

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2218.

JAKÓ TAMÁS

Experimentális és klinikai farmakológia
című program

Programvezető: Dr. Szökő Éva, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Szökő Éva, egyetemi tanár

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

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	6
1.1 Az excitátoros aminosavak, receptoraik és a tanulási folyamatok ismertetése.....	6
1.2 Excitotoxikus folyamatok, az NMDA receptor szerepe különböző patológiás folyamatokban.....	11
1.3. A D-aminosavak előfordulása a természetben.....	12
1.3.1 Kiralitás.....	12
1.3.2 D-aminosavak az idegrendszeri szabályozásban.....	14
1.4 Mikrodialízis.....	17
1.5 Elválasztástechnikai módszerek és összehasonlításuk.....	19
1.5.1 Kapilláris elektroforézis.....	21
1.5.1.1 Kapilláris zónaelektroforézis és elméleti háttere.....	23
1.5.2 Királis elválasztás.....	26
1.5.2.1 Királis szelektorok.....	27
1.5.3 Detektálási módszerek.....	31
1.5.4 Fluoreszcens származékképzés.....	34
2. Célitűzés.....	40
3. Módszerek.....	41
3.1 Felhasznált anyagok.....	41
3.2 Készülékek.....	42
3.3 Származékképzés.....	42
3.4 Elválasztási körülmények.....	43
3.5 Állatkísérletek.....	43
3.5.1 Szövetekből történő meghatározáshoz használt állatok.....	43
3.5.2 Tanulási folyamatok vizsgálata szövetmintákból.....	44
3.5.3 Szövet és mikrodialízis minták az excitátoros aminosavak méréshez.....	45
3.5.3.1 Szövetminták a kémiai vizsgálathoz.....	45
3.5.3.2 Mikrodialízis szonda beültetése.....	46
3.5.3.3 Mikrodialízis procedúra.....	46

3.5.4 Szövetminták a D-serin és D-aszpartát egyidejű meghatározásához.....	47
3.6 Módszervalidálás.....	47
3.7 Statisztikai és számítási módszerek.....	48
4. Eredmények.....	50
4.1 CE-LIF módszer kidolgozása.....	50
4.1.1 A származékképzés optimalizálása.....	50
4.1.2 Az elválasztási körülmények optimalizálása.....	51
4.1.3 A módszer validálása.....	58
4.2 Biológiai minták analízise.....	59
4.2.1 D-serin és D-aszpartát agyterületek közötti eloszlásának vizsgálata.....	59
4.2.2 Az aszpartát enantiomerek és glutamát enantiomerek agyterületek közötti eloszlásának vizsgálata.....	62
4.2.3 Az aszpartát enantiomerek és L-glutamát extracelluláris koncentrációjának meghatározása mikrodializátum mintákban.....	67
4.2.3.1 Mennyiségi változása tanulás/jutalmazás hatására, kémiai depolarizáció hatására.....	67
4.2.3.2 Az aminosavak agyi és extracelluláris mennyiségeinek összehasonlítása.....	68
5. Megbeszélés.....	70
5.1 Módszerfejlesztés.....	71
5.1.1 Származékképzés.....	71
5.1.2 Elválasztási körülmények optimalizálása.....	72
5.2 A módszer teljesítőképessége.....	77
5.3 Szövetminták és mikrodializátumok vizsgálata.....	80
5.3.1 D-serin és D-aszpartát meghatározása C57BL/6 egerekből.....	80
5.3.2 Aszpartát és glutamát enantiomerek vizsgálata szöveti extraktumból, valamint mikrodializátumból.....	81
6. Következtetések.....	84
7. Összefoglalás.....	86
8. Irodalomjegyzék.....	88
9. Saját publikációk jegyzéke.....	107
10. Köszönetnyilvánítás.....	108

Rövidítések jegyzéke

Ac: Nucleus Accumbens

ACSF: Artificial Cerebrospinal Fluid

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid

Amy: Amygdala

APOC: (1/2)-1-(9-anthryl)-2-propyl chloroformate

Arco: Arcopallium

CBQCA: 3-(4-carboxybenzoyl)quinolone-2-carboxaldehyde

CE: Capillary Electrophoresis

CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl ester

CZE: Capillary Zone Electrophoresis

DAAO: D-amino acid oxidase

DDO: D-aspartate oxidase

DM- β -CD: Heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin

EAA: Excitatory amino acid

EAAT: Excitatory amino acid transporter

EOF: Electro-osmotic flow

FACE SH: 2-((5-fluoresceinyl)aminocarbonyl)ethyl mercaptan

FITC: Fluorescein isothiocyanate

FQ: 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde

GABA: Gamma-aminobutyric acid

GC: Gas chromatography

GLM: General Linear Model

HEPES: 2-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)ethanesulfonic acid

HP- β -CD: Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

HPA- β -CD: 6-monodeoxy-6-mono(3-hydroxyl)propylamino- β -cyclodextrin

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

iMM: Intermediate medial mesopallium

KIR: Központi Idegrendszer

LIF: Laser Induced Fluorescence

LOD: Limit of Detection

LOQ: Limit of Quantification

LTD: Long-term depression

LTP: Long-term potentiation

MS: Mass spectrometer

MEKC: Micellar Electrokinetic Chromatography

mSt: Medial striatum

NDA: Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde

NBD-Cl: 4-chloro-7-nitrobenzofurazan

NBD-F: 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan

NMDA: N-methyl-D-aspartate

OPA: Ortho-phthalaldehyde

Ptctx: Parietalis cortex

PDA: Photodiode array

SVZ: Subventricular zone

QC: Quality control

TEMED: N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine

TM- β -CD: Heptakis(2,3,6-tri-O-metil)- β -cyclodextrine

UPLC: Ultra-Performance Liquid Chromatography

UV: Ultraviolet

1. Bevezetés

1.1 Az excitátoros aminosavak, receptoraik és a tanulási folyamatok ismertetése

Régóta ismert, hogy a glutamát és az aszpartát a többi szövethez képest a központi idegrendszerben (KIR) rendkívül magas koncentrációban van jelen. Elsőként 1959-ben Curtis és Watkins írta le a glutamát és az aszpartát gerincvelői neuronokon tapasztalt ingerlő tulajdonságait és vetették fel annak lehetőségét, hogy e két fehérjealkotóként ismert aminosav az agykéregben serkentő hatású jelátvivő molekulaként is funkcionálhat. A központi idegrendszerben az excitátoros aminosavak közül a glutamát tekinthető a fontosabbnak [68]. A glutamát az elsődleges mediátor a szenzoros információk közvetítésében, a motoros koordinációban és a memória kialakulásában, valamint a tanulási folyamatokban. Az agyi neuronok 80-90 %-a glutamátot használ, mint neurotranszmittert és körülbelül 80-90%-a a szinapszisoknak glutamáterg [49, 68]. A szinaptikus résbe ürülő glutamátot a környező asztrociták membránjában található excitátoros aminosav transzporterek (EAAT) veszik vissza. A glutamát, neurotranszmitter lévén a szinaptikus vezikulákban tárolódik, ahol magas koncentrációt (60-250 mmol/L) ér el, szemben a citoszolban található néhány mmol/L-el. A glutamáterg szinapszis az egyik legfontosabb kommunikációs útvonal a pre és posztzinaptikus kapcsolatban. Megtalálható az axo-dentritikus és az axo-axonális szinapszisokban, illetve nem neuronális sejtekben, mint például asztrociták és oligodendrociták sejtmembránjában is írtak le glutamát receptorokat, melyeket stimulálhat az idegvégződésből felszabaduló glutamát [68].

A glutamát és az aszpartát is képes felszabadulni kalcium dependens módon kálium-klorid hatására a sejtből. Feltételezik, hogy létezhetnek külön csak aszpartáterg, valamint glutamáterg neuronok. Az aszpartát kémiaiilag nagyon hasonlít a glutamát molekulához, azonban aszpartát tartalmú vezikulákat eddig nem sikerült azonosítani, ezért klasszikus értelemben nem nevezhető neurotranszmitternek. Az egyik lehetséges felszabadulási mechanizmusa az idegvégzódések citoszoljából történhet direkt úton, tehát nem vezikulárisan. Az aszpartát koncentrációja a citoszolban meglehetősen magas a GABA-erg neuronokban, azonban még felderítésre vár, hogy fiziológias körülmények

között felszabadul-e az aszpartát ezekből a neuronokból. Az aszpartát képes a későbbiekben ismertetésre kerülő NMDA receptorok aktiválására, míg a másik, szintén később ismertetendő, ún. AMPA receptorokon nincs hatása [183]. Az aszpartát szerepét a neurotransmisszióban még homály fedi és jelenleg is a kutatások részét képezi.

