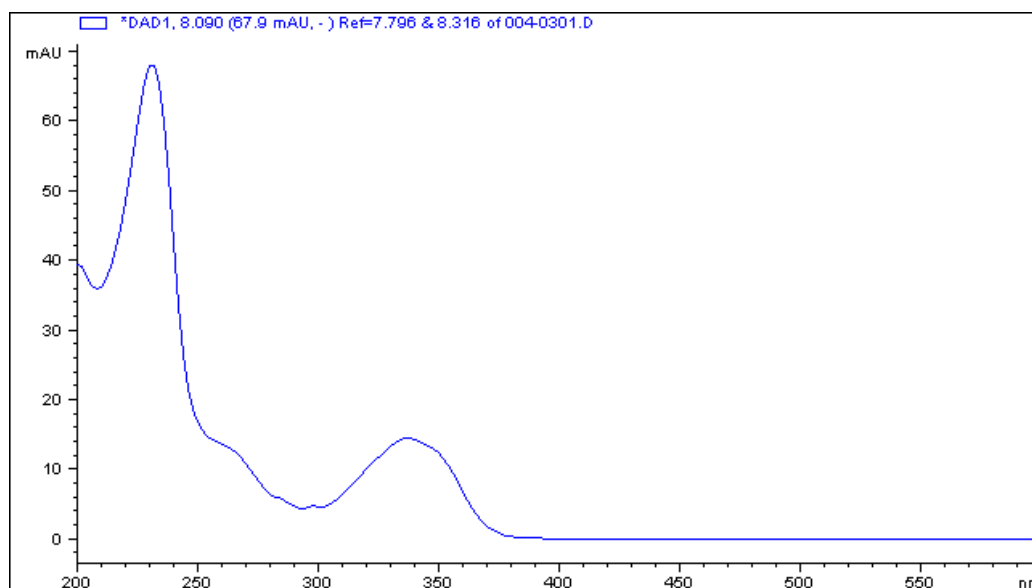
A származékképző kiválasztásánál elsődleges szempont volt az elválasztás hatékonysága valamint szelektív és érzékeny detektálás biztosítása. A nagy mintaszám és a mérési idő (run time) miatt fontos szempont volt továbbá, hogy a keletkezett származék hosszú ideig stabil, bomlás nélkül eltartható legyen. Irodalmi adatok alapján [70], az OPA mellett használt kéntartalmú származékképzők közül a nátrium-szulfidot és β -merkaptó-etanol nem találtam alkalmasnak megfelelő stabilitású és intenzitású

fluoreszcens származék képzésére, ezért a kísérleteim további részében NAC-t alapú derivatizációt használtam.

A származékképzési körülményeket, a reagens koncentrációit és arányait, primer aminok (mint amilyen a glutamát is) reverz-fázisú HPLC-s mérését leíró irodalmi források alapján határoztam meg [71]. A minta minél kevésbé való kihígítása miatt az eredeti 4 mg/ml OPA és 5 mg/ml NAC reagens koncentrációt megdupláztam, valamint a reakció puffereként használt 1 mM-os nátrium-tetraborát oldatot, a jobban oldódó 1,5 mM-os kálium-tetraborát pufferre cseréltem, megtartva az eredeti 10,4-es pH-jú reakció közeget.

A származékképzést 30 µl minta és 52 µl reagens arányában végeztem, a korábbi minta-előkészítési protokollnak megfelelően [71]. A mérések során a származékképzést online, azaz a mintavevő egységben automatizáltan végeztettem. Így csökkent az anyag- és munkafelhasználás, valamint az emberi hibák okozta szórás is redukálható, növelve a mérés ismételhetőségének megbízhatóságát.

A reakciót követően kapott termék fluoreszcens spektruma alapján 346 nm-es gerjesztés mellett 422 nm-en detektálhatóvá válik. Ezeket a hullámhosszokat a termék spektrumának elemzésével állapítottam meg (9 ábra).



9. ábra A glutamát származék diódasoros (DAD) detektorral felvett elnyelési spektruma 200 és 600 nm között, 225 nm-en az irodalmi adatoknak megfelelően a glutamát szénláncának van elnyelése, míg a másik elnyelési maximumot, 346 nm-en az izoindol vázas származék okozza

A 346 nm-es abszorpciós maximumot választottam gerjesztési hullámhossznak, mivel a szénláncal ellentétben az izoindolvázis származék 4 kettős kötést is tartalmaz,

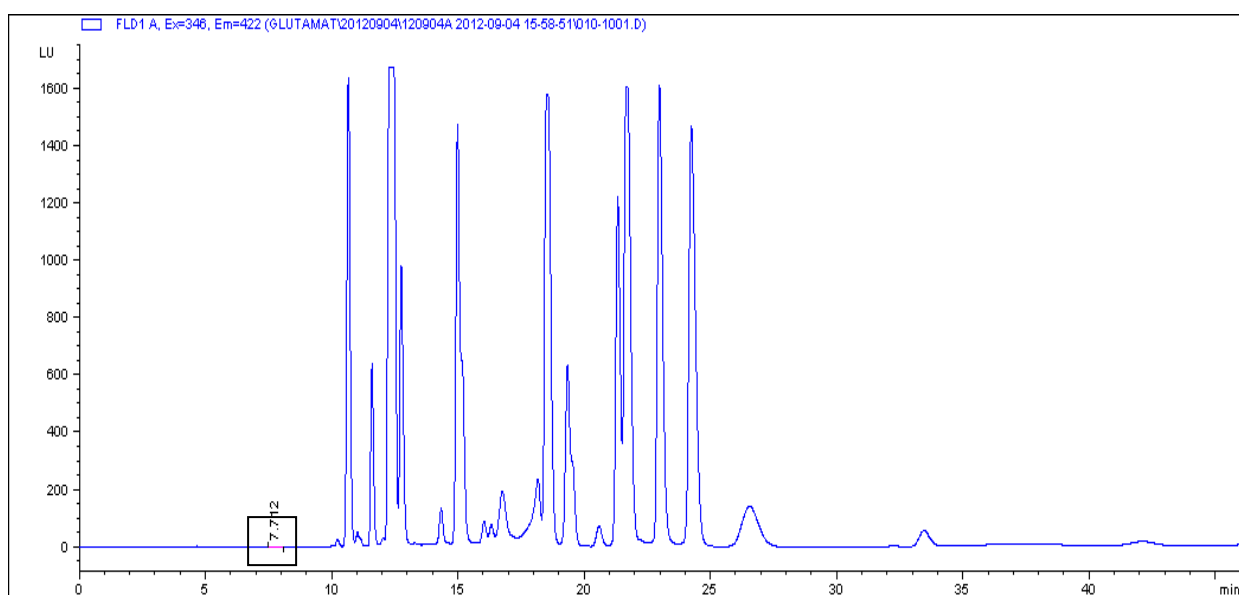
amelyek megfelelő gerjesztés (346 nm) mellett jól mérhető fluoreszcens jelet ad. A következő lépésben a legintenzívebb emissziós hullámhosszt kellett megtalálnom, ezért 346 nm excitáció mellett multiemissziós spektrumot vettem fel. Az eredmények alapján a sikerült kijelölnöm a 326 nm-es gerjesztési és 422 nm-es emissziós hullámhosszt is, így maximalizálva a glutamát származék fluoreszcens jelének intenzitását, ezzel növelve az érzékenységet.

A HPLC-s elválasztás alapját irodalmi adatok [72] és az EGIS Biztonság Farmakológiai Laboratóriumának már kidolgozott eljárása adták. Mivel ezek a módszerek mikrodialízis minták elemzésére szolgált, szükség volt az elválasztást a megváltozott mátrixra optimalizálni. A hatékony szeparáció érdekében gradiens elúciót alkalmaztam, amely menetét az 2. táblázat ismerteti.

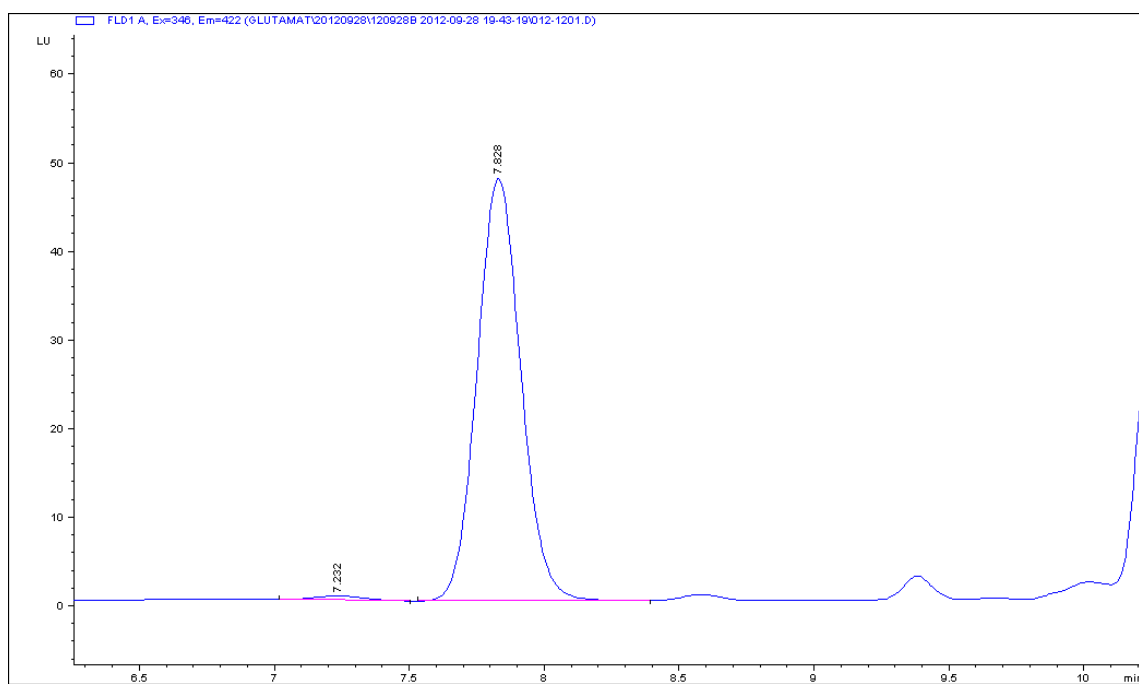
Időpontok (min)	Eluens (V/V%)		
	A	B	C
0	100	0	0
5	94,7	5,3	0
10	69,7	26,8	3,5
20	47,5	45,5	3,5
40	45,5	45,5	5
50	43	45,5	7,5

2. Táblázat Gradiens elúció időbeli lefolyása V/V%-okban összesítve, A=50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ pH=6,7 – 5% Metanol, B= Metanol, C=Acetonitril,

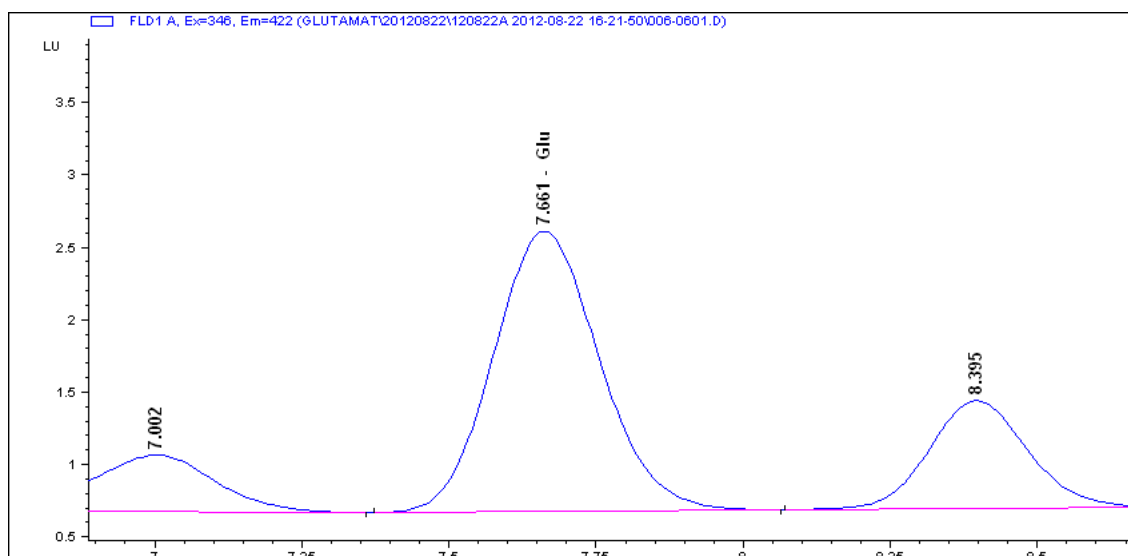
A Na_2HPO_4 puffer pH-ján a glutamát molekulák várhatóan azonos töltöttségi állapotban vannak, mivel a glutamát láncvégi karboxil csoportjának pKa értéke 4,07. Ezért a glutamát az elválasztás után egy csúcsban jelenik meg. A szeparáció hatékonyságát az első gradiens szakasz biztosítja, a további szerves fázisban gazdag eluens a később eluálódó komponensek kolonnáról való lehajtásáért felel. A felhasználás során használt tenyésztő folyadékban (NBA-B27) a glutamát mellett jelentős számban és a glutamát sokszoros mennyiségében találhatóak az azonos hullámhosszon emissziót mutató vegyületek (10. ábra). A számos zavaró komponens miatt egy minta futási idejét 55 percben sikerült minimalizálni.



