NMDA receptoron ható aminosav neurotranszmitterek királis analízise CE-LIF segítségével különböző biológiai mintákban

Doktori értekezés

Dr. Jakó Tamás

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Szökő Éva, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Rónai Zsolt, PhD., egyetemi docens
Dr. Péter Antal, DSc., professor emeritus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vincze Zoltán, DSc., professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Béni Szabolcs, PhD., egyetemi docens
Dr. Ducza Eszter, PhD., egyetemi adjunktus

Budapest
2018

1. Bevezetés

Régóta ismert, hogy a glutamát és az aszpartát a többi szövethez képest a központi idegrendszerben (KIR) rendkívül magas koncentrációban van jelen. A glutamát az elsődleges mediátor a szenzoros információk közvetítésében, a motoros koordinációban és a memória kialakulásában, valamint a tanulási folyamatokban. A glutamát hatásainak közvetítésében az NMDA-receptor kitüntetett szerepet játszik. Az NMDA receptorok szabályozása nagyon összetett, több regulációs lépést is magába foglaló folyamat. Aktiválódásához egy agonista és egy ko-agonista egyidejű kötődése szükséges. A ko-agonisták közül korábban a glicint tartották a legfontosabbnak, azonban az analitikai technikák fejlődésével kimutatták, hogy a glicin kötőhelyhez sokkal nagyobb affinitással képes kötődni a D-szerin. Érdekesség, hogy a glutamát mellett az agonista kötőhelyen az L- és a D-aszpartát is kötődhet, aminek jelentősége eddig kevéssé ismert.

A természetben az egyes vegyületek között különböző izomériák figyelhetők meg. Az optikai izomerek fizikai és kémiai tulajdonságai teljesen megegyeznek, az egyetlen különbség, hogy a síkban polarizált fényt ellentétes irányba forgatják. Aminosavak esetében a központi szénatom egy karboxil és egy amino csoporthoz, valamint egy hidrogénhez és az aminosavat meghatározó R-szubsztituenshez kapcsolódik. A régi homokirális nézettel szemben ma már kijelenthető, hogy az aminosavak D-enantiomerjei is megtalálhatóak élő szervezetekben, azonban az aminosavak L-izomere jóval nagyobb mennyiségben fordul elő a D-izomerekhez képest. Újabban egyre több D-aminosavról derül ki, hogy különböző funkciókat töltenek be a szervezetben, úgy, mint hormon, neurotranszmitter vagy neuromodulátor.

A D-aminosavak közül az idegrendszeri szabályozásban legfontosabb a D-szerin, valamint a D-aszpartát. A D-szerin legfontosabb szerepe az NMDA receptoron ko-agonista, neuromodulátor funkciója. A központi idegrendszer egyes területein való előfordulása hasonló, mint az NMDA receptor disztribúciója.

Amíg azonban a D-szerin neuromodulátor funkcióját széles körben tanulmányozzák, a D-aszpartát pontos szerepe jelenleg kevéssé ismert. Csirkékben, patkányokban és emberben az idegrendszer fejlődése alatt nagy mennyiségben mutatható ki, azonban felnőtt korra a mennyisége jelentősen lecsökken, így feltételezett, hogy az idegrendszer fejlődésében tölt be kulcs fontosságú szerepet. Nagyobb mennyiségben található a nagy proliferációs kapacitással bíró régiókban. Kimutatták, hogy a D-aszpartát képes az NMDA receptorok aktiválására. Több publikáció is beszámol a D-aszpartát kognitív működésben betöltött szerepéről, az NMDA receptor L-glutamát kötőhelyhez történő kötődésével és agonista hatásával

összefüggésben. Ebből következik, hogy akárcsak a D-szerinnek, a D-aszpartátnak is fontos szerepe lehet a tanulásban és a memória kialakulásában, valamint az NMDA receptorok diszfunkciójához köthető betegségekben is.

Biológiai közegben az egyes enantiomerek mennyiségi meghatározását nehezíti, hogy általában az egyik enantiomer jóval nagyobb feleslegben van jelen a másikhoz képest, valamint hogy az enantiomerek fizikai és kémiai tulajdonságukban megegyeznek. Az elválasztásukhoz az egyik leghatékonyabb módszer a kapilláris elektroforézis, mely kis mintaigény, gyors analízisidő és alacsony oldószer szükséglet mellett képes biztosítani a nagyhatékonyságú királis elválasztást. Ekkor különböző királis szelektorokat használnak, melyekkel az enantiomer párok fizikai és kémiai tulajdonságaiban különböző komplexeket képeznek. A gyógyszeranalitika területén manapság szinte kizárólag ciklodextrineket használnak királis szelektornak. Ha a vendég molekula racém vegyület, akkor eltérő stabilitású komplexeket képez a ciklodextrin a két enantiomerrel, és ezek a komplexek már megváltozott fizikai, fizikai-kémiai, kémiai tulajdonságuk révén elválaszthatóak egymástól.

Az optikai detektálás két legismertebb módja az UV és a fluoreszcencia detektálás. Az UV elnyelés a legszélesebb körben használt detektálási mód, azonban alacsony koncentrációérzékenysége korlátozza a használatát kapilláris elektroforézis során. A fluoreszcens detektálás a legszelektívebb detektálási forma, érzékenysége általában egy-két nagyságrenddel jobb az UV detektáláshoz képest. A fluoreszcencia detektálás használatának korlátja, hogy csak fluoreszcens molekulák mérésére használható. Ritka kivétel, ha az elválasztandó vegyületek natív fluoreszcenciával rendelkeznek, ezért általában felhasználása során a vizsgálandó vegyületből származékképzéssel állítják elő a már fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkező molekulát. A fluoreszcens detektálás során a megfelelő gerjesztést általában lézerfénnyel biztosítják, mely az érzékenységet nagyon megnöveli. A lézerfény előnye, hogy egy adott hullámhosszon szelektíven képes gerjeszteni. Biológiai minták kapilláris elektroforézissel történő vizsgálata során érzékenysége és szelektivitása révén a lézer-indukálta fluoreszcencia (LIF) az egyik leggyakrabban alkalmazott detektálási mód.