Az excitátoros aminosavak szerepe létfontosságú a tanulási folyamatokban, valamint a memória formációban. Jelenlegi ismereteink szerint a központi idegrendszerben szinaptikus szinten végbemenő változásoknak köszönhetően alakul ki az információ tárolása, melyet szinaptikus plaszticitásnak neveznek. Ennek mélyebb megértéséhez két szinaptikus folyamatot kell megismerni, melyek elengedhetetlenek a tanulási folyamatokhoz. Az egyik az ún. long-term potentiation (LTP), míg a másikat long-term depressionként (LTD) említi a szakirodalom. A glutamáterg szinapszisoknál megfigyelték, hogy nagy frekvencián történő stimulálás a továbbiakban könnyebb ingerelhetőséghez vezetett, mely képesség jelentős időn keresztül megmaradt (akár hónapokig is), ezt a folyamatot 1966-ban írta le Lřmo és nevezték el LTP-nek. LTP esetében az akciós potenciál könnyebben és nagyobb mennyiségben vált ki glutamát felszabadulást. LTD során pont ellentétesen, alacsony frekvencián történő stimulálás során nehezebben ingerülhető szinapszisok alakultak ki [68, 163]. Az LTP jelenléte kimutatható az agy jelentős részében, de legintenzívebben a hippocampusban tanulmányozták, mely esszenciális az ún. explicit memória kialakulásához és fenntartásához.

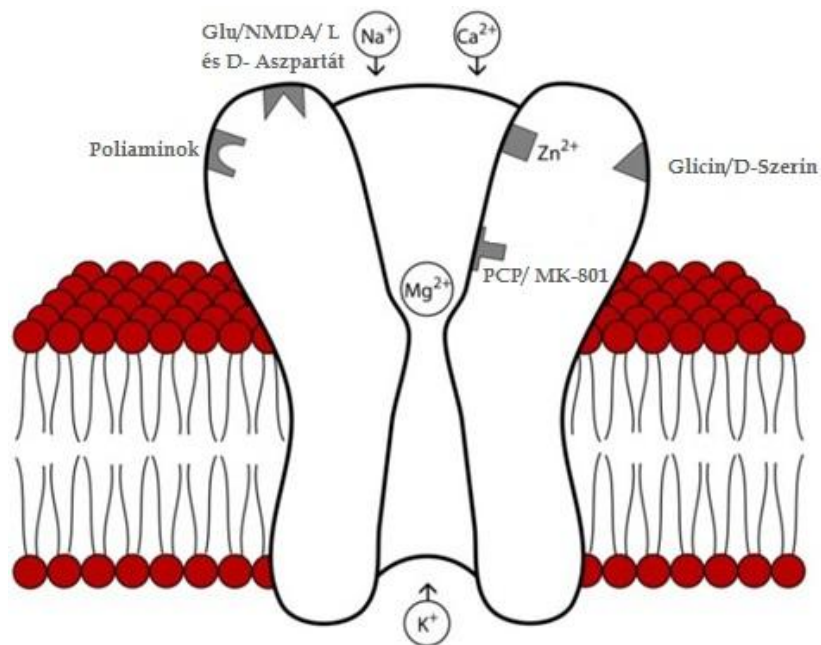
Az LTP további megértéséhez az excitátoros glutamát receptorainak megismerése elengedhetetlen. A glutamát receptorok két nagy családra oszthatóak, ionotróp receptorokra és metabotróp receptorokra. Háromféle ionotróp és nyolcféle metabotróp receptort ismerünk jelenleg [68].

Az ionotróp receptorok közös jellemzője, hogy kation csatornaként funkcionálnak, és megnyitásukat a glutamát kötődése elősegíti. A metabotróp receptorok G-proteinhez kapcsolt receptorok, melyek különböző intracelluláris folyamatokat indítanak el glutamát kötődésekor. Az ionotróp receptorokat további három alcsaládra osztjuk szelektív agonistáik alapján, ugyanis ezek a glutamát receptorok működésükben és fiziológiás szerepükben is jelentősen eltérnek. A három fő típus tehát az N-metil-D-aszpartátra nyíló ún. NMDA receptorok, az α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-

propionsavra (AMPA) nyíló ún. AMPA receptorok, valamint a kainátra nyíló kainát receptorok. Az AMPA és a kainát receptorok az egész központi idegrendszerben széleskörben megtalálhatóak, és gyors ingerületátvitel biztosításában játszanak fontos szerepet; a glutamát kötődésekor miliszekundumok alatt deszenzitizálódnak. Az NMDA receptor aktiválódása egy lassabb folyamat az AMPA receptor aktiválódáshoz képest, azonban akár több száz milliszekundumig is képes aktív maradni. Az NMDA receptorok aktiválódása a bejövő ingerületek térbeli és időbeli összegzésének az eredménye [68]. Az egyes családokon kívül további variabilitást jelent a receptorokat felépítő alegységek varianciája, melyek alapvetően befolyásolják az egyes receptorok viselkedését [68]. Mindhárom ionotróp glutamát receptor Na^+ , K^+ és Ca^{2+} áteresztő képességgel rendelkezik, mely a Na^+ és a Ca^{2+} ionnál az intracelluláris irányba történik, tehát a sejtet depolarizálják és akciós potenciál kiváltására alkalmasak. A K^+ a sejtől kifelé az extracelluláris tér irányába áramlik. A glutamát receptorok alegységeitől függően azonban a kalcium és a nátrium ionok vezetése között jelentős eltérések vannak. A GluA2 alegység jelenléte nagy nátrium permeabilitást biztosít alacsony kalcium beáramlás mellett. Ennek az alegységnek a hiányakor a kalcium vezetőképessége lesz jelentősebb. Az NMDA receptorok sajátossága, hogy nagy kalcium vezetőképességgel rendelkeznek [33, 99, 109, 197]. Mind az AMPA és kainát, mind az NMDA receptorok részt vesznek az excitátoros poszt-szinaptikus potenciál kialakításában glutamát kötődésekor. A depolarizáció hatására egyéb szinaptikus bemenetek vagy nem-szinaptikus membrán csatornák indíthatnak akciós potenciálokat [68]. Az NMDA receptoroknak fontos szerepe van az idegrendszeri fejlődésben, a szinaptikus plaszticitás kialakulásában, a memória formációban, valamint a tanulásban is [33, 76, 131, 183].

Az NMDA receptorok szabályozása nagyon összetett, több regulációs lépést is magába foglaló folyamat. Nagy különlegessége, hogy aktiválódásához egy agonista és egy ko-agonista egyidejű kötődése szükséges [68, 91]. Az agonista a leggyakrabban glutamát, de egyéb agonisták is képesek az NMDA receptor aktiválására, mint például az L-aszpartát, valamint ennek tükörképi párja, a D-aszpartát. Régebben a ko-agonisták közül a glicint tartották a legfontosabbnak [68, 91, 183], azonban az analitikai technikák fejlődésével kimutatták, hogy a glicin kötőhelyhez sokkal nagyobb affinitással képes kötődni a D-szerin [50, 155, 198]. További fontos reguláló molekulák a magnéziumion,

ami az NMDA receptor ioncsatornájában elhelyezkedve feszültségfüggő blokkot hoz létre, a cink és a hidrogénion [182], melyek gátló hatást fejtenek ki, illetve a poliaminok, amik a receptor aktiválását segítik elő. A pH függő gátlás ischaemia (pl. stroke) fennállásakor kiemelten fontos lehet, mert meggátolja a további NMDA aktiválást. A poliaminok (pl. spermin és spermidin) a protonok megkötésével pH függően szabályozzák/fokozzák az NMDA receptor működését [182]. Az agonista és a ko-agonista együttes kötődésén kívül részleges depolarizáció is szükséges ahhoz, hogy az NMDA receptor magnézium blokkja feloldható legyen [76, 112, 125, 183]. Az NMDA receptor antagonistái az anesztetikumként használt ketamin, az MK-801 és a kábítószerként ismeretes fenciklidin (1. ábra).

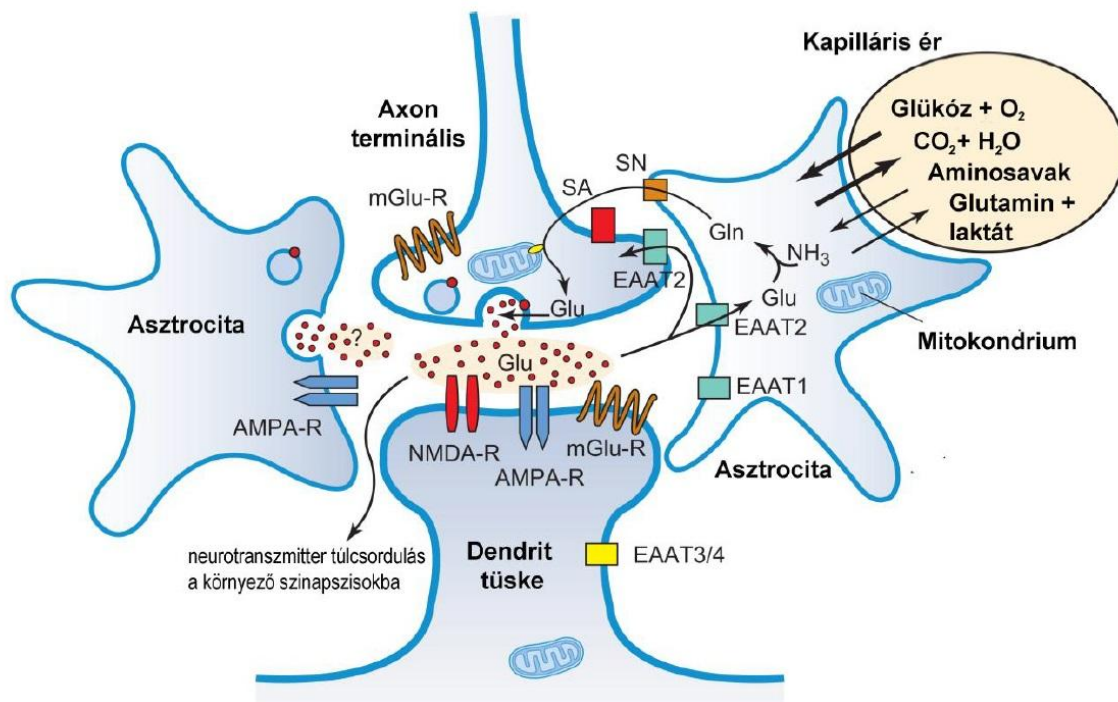


1. ábra: Az NMDA receptort reguláló molekulák és ionok kötőhelyei (forrás: <http://www.mdpi.com/1424-8247/6/2/251/htm>)