10. ábra NBA-B27 médiumban oldott QC 15 µM-os minta kromatogramja 25°C-os kolonna termosztálás, 346 nm-es excitáció és 422 emisszió mellett, jelölve rajta a glutamát retenciós ideje, jelölve rajta a következő ábrán kinagyított részt



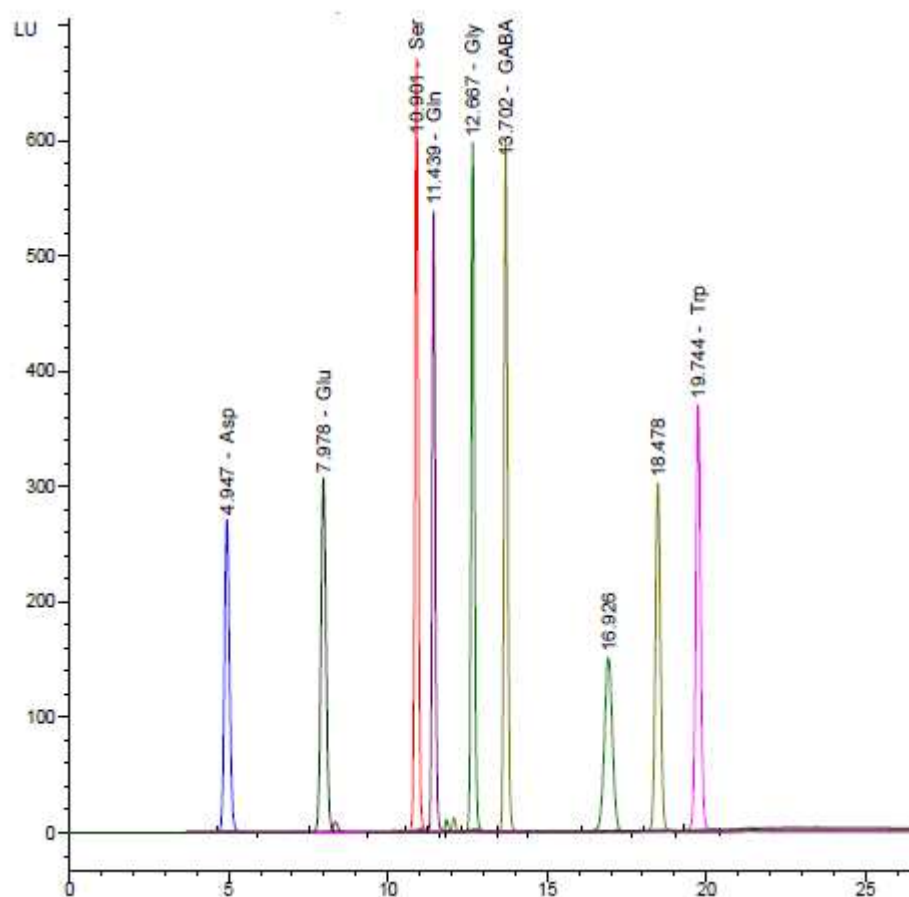
11. ábra Glutamát adta csúcs kinagyítva a 10. ábrán látható kromatogramból QC 15 µM koncentráció esetén NBA-B27 közegben



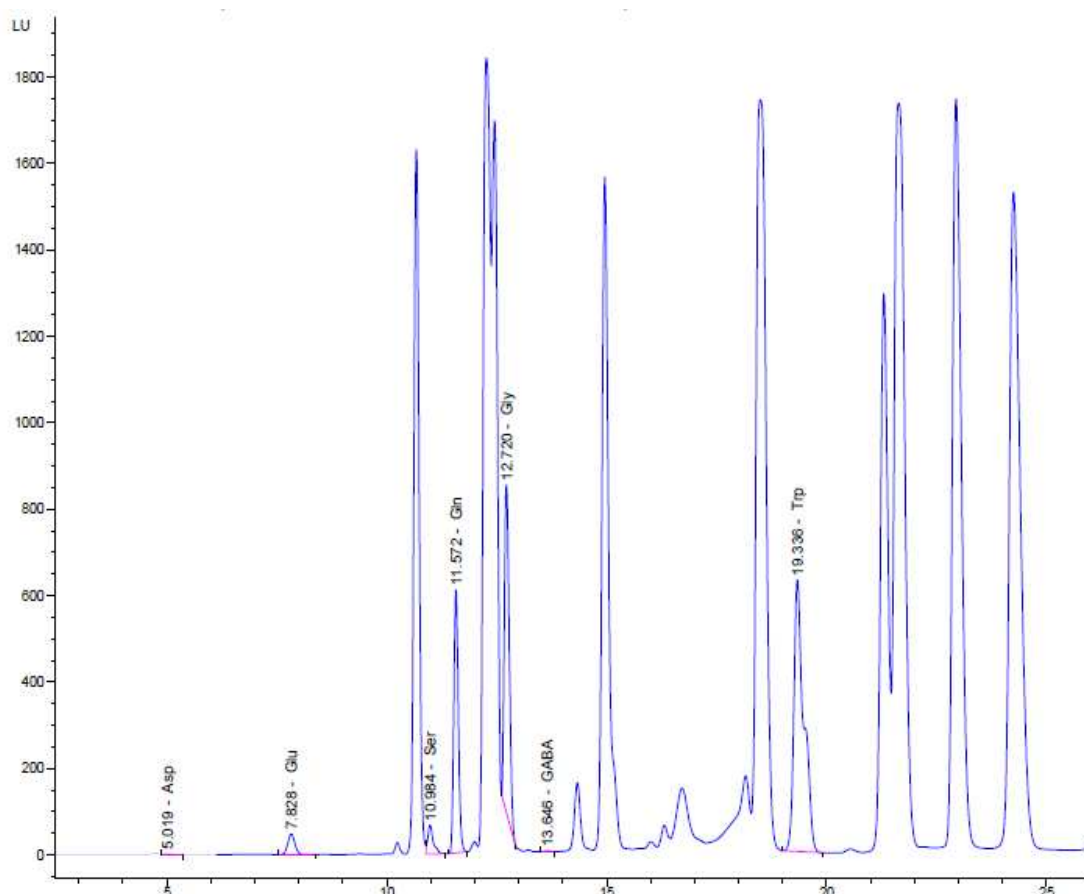
12. ábra Glutamát (Glu) NBA-B27 médiumban oldva (előzőeknél kisebb, 0,25 μ M), jelölve a glutamát származék retenciós ideje és a szomszédos csúcsok

A 12. ábra az alacsony 0,25 μ M koncentrációjú spike-olt minta kromatográfiás csúcsa és a szomszédos csúcsok hatékony szeparációját demonstrálja. Az első és a harmadik csúcs és glutamát adta csúcs közötti csúcsfelbontásai értékek (R) egyaránt nagyobbak 1,5-nél (1,75; 1,77), azaz a csúcsok között az elválasztás alapvonalinak tekinthető.

A glutamáton kívül, sikerült valószínűsíteni több aminosavak jelenlétét is. Ezek mindegyike jól elkülöníthető volt a glutaminsavtól (13. ábra). Lemért aminosav standardok a következők voltak: aszparaginsav (Asp), glutaminsav (Glu), szerin (Ser), glicin (Gly), γ -aminovajsav (GABA), glutamin (Gln) és triptofán (Trp). A glicin és a GABA az eluens puffer 6,7-es pH-ján valószínűsíthetően két töltöttségi állapotban van jelen, ezért ezek a kromatogramon két csúcs adnak. A vizes közegű mérés után a tenyésztő folyadékban is azonosíthatóak voltak a fenti aminosavak (14. ábra).



13. **ábra** Különböző standard minták (100 μ M) eredményeinek egymásra másolása desztillált vizes közeg esetén OPA/NAC származékképzéssel ex:322 nm, em:422 nm



14. ábra Különböző aminosav standardok NBA-B27 közeg esetén, OPA/NAC származékképzéssel
ex:322 nm, em:422 nm

A kromatogram alapján elmondható, hogy az általam kidolgozott szeparációval a vizsgált aminosavakat hatékonyan el tudtam különíteni és kidolgozott módszer alkalmas lehet egyéb aminosav meghatározására is.

A glutamát felülúszó minták mérésre alkalmassá tétele előzetes minta-előkészítést is igényel. Ezért feladatom volt a minta-előkészítés optimalizálása a speciális biológiai mátrixra. A minta fehérjementesítése kulcskérdés, hiszen a különböző fehérje molekulák, amelyeket jelentős mennyiségben tartalmazza a tenyésztő médium (NBA - B27, Függelékek), zavarhatják a detektálást, valamint a magasabb szerves fázis tartalmú eluenssel találkozva kiválásokat okozhatnak a rendszerben. A fehérjementesítéshez az irodalmi adatoknak megfelelően perklórsavas (PCA) oldatot használtam [73]. A PCA oldat mennyiségének meghatározásakor figyelembe vettem a minta hígulásának minimalizálását, valamint a maximális fehérje kicsapási hatásfokot. Ezért frakcionált kicsapást végeztem a 4 N-os PCA oldat alkalmazása mellett. Meghatároztam, hogy 5% PCA hozzáadásán felül további savas oldat adása már nem okoz további fehérje kiválást. A továbbiakban ezt a koncentrációt és hozzáadási arányt használtam, ami

15000 fordulatszámon (Thermo Scientific Ultracentrifuga) jól ülepedő csapadékot képzett. A minták visszasemlegesítését NaOH oldat adásával végeztem.

A következő lépés a mennyiségi meghatározás koncentráció tartományának kijelölése volt. Az irodalmi adatok *in vivo* és *in vitro* kísérletekben is eltérő koncentráció értékeket közölnek mind egészséges mind sérült neuronok esetében [67, 74, 75]. Továbbá a glutamát koncentráció változására kihat a tenyészetek kora, valamint összetételük különösképpen a gliasejtek aránya. Newcomb és munkatársai által neurális kultúrákon végzett kísérletei során a glutamátszint lízált sejtek esetén akár 50-100 μM is lehet, ezért a meghatározás felsőhatárát 100 μM -ban állapítottam meg. A legkisebb meghatározási koncentrációt a NeuroBasal-A B27 komponenst tartalmazó tenyésztő médium névleges glutamát tartalmának megfelelően 0,25 μM -nak választottam (lásd Függelék). A 0,25 és 100 μM által közre fogott tartományban a megfelelő kalibráció elérésének érdekében 8 pontos koncentráció sort vettem fel. A pontok 0,25; 0,5; 1,5; 5; 10; 25; 50 és 100 μM voltak. A kalibrációs egyenes pontjait desztillált vizes oldatokból készítettem, mivel az alap médium glutamát szintje a kultúrák fiziológias működése során esetenként csökkenthet is. A kalibrációs egyenes illesztésénél a kiugró értékeket nem vettem figyelembe, illetve az egyenest lineárisan illesztettem és kvadratikus súlyozást alkalmaztam. Minden mérés esetén két kalibrációs egyenest vettem fel a minták előtt (kal 1.) és után (kal 2.).

A kalibráció és ezáltal a meghatározás megbízhatósága miatt minőségellenőrző (quality controll, QC) mintákat készítettem mind desztillált vizes mind médiumos közeg esetén. Ezek koncentráció szintje 3 és 15 μM volt, amelyek kellően reprezentálják a kalibrációs tartományt. Az adott mérést akkor tekintettem eredményesnek, ha a QC minták 75%-nak eltérése a nominális koncentráció értéktől kisebb volt, mint a $\pm 20\%$.

