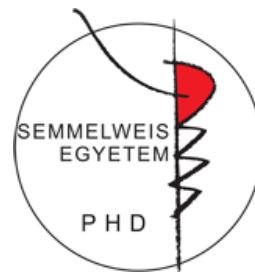


A D-szerin szintet szabályozó mechanizmusok vizsgálata – lehetséges gyógyszerátadáspontok

Tézisfüzet

Dr. Vincze István

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szökő Éva, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Gáspár Róbert, PhD, egyetemi docens
Dr. Zelles Tibor, PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Klebovich Imre, D.Sc., professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ducza Eszter, PhD., egyetemi docens
Dr. Völgyi Gergely, PhD., egyetemi docens

Budapest

2021

1. Bevezetés

A D-szerin ko-agonista tulajdonsággal rendelkezik az N-metil-D-aszpartát (NMDA) molekulára nyíló ionotróp glutamát receptoron, így fontos szerepet játszik a neurotranszmisszióban. Az NMDA receptor szerepét számos központi idegrendszeri megbetegedésben azonosították. Ehhez kapcsolódóan a D-szerin megváltozott mennyiségét is összefüggésbe hozták különböző központi idegrendszeri betegségekkel, amelyet az 1. táblázat foglal össze.

1. táblázat: A D-szerin koncentrációkban talált eltérések különböző központi idegrendszeri betegségekben

Betegség	A D-szerin központi idegrendszeri mennyiségében feltételezett változások
ALS	↑
Alzheimer-kór	↑
Epilepszia	↕
Szkizofrénia	↓
Parkinson-kór	↓

A fentebb említett betegségekben a D-szerin koncentrációt különböző biológia mátrixokból határozták meg. ALS: gerincvelő, Alzheimer-kór: cerebrospinális folyadék, szkizofrénia: plazma, Parkinson-kór: cerebrospinális folyadék, epilepszia: cerebrospinális folyadék, különböző agyi területek (állatkísérlet)

A D-szerin koncentrációjának szabályozásában a szerin-racemáz (SR) enzim, a D-aminosav-oxidáz (DAAO) enzim és a különböző transzporterek játszanak fontos szerepet. A SR enzim elsősorban neuronokban fordul elő, és a legfontosabb funkciója, hogy L-szerinből D-szerint képez. Megváltozott működését mutatták ki különböző betegségekben, azonban gyógyszerátadáspontként való alkalmazhatóságát kevés kutatásban vizsgálták.

A flavin-adenin-dinukleotid (FAD) kofaktorral működő DAAO enzim a D-szerin metabolizmusáért felelős. Az enzim a központi idegrendszerben legnagyobb

mennyiségben az alsó agytörzsi szakaszon és a cerebellum területén mutatható ki. Számos DAAO enzim gátló vegyületet fejlesztettek az utóbbi időben, melyeket *in vitro* kísérletek után preklinikai vizsgálatokban teszteltek elsősorban szkizofrénia állatmodelleken. A nagyszámú biztató eredmény mellett hatástalanságról is beszámolnak az irodalomban. Klinikai vizsgálatokban kizárólag a jól ismert, gyenge DAAO enzim gátló tulajdonsággal rendelkező nátrium-benzoát került kipróbálásra. Újabb molekulák fejlesztése és vizsgálata továbbra is szükségesnek látszik.

A központi idegrendszerben a D-szerin membránokon keresztüli szállításában különböző transzporterek játszanak fontos szerepet. Az alanin-szerin-cisztein-1 (asc-1) transzporter elsősorban neuronokon található meg, Na⁺-független módon szállít, nagy affinitású a D-szerin iránt és a legfontosabb funkciója a D-szerin extracelluláris térbe történő felszabadítása a sejtből.

A leginkább asztrocita sejtekre jellemző alanin-szerin-cisztein-treonin-1 és -2 (ASCT-1 és -2) transzporterek Na⁺-függő módon működnek, kis affinitással rendelkeznek a D-szerinre és leginkább a D-szerin felvételben és ezzel párhuzamosan az L-szerin felszabadításban játszanak fontos szerepet (antiporter tulajdonság). Az ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek megkülönböztetésére szelektív, vagy preferált szubsztrátok alkalmazhatóak. A transz-4-hidroxi-L-prolin (t-Pro) az ASCT-1 transzporter preferált szubsztrátjának tekinthető, azonban magasabb koncentrációtartományban az ASCT-2 transzportert is gátolja. Az L-glutamint és az L-aszparagint az ASCT-2 preferált szubsztrátjaként tartják számon.

Az utóbbi időben alkalmazzák a ketamint depresszióban szenvedők kezelésére, gyors tünetjavító hatása miatt. A ketamin racém vegyület, R- és S-ketamin enantiomerek alkotják. Az S-ketamint teszik felelőssé a ketamin terápia során tapasztalt disszociatív mellékhatásért, melynek hátterében a molekula ASCT-2 transzporterre szelektív, kevert kompetitív, nem-kompetitív gátló hatását valószínűsítik. Jelenleg a transzporterek tulajdonságainak megismerése, illetve az egyes vegyületek D-szerin transzportra kifejtett hatásának gyors és egyszerű vizsgálata a cél, melyet *in vitro* modellek segítségével valósíthatunk meg.

2. Célkitűzések

Munkám során célul tűztem ki a szervezet, a sejtek D-szerin koncentrációjának befolyásolási lehetőségeinek vizsgálatát, hiszen a D-szerin csökkent és emelkedett mennyisége egyaránt szerepet játszik különböző patológias folyamatokban. Céлом volt potenciális gyógyszeráadásponatok megismerése és gyógyszerjelölt molekulák tesztelésére alkalmas modell kidolgozása.