Az LTP kialakulásnak alapja, hogy a preszinaptikus ingerület során glutamát szabadul fel, mely a posztszinaptikus AMPA, majd később NMDA receptorokat aktiválja. Az AMPA receptorok biztosítják a megfelelő depolarizációt nátriumion beáramlása révén, mely feloldja az NMDA receptorban található magnéziumion blokkoló hatását. Az NMDA receptorokon keresztül történő kalcium beáramlás számos intracelluláris biokémiai folyamatot indít el, mely jelentősen megváltoztatja az adott neuron

működését. Attól függően, hogy milyen intracelluláris folyamatok indulnak el, ezek segíthetik, vagy gátolhatják az NMDA további aktivációját [35, 68, 180].

Az NMDA receptorok aktiválódása és lassú inaktíválódása, valamint az elindított intracelluláris folyamatok képezik az LTP, valamint az LTD alapjait [33, 75, 100, 146]. Ahogy fentebb említésre került, az LTP feltétele a megfelelően hosszú ideig tartó nagy frekvenciájú stimulálás. Ez a stimuláció szükséges az NMDA receptorok aktiválódásához, ami felelős az LTP kialakulásáért [68]. A glutamátrendszer körforgását a 2. ábra mutatja be.



2. ábra: A glutamát által közvetített neurotranszmisszió (Az ábra forrása: [68]). A szinaptikus végkészülékben a glutamát tartalmú vezikulák akciós potenciál hatására fuzionálnak a sejtmembránnal és tartalmuk a szinaptikus részbe ürül. A glutamát a posztszinaptikus dendritikus tükén található ionotróp (AMPA, NMDA), illetve metabotróp (mGlu-R) receptorokhoz kötődhet, valamint felvevődhet a specifikus glutamát transzportereken keresztül (EAAT 3/4). A felszabadult glutamátot szinapszis közelében lévő asztrociták specifikus transzportereik révén (EAAT 1/2) felveszik, majd enzimatikus úton glutaminná alakítják. A glutamin az asztrocitákból transzportereken keresztül (SA, illetve SN) ismét a szinaptikus végkészülékbe kerül vissza, ahol a mitokondriális glutamináz enzim glutamáttá alakítja. A glutamát az EAAT2 transzporter révén közvetlenül is visszavevődhet a szinaptikus végkészülékbe. Nagy mennyiségű transzmitterürülés esetén a glutamát molekulák eljutnak a környező szinapszisokhoz is.

1.2 Excitotoxikus folyamatok, az NMDA receptor szerepe különböző patológiás folyamatokban

Az 1970-es években nyert felismerést, hogy a glutamáterg rendszer túlműködése patológiás állapotokhoz vezethet. A glutamáterg rendszer aktiválódása fontos a neuronális növekedésben, azonban a túlzott aktivitás excitotoxikus sejthalálhoz vezet. A túlzott aktiválás az NMDA receptorokon keresztül beáramló kalciumionoknak köszönhetően apoptotikus folyamatokat indít el. Egy másik érdekes teória alapján az NMDA receptorok lokalizációja is befolyásolja, hogy neuronális növekedést, tehát trófikus hatást mutat az NMDA receptor aktiválódása, vagy az apoptózist facilitálja. E szerint a szinapszisban található NMDA receptorok felelősek a trófikus hatásért, míg az extraszinaptikus NMDA receptorok felelősek azokért az intracelluláris folyamatokért, melyek apoptózist indukálnak [61, 68]. Az utóbbi eset akkor jöhet létre, ha a glutamát felszabadulás mértéke meghaladja a visszavételét, ekkor a glutamát a szinapszist elhagyva (spill over jelenség) képes aktiválni az extraszinaptikusan elhelyezkedő NMDA receptorokat is. Ilyen állapot ischaemiás körülmények (pl. stroke vagy trauma) között következik be, amikor is a glutamátot a szinapsziszból eltávolító ún. reuptake mechanizmusok szenvednek károsodást.

A glutamáterg rendszer, valamint az NMDA receptorok hibás működésének szerepét egyéb multifaktoriális neurológiai betegségekben is felvetették, mint például az Alzheimer-kór, a skizofrénia [18, 33, 68, 100, 131, 200], vagy akár az epilepszia [82, 205].

Az Alzheimer-kór egy súlyos demenciával járó progediáló neurodegeneratív betegség [3, 8, 12, 16, 53, 134, 142, 143, 144]. Az Alzheimer-kór korai fázisában a kognitív funkciókért felelős agyi kéreg, valamint a hippocampalis területek szenvednek károsodást, melyek a betegség legjellemzőbb tünetéhez, a demenciához vezetnek. Ezeknek a területeknek a fő beidegzése glutamáterg [68, 200]. Az NMDA receptorok szerepét igazolja, hogy az Alzheimer-kór kezelésében gyakran használatos memantin, mint NMDA-receptor csatorna-gátló a betegség elején jó hatással bír.

Skizofrénia esetében is felmerült az NMDA receptor szerepe [17, 33, 50, 96], ugyanis az NMDA receptor gátló vegyületek, mint például a ketamin, vagy a fenciklidin, a skizofréniahoz hasonló pszichotikus állapot előidézésre alkalmasak. Maga a skizofrénia

egy komplex heterogén kórkép, melynek pozitív, negatív és kognitív tünetei is vannak. A skizofréniában az NMDA receptorok alulműködését teszik felelőssé a negatív tünetekért (passzivitás), ezért felmerült a ko-agonisták (glicin és D-szerin) jótékony hatása a betegségben, főleg, hogy e beteg populációban csökkent D-szerin mennyiséget írtak le [18, 19, 42, 50, 97, 184, 192]. További érdekesség, hogy a kinurénsav mennyisége emelkedett e betegekénél, mely az NMDA receptorok endogén antagonistája a glicin/D-szerin kötőhelyen [33, 136].

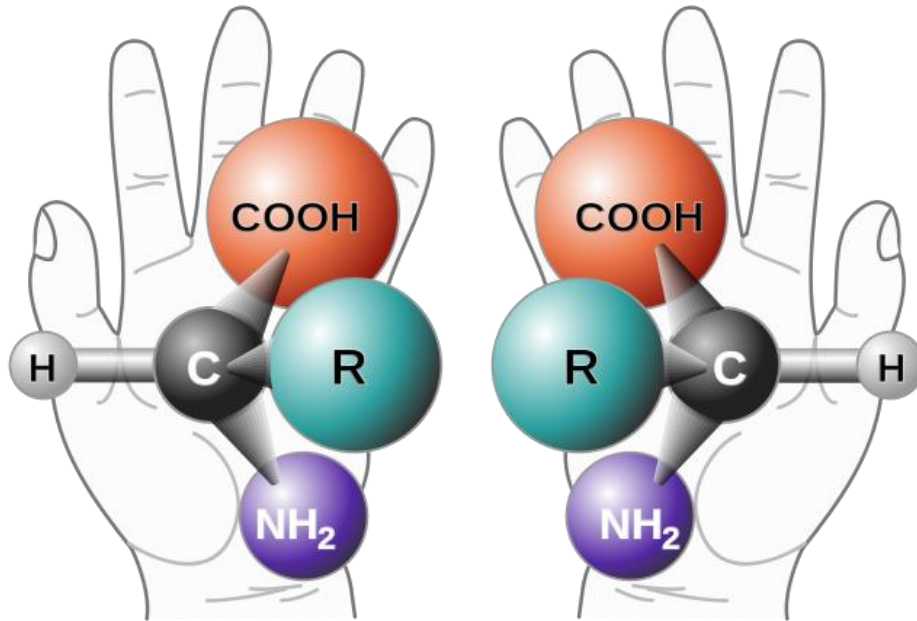
A fent említett betegségek terápiájában tisztán agonista vegyületek súlyos neurotoxikus hatásuk, míg az ismert antagonisták skizofréniászerű tüneteket okozó hatásuk miatt nem alkalmazhatóak [93]. A jövőben a szabályozó, moduláló hatású vegyületek kaphatnak nagyobb szerepet, ehhez azonban szükséges feltárni a fiziológiás, illetve patológias állapotok mögött húzódó szabályzó mechanizmusokat.

1.3 A D-aminosavak előfordulása a természetben

1.3.1 Kiralitás

A természetben az egyes vegyületek között különböző izomériák figyelhetők meg. Az izoméria görög eredetű szó, jelentése: egyenlő rész. Azon molekulák melyek izomerek egymással, azonos összegképlettel írhatók le. Fiziológiás szempontból az izoméria egyik csoportján, a sztereoizomérián belül található optikai izoméria tekinthető az egyik legfontosabbnak.