2. A kidolgozott analitikai módszer validálása

A kidolgozott HPLC-s módszert - az analitikai feladatra való alkalmasságának bizonyítására - számos követelménynek kellett megfeleltetnem. A validálás során vizsgáltam a módszer napon belüli és napok közötti ismételhetőségét, megbízhatóságát, illetve a mérési technika sajátosságai miatt a minták stabilitását szobahőmérsékleten (22°C) és -80°C-on.

A biológiai eredetű minták, mint amilyenek az általam vizsgált idegsejtenyészetek felülúszói is, önmagukban a biológiai rendszerekre jellemző nagyobb heterogenitással és ezáltal nagyobb szórással rendelkeznek. Ez az *in vitro* sejtenyészetekre is igaz, hiába törekszünk a megegyező körülményeket biztosítására, valamilyen szinten minden vizsgálati pont különbözni fog. Ezért is fontos, hogy a biológiai minták mérése megfelelően ismételhető legyen, hogy ezzel se okozunk további szórásnövekedést, ami álnegatív vagy álpozitív eredményekhez és fals biológiai következtetésekhez vezethet.

Ennek a feltételnek bizonyítására napon belüli (intra-assay) és napok közötti ismételhetőségi (inter-assay) vizsgálatot végeztem. Az intra-assay során hat párhuzamos QC mintát mértem két koncentráció (3 és 15 μM) szinten. A mérés napon belüli ismételhetőségét akkor fogadhattam el, ha a QC minták legalább 75%-a a relatív hiba nem tér el (a kalibráció alapján visszaszámolt egyedi, mért koncentráció (C_i) százalékos eltérése) nem haladta meg a $\pm 20\%$ -ot. A 3. táblázat mutatja az eredményeimet, amelyekből látszik, hogy 15 μM -os koncentráció szinten 75%-a, 3 μM -os koncentráció szinten 100%-a egyezett meg a nominális koncentráció értékével. Továbbá a 4. táblázat eredményei alapján a minták C_i -nak relatív szórása nem haladta meg a 20%-ot.

C_n	C_i	Eltérés %
15	15,02	0,133333
15	14,72	-1,86667
15	15,47	3,133333
15	18,35	22,33333
15	16	6,66667
15	17,47	16,46667
3	3,17	5,5
3	3,47	15,8
3	3,17	5,7
3	3,131	4,36667
3	3,39	12,9
3	3,18	5,833333

3. Táblázat Intra-assay eredmények, a kalibrációs egyenes alapján visszaszámolt koncentrációk (C_i) és százalékos eltérésük a nominális koncentrációhoz képest (C_n) 3 és 15 μM -os glutamát koncentráció szinten

Cn	Ci						Átlag	Sd	Rsd
15	15,02	14,72	15,47	18,35	16,00	17,47	15,78	1,21	7,64
3	3,17	3,47	3,17	3,13	3,39	3,18	5,80	0,97	16,77

4. Táblázat Az intra-assayben kapott Ci-k (μM) átlag, szórás és relatív szórás értékei.

A napok közötti ismételhetőség meghatározására három különböző napon végeztem háromszor két kalibrációs egyenes felvételét, valamint két párhuzamossal két koncentráció szinten QC minták mérését. Az ismételhetőséget akkor tekintettem megfelelőnek, ha a QC minták, valamint a kalibrációs egyenes pontjai legalább 75%-a esetén a relatív hiba nem haladta meg a ± 20 %-ot.. A kapott eredményeket az 5. és 6. táblázat szemlélteti.

Mérési napok	1.		2.		3.	
Cn	Ci	Eltérés %	Ci	Eltérés %	Ci	Eltérés %
Kal 1.						
0,25	0,26	2,40	0,26	3,20	0,22	-12,40
0,50	0,50	0,80	0,53	5,80	0,40	-20,80
1,50	1,30	-13,33	1,33	-11,33	1,33	-11,67
5,00	4,43	-11,36	4,70	-6,00	4,32	-13,70
10,00	9,44	-5,60	9,38	-6,20	9,58	-4,25
25,00	22,78	-8,88	22,90	-8,40	23,02	-7,92
50,00	44,46	-11,08	50,25	0,50	48,31	-3,38
3,00	2,65	-11,67	3,17	5,50	2,55	-15,00
15,00	14,97	-0,20	14,72	-1,87	14,71	-1,93
Kal 2.						
0,25	0,24	-2,80	0,26	2,40	0,30	18,40
0,50	0,52	4,00	0,44	-12,00	0,53	5,20
1,50	1,53	1,73	1,60	6,60	1,87	24,80
5,00	5,08	1,60	4,81	-3,80	5,56	11,20
10,00	10,58	5,80	10,81	8,11	11,75	17,50
25,00	30,58	22,32	29,02	16,08	21,91	-12,36
50,00	66,35	32,70	53,00	6,00	49,69	-0,62
3,00	3,41	13,67	3,17	5,70	3,42	14,00
15,00	17,09	13,93	15,02	0,13	15,77	5,13

5. Táblázat Inter-assay eredményeit összefoglaló táblázat, Cn nominális, Ci a kalibrációs egyenes által visszszámolt értékeket jelenti μM -olban, az eltérés % pedig a Ci eltérését a Cn-hez képest %-ban, a 1-3. az egyes mérési napokat jelölik, $n=2 \times 3$

Cn	Ci						Átlag	Sd	Rsd
	1.		2.		3.				
0,25	0,256	0,26	0,22	0,243	0,26	0,30	0,26	0,03	10,21
0,5	0,504	0,53	0,40	0,52	0,44	0,53	0,49	0,05	11,18
1,5	1,3	1,33	1,33	1,526	1,60	1,87	1,49	0,22	14,83
5	4,432	4,70	4,32	5,08	4,81	5,56	4,82	0,45	9,42
10	9,44	9,38	9,58	10,58	10,81	11,75	10,26	0,95	9,28
25	22,78	22,90	23,02	30,58	29,02	21,91	25,04	3,74	14,96
50	44,46	50,25	48,31	66,35	53,00	49,69	52,01	7,56	14,54
3	2,65	3,17	2,55	3,41	3,17	3,42	3,13	0,32	10,19
15	14,97	14,72	14,71	17,09	15,02	15,77	15,44	0,9	5,84

6. Táblázat Az inter-assay további eredményei Ci értékeinek átlaga, szórása (sd) és relatív szórása (rsd), 1-3. az egyes mérési napokon, n=2x3

Az 5. és 6. táblázatban feltüntetett eredmények alapján a mérés ismételhetősége megfelel az előzetesen támasztott követelményeknek. A kalibrációs és QC minták több mint 75 %-ára teljesült, hogy a relatív hiba nem haladta meg a ± 20 %-ot. Továbbá a különböző napokon mért kalibrációs pontok és QC minták visszaszámolt értékeinek relatív szórása (Rsd) sem haladta meg a 15%-ot sem.

A neurotoxicitási kísérletek menete nagyszámú, egyszerre vett tenyészet felülúszó mintát eredményez. Ezek lemérése egy méréssorozatban („run-ban”) nem lehetséges, ezért a minták a mérésig -80°C -os hűtőszekrényben kerülnek tárolásra. Ezért meg kellett bizonyosodnom arról, hogy a minták glutamát tartalma a lefagyasztás és tárolás alatt változatlan marad. Ennek bizonyítására két koncentráció (3 és 15 μM) szinten spike-olt mintákat készítettem NBA közegben, melyeket frissen, illetve 24 óra és 1 hét elteltével is lemértem. A kromatográfiás csúcs alatti területek értékét hasonlítottam össze (7. táblázat). Stabilnak fogadtam el a mintát, ha a $t=0$ időpontban és a tárolást követően mért csúcs alatti területértékek közötti százalékos eltérés nem haladta meg a ± 20 %-ot.

	C _n	Átlag	Eltérés 0h-tól %
0h	15	671	-
- 80C° 24h		641,5	-4,40
- 80C° 1hét		641,5	-4,40
0h	3	147,5	-
- 80C° 24h		138	-6,44
- 80C° 1hét		141	-4,41

7. Táblázat Stabilitási vizsgálat eredményei 3 és 15 µM-os minták esetén -80C°-os tárolás esetén, ábrázolva a kapott csúcs alatti területek átlagát és eltérés %-át mutatja a 0h-ás, friss mintától (n=3).

A minták tárolása a stabilitási vizsgálat alapján megoldható, a fenti tárolási idő és körülmények között a glutamát stabilnak tekinthető.

További stabilitási kérdéseket vetnek fel a hosszú futási idők. A hét pontos kalibrációs egyenesek és QC minták felvétele önmagában 10-12 órát vesz igénybe. Az éles minták pedig egyenként további egy órás futási időt jelentenek. Így a minták az automata mintavevő egységben 22C°-on tárolódnak, míg lemérésre nem kerülnek. Nagy mintaszám esetén az utolsó minták akár 48 órát is állhatnak 22C°-on, mielőtt származékképzést követően injektálásra kerülnek. Ezért meg kellett bizonyosodnom a minták glutamát tartalmának változatlanságáról 22C°-on 24 és 48 óráig NBA közegben.

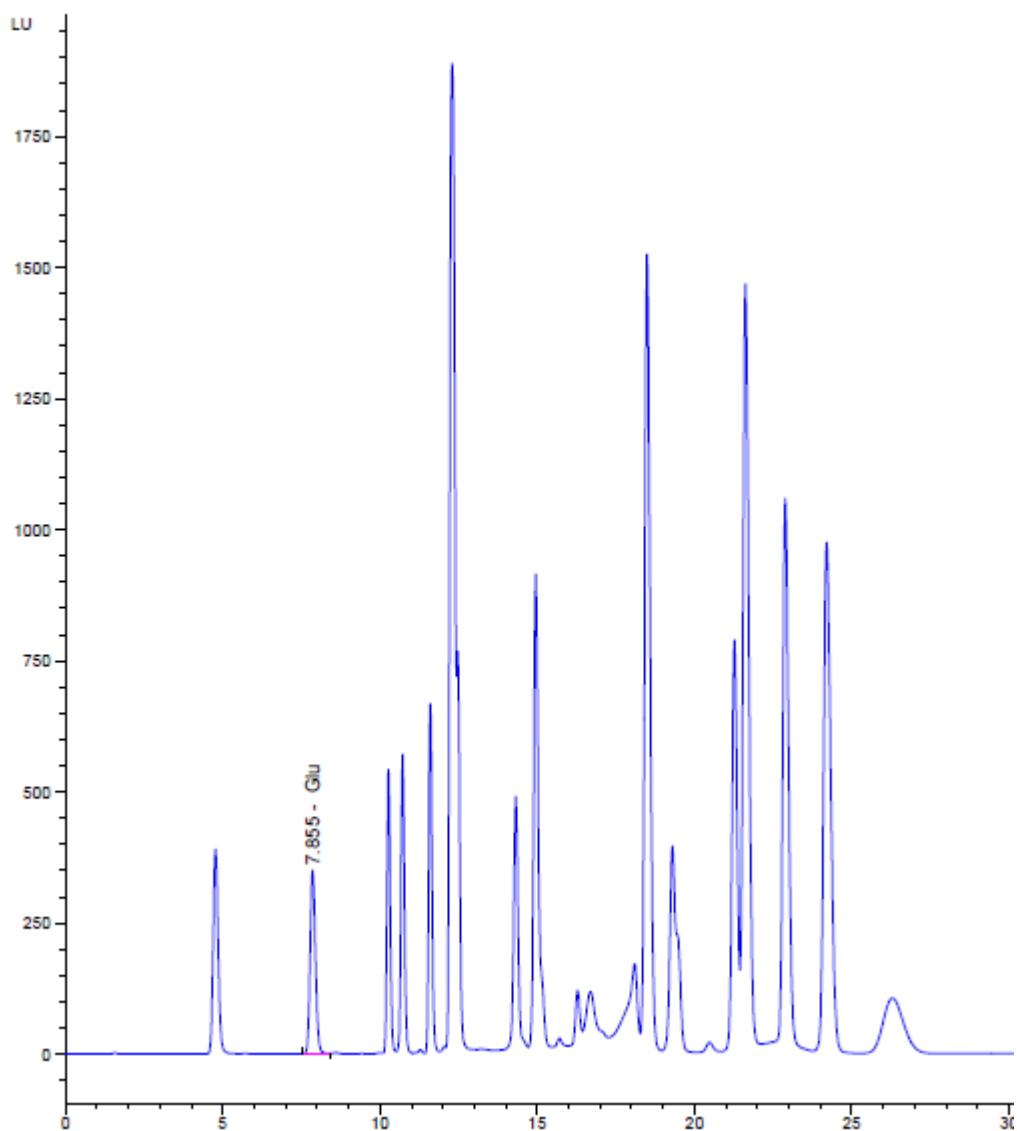
	C _n	Átlag	Eltérés % 0h-hoz
0h	15	598,67	
22C° 24h		601,43	0,42
22C° 48h		629	5,01
0h	3	151,7	
22C° 24h		153,42	0,93
22C° 48h		177,5	16,78

8. Táblázat Stabilitás vizsgálat eredményei 22C°-os tárolás esetén, a különböző időpontokban lemerített minták csúcs alatti terület értékei és eltérésük a 0. időponttól %-ban (n=3).