- Az újonnan fejlesztett D-aminosav-oxidáz (DAAO) enzimgátló 6-fluor-1H-indazol-3-ol hatásának vizsgálata a D-szerin mennyiségének változására *in vivo*
- Az SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtvonal karakterizálása, mint lehetséges D-szerin transzport modell
- Az SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtvonal és patkány asztrocita sejt kultúra D-szerin transzportjának összehasonlítása
- Az S-ketamin D-szerin transzportra gyakorolt hatásának vizsgálata az SH-SY5Y sejtvonalon

3. Módszerek

3.1 A sejt kultúra fenntartásához Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, (DMEM/F12) tápoldatot, főtális borjú szérumot (FBS), stabilizált glutamint és nem esszenciális aminosav oldatokat alkalmaztunk.

A Western blot analízis során Novex 4-12%-os poliakrilamid gélt használtunk. Az ASCT-1 és ASCT-2 primer antitestek a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) és a Cell Signaling (Danvers, MA, USA) cégektől származtak. A mérés során nyúl antigén elleni szekunder antitest került felhasználásra.

3.2 A 6-fluor-1H-indazol-3-ol DAAO enzim gátló vegyület *in vivo* vizsgálatát hím NMRI egereken végeztük. Csoportonként 5 állatot 30 mg/kg D-szerin mellett 30 mg/kg 6-fluor-1H-indazol-3-ol oldattal vagy vegyületet nem tartalmazó fiziológiás sóoldattal kezeltünk intraperitoneálisan. A plazma D-szerin koncentrációt 10, 60 és 120 perc elteltével határoztuk meg.

Az állatokat a Semmelweis Egyetem Állatkísérletes Etikai Bizottságának jóváhagyásával, a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH, Budapest, Magyarország) engedélyével (22.1/606/001/2010, 2010. február 5.) és az Európai Tanács kísérleti és egyéb tudományos célokra felhasznált állatok védelmére vonatkozó rendelkezésének megfelelően kezeltük (86/609/EEC).

3.3 A D-szerin biológiai mintából történő kvantitatív meghatározását az intézetünkben korábban kifejlesztett és validált kapilláris elektroforézis lézer indukálta fluoreszcencia (CE-LIF) módszerrel végeztük. A származékképzéshez a 4-fluor-7-nitrobenzofurazán (NBD-F) fluoreszcens reagenst használtuk, belső standardként L-ciszteinsavat (2 μ M) alkalmaztunk, amit a származékképzéshez használt borát pufferhez (pH 8,5; 20 mM) adtunk. A mintákat 20 percig melegítettük 65 °C-on a származékképzési reakcióhoz, majd lehűtöttük. A mérésekig a mintákat -20 °C-on tároltuk.

Az analitikai mérés P/ACE MDQ CE készüléken történt, melyhez Ar-ion lézer forrással rendelkező LIF detektort kapcsolunk. Az elválasztást 75 μm belső átmérőjű és 365 μm külső átmérőjű ömlesztett szilika kapillárisban végeztük, amelynek belső felületén lineáris poliakrilamid borítást alakítottunk ki.

3.4 A primer asztrocita sejt kultúra készítéséhez az 1-3 napos Wistar-patkány kölyköket alkalmaztunk. Az állatok kezelését a Semmelweis Egyetem Állatkísérletes Etikai Bizottságának jóváhagyásával és a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH, Budapest, Magyarország) engedélyével (22.1/606/001/2010, 2010. február 5.) végeztük. A kísérletek során minden tekintetben betartottuk az Európai Tanács kísérleti és egyéb tudományos célokra felhasznált állatok védelmére vonatkozó rendelkezését (86/609/EEC). A konfluens állapot elérését követően az asztrocita sejteket feldolgoztuk.

További kísérleteinkhez SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejt vonalat használtunk, melyet a European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK) cégtől szereztünk be.

3.5 Az SH-SY5Y sejtekben az ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek expressziójának vizsgálatához Western blot analízist végeztünk. A mintákat 4-12% gradiens gélen választottuk el. Az elektorforézist követően a fehérjéket PVDF membránra blottoltuk át. A membránokat 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-ASCT-1, illetve 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-ASCT-2 primer antitestet tartalmazó 5%-os sovány tejpor oldatban inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán keresztül. Másnap a membránokat 1:1000-hez hígításban alkalmazott nyúl antigén elleni szekunder antitesttel konjugált tormaperoxidázzal inkubáltuk szobahőmérsékleten egy órán át. A transzporter fehérjéket Tween 20-at tartalmazó TRIS-szel puffereelt sóoldattal (TBST) háromszor 10 percig tartó mosást követően kemilumineszcens technikával, röntgenfilmen tettük láthatóvá Pierce ECL Western blot reagens alkalmazásával.

3.6 A kísérlet napján a sejteket a tripszines felvétel után Tris-szel beállított HEPES pufferben (THB) szuszpendáltuk úgy, hogy a sejtek koncentrációja 1 millió sejt/500 μL oldat legyen. A sejt szuszpenziót 0, 25, 50 és 200 μM D-szerinnel inkubáltuk 0, 15, 30, 60

és 120 percen keresztül 37 °C-on. Az inkubáció után a szuszpenziót jeges vízfürdőbe helyeztük, majd hűtve centrifugáltuk (630 g, 4 °C, 5 perc) és kétszer mostuk jéghideg THB oldattal. A sejtpelleteket végül 35 µL acetonitril:víz (2:1 V/V) elegyében re-szuszpendáltuk és a kicsapódott fehérjét centrifugálással (3000 g, 4 °C, 20 min) távolítottuk el. A felülúszót összegyűjtöttük és felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

3.7 A Na⁺-független transzport vizsgálatához a puffer oldat NaCl tartalmát kolin-kloriddal helyettesítettük. Az 1 millió sejt/500 µL oldat koncentrációjú sejtszuszenziót 50 µM D-szerinnel inkubáltuk 0, 15, 30, 60 és 120 percen keresztül 37 °C-on. Az inkubációs idő lejárta után a mintákat a 3.6 fejezetben leírtak szerint dolgoztuk fel.