Az optikai izomerek fizikai és kémiai tulajdonságai teljesen megegyeznek, az egyetlen különbség, hogy a síkban polarizált fényt ellentétes irányba forgatják [152]. Ezek a vegyületek egymásnak tükörképi párjai, ún. enantiomer párok (3. ábra), melyek a molekulán belüli szabad rotáció segítségével sem hozhatók fedésbe egymással. Az ilyen molekulákat királis molekulának nevezzük. Farmakológiai szempontból az enantiomerek jelenléte különösen fontos, hiszen az egyes tükörképi párok eltérő farmakodinámiás hatással és/vagy farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkezhetnek.



3. ábra: Enantiomer párok bemutatása

forrás: https://hu.wikipedia.org/wiki/Optikai_izom%C3%A9ria

A királis molekulák optikai centrumait általában a szénatomok adják, melyek négy különböző szubsztituenst tartalmaznak, lehetőséget adva így a kiralitás kialakítására. Aminosavak esetében a központi szénatom egy karboxil, és egy amino csoporthoz, valamint egy hidrogénhez és az aminocsoportot meghatározó R-szubsztituenshez kapcsolódik. Könnyen belátható, hogy kémiaiilag a glicin kivételével mindegyik természetben előforduló α -aminosavnak létezik enantiomer párja. Az elnevezése az egyes enantiomereknek a latin nyelvből ered, attól függően, hogy merre forgatják el a síkban polarizált fényt. Amennyiben balra forgatja az adott enantiomer, akkor a laevus latin „balra” szóból eredően L-izomerről beszélünk, míg amennyiben jobbra, úgy a dexter „jobbra” szóból eredően D-izomerről [50]. A régi homokirális nézettel ellentétben ma már kijelenthető, hogy az aminosavak D-enantiomerjei is megtalálhatóak a természetben, azonban az előforduló aminosavak L-izomere jóval nagyobb mennyiségben fordul elő a D-izomerekhez képest. Újabban egyre több D-aminosavról derül ki, hogy egyéb funkciókat töltenek be a szervezetben, úgy, mint hormon, neurotranszmitter vagy neuromodulátor [21]. Az enantiomerek analitikai

elválasztásának lehetőségeit és nehézségeit az elválasztástechnika fejezetben ismertetem részletesen az 1.5.2 fejezet alatt.

1.3.2 D-aminosavak az idegrendszeri szabályozásban

A D-aminosavak a szervezetben biokémiai úton keletkezhetnek, vagy a táplálékból kerülhetnek felvételre. A táplálékban a nagy mennyiségű L-izomer hő, vagy erjesztés hatására képes átalakulni D-izomerré. A D-aminosavak biokémiai keletkezésében az aminosav-racemáz enzim vesz részt, míg lebontásukban a D-aminosav-oxidáz (DAAO) a legfontosabb. A racemázok képesek az L-izomer aminosavból D-izomerű aminosavat előállítani és vissza. [50, 57].

A D-aminosavak közül az idegrendszeri szabályozásban legfontosabb a D-szerin [50, 198], valamint a D-aszpartát. A D-szerin szintézisét a szerin-racemáz enzim katalizálja L-szerinből, míg lebontásáért a DAAO felelős. A D-szerin legfontosabb szerepe az NMDA receptoron való neuromodulátor funkciója [7, 47, 50, 115]. Legelőször Hashimoto és mtsai. mutattak ki D-szerint patkány agyának a frontális részéből, mely az össz-szerin mennyiségének 20-25%-át tette ki [64]. Az emlősök frontális agyrészeiben főleg a hippocampalis, hipotalamus, valamint a striatalis részben mutattak ki D-szerint nagy mennyiségben. Kis mennyiségeket találtak a cerebellumban, a medulla oblongatában, valamint a spinális részeken [67]. Neonatális patkányokban és egerekben a cerebellumban nagy mennyiségű D-szerint mértek, mely a korrallal folyamatosan csökken, míg a frontális részekben a későbbiekben is nagyobb mennyiségben van jelen [67]. Mennyiségileg fajtól és agyterülettől, valamint analitikai módszertől függően 7-340 nmol/g koncentrációban mértek D-szerint biológiai mintákból [172]. A feljebb részletezett NMDA receptoron betöltött neuromodulátor szerepét a D-szerinnek tovább erősíti az a tény, hogy az NMDA receptor disztribúciójával összhangban található meg a központi idegrendszerben, szemben a glicinnel [50, 66, 155]. A D-szerin képes kiváltani az NMDA mediálta excitotoxikus mellékhatást, míg a glicinnél ezt a hatást nem írták le, így felmerült, hogy a glicin szerepe inkább egy szabályozó funkció, megakadályozva így a D-szerin NMDA receptoron keresztül érvényesülő excitotoxikus hatását [50, 159].

Jelenleg is vita tárgyát képezi, hogy a D-serin szintézisének színtere neuronális vagy glia eredetű. A legújabb eredmények szerint a termelésének helye főként neuronális, melyeket a neuronális sejt kultúráknál kimutatható D-serin igazolt [50, 84, 148].

Amíg azonban a D-serin neuromodulátor funkcióját széles körben tanulmányozzák, a D-aszpartát pontos szerepe jelenleg kevésbé ismert. A D-aszpartát szintézisét az aszpartát-racemáz enzim katalizálja L-aszpartátból, míg lebontását a dikarbonsavak metabolizmusáért felelős D-aszpartát oxidáz (DDO) katalizálja, mely a D-glutamátot és az NMDA-t is képes lebontani a D-aszpartát mellett [22, 28, 50, 71, 85, 129]. Több vizsgálat is igazolja, hogy endogén módon keletkezik a D-aszpartát [107, 199], valamint egér agyából sikerült kimutatni a D-aszpartát racemáz enzimet [87, 129]. Bakteriális jelenléte peptidoglikán láncban, valamint puhatestűekben való előfordulása régebb óta ismert [24, 26, 129], míg emlősökben csak később került leírásra. Csirkékben [122, 204], patkányokban [34, 63] és emberben [63] az idegrendszer fejlődése alatt nagy mennyiségben mutatható ki a D-aszpartát, azonban felnőtt korra a mennyisége lecsökken, így feltételeztek, hogy az idegrendszer fejlődésében tölt be kulcs fontosságú szerepet, mint neuromodulátor. Dunlop és mtsai. írták le először 1986-ban a D-aszpartátnak a csökkenését patkány agyféltekékben a kor előrehaladtával [34]. A vizsgált kísérleti állatok szöveteiben nagyon különböző mennyiségben fordul elő, a közölt adatok 10-500 nmol/g szövet tartományban változnak [30, 85]. A tudomány jelenlegi állása szerint a D-aszpartát az idegsejtekben termelődik a D-aszpartát-racemáz enzim közreműködésével, és az éretlen neuronokban mutatható ki nagy mennyiségben [87, 151]. A legújabb kutatási eredmények kimutatták, hogy a D-serin keletkezéséért felelős szerin-racemáz enzim is képes a D-aszpartát szintézisére [72, 77]. Ebben az értelmezésben a szerin-racemáz két NMDA receptor működéséhez elengedhetetlen modulátor szintéziséről is gondoskodik. A neuronok nagy többsége embrionális fejlődés során alakul ki. Némely fajnál azonban nem ritka, hogy a posztnatális korban is megfigyelhető még a neuronális képződés [55, 195]. Csirkéknél leírták, hogy a kikeléstől számítva még tart az idegrendszeri fejlődésük néhány hétig [60, 113, 167]. A D-aszpartát koncentrációjának időbeli változása korrelációt mutat az idegrendszer fejlődésével. Emellett nagyobb mennyiségben található a nagy proliferációs kapacitással bíró régiókban [63]. Időfüggését jól mutatja a nagy mennyiség jelenléte embrionális korban, majd hirtelen esése a születés után [37]. A D-aszpartát disztribúciója az egyes

agyterületeken eltérő, melyet Sakai és mtsai. immunhisztokémiai módszerekkel igazoltak. Lokalizációját tekintve intracellulárisan található, ahol is először a sejtmag közelében észlelték, majd később egyre távolabb, végül az axonoknál, ami szintén a neuronális differenciációban játszott szerepét igazolja [151].

Azokon az agyterületeken lehetett magasabb D-aszpartát koncentrációt kimutatni, ahol a lebontásért felelős DAO enzim kis koncentrációban volt megtalálható. Feltételezték, hogy ezeken a területeken, ahol funkcionalitással bír a D-aszpartát, kevésbé expresszált a DAO enzim [129, 156]. Felszabadulása Ca^{2+} függő, kémiai és elektromos stimulussal, továbbá kálium-kloriddal (KCl), nikotinnal, noradrenalinval és acetilkolinval is kiváltható [31, 110, 129]. A fenti eredmények ellenére feltételezik, hogy a D-aszpartát felszabadulása spontán és folyamatosan történik, függetlenül az exocitózistól. Ezt az álláspontot szintén több vizsgálattal alátámasztották. A vizsgálatok során különböző sejt kultúrákban mértek állandó D-aszpartát felszabadulást, valamint az exocitózisban nélkülözhetetlen SNAP-25 fehérjének gátlása nem befolyásolta a D-aszpartát felszabadulását [94, 107].