2. Célkitűzés

Munkámat tudományos diákkörösként kezdtem a Semmelweis Egyetem Gyógyszerhatástani Intézetben, ahol egy olyan nagyhatékonyságú kapilláris elektroforézis módszer kidolgozásában vettem részt, mely alkalmas biológiai mintákban jelenlévő, alacsony

koncentrációjú excitátoros aminosav neurotranszmitter enantiomerek (D- és L-aszpartát, valamint D- és L-glutamát) gyors és hatékony meghatározására. Ekkor merült fel az igény a szintén kis koncentrációban előforduló NMDA ko-agonista D-szerin és a neuromodulátor D-aszpartát egyidejű meghatározására.
Munkám célkitűzései a következők voltak:

1. Nagyhatékonyságú kapilláris elektroforézis módszer kidolgozása és validálása D-aszpartát és D-szerin egyidejű királis meghatározására biológiai mintákból az L-aszpartát, valamint az L-glutamát mellett.

2. Az NMDA receptor agonista L-glutamát és L-aszpartát, valamint a ko-agonista D-szerin mennyiségi változásának vizsgálata kísérleti állatokban

- a D-aszpartát és a D-szerin agyterületi és korfüggő eloszlásának tanulmányozása

- az aszpartát és a glutamát különböző stimulusok hatására bekövetkező extracelluláris koncentrációváltozásának meghatározása mikrodialízis mintavétellel.

3. Módszerek

3.1 A kísérletekhez Beckman Coulter P/ACE-MDQ (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) kapilláris elektroforézis készüléket használtunk. A detektálás során 488 nm-es hullámhosszon gerjesztő argonion lézerforrást (Beckman Coulter) alkalmaztunk, az emittált fluoreszcenciát 520 nm-en detektáltuk. Az elválasztások során 75 µm belső átmérőjű (365 µm külső átmérőjű) ömlesztett kvarc kapillárisokat használtunk (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA). A kapillárisfal poliakrilamiddal történő borítását Hjertén és munkatársai által kidogozott protokoll szerint végeztük.
3.2 A származékképzéshez 5 µl mintát vagy standard oldatot kevertünk össze 5 µl belső standardot tartalmazó származékképző pufferrel, illetve 5 µl származékképző oldattal. Ezt követően hagytuk a reakciót a megfelelő ideig, megfelelő hőmérsékleten végbemenni, majd az analízis kezdetéig a mintákat -20 °C-on tároltuk. A mintához abszolút etanolban oldott, 1,2 mg/ml koncentrációjú származékképzőt, illetve 20 mM pH 8,5 borát puffert adtunk, majd a reakcióelegyet 60 °C-on 20 percig inkubáltuk. A származékképző puffer belső standardként 1

μM L-ciszteinsavat tartalmazott. Az analízis kezdetén a mintákat desztillált vízzel négyszeres térfogatra hígítottuk.

3.3 Az excitátoros aminosavak NBD-F származékainak királis elválasztása 5 mM HPA-β-CD és 8 mM DM-β-CD szelektort tartalmazó 100 mM borát pH 8,0 pufferben történt, 50 cm effektív kapillárishosszon, 25°C-on 400 V/cm alkalmazott feszültség mellett. A mintainjektálás hidrodinamikus úton történt (20 s – 6,89 kPa). A készülék vezérlését, az adatgyűjtést, valamint az elektroferogramok kiértékelését a gyártó által biztosított 32 Karat szoftver 5.0-ás verziójával végeztük. A kettős ciklodextrin rendszer szükséges volt a megfelelő kémiai és a királis szelektivitás biztosítására. A DM-β-CD biztosította az aszpartát és a glutamát közti kémiai szelekciót, míg a HPA-β-CD felelt a királis elválasztásért az egyes enantiomerek esetében. Módszerünk alkalmas a D-aszpartát, L-aszpartát, D-glutamát és L-glutamát kvantitatív meghatározására. A fejlesztett módszer detektálási határa (LOD) D-aszpartátra nézve 17 nM, míg D-glutamát esetében 9 nM. Mindkét D-aminosav esetén a kvantifikálás alsó határa 0,05 μM-nak adódott.

Az excitátoros aminosavak és D-szerin elválasztására fejlesztett módszer esetén 50 mM pH 7 HEPES pufferben oldottuk fel a 6 mM HPA-β-CD királis szelektort. Az effektív és a teljes kapillárishossz 50 és 60 cm volt. Minden futás előtt vízzel és elválasztó pufferrel mostuk a kapillárist. A mintainjektálás akárcsak az excitátoros aminosav rendszernél, itt is hidrodinamikai úton történt (20 s – 6,89 kPa). Az elválasztás 25°C-on, állandó feszültségen (-24 kV, 400 V/cm) zajlott. A készülék vezérlését, az adatgyűjtést, valamint az elektroferogramok kiértékelését itt is a gyártó által biztosított 32 Karat szoftver 5.0-ás verziójával végeztük.