3.8 A D-szerin transzport kinetikájának tanulmányozásához az 1 millió sejt/500 µL oldat koncentrációjú sejtszuszenziót különböző koncentrációjú D-szerinnel kezeltük (0-10000 µM) és 15 percen keresztül inkubáltuk 37 °C-on. Az inkubációs idő lejárta után a mintákat a 3.6 fejezetben leírtak szerint dolgoztuk fel.

3.9 A sejteket 25 µM D-szerinnel inkubáltuk különböző koncentrációban alkalmazott L-alanin, L-treonin, L-glutamin, t-Pro vagy L-szerin aminosavakkal együtt a D-szerin felvételét gátló hatásuk vizsgálatára, 15 percen keresztül 37 °C-on. Az inkubációs idő lejárta után a mintákat a 3.6 fejezetben leírtak szerint dolgoztuk fel.

3.10 A letapadt SH-SY5Y sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk 100 µM D-szerin tartalmú tápoldattal. A tápoldat eltávolítását követően, tripszines felvételt alkalmaztunk, majd THB-ben szuszpendáltuk a sejteket úgy, hogy végül 1 millió sejt/500 µL oldat koncentrációt kapjunk. A sejteket 300 µM L-szerinnel kezeltük 0, 5, 15 és 30 percen keresztül 37 °C-on. Az inkubációs idő lejárta után a mintákat a 3.6 fejezetben leírtak szerint dolgoztuk fel.

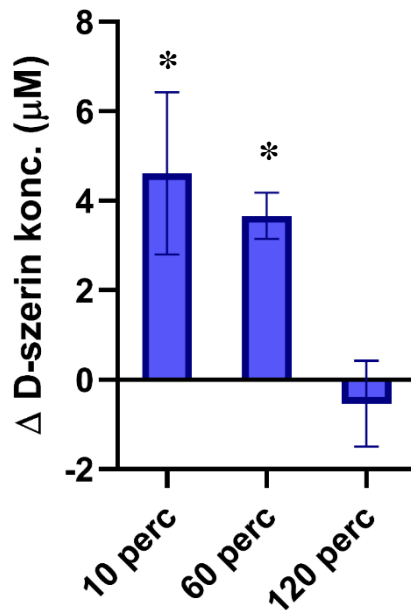
3.11 A sejteket 25 μM D-szerinrel inkubáltuk különböző koncentrációban alkalmazott S-ketaminnal (0, 2, 4, 10, 20, 50, 75 és 100 μM) együtt 15 percen keresztül 37 °C-on. Az inkubációs idő lejárta után a mintákat a 3.6 fejezetben leírtak szerint dolgoztuk fel.

3.12 A letapadt SH-SY5Y sejteket 0, 25 és 50 μM S-ketaminnal inkubáltuk 72 órán keresztül. Az inkubáció után az S-ketamint eltávolítottuk, majd THB oldatban szuszpendáltuk a sejteket úgy, hogy végül 1 millió sejt/500 μL oldat összetételt kapjunk. Ezt követően különböző D-szerin koncentrációt alkalmazva (300 és 1000 μM), 15 percen keresztül 37 °C-on inkubáltuk a sejteket. Az inkubációs idő lejárta után a mintákat a 3.6 fejezetben leírtak szerint dolgoztuk fel.

3.13 Az eredményeinket átlag \pm átlag standard hibája (SEM) formában adtuk meg minimum három párhuzamos mérés értékei alapján. A statisztikai különbségek elemzésére kétmintás t-próbát, vagy egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk, majd a különböző adatok összehasonlítására Dunnett post-hoc tesztet használtunk. A különböző görbeillesztések, illetve az illesztések alapján számolt paraméterek összehasonlítására F-próbát alkalmaztunk, amelyből meghatároztuk a p értéket. Az értékeléseknél a különbséget akkor tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak, ha $p < 0,05$ értéknek adódott.

4. Eredmények

4.1 A Természettudományi Kutatóközpont Szerves Kémia Intézetének DAAO gátló vegyületek fejlesztési projektjébe kapcsolódtunk be. Az előzetes kísérletek alapján a 6-fluor-1H-indazol-3-ol molekula került kiválasztásra *in vivo* tesztelés céljából, amely kísérlet a Gyógyszerhatástani Intézetben valósult meg. A vizsgálat során egerek D-szerin vagy D-szerin és 6-fluor-1H-indazol-3-ol kezelését végeztük intraperitoneálisan, majd a plazma D-szerin szinteket határoztuk meg CE-LIF módszerrel. A beadást követő 10. percben a csak D-szerin kezelésben részesülő csoportban $13,81 \pm 1,20 \mu\text{M}$ D-szerin volt mérhető. A D-szerin DAAO gátló vegyülettel együtt történő alkalmazása 33%-os, szignifikáns emelkedést okozott a D-szerin koncentrációban. A kezelés után egy órával a D-szerin plazmakoncentrációja $11,11 \pm 1,69 \mu\text{M}$ volt a D-szerin kezelést önmagában kapó egerekben, melyet szignifikánsan, 27%-kal, növelt a kezelés DAAO gátlószerrel történő kiegészítése. Két óra elteltével a D-szerin szint visszatért a kontroll értékre (1. ábra).