Számos kutató írta le a D-aszpartát feltételezett neurotranszmitter és neuromodulátor szerepét [10, 21, 30, 43, 129, 154, 165]. Kimutatták, hogy a D-aszpartát képes az NMDA receptorok aktiválására [188], valamint az AMPA receptorokon neuromodulátor hatása van, mely esetben csökkenti a receptor aktiválódásához szükséges időt [10]. D'Anellio és mtsai. emelkedett cAMP szintet mértek patkányban D-aszpartát hatására, ami az intracelluláris jelátviteli szerepét is felveti a D-aszpartátnak [30]. Egy másik érdekes lehetőség, melyben a D-aszpartát mintegy prekursor molekulaként szerepel az NMDA szintéziséhez, hozzájárulva így az endogén NMDA hipotéziséhez [23, 27, 29, 129, 153, 179]. Felmerült, hogy a D-aszpartát feltételezett hatásait valójában az NMDA közvetíti, azonban sok agyterületen nem találtak NMDA-t, ahol a D-aszpartát kimutatható volt.

Élettani funkciókat tekintve több publikáció is beszámol a D-aszpartát kognitív funkciókban betöltött szerepéről, mely az NMDA receptor L-glutamát kötőhelyhez történő kötődése és agonista hatásából ered [40, 129]. Ebből következik, hogy akárcsak a D-serinnek, a D-aszpartátnak is fontos szerepe lehet a tanulásban és a memória kialakulásában, valamint az NMDA receptorhoz köthető betegségekben is [85, 129]. Ezeket az állításokat különböző állatkísérletekkel és skizofrénia modelleken is

tesztelték. Az egyik ilyen vizsgálatban krónikusan hoztak létre D-aszpartát emelkedést, mely gyengítette a gyógyszeresen indukált skizofrénia tüneteket [39], míg egy másik vizsgálatban per os adagolt D-aszpartát javította a patkányok térbeli tanulási képességeit a kontroll csoporthoz képest. Továbbá, amelyik patkánynak a hippocampusában nagyobb mennyiségű D-aszpartátot mértek, azok az állatok könnyebben végezték el a különböző feladatokat [181]. Errico és mtsai. kimutatták egéren, hogy a D-aszpartát képes volt kivédeni a korral járó hippocampalis szinaptikus plaszticitásokban fellépő gyengülést, amiből arra következtethetünk, hogy képes meggátolni az NMDA receptor jelátvitel gyengülését [38]. Egy másik érdekes kimutatást hajtottak végre D'Anellio és mtsai. 1998-ban Alzheimer-kóros humán betegek agymintáiban (neocortex, hippocampus és amygdala), ahol is csökkent D-aszpartát szintet találtak ellenben a cerebellummal, mely mentes az Alzheimer-kór neuropatológiai változásaitól, ezzel is tovább növelve az evidenciát a D-aszpartát memóriaképző és tanulási folyamatokban betöltött szerepére vonatkozóan [25].

1.4 Mikrodialízis

A mikrodialízis alapjait Delgado és mtsi. dolgozták ki még 1972-ben, azonban a technikai fejlődésnek köszönhetően manapság rutin eljárásnak számít [32]. A mikrodialízis célja a kísérleti állatok szövetei extracelluláris környezetének in vivo vizsgálata, mely különösen az agyszövet esetén ad lehetőséget a felszabaduló neurotranszmitterek és neuromodulátorok idő függvényében történő monitorozására. A mikrodialízis során egy speciális szondát ültetnek a vizsgálni kívánt szövetbe, melynek a szövetbenyúló vége egy szemi-permeabilis membránból áll. A szondán keresztül folyamatosan perfúziós folyadék kering, így az alacsony molekulatömegű komponensek a koncentráció gradiensnek megfelelően a membránon átdiffundálva a perfúziós folyadékba kerülnek. Ezzel szemben a nagy molekulatömegű komponensek (pl. fehérjék) továbbra is az extracelluláris környezetben maradnak, hiszen a féligáteresztő membrán barrierként szolgál a makromolekuláknak. A mikromolekulákat a perfúziós folyadék frakciókba gyűjtik, melyek utána analitikai módszerekkel vizsgálhatóak, és így az extracelluláris környezet összetétele és időbeli változása vizsgálható. Az ideális perfúziós folyadéknak, melyet gyakorlatban használnak, a fiziológias viszonyokat kell

utánoznia. Agyszövet vizsgálata esetén például a mesterséges gerincvelő folyadékot (ACSF) perfundálnak, így megtartva az *in vivo* szöveti homeosztázist. Tipikusan 1-5 $\mu\text{l}/\text{perc}$ átfolyási sebességet alkalmazva az időbeli felbontástól függően néhány mikroliter térfogatú minták nyerhetőek. A dialízis membránon keresztül történő diffúzió alapvetően nem egyensúlyi folyamat [203]. A dialízis határfoka 20-80% között mozog, értékét befolyásolja a szonda geometriája, a vizsgálandó vegyület, az átfolyási sebesség, valamint az alkalmazott membrán pórusmérete is. Az extrackiós határfok *in vitro* körülmények között mérhető, azonban nehezen interpretálható *in vivo* körülményekre [135, 150]. Ebből következik, hogy a vizsgált vegyületek extracelluláris térbeli abszolút koncentrációja ezzel a módszerrel pontosan nem meghatározható. Vizsgálható viszont az egyes stimulusokra bekövetkező komponens koncentráció változása egy adott kontrollcsoporttal szemben. A változást ilyen vizsgálatoknál ezért mindig az alapkonzentrációhoz viszonyítva adják meg százalékosan. Agyszövet vizsgálata esetén jól követhető ilyen vizsgálati módszerrel az egyes neurotranszmitterek, neuromodulátorok felszabadulása, valamint annak mechanizmusa, illetve ebből adódóan a neuronális folyamatokban betöltött szerepük. Korlátozza a mikrodialízis alkalmazhatóságát a szonda nagysága, ugyanis így csak szövettanilag egységes nagyobb agyterületek vizsgálhatóak. Előnye, hogy éber, mozgásában nem korlátozott állatok vizsgálhatóak vele *in vivo*. Ebből kifolyólag kiválóan alkalmas komplex mechanizmusok tanulmányozására, mint például a tanulási folyamatok, viselkedési formák neurokémiai hátterének esetleges feltárására. Gyakorlatban szinte az összes neurotranszmitter vizsgálható. Az adott neurotranszmitterek enzimatis bontása nem mehet végbe a szemipermeábilis membránok barrier funkciója miatt, ugyanis az enzimatis lebontáshoz szükséges enzim továbbra is az extracelluláris térben marad. A nyert mintákat ezért nem kell továbbiakban előkészíteni és fehérjementesíteni. A neurokémiai hatások felderítéséhez egy további nagy előnye, hogy a diffúzió lehetőséget biztosít vizsgálandó, vagy ismert farmakonok bejuttatására az extracelluláris térbe, és e gyógyszerek által kiváltott hatásokat is lehet vizsgálni.

A számos előnye mellett, természetesen szót kell ejteni a módszerkorlátozó tényezőiről is. Legfontosabb hátránya, hogy a kinyert minták az adott neurotranszmittert nagyon kis koncentrációban ($\leq \mu\text{M}$) tartalmazzák, továbbá a megfelelő időfelbontás megtartása nagyszámú kis térfogatú minta gyűjtésével jár, ezért vizsgálatukra nagyon érzékeny, kis

mintaigényű, könnyen automatizálható és specifikus analitikai módszerek szükségesek [98]. Igaz az áramlási sebesség csökkentésével a minták valamelyest dúsíthatóak, ugyanis több idő van így a diffúzióra, viszont ekkor a vizsgálati komponens koncentrációjának időbeli változásáról nyert információkban következik be minőségromlás. Egy következő jelentős hátránya, hogy akármennyire kis műtérről legyen is szó, a mikrodialízis technika egy invazív eljárás, mely a környező szövet károsodásához vezet. A mikrodialízis eljárásból következik, hogy számos egyéb mikrokomponens is átkerül a perfúziós folyadékba, úgymint metabolitok és fontos regulációs molekulák, melyek koncentrációcsökkenése az adott környezetre hatással lehet. Ki kell emelni, hogy az ionkoncentráció természetesen nem változik, de egyes növekedési faktorok, vagy tápanyagforrások, mint például glükóz és laktát koncentrációja csökken. Egy másik vitát generáló kérdés, hogy a szonda helyzete miatt a felfedezett változások nehezen interpretálhatóak szinaptikus szinten. A transzmitterek visszavételéért és lebontásáért felelős fehérjék folyamatosan jelen vannak és ezek is befolyással bírnak a transzmitterek extracelluláris koncentrációjára [196]. Hátrányai ellenére a mikrodialízis jelenleg is elterjedt vizsgálómódszer az idegtudományokban, alkalmazásával a neurotranszmisszióra vonatkozó értékes információk nyerhetőek.