3.4 Az állatkísérleteket a Semmelweis Egyetem Anatómiai-, Szövet és Fejlődéstani Intézet munkatársai, míg a mintaanalízist kutatócsoportunk végezte. Az excitátoros aminosavak meghatározását 2, 4, 8 és 62 napos házi csirkéken végeztük, melyek a Bábolna Kft.-től kerültek beszerzésre (Budapest, Magyarország), valamint 100-150 napos nőstény Wistar patkányokon, amelyek a helyi tenyészetből származtak (Semmelweis Egyetem Anatómiai-, Szövet és Fejlődéstani Intézet, Budapest). Csirkék esetén tízes csoportokban tartottuk az állatokat egy 33 x 40 x 25 cm-es műanyag dobozban nyolc napos korukig, majd utána négyfős csoportokra osztva nagyobb ketrecekben lettek elhelyezve, amíg elérték a felnőtt kort (62 nap). A patkányokat standard laboratóriumi ketrecekben tartottuk.

A D-szerin és D-aszpartát egyidejű vizsgálata újszülött és felnőtt C57BL/6 egereken (n=5 mindkét csoportban) történt, melyeket a Semmelweis Egyetem Anatómiai-, Szövet és

Fejlődéstani Intézet biztosított számunkra. Az egereket standard laboratóriumi ketrecekben tartottuk.

3.5 Az excitátoros aminosav analízishez használt szövetmintákat 2, 4, 8 vagy 62 napos csirkékből, valamint felnőtt (100-150 napos) patkányokból nyertük. A csirkéket (n=61, valamint 84, kísérlettől függően) és a patkányokat (n=8) a fent említett kor elérésekor ketamin-xilazinnal mély altatásba juttattuk, majd dekapitáltuk. A megfelelő agyterületek eltávolítása sztereomikroszkóp alatt történt, majd a mintákat a további feldolgozásig -80 °C-on tároltuk. Az alábbi szövetrészeket különítettük el csirkék esetében: medialis striatum (mSt), intermediál medial mesopallium (iMM), arcopallium (Arco) és cerebellum. Patkányok esetében szintén dekapitáció után azonnal az alábbi agyrészeket különítettük el: parietalis cortex (Ptctx), nucleus accumbens (Ac), amygdala (Amy), valamint cerebellum. A madarak egyes agyterületei megfeleltethetőek az emlősök, és így a patkánynál használt agyterületeknek: Ptctx az iMM-el, nucleus accumbens az mSt-vel, míg az amygdala az arcopalliummal.

Az összes szövetmintához mg-onként 10 µl acetonitril-víz elegyet (2:1) adtunk, ultrahanggal rövid ideig (5 s) homogenizáltuk, majd ezt követően centrifugáltuk (3000×g, 10 perc, 4 °C). A felülúszókat mesterséges cerebrospinális folyadékkal (ACSF) tízszeres térfogatra hígítottuk, majd elvégeztük a származékképzést.

3.6 A mikrodialízis kísérletek során az eszköz műtéti behelyezésére az állatok érkezésének napján került sor. Az érzéstelenítéshez intramuszkuláris ketamin-xilazin injekciót használtunk (40 és 8 mg/ttkg dózisban). A mikrodialízis-szondát a baloldali mediális striátumba ültettük és fogászati cement használatával rögzítettük a koponyacsonton. A műtét után a csirkéket (n=8) üvegfalú, felül nyitott dobozba helyeztük. A mikrodialízis-szondán keresztül ACSF-et (120 mM Na^+, 6 mM K^+, 2 mM Ca^{2+}, 125 mM Mg^{2+}, 129 mM Cl^-, 125 mM $H_2PO_4^-$, 21 mM HCO_3^-, pH 7,4) perfundáltunk. Az áramlási sebesség 0,3 µl/perc volt. 18-20 órás stabilizációs periódus után megkezdtük a mintagyűjtést 200 mikroliteres polipropilén csövekbe, húsz perces időközönként. A mintákat azonnal szárazjégre helyeztük, majd −80 °C-on tároltuk felhasználásig. A kísérlet során három mintavétel után (60 perc) a madarak ihattak vizet szabadon 20 percen keresztül, 100 perccel később 50 mM KCl tartalmú ACSF került átáramoltatásra 20 percen keresztül, majd minden stimulus után a perfúziós médiumot visszaváltottuk standard ACSF-re további mintagyűjtés céljából. A nátriumionokat KCl adagolásakor lecsökkentettük, fenntartva így az ozmolalitást.

3.7 A D-szerin és D-aszpartát agyi eloszlásának meghatározásához 5-5 újszülött és felnőtt C57BL/6 egeret dekapitáltunk és az agyukat azonnal a megfelelő részekre bontottuk. A mintakészítés során egy rostrális vágást végeztünk, mely a mediális orbitofrontális cortexet

tartalmazza; és egy caudális vágást, mely az amygdalát, hippocampust és a hipotalamuszt. A szövetminták tömegét lemértük, majd azonnal szárazjeges közegbe helyeztük. A mintákat a további feldolgozásig -80 °C-on tároltuk. A mintaelőkészítés hasonló módon történt az excitátoros aminosavak meghatározásához nyert biológiai minták előkészítéséhez, azonban a felülúszók végső hígítása nem tízszeresére történt ACSF-el, hanem kétszeresére.