1. ábra: A D-serin koncentrációban mért különbség a 6-fluor-1H-indazol-3-ol vegyülettel történő kezelés hatására egerek plazmájában. Az egerek 30 mg/kg dózisú D-serin mellett izotóniás sóoldatot, vagy 30 mg/kg 6-fluor-1H-indazol-3-ol oldatot kaptak intraperitoneálisan. A plazma D-serin koncentrációjának meghatározása a beadást követő 10, 60, 120 percekben történt. A D-serin koncentráció különbséget úgy kaptuk, hogy a 6-fluor-1H-indazol-3-ol és D-serin együttes kezelés esetén mért D-serin koncentrációból kivontuk a D-serin és sóoldat kezelés esetében mért értékeket. Statisztikai összehasonlításra kétmintás t-próbát alkalmaztunk, ahol a D-serin és sóoldat kezelés eredményeit hasonlítottuk össze a D-serin és a 6-fluor-1H-indazol-3-ol együttes adagolása esetén kapott értékekkel. Az elemzést $p < 0,05$ értéknél tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az eredmények átlag \pm SEM értéként kerültek megadásra (10 perc, $n=5$; 60 perc, $n=4$, 120 perc, $n=5$).

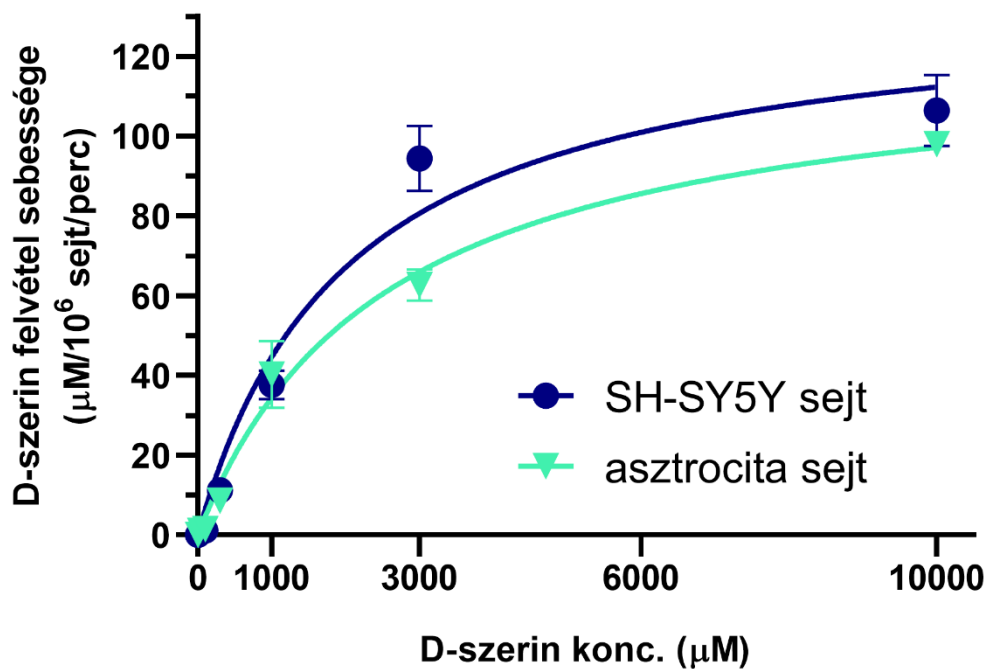
4.2 A DAAO enzimgátló vegyület hatásának *in vivo* vizsgálatát követően egy másik lehetséges és kevésbé kutatott támadásponttal kezdtünk foglalkozni, a D-serin szállításában résztvevő transzporterekkel, *in vitro* körülmények között.

Vizsgáltuk az SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonal D-serin felvételét különböző koncentrációjú D-serin (25, 50 és 200 μ M) illetve inkubációs idő (0, 15, 30, 60 és 120 perc) alkalmazása esetén. A növekvő D-serin mennyiség nagyobb intracelluláris D-serin koncentrációt eredményezett. Ezzel párhuzamosan a növekvő inkubációs idő is megnövekedett intracelluláris D-serin szintekkel társult, tehát egy koncentráció-, és időfüggő transzportról beszélhetünk. A 15 perces inkubációs idő mind a három

alkalmazott koncentráció esetén a dinamikus szakaszba esett, így a gátlószerek és a kinetikai paraméterek vizsgálatakor ezt az inkubációs időt alkalmaztuk.

4.3 Vizsgáltuk az SH-SY5Y és asztrocita sejtek D-szerin felvételének Na^+ -függését. A D-szerin szállításban résztvevő neuronális asc-1 transzporter Na^+ -független módon, míg az asztrocita sejtekre jellemző ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek Na^+ -függően működnek. A nátrium ionok kolin ionokkal történő helyettesítése jelentősen, az egyes időpontokban 66-91%-kal kisebb D-szerin felvételt eredményezett mindkét sejttypusnál. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy döntően Na^+ -függő D-szerin felvétel jellemzi az SH-SY5Y sejt vonalat és az asztrocita kultúrát egyaránt. Ezek alapján az ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek működése valószínűsíthető az SH-SY5Y sejt vonalon. Ezt erősíti meg, hogy Western blot analízissel igazoltuk a mindkét transzporter fehérje jelenlétét az SH-SY5Y sejteken.

4.4 Elvégeztük az SH-SY5Y és az asztrocita sejtek D-szerin felvételének kinetikai összehasonlítását. Mindkét sejttypust különböző koncentrációjú D-szerinnel inkubáltuk (0, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 és 10000 μM) 15 percig. A növekvő D-szerin koncentráció emelkedő intracelluláris D-szerin koncentrációt eredményezett mind az SH-SY5Y, mind az asztrocita sejteken. A felvételi görbék a Michaelis-Menten kinetikát követték (2. ábra). A számolt kinetikai paraméterek, a K_m és a V_{\max} értékek nem mutattak szignifikáns különbséget a két sejttypus összehasonlításakor, amely eredmény alapján hasonló affinitás és kapacitás feltételezhető az SH-SY5Y és az asztrocita sejteknél.