1.5 Elválasztástechnikai módszerek és összehasonlításuk

A leggyakrabban alkalmazott elválasztechnikai eljárások a kromatográfiai módszerek. Számos folyadék és gázkromatográfiai módszer ismert, melyek alapja, hogy egy adott közegben az állófázissal eltérő erősségű kölcsönhatások alakulnak ki a szétválasztandó komponensek között, így a migrációjuk sebessége között eltérés fog kialakulni. Jó példa a kromatográfiai módszerekre a leggyakrabban használt nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), a vékonyréteg kromatográfia, valamint a gázkromatográfia. Sokrétű felhasználóságuk, valamint könnyen automatizálható mivoltuk miatt a HPLC technikák tekinthetőek a legelterjedtebb elválasztási módszernek a gyógyszeripar területén. Az irodalomban számos biológiai mintákból történő aminosav meghatározás került leírásra HPLC módszerrel [25, 52, 57]. A klasszikus kromatográfia elterjedése a gyógyszeranalitikában

annak köszönhető, hogy nagy variációs lehetőséget kínáló technika. Az újabb irodalmak áttekintése során leginkább HPLC-MS kapcsolt technikák kerültek leírásra, amikor is a HPLC-t egy (vagy akár kettő) tömegspektrométerrel kapcsolják össze [83, 164]. Gyakori, hogy a nagyobb elméleti tányérszámot és, ebből következően, szebb csúcsalakot eredményező UPLC készüléket kombinálják a tömegspektrométerrel [202]. Ekkor Ultra Nagyhatékonyságú Folyadékromatográfiáról beszélünk, aminek különbsége a nagyobb nyomás biztosításában rejlik, ugyanis ekkor az oszlopokban levő részecskeátmérő a HPLC-hez képest jóval kisebb ($\approx 1,7 \mu\text{m}$), ami nagyobb nyomásesést okoz, viszont kisebb a csúcshéledés (az elméleti tányérszám ekkor megközelíti a kapilláris elektroforézisnél tapasztaltat). A HPLC technikák során a mozgófázis (eluens) egy víz-szerves folyadékelegy, mely szállítja a meghatározandó komponenseket. Az állófázis pedig az oszlopba töltött szilárd részecskékből áll. A leggyakrabban az ún. fordított fázisú elválasztások terjedtek el a gyógyszeranalitika területén, ahol is az állófázist hosszú szénláncú (C18) molekulák alkotják, és az elválasztás a komponensek lipofilitásának különbségéből adódik. A HPLC technikák esetén a biológiai mintákból történő királis elválasztás történhet indirekt vagy direkt módon. Direkt elválasztás esetén általában két oszlop egyidejű használatát igényli, ahol az egyik oszlop a királis állófázist biztosítja, míg a másik a gyakran használt fordított állófázist. Ezek a technikák azonban bonyolult műszerezettséget igényelnek, valamint a két oszlop közötti holtterefogat a diffúzióknak, és így a csúcshéledésnek kedvez. Indirekt elválasztás esetén az elválasztás előtt történik meg az enantiomer párok származékképzése valamilyen királis vegyülettel, mely esetben már diasztereomer viszonyban álló vegyületeket kapunk. A módszer legnagyobb hátránya, hogy az ilyen származékképző vegyületek enantiomer tisztasága nagyban befolyásolja a diasztereomer képzést. A fentebb említett MS detektálás számos előnye ellenére azonban rengeteg megkötéssel is jár. Megfelelő csatlakozás, valamint speciális oldószerek használata szükséges, amely kevesebb lehetőséget biztosít az analitikus számára. Ezen felül ez a műszerezettség kifejezetten drága, valamint a nagy oldószerezettség tovább emeli az anyagi költségeket [172].

Az irodalomban gázkromatográfiás (GC) technikák is fellelhetők biológiai mintákból történő aminosav analízisre. Nevéből adódóan a GC esetében a mozgófázis gáz halmazállapotú. Az állófázis ez esetben szintén lehet szilárd, valamint helyhez kötött folyadék. Ha az állófázis adszorbens tulajdonságú, akkor gáz-szilárd, vagy ún.

adszorpciós gázkromatográfiáról, ha nem illékony folyadék, akkor gáz-folyadék, vagy ún. megoszlasos gázkromatográfiáról beszélünk. A mozgófázis lehetőleg legyen közömbös az állófázissal szemben itt is, akár csak a folyadékkromatográfia esetében. Az elválasztás alapja a mintakomponensek eltérő kölcsönhatása a különböző állófázisokkal [5]. A királis elválasztás itt is történhet direkt, valamint indirekt módon. Az irodalomban főleg a Chirasil-L-Val oszloppal értek el aminosav elválasztásokat biológiai minákból [132], de ciklodextrin állófázisú oszlop alkalmazásra is van példa [172, 191]. Indirekt GC királis módszerek is találhatók az irodalomban, azonban jóval kevésbé elterjedt a direkt eljárásokkal szemben. Hasegawa és mtsai. használtak (+)- α -metoxi- α -trifluorometil-fenilacetil-kloridot diasztereomer képzéshez. Módszerük érzékenysége azonban elmaradt az irodalomban fellelhető HPLC és később ismertetésre kerülő kapilláris elektroforézis módszereitől. Csak a legnagyobb mennyiségben előforduló D-szerin vizsgálatára alkalmazható leginkább [62].

A gyógyszer és biokémiai kutatások során leggyakrabban használt kromatográfiás eljárások mellett széles körben elterjedt az elektroforetikus technikák alkalmazása is. Kis térfogatban rendelkezésre álló biológiai minták esetében a HPLC relatíve nagy mintatérfogat igénye és hosszabb analízisideje miatt előnyösebb az anyagilag kedvezőbb, kis mintaigényű, gyors elválasztást biztosító, elektroforetikus módszerű kapilláris elektroforézist alkalmazni [172]. Az aminosavak vizsgálatát tovább nehezíti, hogy hidrofil kis molekulákról van szó, mely esetben a HPLC során ismertetett fordított fázis használata csak valamilyen kémiai reakció útján érhető el (származékképzés, komplexálódás stb.).

Az irodalomban különböző állatfajok agyterületeiből a HPLC-vel [54, 65, 83, 88, 90, 169, 170], GC-vel [11, 157] és kapilláris elektroforézissel [74, 208, 210] történő aminosav meghatározások dominálnak.

1.5.1. Kapilláris elektroforézis

Az elektromigrációs technikák során a migráció hajtóereje az elektromos feszültségkülönbség és nem a nyomáskülönbség. Ha az elválasztás egy kapillárisban történik, akkor kapilláris elektroforézisről beszélünk. A kapilláris elektroforézis előnyeinek miatt számos esetben kedvezőbb lehet egy adott analitikai feladatra a HPLC-vel

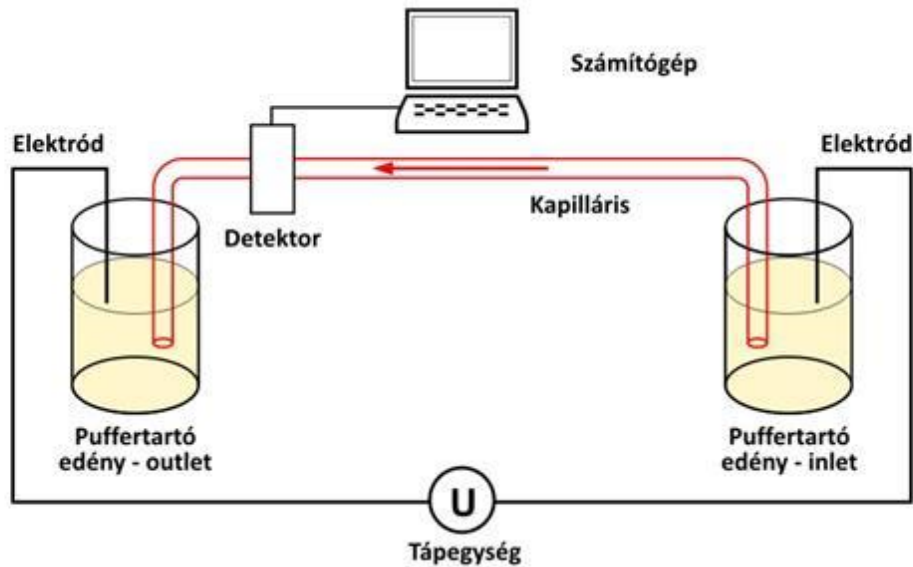
szemben. Ilyen előnynek számít például a kis mintaigény (10-20 nanoliter), a nagy hatékonyságú elválasztás, a gyors analízis, a környezetkímélő kis szerves oldószerigény, valamint az alacsonyabb üzemeltetési költség [173].

Az elválasztás általában egy 25-150 μm belső átmérőjű, 5-100 cm hosszú ömlesztett szilika kapillárisban megy végbe, melynek két vége két, egymástól elválasztott pufferoldatba merül. A pufferoldatokba egy-egy platina elektród is belemerül. Az elektródokra érkező feszültség hatására, mely jellemzően 10-30 kV nagyságú, indul meg az elválasztani kívánt komponensek eltérő sebességű migrálása az elektrolit pufferrel töltött kapillárisban. Optikai detektálás esetén egy detektorablakot kell létrehozni a kapilláris külső, flexibilitását adó poliimid rétegének eltávolításával [173]. A minta bejutattása történhet:

- Hidrodinamikai injektálás útján:
 - Nem tesz különbséget a mintakomponensek között, ezért injektálás után nem változik a minta összetétele, tehát reprodukálhatóbb mérést tesz lehetővé.