3.8 Az excitátoros aminosavak mellett történő D-szerin meghatározásra kidolgozott módszert az FDA irányelvei alapján validáltuk. Belső standardként (IS) 1 μM L-ciszteinsavat alkalmaztunk. A kalibrációs görbe megszerkesztéséhez a D-aszpartát és D-szerin standardokból hat különböző koncentrációt (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 1,5 μM) használtunk. Ahhoz, hogy az L-aminosavak biológiai mintákban jelenlévő mennyiségét imitáljuk, a standardok keveréke ötvenszeres koncentrációfeleslegben (2,5; 5; 12,5; 25; 50, 75 μM) L-glutamátot, L-aszpartátot, L-szerint, taurint és glicint is tartalmazott. A minőségellenőrzési (QC) minták alacsony, közepes és magas koncentrációban tartalmazták a D-aszpartátot és a D-szerint (0,08; 0,04; 1,25 μM), melyekkel a mérések napon belüli és a napok közötti pontosságát és torzítatlanságát állapítottuk meg. A rendszer pontosságát a mérések relatív szórás-értékeivel jellemeztük. A módszer torzítatlanságának jellemzése során a mért aminosav koncentrációt a nominális koncentráció százalékában adtuk meg. A napon belüli megbízhatósági adatok meghatározásához öt-öt párhuzamost használtunk. A napok közötti megbízhatósági adatok meghatározásához a méréseket öt egymást követő napon megismételtük, minden nap három-három párhuzamos mérést végeztünk. Kvantitálási határnak azt a legkisebb koncentrációértéket fogadtuk el, ahol a torzítatlanság 80 és 120 % között volt és a pontosság (a mérések relatív szórása) nem haladta meg a 20 %-ot. A detektálás határának a 3:1 jel/zaj arányhoz tartozó mintakoncentrációt tekintettük.

4. Eredmények

4.1 A Gyógyszerhatástani Intézetben már régebben is alkalmaztak NBD-F-et, mint származékképző reagenst diaminok, valamint lizin meghatározására. A módszer optimalizálását ekkor végezték el, melyet az excitátoros aminosavak meghatározásánál is használtunk, ugyanis a csúcsterületek 20 mM, pH 8,5 borát puffer alkalmazása és 15 perces reakcióidő mellett mutattak maximumot.

A D-szerinnel kapcsolatban is megvizsgáltuk a származékképzési reakció időfüggését. Kiértékelve az elektroferogramokat azt kaptuk, hogy a D-szerin, valamint a D- és L-aszpartát esetében 20 mM pH 8,5 borát pufferben 20 perces származékképzési reakcióidő nagyobb

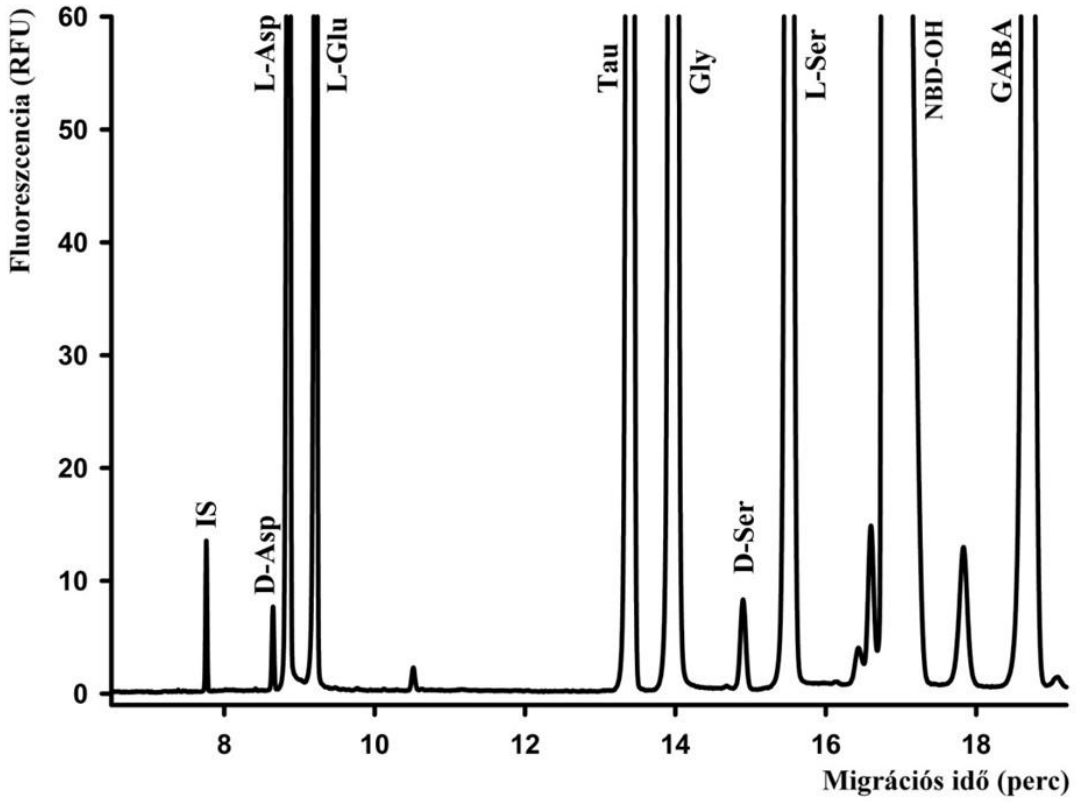
csúcsterületet eredményezett, mint a 15 perces, míg az L-glutamát esetében számottevő változást nem tapasztaltunk. Ezért 20 percre emeltük a származékképzési reakcióidőt.