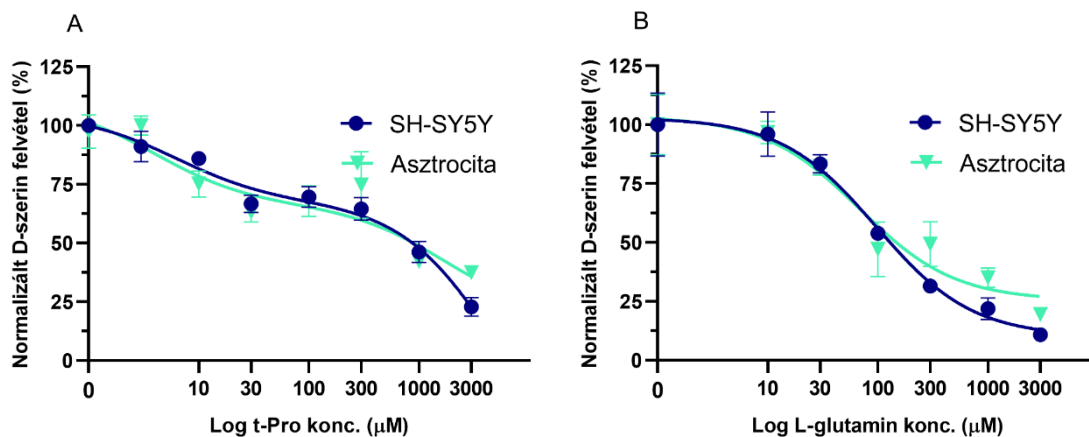
2. ábra: A D-szerin felvétel kinetikai jellemzése az SH-SY5Y és asztrocita sejtekben. Az ábrán a D-szerin felvétel sebessége látható SH-SY5Y sejtekben és patkány kortikális asztrocita sejtekben. Különböző koncentrációban alkalmaztunk D-szerint (0-10 000 μM) Na^+ -tartalmú pufferben. Az adatokat átlag \pm SEM formában mutatjuk be ($n \geq 3$). Az illesztés során Michaelis-Menten görbét használtunk.

4.5 A D-szerin felvételét vizsgáltuk az ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek szubsztrátjai, az L-alanin, illetve az L-treonin jelenlétében az SH-SY5Y és az asztrocita sejteken. Mindkettő aminosav esetében koncentrációfüggő és a legmagasabb alkalmazott koncentráció esetén a D-szerin felvétel közel teljes gátlását tapasztaltuk mind az SH-SY5Y, mind az asztrocita sejteken. Mivel két transzporter is szerepet játszhat a szerin felvételben, az egy és kétlépcsős gátlási görbe lehetőségét is megvizsgáltuk és a statisztikai összehasonlítás során minden vizsgált esetben az egylépcsős illesztés mutatkozott preferált modellnek. Az SH-SY5Y sejteken, illetve az asztrocita kultúrán mért gátlási eredményekből származó IC_{50} értékek ugyancsak nem mutattak statisztikai különbséget az L-alanin és az L-treonin tekintetében.

Az ASCT-1 szelektivitással rendelkező t-Pro szintén koncentrációfüggően gátolta a D-szerin felvételét mindkét sejtípus esetében (3. A ábra). A gátlási görbére a kétlépcsős

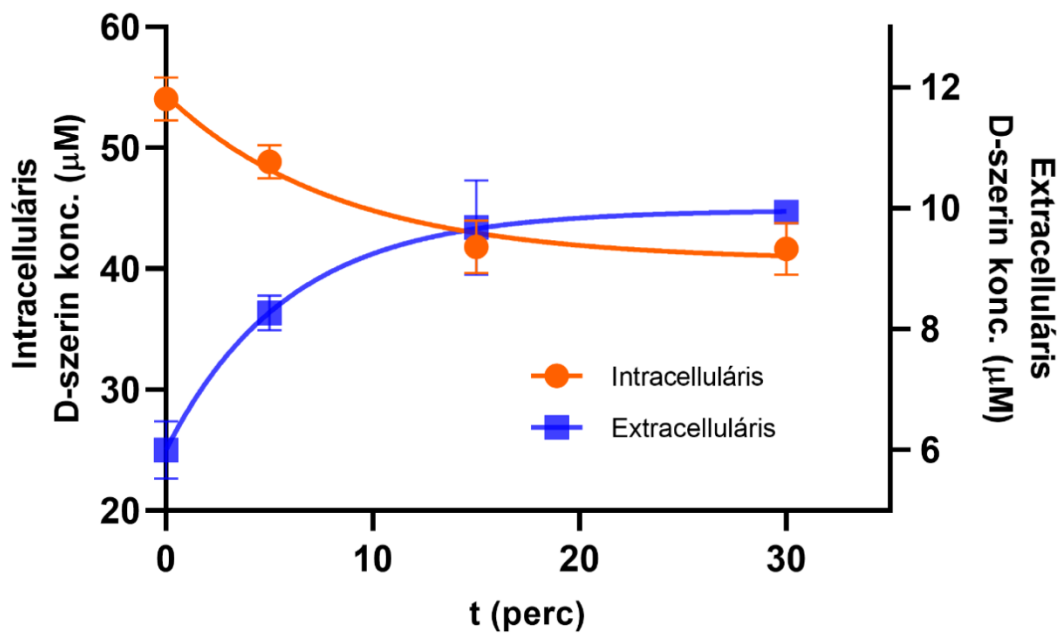
modell megfelelőbb illesztésnek bizonyult mind az SH-SY5Y, mind az asztrocita sejteken. A D-szerin felvételben körülbelül 30%-os csökkenés mutatkozott a nagyobb affinitású gátlási szakaszon, amely az ASCT-1 transzporter közreműködését reprezentálhatja a D-szerin szállításában. A nagyobb affinitású gátlási szakaszhoz tartozó IC_{50} értékek statisztikailag nem különböztek az SH-SY5Y és asztrocita sejteken. Magasabb koncentrációban alkalmazva a t-Pro már gátolja az ASCT-2 transzportert is, ezt mutatja a gátlási görbe második szakasza. A kísérleteinkben alkalmazott legnagyobb t-Pro koncentráció sem okozott teljes gátlást a D-szerin felvételében. A második lépcső eredményei alapján számolt IC_{50} értékek azonban nagy hibával terheltek, ezért nem volt lehetséges az összehasonlításuk a két sejttypusban.

