

HPLC metodikák alkalmazása neurológiai megbetegedések preklinikai és klinikai vizsgálatára

című Ph.D. tézis összefoglalója

Veres Gábor Pharm.D.

Szeged

2017

HPLC metodikák alkalmazása neurológiai megbetegedések preklinikai és klinikai vizsgálatára

című Ph.D. tézis összefoglalója

Veres Gábor Pharm.D.

Kísérletes és Klinikai Idegtudományok képzési program

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető:

Dr. Zádori Dénes

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ

Neurológiai Klinika

Szeged

2017

A Ph.D. értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó eredeti közlemények:

I. **Veres G**, Molnár M, Zádori D, Szentirmai M, Szalárdy L, Török R, Fazekas E, Ilisz I, Vécsei L, Klivényi P. Central nervous system-specific alterations in the tryptophan metabolism in the 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015 13: 115–24. **(IF: 2,537)**

II. **Veres G**, Fejes-Szabó A, Zádori D, Nagy-Grócz G, László AM, Bajtai A, Mándity I, Szentirmai M, Bohár Z, Laborc K, Szatmári I, Fülöp F, Vécsei L, Párdutz Á. A comparative assessment of two kynurenic acid analogs in the formalin model of trigeminal activation: a behavioral, immunohistochemical and pharmacokinetic study. *J Neural Transm.* 2017 124: 99-112. **(IF (2015): 2,587)**

III. Török R, Salamon A, Sümegi E, Zádori D, **Veres G**, Molnár MF, Vécsei L, Klivényi P. Effect of MPTP on mRNA expression of PGC-1 α in mouse brain. *Brain Res.* 2017 1660: 20-26. **(IF (2015): 2,561)**

IV. **Veres G**, Szpisjak L, Bajtai A, Siska A, Klivényi P, Ilisz I, Földesi I, Vécsei L, Zádori D. The establishment of tocopherol reference intervals for Hungarian adult population using a validated HPLC method. *Biomed Chromatogr.* 2017 e3953: 1-8. **(IF (2015): 1,729)**

A kapcsolódó közlemények impakt faktora összesen: **9,414**

A Ph.D. értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

Samavati R, Zádori F, Szűcs E, Tuka B, Martos D, **Veres G**, Gáspár R, Mándity I, Fülöp F, Vécsei L, Benyhe S, Borsodi A. Kynurenic acid and its analogue can alter the opioid receptor G-protein signaling after acute treatment via NMDA receptor in rat cortex and striatum. *J Neurol Sci.* 2017 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2017.02.053>. **(IF (2015): 2,126)**

Zádori D, **Veres G**, Szalárdy L, Klivényi P, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L. Inhibitors of the kynurenine pathway as neurotherapeutics: A patent review (2012–2015)

Expert Opin Ther Pat, 2016 26: 815-832. **(IF (2015): 4,626)**

Török R, Kónya JA, Zádori D, Veres G, Szalárdy L, Vécsei L, Klivényi P. mRNA expression levels of PGC-1alpha in a transgenic and a toxin model of Huntington's disease. Cell Mol Neurobiol. 2015 35: 293-301. **(IF: 2,328)**

Zádori D, Veres G, Szalárdy L, Klivényi P, Vécsei L. Drug-induced movement disorders. Expert Opin Drug Saf. 2015 14: 877-890. **(IF: 2,896)**

Fejes-Szabó A, Bohár Z, Vámos E, Nagy-Grócz G, Tar L, Veres G, Zádori D, Szentirmai M, Tajti J, Szatmári I, Fülöp F, Toldi J, Párdutz Á, Vécsei L. Pre-treatment with new kynurenic acid amide dose-dependently prevents the nitroglycerine-induced neuronal activation and sensitization in cervical part of trigemino-cervical complex. J Neural Transm. 2014 121: 725-738. **(IF: 2,402)**

Grozdics E, Berta L, Gyarmati B, Veres G, Zádori D, Szalárdy L, Vécsei L, Tulassay T, Toldi G. B7 Costimulation and intracellular indoleamine 2,3-dioxygenase expression in umbilical cord blood and adult peripheral blood. Biol Blood Marrow Transplant. 2014 20: 1659-1665. **(IF: 3,404)**