4.2 a A derivatizált aminosavak egy vagy két negatív töltéssel rendelkeznek, ezért bázikus vagy semleges pH-n jelentős elektroforetikus mobilitással rendelkeznek az anód irányába. Gyors analízisük anód irányú elválasztással valósítható meg, amennyiben az EOF-et teljes mértékben visszaszorítjuk. Ennek eléréséhez lineáris poliakrilamiddal borítottuk a kapillárisfalat, akárcsak az excitátoros aminosavak királis elválasztásakor alkalmazott módszerünk esetében. L-ciszteinsavat használtunk belső standardnek az elválasztandó aszpartát és glutamát komponensekhez hasonló karakterisztikája miatt (két negatív töltéssel rendelkezik bázikus, vagy neutrális pH-n). Az elválasztásokat 50 cm effektív kapillárishosszon végeztük. Az excitátoros aminosavak királis elválasztása során a HPA-β-CD megfelelő szelektornak bizonyult az aszpartát és a glutamát enantiomerek elválasztásához. Módszerünket szerettük volna továbbfejleszteni, és az NMDA receptorokon ko-agonista funkciójú molekula, a D-szerin meghatározásával kiegészíteni. Mivel a módszer biológiai mintára való alkalmazhatóságának tesztelésekor a házi csirkék agyából származó mintákban D-glutamát nem volt detektálható, az L-glutamát, valamint a D- és L-aszpartát mellett a szerin enantiomerek mérésére is alkalmas új módszer kidolgozásakor nem tartottuk szükségesnek a kettős ciklodextrin rendszer alkalmazását. Kiindulási lépésként 100 mM pH 8 borát puffert és királis szelektorként 5 mM HPA-β-CD-t használtunk. Azonban a D-szerin teljes alapvonal elválasztását ilyen körülmények között nem tudtuk elérni, hiszen a D-szerin az előtte migráló glicinnel és az NBD-F fluoreszcens melléktermékeivel részben ko-migrált, meggátolva így a pontos kvantitatív meghatározást.

4.2 b A módszer optimalizálása során a pH csökkentése 8-ról 7-re javította mind a kémiai, mind a királis szelektivitást. A pH 8 alá csökkentése azonban a borát pufferről a megfelelő pufferkapacitású zwitterionos HEPES-re történő váltást indokolta. A glicin, valamint a származékképzőből származó melléktermékek alapvonalon elváltak a D-szerintől. A pH további csökkentése 6,5-re azonban az aszpartát és a glutamát ko-migrációját eredményezte, ezért végül 50 mM pH 7 HEPES puffert választottuk a háttér elektrolitnak.

4.2 c A módszerfejlesztés további részében a királis szelektor koncentrációját vizsgáltuk meg. A HPA-β-CD koncentrációjának emelése 3 és 7 mM között javította a királis, illetve kémiai szelektivitást, mely alatt a D-szerin és a glicin, valamint a melléktermékek elválasztásának javulását értjük. Azt tapasztaltuk, hogy a 6 és a 7 mM királis szelektor hatása között lényeges különbség nem tapasztalható, ezért a végső koncentrációnak 6 mM HPA-β-CD-t választottunk.

4.2 d Több lehetséges aminosavat is teszteltünk az esetleges ko-migráció kizárása érdekében, melyek a biológiai mintában előfordulhatnak. Ilyen komponensek például a GABA, a taurin, a glicin, a methionin, az alanin, a treonin és a valin. A taurin és a glicin a D-szerin előtt migrál, míg a többi vegyület később érkezett a detektor ablakhoz. A lassabban migrálódó vegyületek közül a GABA migrált a legközelebb a D-szerinhez, de felbontásbeli problémát nem jelentett (1. ábra).



***1. ábra*: 1 µM L-ciszteinsav belső standard (IS), 2,5 µM D-Asp és D-Ser, 25 µM L-Asp, L-Glu és L-Ser, 50 µM glicin (Gly) és taurin (Tau) és GABA tartalmú standard minta. Elválasztási körülmények: 50/60 cm x 75 µm poliakrilamiddal borított ömlesztett szilika kapilláris; injektálás: 6,89 kPa 20 s; 6 mM HPA-β-CD, 50 mM HEPES puffer pH 7; -24 kV.**

4.2 e A biológiai mintákban a D-enantiomerekhez képest az L-aminosavak, illetve a glicin és a taurin sokkal nagyobb feleslegben fordulnak elő, ezért a validáláshoz a módszer szelektivitásának biztosítása érdekében ötvenszeres feleslegben alkalmaztuk az L-aminosavakat (L-Glu, L-Asp, L-Ser), valamint a glicint és a taurint a D-enantiomerekhez képest. A kalibrációs görbéket 0,05-1,5 µM közötti koncentráció tartományban vettük fel a D-

aszpartátra, illetve a D-szerinre, míg 2,5-75 μM között az L-aszpartátra és az L-glutamátra, ahol a jel és koncentráció között lineáris összefüggést találtunk. A napon belüli és a napok közti pontosság és torzítatlanság is meghatározásra került az alábbi QC mintakoncentrációkkal: 0,08; 0,4; 1,25 μM a D-aszpartátra és a D-szerinre, illetve 4; 20; 62,5 μM az L-aszpartátra és az L-glutamátra, lefedve így a szükséges koncentráció tartományt. A napon belüli torzítatlanság a D-aminosavakra 85,10-105,94%-nak, az L-aminosavakra 85,05-112,11%-nak adódott. A napon belüli pontosság 2,09-7,90% volt a D-aminosavakra, míg 3,93-6,55% az L-aminosavakra nézve. A napok közötti pontosság a D-aminosavak esetében 0,44-9,47% között volt, illetve az L-aminosavak esetében 0,95-14,90%. A mennyiségi meghatározás alsó határát (LOQ) a D-enantiomerekre határoztuk meg, mely 0,05 μM-nak adódott mind a D-aszpartát, mind a D-szerin esetében. A detektálás alsó határát 3:1 jel/zaj arány alapján számoltuk ki és 8, valamint 12 nM koncentráció értéket kaptunk a D-aszpartát, illetve a D-szerin esetében.