Az L-glutamin koncentrációfüggő, közel teljes gátlást eredményezett a D-szerin transzportban mindkét sejttypusban (3. B ábra). Az L-glutamint az ASCT-2 transzporter preferált szubsztrátjaként említik, azonban kísérletünkben az egylépcső modell jellemezte jobban a gátlás karakterisztikáját az SH-SY5Y és asztrocita sejteken egyaránt. Következésképpen elmondható, hogy az L-glutamin csak mérsékelt affinitásbeli különbséggel rendelkezik az ASCT-1 és ASCT-2 transzportereket illetően. A számított IC_{50} értékek nem különböztek szignifikánsan egymástól az SH-SY5Y és asztrocita sejtek összehasonlítása során.



3. ábra: Az SH-SY5Y és a patkány kortikális asztrocita sejtekbe történő D-szerin transzport gátlása t-Pro és L-glutamin alkalmazásával. A t-Pro kétlépcsős gátlási görbét eredményezett mindkét sejttypusban (A). Egylépéses gátlási görbét figyeltünk meg L-glutamin esetében az SH-SY5Y és az asztrocita sejteknél is (B). A gátlószer hiányában mért intracelluláris D-szerin koncentrációt tekintettük 100%-os felvételnak. Az adatokat átlag \pm SEM formában mutatjuk be ($n \geq 3$).

4.6 Az összehasonlító méréseket követően az SH-SY5Y sejtek D-szerin transzportjának további karakterizálását végeztük el. Az irodalmi adatok alapján az ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek antiporter tulajdonsággal rendelkeznek, tehát egy aminosav felvételekor egy másik leadása is megtörténik párhuzamosan. A D-szerinnel előzetes inkubált (feltöltött) SH-SY5Y sejteken L-szerin hatására időfüggő D-szerin felszabadulás volt mérhető. Ezt az eredményt az intracelluláris D-szerin csökkenése mellett a növekvő extracelluláris D-szerin mennyiség is alátámasztotta (4. ábra).

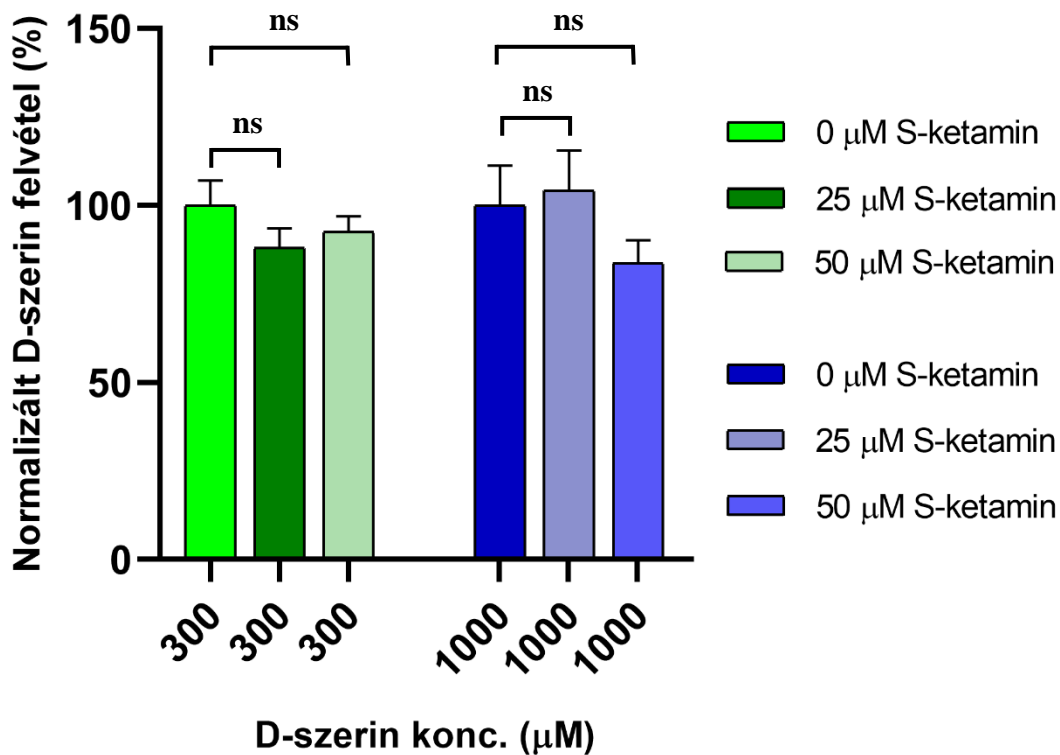


4. ábra: A D-szerin felszabadulása SH-SY5Y asztrocita modell sejteken L-szerin hatására. A D-szerin koncentrációt mind intra-, mind extracellulárisan meghatároztuk. A letapadt SH-SY5Y sejteket 24 órán keresztül kezeltük 100 µM D-szerin tartalmazó tápoldattal. A sejtek mosását és szuszpendálását követően 300 µM L-szerint alkalmaztunk 30 percen keresztül. Az adatokat átlag ± SEM formában mutatjuk be ($n \geq 3$).