Grozdics E, Berta L, Bajnok A, Veres G, Ilisz I, Klivényi P, Rigo J Jr, Vécsei L, Tulassay T, Toldi G. B7 costimulation and intracellular indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) expression in peripheral blood of healthy pregnant and non-pregnant women. BMC Pregnancy Childbirth. 2014 14: 306-315 **(IF: 2,190)**

Zádori D, Veres G, Szalárdy L, Klivényi P, Toldi J, Vécsei L. Glutamatergic dysfunctioning in Alzheimer's disease and related therapeutic targets. J Alzheimers Dis. 2014 42: S177-S187. **(IF: 4.151)**

A nem kapcsolódó közlemények impakt faktora összesen: **24,123**

Összesített impakt faktor: **33,537**

1 Bevezetés

A neurológiai megbetegedések, mint a fejfájás (migrén, tenziós fejfájás), Alzheimer-kór (AD) és egyéb demenciák, szklerózis multiplex, Parkinson-kór (PD) és epilepszia, felelősek világszerte a betegségek általi terhelés 3 százalékáért. Bár ez a szám kicsinynek tűnhet, ezek a betegségek tartoznak azok közé amik a legtöbb rokkantsággal eltöltött életévvel járnak.

A neurodegeneratív betegségek (AD, PD, Huntington-kór (HD)) ugyan kisebb százalékát érintik a népességnek, de jelenleg egyikre sincs tényleges gyógymód, csak tüneti terápia. A rendelkezésre álló kezelési lehetőségek (a PD kivételével) hatásfoka is elmarad az optimálistól. Ennek háttérében a komplex és részben felderítetlen patomechanizmusok állnak. A neurodegeneráció progresszív neuron vesztéssel jellemezhető, ami súlyos neuronális diszfunkcióhoz vezet köszönhetően különböző genetikai mutációknak és környezeti faktoroknak. Annak ellenére, hogy a molekuláris és sejtszintű folyamatok jól körülírtak, mint mitokondriális diszfunkció és emelkedett szabadgyök-képződés, glutamát excitotoxicitás, lerakódott fehérje aggregátumok, gyulladás és megváltozott génexpresszió, ezek a folyamatok nehezen befolyásolhatóak.

A neurológiai tudományok fő célja az idegrendszer vizsgálata fiziológias és patológias körülmények között a betegségek diagnosztizálásához, prevenciójához és kezeléséhez szükséges ismeretek felderítésére. Nagy része a kutatásoknak új biomarkerek keresésére fókuszál, amelyek nem csak a patomechanizmusok vizsgálata során szükségesek, hanem új gyógyszerek hatásának monitorozása során is jelentős szereppel bírnak.

Humán és állatkísérletes tanulmányok alapján feltételezzük, hogy a trigeminális rendszerben, ami a fej területén érzett fájdalom feldolgozásáért felelős, a glutamát receptorain (főleg az N-metil-D-aszpartát receptoron (NMDAR)) keletkező ingerlés fontos szerepet játszik a fájdalom mechanizmusában. A triptofán (TRP) metabolizmusának kinurenin útvonala (KP) egy alaposan kutatott terület, főleg a kinurénsav (KYNA) kimutatható endogén protektív hatásának köszönhetően az ugyanezen útvonalon képződő kinolinsav (QUIN) és 3-hidroxikinurenin (3-OHK) excitotoxicitást és oxidatív stresszt előidéző hatásaival szemben. Ezt a hatást a KYNA főleg az NMDAR-ok nem-szelektív antagonistájaként éri el. A glutamáterg neurotranszmisszió gátlása a fejfájás terápiájában egy lehetséges célpont, ezért a KYNA és analógjai központi szereppel bírnak új, potenciálisan protektív vegyületek tesztelése során. Az egyik, preklinikai

vizsgálatok során gyakran használt állatkísérletes modell az orofaciális formalin teszt, amivel a fájdalom perifériás és centrális komponenseit is meg lehet figyelni.