4.3 Hat különböző agyterületet vizsgáltunk meg felnőtt és újszülött egereknél a D-aminosavak meghatározásához, melyek az alábbiak: amygdala, bulbus olfactorius, cerebellum, hippocampus, hypothalamus és prefrontális cortex. Mindegyik mintában a D-aszpartát, valamint a D-szerin detektálható és kvantifikálható volt. A D-szerin koncentrációja felnőtt egerek esetén (14-50 nmol/g nedves szövet) kb. egy nagyságrenddel nagyobb volt a D-aszpartáthoz képest (1,9-3,2 nmol/g nedves szövet) mindegyik agyterületnél, kivéve a cerebellumot, ahol a koncentrációk hasonlóak voltak (0,9 és 1,2 nmol/g nedves szövet). Ezzel szemben az újszülött egereknél a két aminosav nagyságrendileg összemérhető (D-aszpartát esetén 11-22 nmol/g szövet, míg D-szerin esetében 11-26 nmol/g szövet). Az újszülött egereknél körülbelül egy nagyságrenddel nagyobb a D-aszpartát mennyisége, mint felnőtt korban, mely a neurogenezisben betöltött fontos szerepét támasztja alá. Látható, hogy a D-szerin mennyisége a felnőtt egereknél három agyterületen kimagaslik az újszülöttekhez képest, méghozzá az amygdalában, a hippocampusban és a prefrontalis cortexben. Ez a három terület kiemelt szerepet tölt be a neuronális plaszticitásban, valamint tanulási folyamatokban és a memória kialakulásban. Érdekes eredmény a kisagyban mért szignifikáns D-szerin csökkenés felnőtt egyedeknél.

4.4 a Az excitátoros aminosavak vizsgálatakor is azt tapasztaltuk, hogy a kornak szignifikáns hatása van a D-aszpartát koncentrációra. Az általunk vizsgált négy csirke agyterületen jelentős csökkenést mutatott a második és a negyedik nap között és alacsony is marad innentől kezdve. Ha az L- és a D-aszpartát koncentrációját százalékosan fejezzük ki (L-aszpartát az L-aszpartát és L-glutamát összegéhez viszonyítva, illetve a D-aszpartát a D-

aszpartát és L-aszpartát összegéhez viszonyítva), akkor tisztán látható a D-aszpartát korfüggő csökkenése egy egyensúlyi L-aszpartát szint mellett.

4.4 b Kortól függő változást tapasztaltunk az L-aszpartát és az L-glutamát esetében is, főleg a 4. napon bekövetkezett tranziens csökkenésnek köszönhetően. Az L-glutamát koncentrációban szignifikáns különbség volt az agyterületek között. A legkevesebb L-glutamát az mSt/Ac területeken volt.

4.4c Nem találtunk szignifikáns különbséget a felnőtt csirkék és patkányok L-aszpartát koncentrációja között, azonban az agyterületi hatás és a két faktor közötti interakció szignifikáns külöbségeket mutatott. A post-hoc páros t-próbákkal felfedezésre került, hogy a csirkék arcopalliumában csökkent L-aszpartát szint figyelhető meg, de csak ha a cerebellumhoz hasonlítjuk, míg a patkányoknál a cerebellumban találtuk a legkisebb L-aszpartát szintet.

4.4 d Az L-aszpartátnak a két faj közti különbsége szignifikánsan kisebb értéknek adódott a patkány cerebellumban. Ha összehasonlítjuk az arányokat (L-aszpartát/L-aszpartát + L-glutamát), akkor már azt tapasztaljuk, hogy nincs eltérés a két faj között, de szignifikáns az eltérés az agyterületek között.

4.4 e A patkányoknál kicsivel kisebb L-glutamát koncentrációt mértünk, mint csirkéknél, de csak némely agyterületen volt szignifikáns eltérés: az mSt/Ac és az iMM/Ptctx területeknél. Csirkékben az L-glutamát koncentráció kisebb volt az mSt-ben és a cerebellumban, mint az iMM-ben, míg patkányoknál a nucleus accumbens mutatott alacsonyabb L-glutamát koncentrációt bármelyik másik agyterülettel szemben. A fajon belüli eltéréseket elemezve az mSt tartalmazta a legkevesebb L-glutamátot a másik három agyterülethez képest csirkéknél.

4.4 f A felnőtt csirkéknél három agyterületnél a négyből magasabb D-aszpartát szinteket mértünk, mint a patkányoknál, míg a cerebellum esetében nem találtunk eltérést. A D-aszpartát koncentráció agyterületenként változónak adódott, amikor mind a patkányokat, mind a csirkéket együttesen vizsgáltuk. Az eltéréseknél fajok közötti különbségeket is felfedeztünk. Nem találtunk szignifikáns különbséget csirkék agyterületei között, míg patkányoknál a D-aszpartát szintje a cerebellumban volt a legmagasabb és a Ptctx-ben volt a legkevesebb. Azonos eredményt kaptunk, amikor az arányokat (D-aszpartát / D-aszpartát + L-aszpartát) vizsgáltuk.

4.5 Vizsgálataink során az Ac/mSt régiókban különböző stimulus hatására mérhető L- és D-aszpartát szint, valamint az L-glutamát mennyiség változására voltunk kíváncsiak, melyhez mikrodialízis mintavételt alkalmaztunk, ahol is a csirkék szabadon mozoghattak. Mindkét vizsgált L-aminosav extracelluláris mennyisége emelkedést mutatott víz adásakor (jutalom a szomjas csirkéknek). Hasonló, de nagyobb excitátoros L-aminosav-szint emelkedést

tapasztaltunk magas kálium-klorid koncentráció hatására. A D-aszpartát esetén egy kisebb, nem szignifikáns emelkedés volt tapasztalható víz fogyasztásakor, azonban egy robosztus (körülbelül tízszeres) emelkedés volt tapasztalható káliumion perfundálásakor. A D-aszpartát emelkedése azonban a magas kálium-klorid adagolása után késve jelent meg. Az L-aszpartát aránya mind a mikrodialízis, mind a szöveti mintákban hasonló volt. Érdekes, hogy a D-aszpartát aránya közel duplájára nőtt a kálium-kloriddal történt stimuláció hatására (40%-át adva így az össz-aszpartát mennyiségnek), míg a szövetkivonatban lévő koncentrációja közel két nagyságrenddel kisebb volt az L-aszpartáthoz viszonyítva.