A 8. táblázat eredményei alapján látható, hogy a két koncentráció szinten spike-olt minták csúcs alatti terület értékei tárolás előtt (0. időpont) és után nem térnek el $\pm 20\%$ -nál nagyobb mértékben. Kijelenthető tehát, hogy a minták 48 óráig megőrzik glutamát tartalmukat, ezért a „run”-ok hossza lehet akár 48 óra is.

A kidolgozott eljárás tesztelésére advanced dMEM (Advanced Dulbecco Modified Minimum Essential Medium, sejtvonalak tenyésztéséhez használt médium) névleges,

azaz 100 μ M-os glutamát koncentrációját mértem meg, mintegy összetettebb standard mintaként (15. ábra).



15. ábra Adv dMEM kromatogramja em: 326 nm; ex:422 nm, jelölve rajta a glutamát adta csúcs és retenció ideje

A kapott csúcs alatti terület megfeleltethető volt a glutamát 100 μ M-os desztillált vizes minta csúcs alatti területének (n=2).

Összefoglalva a kidolgozott analitikai módszer napon belüli és napok közötti pontosság valamint relatív hiba tekintetében is megfelelt az előzetesen támasztott feltételeknek. A minták lefagyasztása során glutamát tartalma nem változik, ezért a biológiai minták a tenyésztés folyamán összegyűjthetők és -80°C -on tárolhatóak és a későbbiekben akár különböző napokon mérhetőek le. Továbbá a hosszú akár 48 órás

mérési idők is megengedhetőek, hiszen ez idő alatt a minták glutamát tartalma 22C°-on nem változik.

A kísérletek során az analitikai módszer 20%-os megengedett eltérése és a biológiai mintákra jellemző heterogenitás miatt a kísérleti eredmények különbözőségét 30%-os eltérés esetén fogadtam eltérőnek.

3. Glutamátszintek változása különböző neurotoxikus kísérletekben

Az analitikai kritériumok teljesítését követően a kidolgozott eljárás alkalmassá vált a neurotoxikus kezeléseknek kitett neurális kultúrák felülúszójának glutamát mérésére. Az idegsejteket glutamátszint változását vizsgáltam megnövekedett reaktív oxigén vegyületek koncentrációja és amiloid-béta kezelés mellett. Az excitotoxicitás szerepének indirekt bizonyítására, annak kulcs receptorának blokkolásán keresztül, MK-801 NMDA receptor antagonistá mellett vizsgáltam.

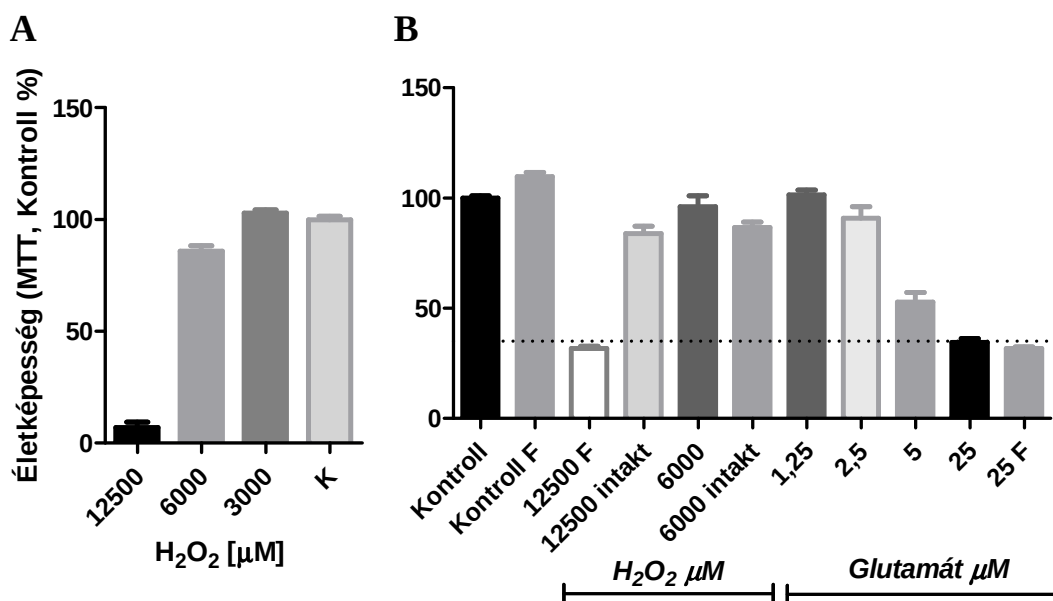
3.1. Az excitotoxicitás szerepe oxidatív stressz okozta neurotoxicitási kísérletekben

A következő kísérleteimben a reaktív oxigén gyökök koncentrációjának megnövekedését vizsgáltam, külön tekintettel az excitotoxicitás szerepére a kidolgozott neurotoxicitási tesztben.

Ahogy azt az előző TDK dolgozatomban [76] részletesebben taglaltam a neurális tenyészetek egyre érzékenyebbé válnak a toxikus ágensekre abban az időtartamban (DIV14-18), amikor az tesztek végezzük. Ezért minden kísérletben H₂O₂ koncentráció sort vettem fel annak meghatározásához, hogy az adott tenyészetek (sejtsűrűség, *in vitro* kor stb.) melyik koncentrációban bizonyulnak toxikusnak. Az eredmények alapján az 12500 µM mindig teljes toxicitást ért el, míg az adott kísérletben 6000 µM-os csak 13±0,85%-os sejtpusztulást eredményezett (16/A ábra). A kontroll és a 3000 µM között nem volt szignifikáns különbség.

Annak a kérdésnek a tisztázására, hogy a toxikus kezelés hatására felszabadul-e valamilyen másodlagos stressz ágens, a kezelt tenyészetek felülúszóit (F) átmértem egy másik tenészetre. Annak bizonyítására, hogy az elsődleges toxikus ágensnek használt H₂O₂ hatását, annak gyors lebomlása miatt nem közvetíti az átvitt felülúszó, az azonos

H₂O₂ koncentrációjú médiumot párhuzamosan sejtmentes tenyésztőedényben is inkubáltam 37C°-on 24 óráig, majd ezt a médiumot is átmértem a felülúszót kapott tenyészetek testvértenyészeire (intakt). A toxicitást exogén glutamát koncentráció sor hatásához viszonyítottam. Továbbá az előző tenyészetben negatív kontrollnak használt 25 µM-os glutamát koncentrációt is átmértem, hogy bizonyítsam toxikusságának maradandó hatásosságát (16/B ábra).



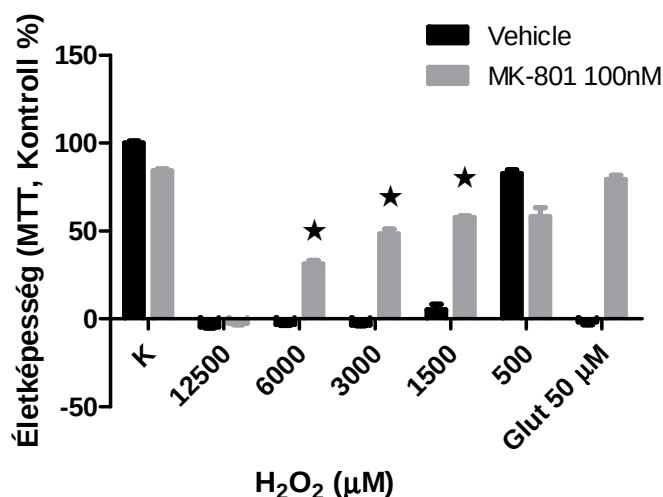
16. ábra MTT mérések eredményei, kontroll minták O.D. értékeinek %-os arányában (A, n=12, B, n=6)
A: elsődleges kísérlet H₂O₂ okozta életképesség csökkenés; **B:** felülúszó és intakt médiumok okozta életképesség csökkenés

Az eredmények alapján az egyébként markánsan toxikus 12500 µM-os H₂O₂-ot tartalmazó intakt médium 24 óra inkubáció után nem okozott életképesség csökkenést, toxikus tartalma az inkubáció alatt elbomlott. Ezzel szemben az azonos kiindulási médium idegsejtek felülúszójaként toxikusnak bizonyult. Ebből következtethető, hogy a ROS kezelés következtében elpusztuló sejtekből másodlagos stressz ágens szabadul fel. Az toxicitás mértéke a 25 µM-os azaz teljes mértékben toxikus koncentrációval megegyező. A 6000 µM-os és az átvitt kontroll tenyészet sem okozott a tápcsere következtében kialakuló életképesség ingadozásnál (+/-10%, [76]) nagyobb életképesség csökkenést.

Arra a kérdésre, hogy ez a felszabadult másodlagos stressz ágens a glutamát vagy más toxikus vegyület, egyaránt végeztem farmakológiai és analitikai vizsgálatokat.

A excitotoxicitás farmakológiai indirekt bizonyítására MK-801 NMDA antagonistát alkalmaztam 100 nM koncentrációban, amely blokkolja NMDA receptor

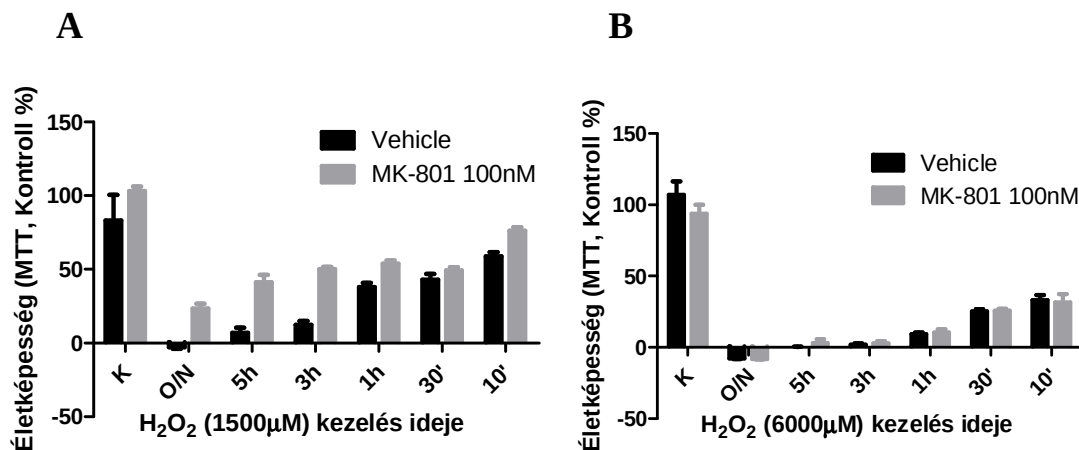
ioncsatornáját, ezáltal megakadályozza a glutamát indukálta a kation beáramlást. A H_2O_2 koncentrációsorot vettem fel 12500 μM -tól 500 μM -ig (17. ábra). Az MK-801 hatásosságának bizonyítására 50 μM -os glutamát kezelést is alkalmaztam.