4.7 A továbbiakban olyan molekula tesztelését végeztük el, amely irodalmi adatok alapján befolyásolhatja az asztrocita sejtekre jellemző D-szerin transzportot. Korábban *in vitro* kísérletek alapján az S-ketaminnal történő akut kezelés D-szerin transzportot gátló hatásáról számoltak be, és a gátlást az ASCT-2 transzporterhez kötötték. Az általunk végzett kísérletben a 25 µM D-szerin mellett növekvő koncentrációban alkalmazott S-ketamin azonban nem okozott szignifikáns változást a D-szerin felvételben az SH-SY5Y sejteken.

A kompetitív gátlás lehetősége mellett vizsgáltuk a 72 órás S-ketamin előkezelés D-szerin felvételt befolyásoló hatását is. Az SH-SY5Y sejteket 72 óráig inkubáltuk 25, vagy 50 µM S-ketaminnal, illetve S-ketamin nélkül, majd az inkubációs médium eltávolítása után 300 és 1000 µM D-szerint alkalmaztunk 15 percig és az intracelluláris D-szerin szinteket határoztuk meg. A S-ketaminnal nem kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva sem a 25

sem az 50 μM -os S-ketamin kezelés nem okozott szignifikáns változást függetlenül az alkalmazott D-szerin koncentrációtól (5. ábra).



5. ábra: A krónikus S-ketamin kezelés hatása az SH-SY5Y sejtek D-szerin transzportjára. A letapadt SH-SY5Y sejteket 25 vagy 50 μM S-ketaminnal, illetve S-ketamin nélkül tartottuk 72 órán át. A sejteket mostuk és szuszpendáltuk, majd különböző koncentrációjú (300 és 1000 μM) D-szerint tartalmazó pufferben, 15 percig inkubáltuk. Az adatokat átlag \pm SEM formában mutatjuk be ($n \geq 3$).

5. Következtetések

A jelen munka során célul tűztük ki a D-szerin mennyiségének *in vivo* és *in vitro* körülmények között történő vizsgálatát, befolyásolási lehetőségeinek tanulmányozását. Elsőként egy újonnan fejlesztett DAAO gátló vegyület egereken történő tesztelését végeztük el. Ezt követően célunk volt az SH-SY5Y sejt vonal D-szerin transzportjának részletes karakterizálása, illetve az asztrocita sejtekkel való összehasonlítása annak megállapítására, hogy a sejt vonal alkalmas-e az asztrociták D-szerin transzportjának modellezésére. Végül az S-ketamin D-szerin transzportot befolyásoló farmakológiai hatását vizsgáltuk meg.

- Az előzetes vizsgálatok alapján a 6-fluor-1H-indazol-3-ol vegyület került kiválasztásra, hogy *in vivo* körülmények között teszteljük. Célunk volt az egerek plazma D-szerin szintjében bekövetkező változás vizsgálata a DAAO gátló vegyület és D-szerin együttes kezelés hatására. A kísérletünk eredménye alapján a 6-fluor-1H-indazol-3-ol hatására szignifikánsan megemelkedett az állatok plazma D-szerin koncentrációja. A hatás a kezelést követően már a 10. percben kialakult és a 60. percben is megtartott volt. Eredményeink a 6-fluor-1H-indazol-3-ol *in vivo* DAAO gátló hatását igazolják.

Kísérleteinkben igazoltuk, hogy az SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejt vonal alkalmas a D-szerin transzport vizsgálatára. A folyamatot az asztrocita sejteken tapasztalható D-szerin transzporttal hasonlítottuk össze és megállapítottuk, hogy:

- az SH-SY5Y sejt vonalon döntően Na^+ -függő D-szerin transzport játszódik le, hasonlóan az asztrocita sejteknél tapasztaltakhoz. Az asztrocita sejtekre jellemző, Na^+ függő, D-szerin szállításban résztvevő transzporterek az ASCT-1 és az ASCT-2. Ezek működését igazolta a D-szerin felvétel kinetikai vizsgálata mind az SH-SY5Y sejt vonalon, mind az asztrocita sejteken, amelyet a fehérjék Western blot módszerrel történő kimutatása is megerősített az SH-SY5Y sejt vonalon.
- A D-szerin felvétel t-Pro által okozott kétlépcsős gátlása mind a két sejt típusban arra utal, hogy az ASCT-1 és ASCT-2 is részt vesz a D-szerin szállításában.
- Kísérleteinkben az L-glutamin nem bizonyult az ASCT-2 transzporter preferált szubsztrátjának sem az SH-SY5Y, sem az asztrocita sejteken.

- Az általunk vizsgált valamennyi ASCT szubsztrát aminosav (L-alanin, L-treonin, t-Pro, L-glutamin) azonos karakterű gátlást eredményezett mind az SH-SY5Y, mind az asztrocita sejteken. A kísérletek során számolt IC₅₀ értékek nem különböztek egymástól a két sejtípus összehasonlításakor. Ezek az eredmények az SH-SY5Y sejt vonal asztrocita modellként való felhasználhatóságát támasztják alá.

Az SH-SY5Y asztrocita sejtmodell további karakterizálást L-szerinnel végzett kísérletekkel végeztük el.