5. Következtetések

5.1 a Kutatócsoportunk munkája során olyan királis kapilláris elektroforézis módszerek kidolgozásában vettem részt, melyek alkalmasak a biológiai mintákból történő excitátoros aminosavak (D- és L-aszpartát, L-glutamát), valamint a D-szerin kvantitatív meghatározására. Módszerünk segítségével, a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetével együttműködésben, házi csirkék különböző agyterületéből határoztuk meg az excitátoros aminosavak mennyiségét, valamint az irodalmi adatokkal összehasonlítottuk a kapott eredményeket, ezzel is validálva módszerünk pontosságát és érzékenységét biológiai minták esetében. A kémiai és a királis szelekció biztosítására kettős ciklodextrin rendszert fejlesztettünk ki, ahol is a DM-β-CD felelős az L-aszpartát és a D-glutamát közti kémiai szelektivitás biztosításáért, míg a HPA-β-CD a királis szelekciót biztosította az enantiomerek közt.

5.1 b A fiatal csirkék esetén magas D-aminosav szinteket mértünk a felnőtt állatokhoz képest. Eredményeinkből következtetve a csirkéknél az L-glutamát és L-aszpartát nem mutatott korspecifikus változást, szemben a D-aszpartáttal. Az L-aminosavak szintje a 4. napon mutatkozott a legalacsonyabbnak, azonban a későbbiekben koncentrációjukat nagyrészt állandónak találtuk. A D-aszpartát százalékosan kifejezve a teljes aszpartát mennyiségre vonatkoztatva a két napos állatoknál volt szignifikánsan a legmagasabb. Három olyan agyterületet vizsgáltunk, mely részt vesz az imprinting mechanizmusban és a passzív elkerülési tesztben. Ez az iMM, az mSt és az arcopallium, melyeket együtt vizsgáltunk az emlősöknél ismert homológjaikkal (Ptctx, nucleus accumbens, amygdala). A cerebellum mindkét fajnál kontrollként szolgált. Eredményeink alapján nagyon robosztus korreláció figyelhető meg az mSt/nucleus accumbens régiók között, ahol is alacsonyabb L-glutamát szint figyelhető meg mindkét fajnál a többi agyterülethez viszonyítva. Az eredményeinket

alátámasztja, hogy ezeken a területeken főleg GABAerg beidegzés található és sok excitátoros terminál, mely glutamát és aszpartát tartalmú, de glutamáterg és aszpartáterg perikaryon kevésbé jellemző.

5.1 c A tanulási folyamat vizsgálata során a vízivás hatására a D-aszpartát mennyiségének csak nem szignifikáns emelkedése volt tapasztalható az extracelluláris térben. KCl perfundálás hatására azonban jelentős mennyiségű D-aszpartát felszabadulást mértünk. A kálium hatása, szemben az L-aszpartát és L-glutamátnál tapasztalt (szintén nagyon robosztus) extracelluláris koncentráció emelkedéssel, a D-aszpartát esetén sokkal elhúzódóbb (kb egy órán át tartó) felszabadulást eredményezett, mielőtt visszatért volna a kiindulási értékhez. Ennek magyarázata lehet valamilyen másodlagos mechanzimus, mely felelős a D-aszpartát folyamatos felszabadításáért a K^+ gyors felszabadító hatása után. A D-aszpartát felszabadulása jelenleg is intenzív kutatások tárgyát képezi. Eredményeink alapján látható, hogy a szöveti D-aszpartát mennyisége közel két nagyságrenddel kisebb az L-aszpartáthoz képest, azonban az extracelluláris térbe meglepően nagy mennyiségű D-aszpartát szabadul fel. KCl hatására az extracelluláris térbe jutó össz-aszpartát mennyiségének egyharmadát teszi ki a D-enantiomer. Az L-aszpartát és L-glutamát esetében mind a tanulási stimulus, mind KCl hatására mennyiségük szignifikánsan megnőtt az extracelluláris térben.

5.2 a Kutatásom során olyan validált királis kapilláris elektroforetikus módszert fejlesztettem ki, mely alkalmas az aszpartát enantiomerek, a D-szerin, valamint az L-glutamát kvantitatív meghatározására. HPA-β-CD királis szelektor alkalmazásával alapvonalon történő elválasztást kaptunk a D- és L-aszpartát, illetve az L-és D-szerin esetében. Mivel a biológiai minták nem tartalmaztak D-glutamátot, ezért az új módszerfejlesztés során a kettős ciklodextrin rendszert elhagyva visszatértünk a csak HPA-β-CD királis szelektort tartalamazó rendszerhez. A futás során a D- és az L-aszpartát alapvonalon történő elválása volt tapasztalható, azonban a D-szerin a glicinnel, valamint az NBD-F bomlástermékeivel ko-migrált. Módszerfejlesztésünk elsődleges célja volt a D-szerin, a bomlástermékek, valamint a glicin közti kémiai szelektivitás növelése. Az aminosavak NBD-F-al képzett származékai semleges pH-n egy vagy két negatív töltéssel rendelkeznek, ezért gyors meghatározásuk lehetséges anód irányú elválasztással. A származékképzéshez a primer és szekunder aminokkal reagáló NBD-F-et használtam, mely relatíve gyors kvantitatív származékképzési reakciót eredményez viszonylag kevés melléktermék képződése mellett. A módszerfejlesztés során a biológiai mátrix nehezítő tényezőit is figyelembe vettük. A módszerfejlesztés során a standardokat mesterséges gerincvelő folyadékban (ACSF) oldottuk, utánozva így az agyminták mátrixának elektrolit összetételét. Módszerünket az FDA irányelveinek

megfelelően validáltuk, továbbá a fejlesztés és a validálás során számításba vettük a biológiai közegben várható nagy L-enantiomer túlsúlyt.