17. ábra MTT mérés eredményei a kontroll tenyészet O.D. értékeinek %-ban H_2O_2 koncentráció sor MK-801 mellett és anélkül (vehicle) (n=6)

Az MK-801 a közbülső toxikus tartományban (csillaggal jelölt koncentrációkban) szignifikánsan növelte a tenyészetek életképességét, azaz kivédte a H_2O_2 okozta toxicitás egy részét. A viabilitás 6000 μM esetén $31 \pm 4,8\%$, 3000 μM esetén $48 \pm 6,8\%$, 1500 μM esetén $58 \pm 2\%$ volt. Itt érdemes ismét kihangsúlyoznom, hogy a tenyészetek a vizsgálati időszakban egyre inkább érzékenyebbé válnak a különböző toxikus ágensek okozta stressz behatásokra. Az MK-801 teljes egészében kivédte az 50 μM -os glutamát kezelést, ami igazolja a referens vegyület hatékonyságát. Ugyanakkor az MK-801 kezelés kontroll tenyészetek esetén is okozott $15 \pm 0,3\%$ -os toxicitást, ami az NMDA receptorokon keresztüli szinaptikus működésének blokkolása okolható

A következő lépésben a H_2O_2 toxicitásának időbeli felbontásának felderítésére végeztem kísérletet. A korábbi eredmények alapján az adott időszakban toxikus 6000-3000-1500 μM koncentrációkat választottam a H_2O_2 toxicitásának időbeli lefolyásának vizsgálatához (18. ábra). A kísérletet MK-801 NMDA receptor antagonistá mellett végeztem, hogy az excitotoxicitás szerepének farmakológiai bizonyítására (n=6, 18. „B” ábra). A tenyészetek H_2O_2 kezelését egy éjszakán keresztül (over night: O/N) – 5 – 3 – 1 – órán és 30 és 10; percig 100 nM MK-801 jelenlétében és anélkül végeztem.

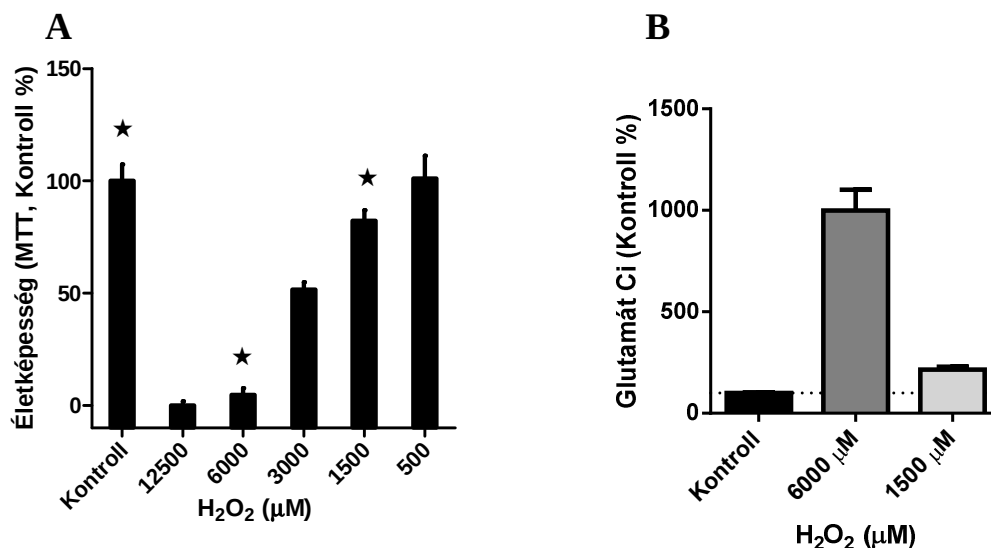


18. ábra Az előző kísérlet alapján kiválasztott toxikus 1500 μM-os (**B**) és 6000 μM-os (**A**), H₂O₂ koncentráció és időbeli hatása a tenyészetek életképességére kontroll tenyészet O. D. értékeinek %-ban MK-801 mellett és hiányában (vehicle) (n=6)

A 6000 μM-os koncentráció még 10 perces kezelés esetén is markáns toxicitást okozott (87±3,7%-os életképesség csökkenés) az NMDA antagonistá jelenlététől függetlenül. Az 1500 μM koncentrációjú H₂O₂ időbeli felbontása esetén 1 órás és annál rövidebb kezelési időtartam esetén az MK-801 a toxicitásnak csak csekély részét volt képes kivédeni. Míg a hosszabb kezelési idők esetében - jellemzően 3-5 óránál - a tenyészetek életképessége a kontroll tenyészetéhez képest akár 5 óra esetén 41±12,2%-ban és 3 óra esetén 50±3,4% megmaradt, a legtoxicusabb oxidatív ágens esetén ez az érték csak 23,2±8,2% volt.

Mivel MK-801 önmagában befolyással van a tenyészetek életképességére az excitotoxicitás farmakológiai igazolására csak indirekt bizonyításképpen alkalmazható.

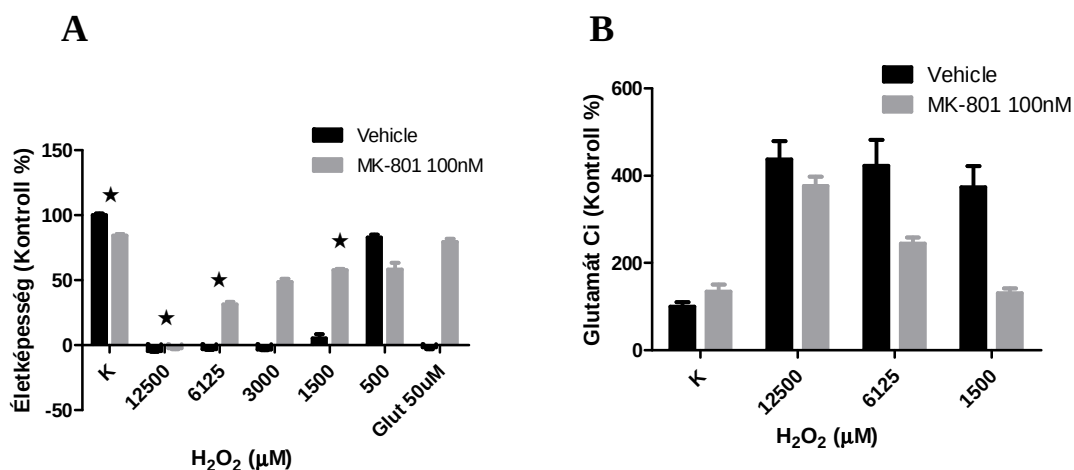
Az előzőek miatt a glutamát felszabadulás direkt bizonyítására kellett törekednem, hogy a toxicitási tesztet ne befolyásoljam az excitotoxicitás szerepének meghatározása közben. Erre az előzőekben kidolgozott HPLC-s eljárást alkalmaztam. A kísérletemben, amit az 19. ábra szemléltet, az előzőekben is alkalmazott H₂O₂ koncentráció sort vettem fel.



19. ábra „A”. H₂O₂ koncentrációsor hatása az életképességre (MTT) O/N kezelés esetén 15 napos tenyészeteken, életképesség értéke kontroll O.D. %-ának értékben ábrázolva (n=6). **„B”**, a csillaggal jelölt minták felülúszójának HPLC-s glutamát meghatározása (n=3)

A mérés során a teljesen toxikus 6000 μM-os, a részlegesen toxikus (14±2,6%) 1500 μM-os koncentráció és a kontroll tenyészetek felülúszójának glutamát tartalmát mértem le. A kapott eredményeket a kontroll minták %-ban ábrázoltam, hogy az életképesség csökkenés és a glutamátszint-változás közvetlenül összehasonlítható legyen. A 19. ábrán látható, hogy a teljesen toxikus a H₂O₂ koncentráció tízszeresére növelte a glutamát extracelluláris szintjét, míg a részlegesen toxikus H₂O₂ is kétszeresére növelte ezt a koncentrációt.

A következő kísérlemben a 20. ábrán bemutatott kísérlet -80°C-on tárolt felülúszóinak glutamát szintjét mértem le, igazolva az elsődleges (H₂O₂) toxikus ágens okozta glutamát felszabadulást az MK-801 jelenlétében is.



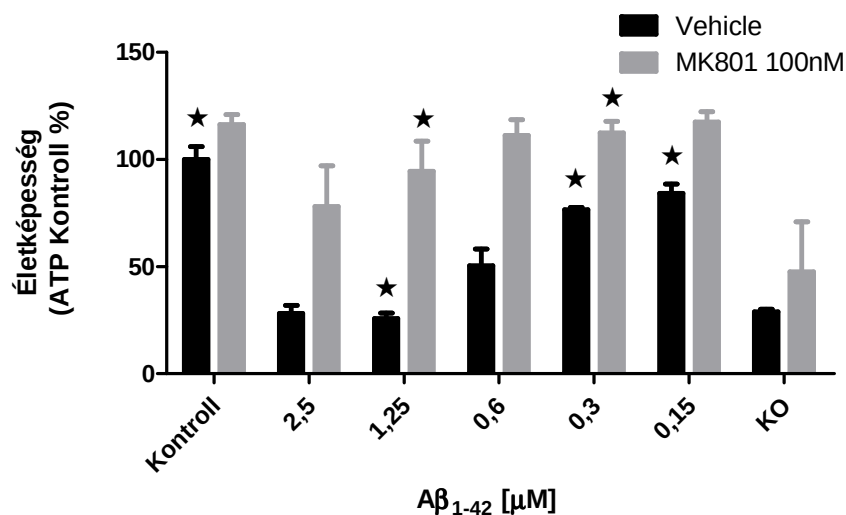
20. ábra „A” ábra szemlélteti az MTT mérés eredményeit a kontroll tenyészet O.D. %-ban (n=6) , „B” a csillaggal jelölt minták felülúszóinak glutamát szintje ábrázolva a kontroll tenyészet glutamát koncentrációjának %-ában MK-801 100 nM-al kezelt és kezeletlen (vehicle) esetben (n=3)

Az 12500 μM-os koncentrációban a kontroll glutamátszint 4x-re nő MK-801 jelenlététől függetlenül, a 6000 μM-os H_2O_2 esetén szignifikáns eltérés van az MK-801-el kezelt és kezeletlen tenyészetek között, de az antagonistával kezelt tenyészet még ez esetben is 2,5x-e a kontroll tenyészetek glutamát szintjének. A 1500 μM-os koncentráció MK-801-el kezelt és a kontroll tenyészetek között nem volt szignifikáns különbség. Az eredmények igazolták, hogy az elsődleges toxikus hatást követően igen jelentős mértékben járul hozzá az idegsejtek pusztulásához a másodlagosan felszabaduló glutamát, azaz a H_2O_2 direkt toxikus hatását az egyszerű életképesség mérés nem hitelesen mutatja meg.

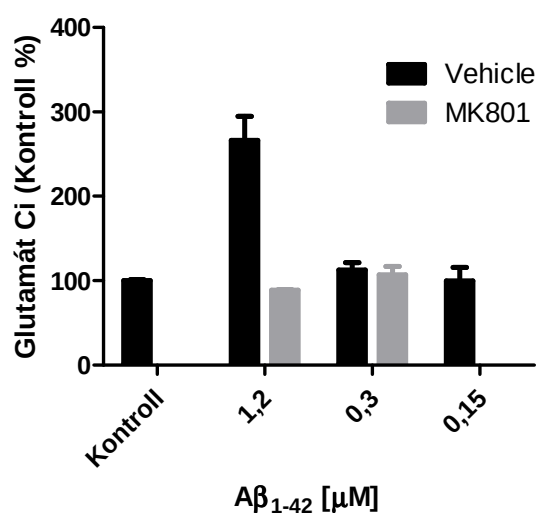
3.2. Amiloid-béta okozta glutamátszint változások

Az $A\beta_{1-42}$ kezelés segítségével az Alzheimer-kór molekuláris patomechanizmusát kívántam modellezni.

Az első kísérletben $A\beta_{1-42}$ koncentráció sor vettem fel 2,5 μM-tól 0,15 μM-ig felező hígításban 100 nM MK-801 jelenlétében és anélkül (vehicle) (21. ábra).



21. ábra ATP szint mérés eredménye Aβ₁₋₄₂ koncentráció sor mellett a kontroll tenyészet lumineszcens válaszainak %-ában, a csillaggal jelölt mintapontok felülűszói kerültek a glutamát mérésre (n=5,6), KO-val jelölt tenyészetek az ozmotikus sokkal teljesen elölt kultúrákat jelöli.