A HD egy autoszómális domináns módon öröklődő neurodegeneratív betegség, ami kognitív, pszichiátriai és motoros tünetekkel jár. A betegség során képződő mutáns huntingtin fehérje által okozott patológiás elváltozások teljes mechanizmusa még nem ismert, de a legelfogadottabb elméletek szerint az excitotoxicitás és mitokondriális zavarok jelentős szereppel bírnak. A glutamáterg excitotoxicitás főleg az NMDAR-ok közvetítésével jön létre és számos bizonyíték van arra, hogy a TRP metabolizmus KP útvonalán képződő vegyületek koncentrációi is változnak HD során. A 3-nitropropionsav (3-NP) a mitokondriumban található légzési lánc II-es komplexét károsítja, aminek csökkent működését HD-ben is kimutatták, ezért a 3-NP kezelést gyakran használják a betegség állatkísérletes toxin modelljeként.

A genetikai hajlamon kívül egyes környezeti faktorok szintén hozzájárulhatnak neurodegeneratív betegségek kialakulásához, aminek egyik kiemelkedő példája az 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) által okozott toxinindukált PD. Az MPTP hatására a mitokondriális légzési lánc I-es komplexe károsodik főleg a nigrostriátális rendszer területén, ami hasonló tünetekkel jár, mint a PD-re jellemző dopaminerg neuronvesztés és mitokondriális diszfunkció a substantia nigra pars compacta területén. A dopamin (DA) koncentrációjának folyadékromatográfiás (HPLC) meghatározásával a PD állatkísérletes toxinmodelljeiben a neuronális károsodás gyorsan és pontosan követhető.

A mitokondrium működésének zavarai, valamint egyes anyagok (pl.: 3-OHK, QUIN) hatására keletkezett reaktív szabadgyökök (RS) a központi idegrendszerre különösen károsak és a legtöbb neurológiai betegség hátterében kimutathatóak. Az RS képződésének mérséklésére a szervezetben komplex antioxidáns rendszer áll rendelkezésre, amelynek egyik nem-enzimikus része az E-vitamin, ami négy tokoferolt és négy tokotrienolt foglal magába. Csökkent tokoferol koncentrációkat már több neurológiai tünet kapcsán is mértek, úgy mint: cerebelláris ataxia, demencia, perifériás neuropátia és miopátia. Tokoferol hiány többnyire felszívódási zavarok, abetalipoproteinémia vagy E-vitamin hiányos ataxia (AVED) miatt alakulhat ki. Mivel e betegségek differenciáldiagnózisa komoly kihívást jelent, a szérumban tokoferol koncentrációjának mérése segítséget nyújthat az orvosok számára a megfelelő diagnózis és terápia felállításában.

2 Célkitűzések

I., Két KYNA analóg (KA-1: N-(2-N,N-dimetilaminoetil)-4-oxo-1H-quinolin-2-karboxamid hidroklorid és KA-2: N-(2-N-pirrolidinilet)-4-oxo-1H-quinolin-2-karboxamid hidroklorid) farmakokinetikai összehasonlítása a protektív mechanizmusok felderítése végett a fejfájás orofaciális formalin modelljében.

II., A KP kezdeti vegyületeinek koncentrációbeli változásainak vizsgálata a TRP metabolizmusában 3-NP kezelést követően a HD toxin modelljében.

III., Nigrostriátális sérülés biokémiai karakterizálása MPTP kezelés hatására bekövetkezett PGC1- α szövetspecifikus expresszió változásának során.

IV., Szérum tokoferol koncentrációinak referencia intervallumainak meghatározása a felnőtt magyar populációban.

3 Anyagok és módszerek

Anyagainkat kereskedelmi forgalomból szereztük be a KA-1 és 2 kivételével, melyek szintézise a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszerkémiai Intézetében történt. Állatainkat standard laboratóriumi körülmények között tartottuk és a rajtuk végzett kísérletek megfeleltek a nemzetközi (International Association for the Study of Pain) és európai (Európai Gazdasági Közösség; 86/609/ECC) irányelveknek. A humán kísérleteinkben részt vevő alanyok írásos beleegyezésüket adták a Helsinki Deklarációnak megfelelően.