5.2 b A D-szerin, a glicin valamint az NBD-F származékképzési reakció során, főleg hidrolízissel képződő termékeinek elválasztásakor a pH hatása volt az egyik legfontosabb tényező, mellyel a kémiai szelektivitást növelhettük. A szakirodalomból ismeretes, hogy az NBD-F melléktermékei fenolos vegyületek, melyek hidroxil csoportjai, gyengén ugyan, de savas karakterűek, ezért a pH változtatásra sokkal inkább érzékenyek enyhén lúgos és semleges pH-n, mint a karboxil csoporttal rendelkező aminosavak. Alacsonyabb pH-n a fenolos melléktermékek töltése és így mobilitása csökken, míg az aminosavaké lényegében nem változik. Másik oldalról a királis szelektor HPA-β-CD töltéssel rendelkező, protonált formájának növekedése erősebb elektrosztatikus interakciót eredményez az aminosavakkal, valamint a komplex lassabb migrációját, ami a szabad komponensek és a komplexek közötti mobilitás különbséget növeli. A pH csökkentése ebben a rendszerben ezért szignifikáns hatással lehet a királis és a kémiai szelektivitásra is. A pH csökkentése 8-ról 7-re 50 mM HEPES rendszerben javította mind a királis, mind a kémiai szelektivitást. A pH további csökkentése azonban már nagyban növeli a nem enantiospecifikus ionos kölcsönhatást a ciklodextrin és a savas excitátoros aminosavak között, ezért 50 mM HEPES puffer alkalmazásakor pH 6,5-nél a két negatív töltéssel rendelkező aszpartát és glutamát esetében már megszűnt az elválasztás, az enantio- és a kémiai szelektivitás egyaránt elveszett.

5.2 c A módszerfejlesztés során vizsgáltuk a biológiai mintákban előforduló egy negatív töltéssel rendelkező aminosavakat, melyek ko-migrálhatnak a D-szerinnel. Az alábbi aminosavak migráltak el a detektorablak előtt az optimálisnak választott körülmények között: GABA, taurin, glicin, methionin és alanin, treonin és valin. A taurin és a glicin a D-szerin előtt migrál, míg a többi vegyület később érkezett a detektorablakhoz. A lassabban vándorló vegyületek közül a GABA migrált a legközelebb a D-szerinhez, de rezolúciós problémát nem okozott.

5.2 d A mintakomponensek kvantitatív meghatározásának alsó határa (LOQ) 0,05 μM volt a vizsgált mintakomponensekre. Kidolgozott módszerünk alkalmasságát újszülött és felnőtt (n=5-5) C57BL/6 egereken teszteltük. Eredményeink során a különböző agyterületeknél ott találtunk magas D-szerin mennyiséget, ahol az NMDA receptorok száma is magas. Ezek az agyterületek a memória formációban is fontos hippocampus, prefrontalis cortex és amygdala. Mind a D-aszpartát, mind a D-szerin agyi mennyisége jelentős korfüggő változást mutat. A fiatal egereken közel egy nagyságrenddel nagyobb mennyiségben található meg a D-aszpartát, mint a felnőtt egyedekben, agyterülettől függetlenül. Hasonló eredményt kaptunk csirkék agyának vizsgálatakor is. A D-szerin mennyisége felnőtt korban szignifikánsan magasabb a

memóriaformációban fontos agyterületeken, míg a többi agyi régióban nem tér el a fiatal egyedekétől (kivéve a kisagy). A kisagyi régióban a felnőtt egereknél az irodalmi adatokkal megegyezően alacsonyabb D-szerin mennyiséget mértünk. Az eredmények jól korrelálnak a szakirodalomban közölt agyi D-aminosav koncentrációkkal. Módszerünk egy mérésen belül képes meghatározni e két fontos D-aminosav mennyiségét biológiai mintákból.

6. Saját publikációk jegyzéke

***Az értekezés témájában megjelent közlemények*:**

Wagner Zs, Tábi T, **Jakó T**, Zachar G, Csillag A, Szökő É.
Chiral separation and determination of excitatory amino acids in brain samples by CE-LIF using dual cyclodextrin system
Anal. Bioanal. Chem., 2012; 404, 2363-2368. (IF: 3,778)

Jako T, Szabo E, Tabi T, Zachar G, Csillag A, Szoko E
Chiral analysis of amino acid neurotransmitters and neuromodulators in mouse brain by CE-LIF.
ELECTROPHORESIS 35:(19) pp. 2870-2876. (2014) (IF: 3,028)

Gergely Zachar, **Tamás Jakó**, István Vincze, Zsolt Wagner, Tamás Tábi, Eszter Bálint, Szilvia Mezey, Éva Szökő, András Csillag

Age-related and function-dependent regional alterations of free L- and D-aspartate, and L-glutamate in postembryonic chick brain

Acta Biol. Hung. 69(1):1-15. (2018)