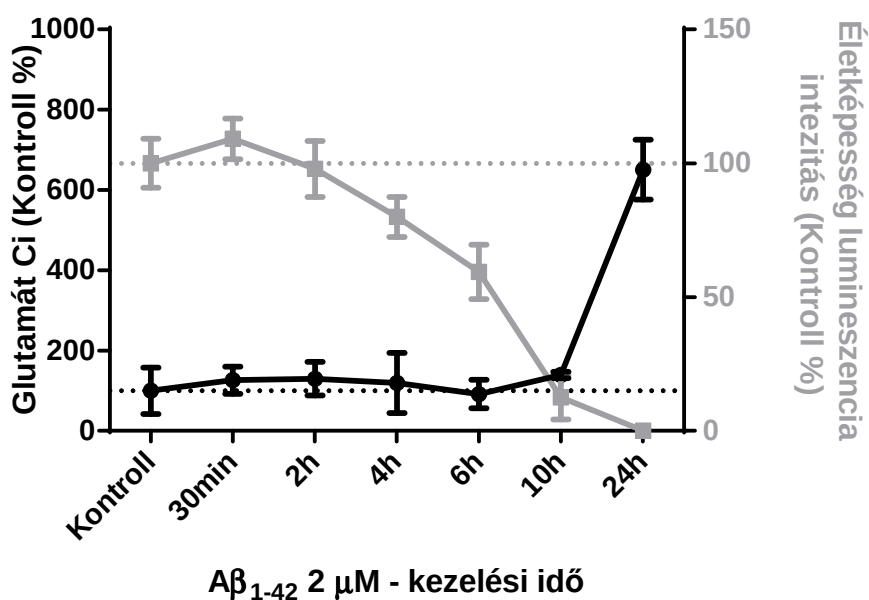


22. ábra A kiválasztott Aβ₁₋₄₂ koncentrációk glutamátszint változásai a kontroll tenyészetek Ci glutamát koncentrációjának %-ában (n=2,3)

Az ATP mérés eredményei alapján az Aβ₁₋₄₂ koncentrációval arányos toxicitást mutat, amelyet a toxikus ágenssel kezeletlen tenyészethez képest szignifikánsan ($p < 0,05$) kivéd az MK-801 100 nM koncentrációban, kivéve a 2,5 μM-os koncentrációt, ahol csak $78 \pm 18\%$ -ban védi a toxikus fehérje hatását. A csillaggal jelölt minták felülűszónak HPLC-s glutamát meghatározását az 22. ábra mutatja. Az 0,3; 0,15 μM-os minták glutamát szintje nem tér el szignifikánsan ($p < 0,05$) a kontrolltól. Míg az 1,2 μM-

os minták esetében 2,5x-ére növelte az $A\beta_{1-42}$ a glutamátszintet a kontroll és az MK-801 kezelt esethez képest.

A következő kísérletben 2 μM $A\beta_{1-42}$ hatását vizsgáltam időben, arra kérdésre keresve a választ, hogy a toxicitás mechanizmusában mikor jelenik a megemelkedett extracelluláris glutamát szint.



3. ábra A kiválasztott 2 μM $A\beta_{1-42}$ hatása az időben ábrázolva a glutamátszint változásai a kalibráció alapján visszszámolt értékek alapján (fekete, n=3,4) és a tenyészetek életképessége az ATP lumineszcencia intenzitás (szürke, n=6)

Az eredmények alapján a kontroll tenyészetet képesti megemelkedett glutamátszint csak 24 órát követően jelenik meg 650,62±74,7 kontroll %-ban, míg az életképesség-csökkenés már a negyedik kezelési órát követően megjelenik.

VII. Diszkusszió

A TDK dolgozatomban eredményeinek első részét a kémiai igen összetett tenyésztő folyadékból a glutamát kimutatására alkalmas analitikai módszer kidolgozása képezi, a második felében pedig a módszer alkalmazásával az idegsejt-tenyészetekben endogén módon felszabaduló glutamát vizsgálata szerepel.

1. Az analitikai HPLC-s módszer kidolgozása

A glutamát koncentrációjának meghatározására HPLC-s módszert dolgoztam ki. A HPLC módszer kialakítása során sikerült kiválasztanom a legalkalmasabb származékképző reagenst, valamint optimalizálni a származékképző körülményeket, beleértve a reagensek és pufferek összetételét és arányát is. A képzett származék spektrum analízise segítségével meghatároztam a fluoreszcens detektálási paramétereket, úgymint a 322 nm-es gerjesztési és 422 nm-es excitációs hullámhosszokat. Ezzel optimalizálva a mérés érzékenységet, mivel így maximális intenzitású válaszjelet kaptam az OPA/NAC glutamát származék esetén.

A szelektivitás maximalizálásáért felelős hatékony elválasztási rendszert dolgoztam ki, a megfelelő gradiens program alkalmazásával. Az eredmények alapján ebben az eluens rendszerben a mérés ideje NBA-B27 közeg esetén nem csökkenthető 55 percnél tovább.

A minta előkészítés beállítása során sikerült egy hatékony fehérjementesítési eljárást kidolgozni. Hús (V/V%) 4N PCA hozzáadása mellett jól centrifugálható csapadék képződik, továbbá a minta kihígulása is minimalizálható, szemben más deproteinizációs eljárásokkal, mint például a szerves oldószeres vagy kisózasos módszerek.

Mivel az alkalmazott készülék automata mintaadagolója lehetővé teszi, online származékképzés alkalmaztam, így csökkentve az előmunka és időráfordítást és növelve a mérés pontosságát.

A következő lépésben a kidolgozott mérési eljárás alkalmazhatóságának bizonyítására törekedtem. Az ismételhetőség kritériumának bizonyítására napon belüli és napok között ismételhetőségi vizsgálatokat végeztem. A intra- és intra-assay eredményei alapján a 20%-nál jobban kiugró értékek száma 75% alatt maradt, a mérés

pontosságát jellemző relatív szórás pedig nem haladta meg a $\pm 15\%$ -ot. A kidolgozott módszer napon belüli és napok közötti ismételhetősége tehát megfelel az előzetes követelményeknek.

A neurotoxicitási tesztek során keletkezett nagyszámú (akár többször 96) felülúszó lemerése egy méréssorozatban nem lehetséges. Ennek megoldására a párhuzamos kezelést kapott mintapontok felülúszóit 2-3-asával összegyűjtöttem, feltételezve azok megegyezőségét. Továbbá az azonnal nem lemérhető minták -80°C -os hűtőszekrénybe kerültek tárolásra a mérésig. Ezért a glutamát minták stabilitását -80°C -on kellett vizsgálnom. Valamint további stabilitási kérdéseket vet fel a hosszú futási idők okozta akár 48 órás mérési idő, ami alatt a mintákat és a származékképzőt a 22°C -os automata mintaadagoló egységben tároljuk. Ezért vizsgáltam a minták stabilitását 22°C -on 24 és 48 órás tárolási időt követően. Mindkét stabilitási vizsgálat eredménye azt mutatja, hogy a minták stabilitása megfelelt az előzetes követelményeknek, hiszen a két koncentráció szinten (3; 15 μM) spike-olt minták csúcs alatti terület értékei tárolás előtt (0. időpont) és után nem tértek el $\pm 20\%$ -nál nagyobb mértékben.

Az általam kidolgozott analitikai módszer tehát alkalmas az éles minták, azaz neurotoxikus behatásoknak kitett tenyészetek felülúszóinak glutamát szintjének meghatározására

2. A kidolgozott analitikai módszer alkalmazása másodlagosan felszabaduló glutamát igazolására elsődleges oxidatív stressz esetén, *in vitro* idegsejtenyészeteken

Az első lépésben a H_2O_2 toxicitás és az excitotoxicitás lehetséges kapcsolatát vizsgáltam az általunk korábban kidolgozott neurotoxicitási tesztekben. A toxikus H_2O_2 koncentráció értéke 12500 és 500 μM között mozgott, ellentétben az irodalmi adatoknak, amelyek a 100 μM környékére teszik ezt, ennek háttérében a NBA médium és B27 komponens tartalmazta antioxidáns koktél áll (Függelékek). Továbbá a toxikus koncentráció egyre csökkent a tenyészetek öregedésével 12500 μM -tól 500 μM -ig DIV14 és DIV18 között. Ezért minden esetben többtagú H_2O_2 koncentráció sort szükséges felvenni, hogy az aktuális toxikus koncentráció meghatározható legyen.

Másodlagos toxikus ágens jelenlétét a H_2O_2 kezelésnek kitett különböző mértékben elpusztult tenyészetek felülúszójának toxicitásával igazoltam: a médiumokban beoldott

H₂O₂ bomlása után az intakt médium nem, míg az azonosan kezdeti összetételű kondicionált médium nagy mértékben toxikusnak bizonyult. Az életképességüket megtartott tenyészetekről származott médium szintén nem volt toxikus, ami arra utalt, hogy a toxikus ágens a sérült, elpusztult idegsejtekből származik.

Az elpusztult tenyészetekből felszabaduló ágens hatása az NMDA receptorok blokkolásával teljes mértékben kivédhető volt, ami arra utalt, hogy a másodlagos hatást az idegsejtekből felszabaduló glutamát okozta. Ez a toxicitás 50% is képes volt kivédeni, ami arra enged következtetni, hogy az excitotoxicitásnak jelentős szerepe van a H₂O₂ indukálta neurotoxikus stressznek. Az elsődleges H₂O₂ okozta toxicitást és a másodlagos sejtpusztulást az NMDA receptor blokkolásával és különböző idejű kezelésekkel sikerült időben is elkülöníteni. A H₂O₂ okozta életképesség csökkenés 1 óra időtartamig kizárólagos, ebben a periódusban a tenyészetek életképességét nem javította a másodlagos toxicitást gátló NMDA receptor antagonist. A további mérési időpontokban az MK-801 hatásosan védte a toxicitást jelentős hányadát, a MK-801-el kezelt tenyészetek életképesség összemérhetővé vált a 1 órás H₂O₂ kezelt tenyészetekhez. Ez arra utal, hogy a tenyészetekből a H₂O₂ kezelés hatására 1 óra után toxikus mértékű glutamát szabadul fel és ez az elsődleges toxikus kezelést túlélte vagy csak részlegesen károsított neuronok pusztulását okozza.

A NMDA receptorok blokkolásával kapott eredményeim a glutamát felszabadulására utalnak, így a rendszer alkalmas arra, hogy segítségével beállítsuk a kidolgozott HPLC módszert élő tenyészetek felülúszójának analitikai vizsgálatára is.

A kidolgozott HPLC-és mérési technika segítségével vizsgáltam a tenyészetek glutamát szintjét. A teljesen toxikus koncentráció esetén a felülúszóban a kontrollhoz képest négyszeres glutamát koncentráció volt tapasztalható, míg részlegesen toxikus esetben is kétszeres. Ez jól példázza, hogy a glutamátszint és az életképesség egymással fordított arányosságban áll. Ez igaz az MK-801 kezelt minták glutamát szintjére is, ahol a glutamátszint ugyan a kontroll többszörösére emelkedett, de a további excitotoxikus folyamatok eredményeként bekövetkező teljes sejtpusztulás (ami a vehicle mintákban megfigyelhető) nem következik be.

Igazoltam, hogy a H₂O₂ kezelés okozta életképesség csökkenés, egy része a közvetlenül az oxidatív ágensnek köszönhető, ugyanakkor a további toxicitás hátterében valóban a sejtekből felszabaduló másodlagos toxikus ágens a glutamát áll. A sejtekből a glutamát a környezetükbe a már említett módokon, úgymint a lízis, exocitózis és a glutamaterg transzport fehérjék reverz működésén keresztül kerül. Ennek tisztázására

jövőbeli kísérleteim során szeretnék fényt deríteni különböző glutamát transzporter blokkoló referens vegyületek alkalmazásával, illetve a sejtízist bekövetkezésének nyomon követésével. A lízis vizsgálatára propidium jodid festék alkalmas lehet, amely a dezintegrált membránokon képes csak keresztül jutni és a sejt DNS állományát fluoreszcensen jelölni.

3. A felszabaduló glutamát jelentőségének vizsgálata $A\beta_{1-42}$ kezelés esetén, *in vitro* idegsejtenyészeteken

Miután a kifejlesztett HPLC módszerrel sikerült igazolni a farmakológiai kísérletek alapján megjósolt glutamátszint növekedést *in vitro* tenyészeteken, olyan neurotoxikológiai modellben vizsgáltuk a glutamát szerepét ahol a glutamát receptorok szerepe már az elsődleges hatásban is fontos lehet. Az Alzheimer kórban szerepet játszó $A\beta_{1-42}$ hatása máig nem tisztázott, de számos adat mutatja a neurotransmitter receptorok, köztük az NMDA receptorok szerepét. Az $A\beta_{1-42}$ kezelt tenyészetek életképesség változását és a felülűzők glutamátszint változását oxidatív stressz modellben alkalmazott kísérletes protokoll szerint vizsgáltuk.