- Elektrokinetikai injektálás útján
 - Feszültségkülönbség hatására a minta a kapillárisba vándorol
 - A kisebb tömeggel, nagyobb töltéssel rendelkező komponensek dúsulnak a kapillárisban, mely érzékenység növekedést eredményezhet némely komponensre nézve.
 - A mintaközeg mérésről mérésre történő változása miatt viszont kevésbé reprodukálható.

A kapilláris elektroforézis sematikus ábráját tartalmazza a 4. ábra.



4. ábra. A kapilláris elektroforézis készülék elvi felépítése Forrás: http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011_0025_vegy_4/ch05.html

A kapilláris elektroforézis főbb típusai az alábbiak:

- **Kapilláris zónaelektroforézis**
- Kapilláris gélelektroforézis
- Micelláris elektrokinetikus kromatográfia
- Izoelektromos fókuszálás
- Izotachoforézis
- Kapilláris elektrochromatográfia
- Affinitás kapilláris elektroforézis

1.5.1.1 Kapilláris zónaelektroforézis és elméleti háttere

A kapilláris zónaelektroforézis (CZE) esetén az elválasztás alapját a komponensek különböző vándorlási sebessége adja az elektrolittal töltött kapillárisban, mely az elektroforetikus mobilitásuk eltérése miatt áll fenn [173]. Mobilitásuk eltérését az egyes

komponensek eltérő töltés/tömeg aránya hozza létre. Az elektromos teret, ami a migráció sebességét meghatározza, az alábbi képlettel számolhatjuk ki:

1. $E = \frac{V}{L}$ ahol E: az elektromos térerő, V: az elektródákra kapcsolt feszültség, L: a kapilláris hossza.

Az elektromos tér hatására a mintakomponensek zónába rendeződnek és különböző vándorlási sebességüknek köszönhetően egymástól szétválasztva elhaladnak a detektorablak előtt. A komponensek vándorlási sebessége arányos az elektroforetikus mobilitásukkal, valamint az elektromos térerősséggel.

2. $v = \mu E$ ahol μ : az adott komponens elektroforetikus mobilitása

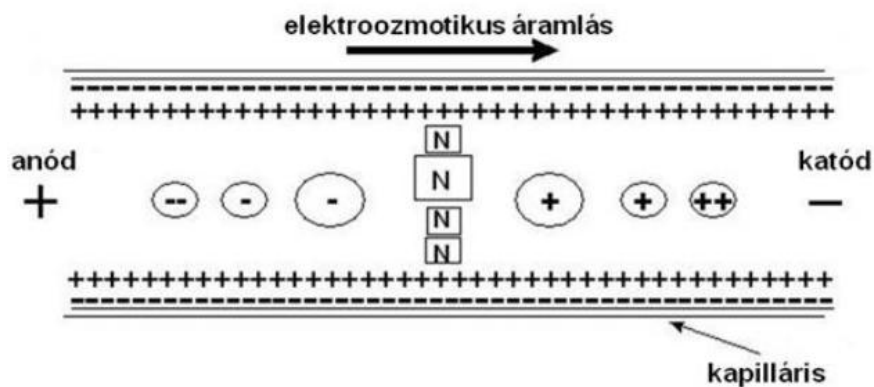
Az elektroforetikus mobilitást meghatározza a mintakomponens töltésének nagysága, a molekula mérete (Stokes' sugara), valamint a közeg viszkozitása.

3. $\mu = \frac{q}{6 \pi \eta r}$ ahol η : a közeg viszkozitása, r: a komponens Stokes' sugara

Két azonos töltéssel rendelkező molekula esetén a kisebb sugárral (gömb alakot feltételezve) a kisebb tömeggel rendelkező molekula elektroforetikus mobilitása lesz a nagyobb, ami gyorsabb migrációjában fog jelentkezni.

A természetben előforduló molekulák, valamint a gyógyszermolekulák az esetek döntő többségében gyenge savak, vagy bázisok. Ezért a puffer pH-ja jelentősen befolyásolja a mintakomponensek töltöttségi állapotát [127, 173]. Általánosságban elmondható, hogy gyors elválasztás és keskeny csúcsalak abban az esetben érhető el, ha a kérdéses molekula közel 100%-ban töltött állapotban van. A megfelelő pH biztosításához megfelelő puffer megválasztása szükséges. Túl alacsony pufferkoncentráció elégtelen pufferkapacitáshoz vezet, kiszélesítve így a csúcsokat, míg a túl magas pufferkoncentráció az áramerősséget növeli meg, ami a Joule-hő emelkedésével jár, növelve így a diffúziós hányadosát a mintakomponenseknek, amely szintén csúcsszélesedéshez vezet. Optimális pufferkoncentráció puffertől függően 5-200 mM között van [127]. Ömlesztett szilika kapillárisok esetében a falon található szilanolos hidroxil csoportok megfelelően lúgos kémhatású puffer esetén disszociáltak, egységnyi negatív töltéssel rendelkeznek. A negatív fal a puffer kationjaival egy elektromos

kettősréteget hoz létre. A puffer kationjai katód irányú elválasztás esetén a katód irányába tartanak, de a falmentén feldúsult kationok miatt nem csak ezek a pozitív puffer ionok, hanem a kapillárisba töltött folyadék is vándorolni kezd a katód irányába. Ezt a folyamatot elektroosmotikus áramlásnak, röviden EOF-nek nevezzük. Az EOF természetéből adódik, hogy ez minden komponensre egyformán hat, ezért ha megfelelően nagy a mértéke (nagyobb, mint az anionos mintakomponensek töltéséből adódó ellentétes irányú elektroforetikus mobilitásuk miatti anód irányú migrációjának mértéke), akkor a detektorablak előtt elhaladnak mind a kationos, mind a neutrális (EOF-el áramló), mind az anionos molekulák. Az EOF áramlási profilja a kapilláris teljes keresztmetszetében egyforma, úgynevezett „dugóhúzó szerű” áramlásprofil (5. ábra), mely nagyon éles csúcsokat eredményez a HPLC-ben található lamináris áramlási profilhoz képest [173].



5. ábra. Dugóhúzó szerű áramlásprofil (EOF), ami a kapilláris elektroforézisre jellemző. Forrás:<http://ttk.pte.hu/analitika/letoltések/jegyzet/ch08s01.html>

Minél lúgosabb kémhatású a puffer, az EOF értéke annál nagyobb. Amennyiben az EOF nem kívánatos, úgy savas pH-n történő meghatározást vagy nagyobb viszkozitású puffert (hidroxipropil-metil-cellulóz tartalmú puffer), vagy borított falú kapillárist kell alkalmazni. A mérés reprodukálásához állandó EOF kell, tehát megfelelően savas pH, mely esetében az EOF nagyon kicsi lesz, vagy megfelelően lúgos pH, ami stabil állandó nagy EOF-et eredményez. Az EOF nagysága az alábbi képlettel számolható ki [173]:

4. $V_{eo} = \mu_{eo} E$ ahol v_{eo} : az EOF sebessége, μ_{eo} : az elektroosmotikus mobilitás, E : elektromos térerősség

5. $\mu_{eo} = \frac{-\varepsilon \zeta}{\eta}$ ahol ε az elektrolit dielektromos állandója, ζ : A kapillárisfal zétopotenciálja, η : Az elektromos kettősréteg viszkozitása.

A kapillárisfal töltöttsége a zéta potenciált határozza meg, míg a puffer viszkozitásával az elektromos kettősréteg befolyásolható az egyenletben. Az EOF figyelembevételével az adott komponens migrációs sebessége a 2. egyenlethez képest az alábbi szerint módosul:

$$6. v = (\mu \pm \mu_{eo}) E$$

Az EOF a feszültség megfordításával (anód irányú elválasztás) megfordítható, ekkor az anionos komponensek migrálnak előrébb a neutrális, vagy kationos társaikhoz képest [173].

1.5.2 Királis elválasztás

Néhány évtizeddel ezelőtt az az általános nézet terjedt el, hogy a természet homokirális, tehát csak az egyik enantiomer fordul elő természetes körülmények között. Az analitikai módszerek fejlődésével azonban kiderült, hogy rengeteg természetben előforduló molekulának az enantiomerpárja is megtalálható a természetben [79]. Biológiai közegben az egyes enantiomerek mennyiségi meghatározását nehezíti, hogy általában az egyik enantiomerpár jóval nagyobb feleslegben van a másikhoz képest, valamint hogy az enantiomerek fizikai és kémiai tulajdonságukban megegyeznek [172]. Az elválasztásukhoz az egyik leghatékonyabb módszer a kapilláris elektroforézis, mely kis mintaigény, gyors futásidő és alacsony oldószer igény mellett képest biztosítani a nagyhatékonyságú királis elválasztást [152]. Ekkor különböző királis szelektorokat használnak, melyekkel az enantiomer párok fizikai és kémiai tulajdonságaiban különböző komplexeket képeznek. Az enantiomer szelektivitást hárompontos kölcsönhatás modellel szemléltetjük, amely legalább három kölcsönhatást igényel a szelektor és legalább az egyik enantiomer között, és az egyik kölcsönhatásnak sztereokémiaiilag szabályozottnak kell lennie. Így stabilabb komplex kialakítására csak

az egyik enantiomer képes, míg a másikonál a sztereokémiai szabályozott kölcsönhatás nem lesz. Ebből következik, hogy eltérő stabilitású komplexet képez a szelektor az enantiomer párokkal [95]. Amennyiben a szabad és a komplex forma elektroforetikus migrációja között különbség áll fenn, létrejöhet a királis elválasztás. A két komplex egymással már diasztereomer viszonyban van [173]. Az elválasztás jellege ez esetben kromatográfiás alapú, de a migráció mechanizmusa az elektroforézis. Az adott komponens effektív mobilitását az alábbi képlet segítségével számolhatjuk ki:

7. $\mu_{\text{eff}} = \left(\frac{[L]}{[L]+[LC]} \right) \mu_L + \left(\frac{[LC]}{[L]+[LC]} \right) \mu_{LC}$ ahol μ_{eff} az adott komponens effektív mobilitása, $[L]$ a komponens szabadformájának a koncentrációja, $[LC]$ a komponens komplexformájának a koncentrációja, μ_L a komponens szabadformájának elektroforetikus mobilitása, μ_{LC} a komponens komplexformájának az elektroforetikus mobilitása.