A KYNA analógok farmakológiai összehasonlítása során felnőtt Sprague-Dawley patkányokat használtunk, melyeket 1 mmol/kg előkezelést követően 15, 30, 60, 120 és 300 perccel feldolgoztunk. A szérum és agyi mintákban a vizsgált vegyületek koncentrációját HPLC-vel mértük, a KYNA-t fluoreszcens (FLD) detektálással, a 3-nitro-L-tirozint (3NLT) mint belső standardot UV detektálással, a KYNA amidokat pedig tömegspektrometriás módszerrel.

A HD toxinmodell vizsgálata során 5 hónapos hím C57Bl/6 egereket alkalmaztunk akiket 18 nappal a 3-NP kezelést követően dolgoztunk fel HPLC méréshez. Az állatok szérumból és

agyi mintáiból (striátum, cortex, hippocampus, cerebellum és agytörzs) a KYN-t és 3-NLT-t UV detektálással, a TRP-t és KYNA-t fluoreszcens detektálással, a 3-OHK-t izoproterenol (IPR) belső standarddal pedig elektrokémiai detektálással (ECD) határoztuk meg.

A PD toxinmodell tanulmányozásakor 12 hetes hím C57Bl/6 egerek kaptak MPTP kezelést két különböző oltási séma alapján. Az akut kezelések során egy nap alatt 5 oltás volt 2 órás intervallumokban, míg a krónikus kezelés napi egy oltásból állt 12 napon keresztül. Az akut csoportban levő állatokat két részre osztottuk, az egyik csoportot 90 perccel az utolsó oltást követően, a másikat pedig egy héttel később dolgoztuk fel. A krónikus oltási sémát követően az állatok 90 perccel az utolsó oltás után kerültek feldolgozásra. Az állatok striátumából HPLC-ECD-vel mértük a DA-t és metabolitjait, a 3,4-dihydroxifenilecetsavat (DOPAC) és a homovanillinsavat (HVA) IPR belső standarddal.

Tokoferol méréseink során a felnőtt magyar populációt vizsgáltuk két csoportban, kontroll és egyéb neurológiai betegségben szenvedő (OND) alanyokkal. Kizártuk a vizsgálatból azokat, akik bármilyen koleszterolszint-csökkentő terápiában részesülnek vagy E-vitamint tartalmazó étrendkiegészítőt szednek. Az OND csoportból továbbá kizártuk az ataxia, miopátia vagy kognitív diszfunkció tüneteit mutató betegeket, valamint a kontroll csoportból kizártuk azokat, akik bármilyen krónikus betegségben szenvednek. A férfiak és nők száma minden csoportban egyenlő volt és életkorban is ugyanolyan eloszlásúak voltak. Az alanyok szérumból α -, γ - és δ -tokoferolok koncentrációit mértük HPLC-vel fotodiódosoros UV detektálás mellett.

Mindegyik mérési módszerünket validáltuk, ami magába foglalta a szelektivitás, detektálási limit, meghatározhatósági limit, precizitás és visszamérhetőség meghatározását.

4 Eredmények

A KYNA amidok koncentrációja a patkányok szérumban beadást követően gyorsan emelkedik, ami az első órában gyorsan csökken is, és 5 óra múlva már csak nyomokban kimutatható. A KA-2 maximum koncentrációja kisebb, mint a KA-1-é, viszont csökkenése időben jobban elhúzódik. A KYNA amidok beadását követően a KYNA koncentrációjának emelkedését tapasztaltuk, ami a KA-2 esetében nagyságrendekkel nagyobb volt, mint a KA-1 esetében. A patkányok agyi mintáiban KA-1-et nem sikerült detektálni, a KA-2 maximum

koncentrációját egy óránál érte el és ezután fokozatosan csökkent. A KYNA szintek emelkedése a két analóg esetében hasonló kinetikát mutatott.