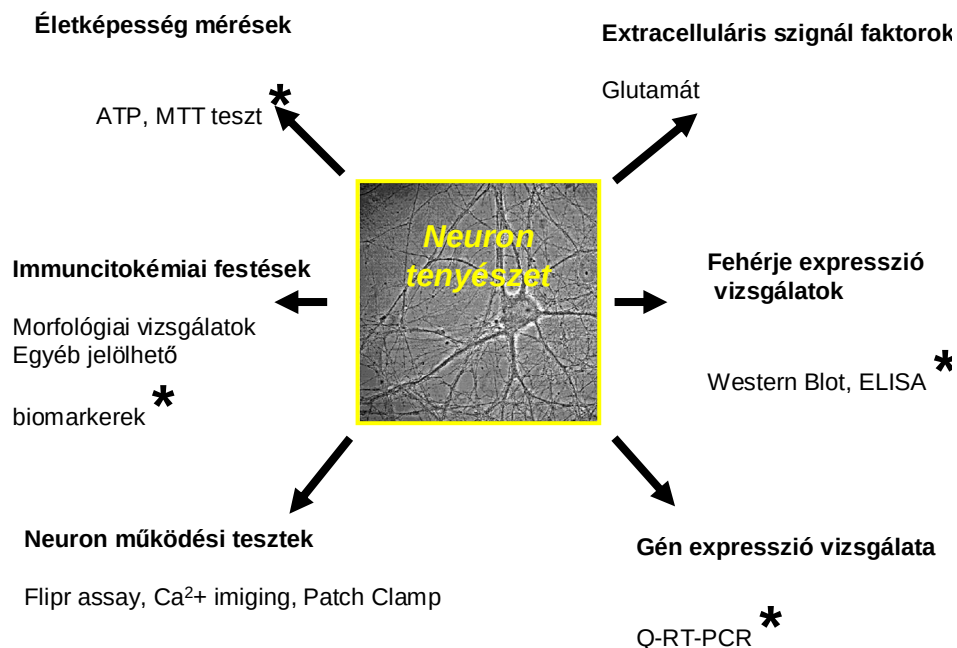
Az $A\beta_{1-42}$ kezelés az életképesség és a glutamátszint korrelációja csak a maximálisan toxikus koncentráció esetében igaz a többi kevésbé, de még 40-60%-os életképesség csökkenést okozó toxikus $A\beta_{1-42}$ koncentráció esetén a glutamát szint nem vagy csak alig növekedett a kezeletlen tenyészethez képest. Tehát a glutamát nem jelent meg a rendszerben mégis tapasztalható egy olyan neurotoxicitás, amelyet az MK-801 teljes egészében kivéd. Ez alá támasztja azokat az irodalmi forrásokat [29], amelyek szerint a szolúbilis $A\beta_{1-42}$ oligomer direkt aktiválni képes az NMDA receptorokat. A folyamatosan ingerlésben tartott NMDA receptorok, mint ahogy azt korábban taglaltam így a glutamát jelenléte nélkül is excitotoxikus sejthalálhoz vezethetnek. Ezt alátámasztják azon eredményeim, hogy a megemelkedett extracelluláris glutamát koncentráció markáns $A\beta_{1-42}$ kezelés esetén is csak 10 órát követően jelenik meg, míg a tenyészetek életképességének csökkenése már 2 órát követően beindul.

A további célom az $A\beta_{1-42}$ toxicitás hatásmechanizmusának részletesebb feltárása különös tekintettel a glutamát rendszer szerepére, hogy ezáltal részletesebb információt

nyerhessek az Alzheimer-kór molekuláris patomechanizmusáról, valamint gyógyszerjelölt molekulák számára molekuláris támadáspontokat jelölhessek ki. Így a teljesíteni azt a célt, amit a kutatócsoportunk kitűzött, azaz Alzheimer-kór asszociálta celluláris neurotoxicitás modellezése *in vitro* neuron kultúrákon. Az elsődleges $A\beta_{1-42}$ hatás egyértelmű elkülönítése a másodlagosan felszabaduló toxikus glutamát hatásától lehetővé teszi olyan modell létrehozását, amely alkalmas lehet neuroprotektív-jelölt molekulák szűrésére vagy részletes hatásmechanizmusuk feltárására.

4. Az *in vitro* neurotoxiciási tesztek információ tartalmának növelése a glutamátszint változás analitikai meghatározásának beillesztésével

A HPLC-s módszer kidolgozás által a tenyészetek felülszójából képesek vagyunk információt nyerni anélkül, hogy a tenyészetekre hatással lennénk, ezáltal egy mintapontból még több információt tudunk kinyerni, így az adott neurotoxikus ágens hatásának lefolyását vagy éppen a neuroprotektív hatóanyag hatásmechanizmusát tudjuk részletesebben feltérképezni. A másodlagosan felszabaduló toxikus glutamát folyamatos vizsgálata lehetővé teszi, hogy meghatározzuk azokat a paramétereket (koncentrációk, kezelési idők) amelyek alkalmazásával tisztán az elsődleges hatás vizsgálható. A 23. ábra mutatja be az adott mintapontból szimultán kinyerhető információkat, amelyek közé új pontként kerül fel a glutamátszint változás mérése. A dolgozatomban ismertetett módszer előnye, hogy a sejtek felülszóját vizsgálja, ami kellően nagy tenyészetek esetén folyamatos időbeli mintavételezést is lehetővé tesz, és párhuzamosan vizsgálható számos más paraméterrel (24. ábra * jelölt módszerek).



24. ábra Molekuláris Farmakológiai Laboratóriumban kidolgozott mérési technikák, amelyek alkalmazásával információt nyerhetünk a neuron tenyészetekből, csillaggal vannak azok a módszerek, amelyek a glutamát meghatározás mellett is alkalmazhatóak

A kidolgozott neurotoxicitási tesztekben tetten érhető másodlagos toxikus folyamatok szerepét tovább szeretném vizsgálni, különös tekintettel a ROS megnövekedett szintjére az egyes neurodegeneratív folyamatokban.

A további céljaim között szerepel a glutamát HPLC-s meghatározás további fejlesztése, hogy az univerzálisan alkalmassá válhasson *in vitro* sejtenyészetek mérése mellett akár *in vivo* mikrodialízis minták elemzésére. Így összehasonlíthatóvá váljanak az *in vitro* és *in vivo* kísérletes eredmények. Valamint az esetleges felmerülő igényeknek megfelelően akár egyéb fontos neurotranszmitter aminosav változásait vizsgálni, mint amilyen a D-szerin vagy az aszpartát.

VIII. Összefoglalás

A célkitűzésekben megfogalmazott célokat a kísérleteim során sikerült elérni.

- Sikerült kidolgozni egy glutamát koncentrációsztint változásának detektálására alkalmas RP-HPLC-s módszert, amelynek segítségével a tenyészetek felülúszójából jutunk úgy új információhoz, hogy a korábban alkalmazott vizsgálatokhoz mintát szolgáltató sejtek nem sérülnek, a kísérletek folyamatán nem kell változtatni. Az analitikai vizsgálatok ismételhetőség, szelektivitás, érzékenység és stabilitás vonatkozásában az előzetesen támasztott követelményeknek megfeleltek.
- A kidolgozott módszer alkalmazásával sikerült az oxidatív és $A\beta_{1-42}$ toxicitási tesztben meghatározni a másodlagos excitotoxicitás szerepét. Míg az oxidatív stressz alkalmazása során 1 óra után megnövekedett glutamát szintet mértem, addig az $A\beta_{1-42}$ kezelés során sikerült olyan koncentráció tartományt meghatározni, amely szignifikáns életképesség csökkenést eredményezett, de csak 24 órát követően jelenik meg a jelentős glutamát koncentráció növekedést. Ezáltal meghatároztam azon koncentráció és idő paramétereket, ahol a kérdéses toxicitások gliasejtekben szegény idegsejt tenyészeteken végzett kísérletekben az additív excitotoxicitás torzító hatása nélkül vizsgálhatóak.

IX. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszöni Dr. Herberth Balázs és Kaufmanné Bojti Erzsébetnek témavezetőimnek, hogy a Molekuláris Farmakológiai Kutatólaboratóriumban szakmai irányításuk alatt készíthettem el a OTDK dolgozatomat. Valamint, hogy időt és fáradságot nem sajnálva mindenben segítették munkámat.

Továbbá szeretném megköszönni Dr. Antoni Ferenc kutatási igazgató helyettesnek, hogy biztosította a lehetőséget, hogy az EGIS Gyógyszergyár Nyrt. Preklinikai Kutatási Főosztályának munkájába bekapcsolódhassak.

Köszönettel tartozom Kovács Gábornak és Hajdúné Gősi Erikának, hogy közreműködött a neuronok preparálásában, valamint laboratóriumi kísérleteim során mindenben segítséget nyújtott.

Szeretnék köszönetet mondani továbbá Dr. Markó Bernadettnek és Alapi Ferencnének és Járasi Andreának, hogy segítettek kísérletes analitikai munkáimat, valamint hálás vagyok az EGIS Preklinikai Kutatási Főosztály összes munkatársának, hogy munkám során bármikor fordulhattam hozzájuk tanácsért és segítségért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak, hogy megteremtették a hátteret, ahhoz hogy elkészíthessen OTDK dolgozatomat.

X. Irodalomjegyzék

1. Sarkadi, L., *Biokémia mérnökszemmel*. 2007, Budapest: Typotex.
2. Fürst, Z., *Farmakológia*. 2001, Budapest: Medicina Könyvkiadó.
3. Meldrum, B.S., *Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology*. J Nutr, 2000. 130(4S Suppl): p. 1007S-15S.
4. Danbolt, N.C., *Glutamate uptake*. Prog Neurobiol, 2001. 65(1): p. 1-105.
5. Strelnikov, K., *Neuroimaging and neuroenergetics: brain activations as information-driven reorganization of energy flows*. Brain Cogn, 2010. 72(3): p. 449-56.
6. Hollmann, M. and S. Heinemann, *Cloned glutamate receptors*. Annu Rev Neurosci, 1994. 17: p. 31-108.
7. Bleakman, D., *Kainate receptor pharmacology and physiology*. Cell Mol Life Sci, 1999. 56(7-8): p. 558-66.
8. Swanson, C.J., et al., *Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders*. Nat Rev Drug Discov, 2005. 4(2): p. 131-44.
9. Siegel, G.J., *Basic neurochemistry : molecular, cellular, and medical aspects*. 7th ed. 2006, Amsterdam ; Boston: Elsevier. xxiv, 992 p.
10. Dzubay, J.A. and C.E. Jahr, *The concentration of synaptically released glutamate outside of the climbing fiber-Purkinje cell synaptic cleft*. J Neurosci, 1999. 19(13): p. 5265-74.
11. Magistretti, P.J., *Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling*. Am J Clin Nutr, 2009. 90(3): p. 875S-880S.
12. Kullmann, D.M. and F. Asztely, *Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: evidence and implications*. Trends Neurosci, 1998. 21(1): p. 8-14.
13. Okubo, Y., et al., *Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(14): p. 6526-31.
14. Rothman, S.M., *The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx*. J Neurosci, 1985. 5(6): p. 1483-9.
15. Manev, H., et al., *Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death*. Mol Pharmacol, 1989. 36(1): p. 106-12.
16. Siman, R. and J.C. Noszek, *Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo*. Neuron, 1988. 1(4): p. 279-87.
17. Reynolds, I.J. and T.G. Hastings, *Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation*. J Neurosci, 1995. 15(5 Pt 1): p. 3318-27.
18. Nicholls, D.G., *Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures*. Curr Mol Med, 2004. 4(2): p. 149-77.
19. Matyja, E., et al., *The mode of spinal motor neurons degeneration in a model of slow glutamate excitotoxicity in vitro*. Folia Neuropathol, 2005. 43(1): p. 7-13.
20. Salinska, E., W. Danysz, and J.W. Lazarewicz, *The role of excitotoxicity in neurodegeneration*. Folia Neuropathol, 2005. 43(4): p. 322-39.
21. Benveniste, H., et al., *Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis*. J Neurochem, 1984. 43(5): p. 1369-74.
22. Zhang, Y. and B.R. Bhavnani, *Glutamate-induced apoptosis in primary cortical neurons is inhibited by equine estrogens via down-regulation of caspase-3 and*