- Az L-szerin D-szerin felszabadulást okoz az előzetesen D-szerinnel inkubált sejtekből, ami megerősíti, hogy az SH-SY5Y sejt vonalon funkcionáló ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek rendelkeznek kicserélődési funkcióval, így szerepet játszanak az aminosavak felvétele mellett az aminosavak felszabadításában is.

Az S-ketamin D-szerin felvételre gyakorolt hatását az SH-SY5Y asztrocita sejtmodellel teszteltük.

- Az S-ketamin nem befolyásolja az asztrocita jellegű D-szerin transzportot az SH-SY5Y sejt vonalon sem akután, sem hosszan tartó előkezelést követően.

A D-szerin extraelluláris mennyiségének befolyásolása ígéretes lehet számos központi idegrendszeri megbetegedés kapcsán. A téma leginkább vizsgált területe a DAAO enzim gátló vegyületek, azonban a meggyőző klinikai eredmények még váratnak magukra.

A másik támadási pont a D-szerin transzport lehet, melyben fontos szerepet játszanak az asztrocita sejtek a központi idegrendszerben. Eredményeink alapján az SH-SY5Y neuroblasztóma sejt vonal alkalmas asztrocita modell, amely egy egyszerűen alkalmazható, gyors és robusztus munkafolyamatot biztosít az asztrocita jellegű D-szerin transzport befolyásolhatóságának tanulmányozására, állatok feláldozása nélkül.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

1. **Vincze I**, Lakatos PP, Bagaméry F, Tábi T, Szökő É
Characterization of a Cell Line Model for d-Serine Uptake.
JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS
Kötet: 187, oldalak: 113360, 2020, doi:10.1016/j.jpba.2020.113360
Folyóiratcikk/Szaccikk/Tudományos
IF: 3,209 (2019)
2. Lakatos PP, **Vincze I**, Nyariki N, Bagaméry F, Tábi T, Szökő É
The effect of L-theanine and S-ketamine on D-serine cellular uptake
BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-PROTEINS AND PROTEOMICS
Kötet: 1868, oldalak: 140473, 2020, doi:10.1016/j.bbapap.2020.140473
Folyóiratcikk/Szaccikk/Tudományos
IF: 2,371 (2019)
3. Szilagyi B, Kovacs P, Ferenczy GG, Racz A, Nemeth K, Visy J, Szabo P, Ilas J, Balogh GT, Monostory K, **Vincze I**, Tábi T, Szökő É, Keserű MGY
Discovery of isatin and 1H-indazol-3-ol derivatives as d-amino acid oxidase (DAAO) inhibitors
BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY
Kötet: 26, oldal: 1579-1587., 2018, doi:10.1016/j.bmc.2018.02.004
Folyóiratcikk/Szaccikk/Tudományos
IF: 2,802

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

1. Bagaméry F, Varga K, Kecsmár K, **Vincze I**, Szökő É, Tábi T
The Impact of Differentiation on Cytotoxicity and Insulin Sensitivity in Streptozotocin Treated SH-SY5Y Cells
NEUROCHEMICAL RESEARCH
In press p. In press (2021), doi:10.1007/s11064-021-03269-2
Folyóiratcikk/Szaccikk/Tudományos
IF: 3,038 (2019)

2. **Vincze I**, Rudge J, Vasarhelyi B, Karvaly GB
Analysis of 14 drugs in dried blood microsamples in a single workflow using whole blood and serum calibrators
 BIOANALYSIS
 Kötet: 12, oldal:1243-1261., 2020, doi:10.4155/bio-2020-0179
 Folyóiratcikk/Szaccikk/Tudományos
IF: 2,371 (2019)

3. Karvaly, GB, Neely M, Kovács K, **Vincze I**, Vásárhelyi B, Jelliffe RW
Development of a methodology to make individual estimates of the precision of liquid chromatography-tandem mass spectrometry drug assay results for use in population pharmacokinetic modeling and the optimization of dosage regimens
 PLOS ONE
 Kötet: 15, oldalak: e0229873, 2020, doi:10.1371/journal.pone.0229873
 Folyóiratcikk/Szaccikk/Tudományos
IF: 2,740

4. Bagaméry F, Varga K, Kecsmár K, **Vincze I**, Szökő É, Tábi T
Lack of insulin resistance in response to streptozotocin treatment in neuronal SHSY5Y cell line
 JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION
 Kötet: 127, oldal: 71-80., 2020, doi:10.1007/s00702-019-02118-5
 Folyóiratcikk/Szaccikk/Tudományos
IF: 3,505 (2019)

5. Zachar G, Jakó T, **Vincze I**, Wagner Zs, Tábi T, Bálint E, Mezey Sz, Szökő É, Csillag A
Age-related and function-dependent regional alterations of free L- and D-aspartate in postembryonic chick brain
 ACTA BIOLOGICA HUNGARICA
 Kötet: 69, oldal: 1-15., 2018, doi:10.1556/018.68.2018.1.1
 Folyóiratcikk/Szaccikk/Tudományos
IF: 0,679

6. Szökő É, **Vincze I**, Tábi T
Chiral separations for d-amino acid analysis in biological samples
 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS
 Kötet: 130, oldal: 100-109., 2016, doi:10.1016/j.jpba.2016.06.054
 Folyóiratcikk/Összefoglaló cikk/Tudományos
IF: 3,255

8. Ulakcsai Zs, Bagamery F, **Vincze I**, Szökő É, Tábi T
Protective effect of resveratrol against caspase 3 activation in primary mouse fibroblasts.
CROATIAN MEDICAL JOURNAL
Kötet: 56, oldal: 78-84., 2015, doi:10.3325/cmj.2015.56.78
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
IF: 1,483