3-NP toxinkezelést követően az egerek szérumában és a vizsgált agyi régiókban KYNA koncentráció eltérést nem észleltünk. TRP esetében jelentős csökkenést tapasztaltunk a kontroll csoporthoz képest mindegyik vizsgált agyi régióban, míg a szérumban nem volt különbség. Továbbá a cortex KYN koncentrációja és a cerebellum 3-OHK szintje csökkent a toxinkezelés hatására. A KP metabolizmus jellemzésére gyakran használt KYN/TRP arányt mi is kiszámoltuk a méréseink alapján és a 3-NP-vel kezelt csoport striátumában, hippocampusában, cerebellumában és agytörzsében szignifikáns emelkedést észleltünk.

MPTP kezelés hatására a striátális DA, DOPAC és HVA szintek jelentősen csökkentek az akut kezelési séma alkalmazásakor 90 perccel az utolsó oltást követően, továbbá ez a különbség egy héttel az utolsó oltást követően is kimutatható volt. A krónikus kezelési séma esetén csak a HVA koncentrációja csökkent, DA és DOPAC esetében nem tudtunk különbséget kimutatni.

Tokoferol méréseink során a kontroll és OND csoport között nem találtunk különbséget, ezért az alanyokat egy csoportba összesítettük. Az alsó (2,5%) és felső (97,5%) referencia intervallumot meghatároztuk a mért értékekből, amelyek pozitív korrelációt mutattak az életkorral. Az alanyok koleszterollal korrigált értékei esetén az életkorral való korreláció megszűnt és a referencia intervallumokat ezekre az értékekre is kiszámoltuk.

5 Megbeszélés

Bioanalitikai mérések központi szerepet játszhatnak a differenciáldiagnózis folyamatában és ennek megfelelően a preklinikai és klinikai kutatások jelentős hányada új biomarkerek felfedezésére fókuszál. Az analitikai módszerek közül a HPLC az egyik legnépszerűbb, mert különböző anyagok széles spektrumának gyors és robusztus meghatározását teszi lehetővé.

A KYNA amidokkal végzett kísérleteink során szerettük volna felderíteni a fájdalom orofaciális formalin modelljében tapasztalt hatások farmakokinetikai hátterét, mivel a KA-1 és KA-2 is pozitív hatást fejtett ki, azonban az utóbbié kifejezettebb volt. Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a magatartásbeli és immunohisztokémiai eltérések hátterében a KYNA analógok kezelése során különböző mértékben emelkedett KYNA koncentráció a felelős. Továbbá, mivel a központi idegrendszerben nem volt különbség a KYNA koncentrációban és

a KYNA amidok nem vagy csak kis koncentrációban voltak detektálhatóak, a tapasztalt hatásért valószínűleg csak a perifériás KYNA szintjének emelkedése áll. Ezt a jelenséget a trigeminális fájdalom érző rostokon is megtalálható NMDAR által mediált neurotransmisszió gátlásával lehet magyarázni.

A TRP metabolizmus és azon belül is a KP vizsgálatára egy másik kísérletsorozatban a HD genetikai modelljeiben már leírt elváltozásokat szeretnénk volna megerősíteni a betegség 3-NP toxinmodelljében. A HD YAC128 transzgenikus egér modelljében emelkedett indolamin dioxigenáz-1 enzim aktivitást mutattak ki, ami a TRP KYN-né való metabolizmusát katalizálja, továbbá egyéb transzgenikus modellekben a KYNA és 3-OHK koncentráció emelkedését írták le. Vizsgálataink során emelkedett KYN/TRP arányt észleltünk a striátum, hippocampus, cerebellum és agytörzs területén, ami a TRP katabolizmus magasabb aktivitására utal hasonlóan a YAC128 transzgenikus modellhez. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a genetikai modellek jobbak lehetnek a HD tanulmányozására, a velük végzett kísérletek idő és pénzigényesek, ezzel ellentétben a 3-NP toxinmodell gyorsabb és költségkímélő, ezért javasoljuk ennek a modellnek pilot vizsgálatként való használatát a transzgenikus állatokon végzett kísérletek előtt.