- prevention of mitochondrial cytochrome c release*. BMC Neurosci, 2005. 6: p. 13.
23. Ankarcrona, M., et al., *Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function*. Neuron, 1995. 15(4): p. 961-73.
 24. Duchen, M.R., *Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death*. J Physiol, 2000. 529 Pt 1: p. 57-68.
 25. Heiskanen, K.M., et al., *Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells*. J Biol Chem, 1999. 274(9): p. 5654-8.
 26. Doble, A., *The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy*. Pharmacol Ther, 1999. 81(3): p. 163-221.
 27. Ye, Z.C. and H. Sontheimer, *Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate*. Cancer Res, 1999. 59(17): p. 4383-91.
 28. Alberdi, E., et al., *Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors*. Cell Calcium, 2010. 47(3): p. 264-72.
 29. Texido, L., et al., *Amyloid beta peptide oligomers directly activate NMDA receptors*. Cell Calcium, 2011. 49(3): p. 184-90.
 30. Hynd, M.R., H.L. Scott, and P.R. Dodd, *Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease*. Neurochem Int, 2004. 45(5): p. 583-95.
 31. Roberson, E.D., et al., *Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2011. 31(2): p. 700-11.
 32. Sonkusare, S.K., C.L. Kaul, and P. Ramarao, *Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders--memantine, a new hope*. Pharmacol Res, 2005. 51(1): p. 1-17.
 33. Barger, S.W. and A.S. Basile, *Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function*. J Neurochem, 2001. 76(3): p. 846-54.
 34. Deb, P., S. Sharma, and K.M. Hassan, *Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis*. Pathophysiology, 2010. 17(3): p. 197-218.
 35. Hoyte, L., et al., *The rise and fall of NMDA antagonists for ischemic stroke*. Curr Mol Med, 2004. 4(2): p. 131-6.
 36. Mizuno, T., *The biphasic role of microglia in Alzheimer's disease*. Int J Alzheimers Dis, 2012. 2012: p. 737846.
 37. Anitha, M., et al., *Targeting glutamate mediated excitotoxicity in Huntington's disease: neural progenitors and partial glutamate antagonist--memantine*. Med Hypotheses, 2011. 76(1): p. 138-40.
 38. Shaw, P.J. and P.G. Ince, *Glutamate, excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurol, 1997. 244 Suppl 2: p. S3-14.
 39. Corona, J.C., L.B. Tovar-y-Romo, and R. Tapia, *Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis*. Expert Opin Ther Targets, 2007. 11(11): p. 1415-28.
 40. Pitt, D., P. Werner, and C.S. Raine, *Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis*. Nat Med, 2000. 6(1): p. 67-70.
 41. Ferrarese, C., et al., *Elevated glutamate in the cerebrospinal fluid of patients with HIV dementia*. JAMA, 1997. 277(8): p. 630.

42. Liu, H.T., et al., *Bradykinin-induced astrocyte-neuron signalling: glutamate release is mediated by ROS-activated volume-sensitive outwardly rectifying anion channels*. J Physiol, 2009. 587(Pt 10): p. 2197-209.
43. Bal-Price, A., Z. Moneer, and G.C. Brown, *Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes*. Glia, 2002. 40(3): p. 312-23.
44. Bal-Price, A. and G.C. Brown, *Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity*. J Neurosci, 2001. 21(17): p. 6480-91.
45. Murray, C.A., et al., *Interleukin-1 beta inhibits glutamate release in hippocampus of young, but not aged, rats*. Neurobiol Aging, 1997. 18(3): p. 343-8.
46. Wang, C.H., et al., *Leptin and interleukin-1beta modulate neuronal glutamate release and protect against glucose-oxygen-serum deprivation*. Curr Neurovasc Res, 2010. 7(3): p. 223-37.
47. Zanella, F., J.B. Lorens, and W. Link, *High content screening: seeing is believing*. Trends Biotechnol, 2010. 28(5): p. 237-45.
48. Haney, S.A., *High content screening : science, techniques and applications*. 2008, Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience. xxv, 391 p., 24 p. of plates.
49. Abraham, V.C., D.L. Taylor, and J.R. Haskins, *High content screening applied to large-scale cell biology*. Trends Biotechnol, 2004. 22(1): p. 15-22.
50. Razvi, E.S., *High-content screening (HCS) : an industry analysis*. [D & MD reports]. 2006, Westborough, MA: D & MD Publications.
51. Haney, S.A., et al., *High-content screening moves to the front of the line*. Drug Discov Today, 2006. 11(19-20): p. 889-94.
52. Daub, A., P. Sharma, and S. Finkbeiner, *High-content screening of primary neurons: ready for prime time*. Curr Opin Neurobiol, 2009. 19(5): p. 537-43.
53. Varma, H., D.C. Lo, and B.R. Stockwell, *High throughput screening for neurodegeneration and complex disease phenotypes*. Comb Chem High Throughput Screen, 2008. 11(3): p. 238-48.
54. Schulte, J., et al., *High-content chemical and RNAi screens for suppressors of neurotoxicity in a Huntington's disease model*. PLoS One, 2011. 6(8): p. e23841.
55. Lund, P., *L-Glutamine and L-Glutamate: UV-Method with Glutaminase and Glutamate Dehydrogenase*. In Methods of Enzymatic Analysis, 1986. 8.
56. Hu, Y., et al., *Direct measurement of glutamate release in the brain using a dual enzyme-based electrochemical sensor*. Brain Res, 1994. 659(1-2): p. 117-25.
57. McLamore, E.S., et al., *A self-referencing glutamate biosensor for measuring real time neuronal glutamate flux*. J Neurosci Methods, 2010. 189(1): p. 14-22.
58. Okumoto, S., et al., *Detection of glutamate release from neurons by genetically encoded surface-displayed FRET nanosensors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(24): p. 8740-5.
59. de Person, M., P. Chaimbault, and C. Elfakir, *Analysis of native amino acids by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry: comparative study between two sources and interfaces*. J Mass Spectrom, 2008. 43(2): p. 204-15.
60. Bruckner, H., R. Wittner, and H. Godel, *Automated enantioseparation of amino acids by derivatization with o-phthaldialdehyde and n-acylated cysteines*. J Chromatogr, 1989. 476: p. 73-82.

61. Nakanishi, H., *Improved cleanup and derivatization for gas chromatographic determination of monosodium glutamate in foods*. J Assoc Off Anal Chem, 1983. 66(6): p. 1528-31.
62. Warren, C.R. and M.A. Adams, *Capillary electrophoresis for the determination of major amino acids and sugars in foliage: application to the nitrogen nutrition of Sclerophyllous species*. J Exp Bot, 2000. 51(347): p. 1147-57.
63. Bienert, G.P., et al., *Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes*. J Biol Chem, 2007. 282(2): p. 1183-92.
64. Bozso, Z., et al., *Controlled in situ preparation of A beta(1-42) oligomers from the isopeptide "iso-A beta(1-42)", physicochemical and biological characterization*. Peptides, 2010. 31(2): p. 248-56.
65. Foldi, I., et al., *Proteomic study of the toxic effect of oligomeric Abeta1-42 in situ prepared from 'iso-Abeta1-42'*. J Neurochem, 2011. 117(4): p. 691-702.
66. Kerokoski, P., H. Soininen, and T. Pirttilä, *Beta-amyloid (1-42) affects MTT reduction in astrocytes: implications for vesicular trafficking and cell functionality*. Neurochem Int, 2001. 38(2): p. 127-34.
67. Newcomb, R., et al., *Increased production of extracellular glutamate by the mitochondrial glutaminase following neuronal death*. J Biol Chem, 1997. 272(17): p. 11276-82.
68. Herman, M.A. and C.E. Jahr, *Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice*. J Neurosci, 2007. 27(36): p. 9736-41.
69. Choi, D.W., *Excitotoxic cell death*. J Neurobiol, 1992. 23(9): p. 1261-76.
70. Kutlán, D., *Az aminosavak és aminosavak kölcsönhatása orto-ftáldialdehiddel. A termékek stabilitása, a reakció mechanizmusa és analitikája*, in *Analitikai és Szervetlen Kémiai Tanszék*. 2006, ELTE TTK: Budapest.
71. Michail, K., *Determination of Memantine Hydrochloride by Spectrophotometry using Anionic Dyes, Bromothymol Blue and Solochrome Black T, in Bulk and Tablet Dosage Forms*. CSJ, 2011. 60.
72. Donzanti, B.A. and B.K. Yamamoto, *An improved and rapid HPLC-EC method for the isocratic separation of amino acid neurotransmitters from brain tissue and microdialysis perfusates*. Life Sci, 1988. 43(11): p. 913-22.
73. Sakuma, R., T. Nishina, and M. Kitamura, *Deproteinizing methods evaluated for determination of uric acid in serum by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection*. Clin Chem, 1987. 33(8): p. 1427-30.
74. Shen, J., et al., *Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo ¹³C NMR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(14): p. 8235-40.
75. Antonelli, T., et al., *Neurotensin enhances endogenous extracellular glutamate levels in primary cultures of rat cortical neurons: involvement of neurotensin receptor in NMDA induced excitotoxicity*. Cereb Cortex, 2004. 14(4): p. 466-73.
76. Hamornik, G., *Gyógyszerhatóanyag-jelölt vegyületek fejlesztésére alkalmas in vitro neurotoxiciási modellrendszer optimalizálása*, in *Vegyész- és Biomérnöki Kar*. 2011, BME: Budapest.
77. Fedoroff, S. and A. Richardson, *Protocols for neural cell culture*. 3rd ed. 2001, Totowa, N.J.: Humana Press. xxii, 362 p.

XI. Függelékek

1. NeuroBasal-A médium összetétele [77]

Komponens	Végső mg/L
Szervetlen sók	
CaCl ₂ (vízmentes)	200.0
Fe(NO ₃) ₃ x 9H ₂ O	0.1
KCl	400.0
MgCl ₂ (vízmentes)	77.3
NaCl	3000.0
NaHCO ₃	2200.0
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	125.0
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.19
Egyéb komponensek	
D-Glükóz	4500.0
HEPES	2600.0
Fenol vörös	8.1
Na-piruvát	25.0
Aminosavak	
L-Alanin	2.0
L-Arginin x HCl	84.0
L-Asparagin x H ₂ O	0.83
L-Cisztein	1.21
L-Glutamin	73.5
L-Glutamát	
Glicin	30.0
L-Hisztidin HCl x H ₂ O	42.0
L-Izoleucin	105.0
L-Leucin	105.0
L-Lizin HCl	146.0
L-Metionin	30.0
L-Fenilalanin	66.0
L-Prolin	7.76
L-Szerin	42.0
L-Treonin	95.0
L-Triptofán	16.0

Komponens	Végső mg/L
L-Tirozin	72.0
L-Valin	94.0
Vitaminok	
D-Kalcium-pantotenát	4.0
Kolin-klorid	4.0
Fólsav	4.0
<i>i</i> -Inosztol	7.2
Niacinamid	4.0
Pirodoxál HCl	4.0
Riboflavin	0.4
Tiamin HCl	4.0
Vitamin B ₁₂	0.34

2. B27 komponens összetétele [77]

Komponens	Végső mg/L
Aminosavak	
L-Alanin	2.0
L-Glutamát	3.7
L-Glutamin	441.0
L-Prolin	7.76
Vitaminok	
Biotin	0.10
Vitamin B ₁₂	0.34
Hormonok	
Kortikoszteron	0.02
Progeszteron	0.0063
Retinol (A vit.)	0.1
Retinol, acetát	0.1
Inzulin	4.0
T ₃ (trijodo-L-tironin)	0.002
Antioxidánsok	
Na-piruvát	25.0
Liponsav	0.047
D,L- α -Tokoferol (E vit.)	1.0
D,L- α -Tokoferol acetát	1.0
Kataláz	2.5

Komponens	Végső mg/L
Glutation (redukált)	1.0
Superoxid dizmutáz	2.5
Egyéb	
L-Karnitin	2.0
Etanolamin	1.0
D(+)-Galaktóz	15.0
HEPES	2600.0
Putreszcin	16.1
Penicillin	50 IU/mL
Sztreptomycin	0.5
Szelén	0.016
Zink szulfát	0.194
Linolsav	1.0
Linolénsav	1.0
Albumin, szarvasmarha	2500.0
Transzferrin	5.0