DA méréseink során célunk az MPTP toxin kezelés hatására bekövetkezett DA, DOPAC és HVA koncentráció-csökkenés megerősítése, ami a modell megfelelő működését jelzi. Az alkalmazott akut kezelési sémánk a szakirodalomban leggyakrabban használt sémák alapján lett megtervezve. Hisztokémiai módszerekkel már többször leírták, hogy ezeknél a kezeléseknél striátális dopaminerg neuronvesztés látható, aminek megfelelően a DA és metabolitjainak szintje jelentősen csökken. Ezt a koncentrációbeli visszaesést a saját vizsgálatainkban akut séma alkalmazásakor 90 perccel és egy héttel az utolsó oltást követően is ki tudtuk mutatni. Továbbá szeretnénk volna egy csökkentett dóziséjú, hosszabb ideig tartó kezelési sémát is tesztelni, hogy vajon alkalmas-e a PD-re jellemző DA szint csökkenést modellezni és a betegség mechanizmusában szerepet játszó tényezők tanulmányozására. A 12 napon keresztül MPTP-vel alacsony dózisban kezelt egereknél csak a HVA koncentráció csökkenését sikerült kimutatni, sem a DA szintjében, sem a PGC1- α expressziójában nem észleltünk változást.

A tokoferol szérumszintjeit gyakran tokoferol/koleszterol arányként adják meg, mivel különböző lipidszintek befolyásolhatják az eredményt. Ez azonban egyes esetekben félrevezető lehet, ugyanis például malnutrició befolyásolhatja a lipid homeosztázist és ennek következtében

a koleszterollal korrigált koncentrációk nem adnak teljes képet a tokoferol szintekről. Ezért mi a vizsgálataink során a tokoferolok korrigált és korrigálatlan értékeire is kiszámoltuk a megfelelő referencia intervallumokat és javasoljuk, hogy a diagnosztikai eljárás során az orvosok mind a kettő ismeretében értékeljék a betegek E-vitamin státuszát.

Az összes metodikánk beállítása során nagy hangsúlyt fektettünk a mérési módszerek validálására és belső standardok használatára. A metodikák robusztussága és a mérések megismételhetősége érdekében ezek elengedhetetlen dolgok, különösen igaz ez a tokoferol mérésére, ahol a mintaelőkészítés sok lépésből áll és az analit koncentrációja könnyen változhat az eredetihez képest. Ennek ellenére az orvosi/biológiai szakirodalomban még mindig gyakran találkozhatunk validálás nélkül közölt mérési eredményekkel, amelyek megismételhetősége kérdéses.

6 Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni őszinte hálámat témavezetőmnek, Dr. Zádori Dénesnek kutatómunkám irányításáért és példamutatásáért a tudományos kutatómunka terén.

Köszönettel tartozom még Prof. Vécsei Lászlónak, a Neurológiai Klinika vezetőjének, amiért lehetővé tette, hogy a klinikán dolgozhassak, valamint Prof. Klivényi Péternek az évek során nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak, Maszlag-Török Ritának, Dr. Bohár Zsuzsannának, Dr. Fejes-Szabó Annamáriának, Molnár Máténak, Vágvölgyi-Sümegei Evelinnek és Dr. Szalárdy Leventének valamint hallgatóinknak, Bajtai Attilának és Szentirmai Mártonnak, amiért rengeteget segítettek a munkámban.

Külön köszönet illeti Dr. Ilisz Istvánt az SZTE-TTIK Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékről és Dr. Mándity Istvánt az SZTE-GYTK Gyógyszerkémiai Intézetéből a HPLC metodikafejlesztéssel kapcsolatos segítségükért, valamint Dr. Szatmári Istvánt és Prof. Fülöp Ferencet az SZTE-GYTK Gyógyszerkémiai Intézetéből a KYNA analógok szintetizálásáért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak a kitartó támogatásukat és türelmüket, amit a tanulmányaim során nyújtottak.