Az optikai elválasztás történhet direkt, vagy indirekt módon. A kapilláris elektroforézis esetén a direkt királis elválasztás a preferált; ekkor a pufferhez királis szelektort adnak hozzá. A direkt elválasztás során a kapillárisban alakul ki különbség az egyes enantiomerek effektív mobilitásában a királis szelektorral alkotott eltérő stabilitású és/vagy mobilitású komplexeik miatt [173]. Indirekt elválasztás esetén a kapillárisba juttatás előtt történik meg a komplexképzés, így alakulnak ki a diasztereomerek, majd az elválasztás a diasztereomerek közötti elektroforetikus mobilitásból következik. Ekkor nincs szükség külön királis szelektorra a pufferben. Ilyen diasztereomer képzésre egyes királis származékképző vegyületek alkalmasak, melyek sztereikusan felismerik az egyes enantiomereket, és az így képződött vegyületek már nem egymás tükörképei. Hátránya a módszernek, hogy nagy enantiomer tisztaságú származékképző szükséges [173].

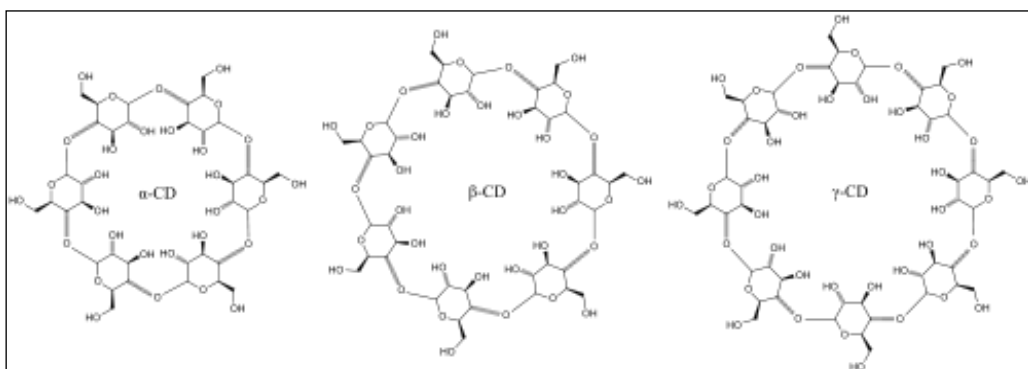
1.5.2.1 Királis szelektorok

A gyógyszeranalitika területén manapság szinte kizárólag ciklodextrineket használnak királis szelektornak. Vannak azonban egyéb királis molekulák, melyek alkalmasak

enantiomerszelektivitást biztosítani, ilyenek például egyes makrociklusos antibiotikumok, epesavak, fehérjék, valamint a koronaéterek [56].

Maguk a ciklodextrinek körülbelül száz éves múlttal rendelkeznek, gyógyászati felhasználásuk azonban az 1970-es évekig várattott magára. Ennek oka lényegében hamisnak vélt toxicitásukban keresendő, amikor French 1957-es publikációjában patkányokkal végrehajtott kísérletéből azt a konklúziót vonta le, hogy amelyik állat evett a ciklodextrinből, az rövidesen elpusztult [46]. Később derült ki azonban, hogy nem maga a ciklodextrin, hanem valószínűleg az akkori korszerűtlenebb technológia miatti oldószerzennyezés (pl.: toulol, mellyel kicsapható volt a β -ciklodextrin) okozta a halálos mérgezéseket a kísérleti állatokon. A későbbiekben azonban ez tisztázódott, és elkezdődhetett ennek a molekulának a sokrétű felhasználása nemcsak a gyógyászat területén, hanem számos más területen is nélkülözhetlenné vált.

Maguk a ciklodextrinek alfa D-glukopiranoz egységekből álló nem redukáló, gyűrűs oligoszacharidok, melyek 1,4-es glikozidos kötésen keresztül kapcsolódnak [158]. A *Bacillus macerans* nevezetű baktérium fermentálja keményítőtől. Alapvetően három fajtájukat különböztetjük meg attól függően, hogy hány darab glükóz molekulából áll a gyűrű (6. ábra. Eszerint lehet alfa (6 tagú), béta (7 tagú), vagy gamma ciklodextrin (8 tagú)).



6. ábra: alfa, béta és gamma ciklodextrin.

Forrás: <https://hu.wikipedia.org/wiki/Ciklodextrin>

A szerkezetükből is látható, hogy nem lehet szó mérgező vegyületekről, ugyanis a szervezetben az amiláz enzim hatására glükózra bomlanak (γ -cilodextrin), vagy a szervezet intestinalis flórája fermentálja őket (α, β -ciklodextrin) [158]. Szerkezetük további elemzése során kiderült, hogy a felépítő szék konformációjú glükóz molekuláknak köszönhetően a szerkezet egy csonkakúphoz hasonlítható. Ezen szerkezet további kialakításában játszanak szerepet a glükóz molekulában található primer, illetve szekunder hidroxil-csoportok, melyeknek köszönhetően a csonkakúp két oldalán található egy keskenyebb, és egy szélesebb nyílás. A glükóz molekulák sajátos elrendeződése miatt, a keskenyebb oldalon találhatóak a primer hidroxil-csoportok, és a szélesebb oldalon a szekunder-hidroxil csoportok. A keskeny oldalon ezen primer hidroxil-csoportok szabad rotációja során csökken az üreg átmérője, míg a széles oldalon a szekunder hidroxil-csoportok intramolekuláris H-kötések kialakítása révén kimerevítik az üreget, létrehozva így a szélesebb nyílást. Az így kialakult különleges szerkezet oka, hogy kívül hidrofil, belül pedig lipofil tulajdonságú a molekula [102]. Így látható, hogy ezek a gyűrűs szerkezetű molekulák belső apoláris részükbe képesek vendég molekulát (vagy molekulákat) befogadni és velük ún. zárványkomplextet képezni. Természetesen a ciklodextrinek és a vendég molekulák között kovalens kötés nem alakul ki, hanem gyenge másodlagos kötőerők (H-híd, elektrosztatikus vonzás, Van der Waals kölcsönhatás stb.) tartják a molekula üregében a vendég molekulát. Az alfa ciklodextrinek inkább kis molekulatömegű alifás oldalláncot tartalmazó vegyületek befogadására alkalmasak, a béta ciklodextrinek aromás és heterociklusos vegyületekkel képeznek stabil komplexet, míg a gamma ciklodextrinek makrociklusokkal és szteroidokkal alakítanak ki stabil származékokat [56].

A ciklodextrineknek a vízdékonysága nagyon jó. Ez az állítás általában igaz, de vannak kivételek, ilyen kivétel például a β -ciklodextrin, melynek a vízdékonysága nagyon gyenge (18,5mg/ml H₂O).

A különböző feladatok ellátására rengeteg féle ciklodextrint fejlesztettek ki, hiszen a szabad hidroxil-csoportok szubsztitúciója különböző csoportokkal rengeteg megváltozott fizikai-kémiai tulajdonságú ciklodextrin létrehozását eredményezte.

A ciklodextrinek számos kiralitáscentrummal rendelkeznek, optikailag tiszta vegyületek, ugyanis enzimatis úton keletkeznek. 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. Manapság a különböző ciklodextrineket hordozóhoz kötve kromatográfiás állófázisként használják (HPLC esetében), vagy a mozgófázishoz adják őket (kapilláris elektroforézis esetében) [56].

A másodlagos kötőerők kialakulása a vendégmolekulák és a ciklodextrinek között a komplexképződés irányába hat, de másodlagos kötőerők révén ezek reverzibilis folyamatok, a folyamat egy K_C egyensúlyi állandóval jellemezhető (általában a komplex kötődési arány 1:1) [102].

Amennyiben a ciklodextrin a mintakomponensével ellentétes töltéssel rendelkezik, a komplexképződés biztosabban megy végbe, azonban túl erős poláros kölcsönhatás esetén a komplex disszociációja olyan mértékben visszaszorul, hogy a sokkal gyengébb, enantioszelektivitástmutató kölcsönhatás nem fogja biztosítani az elválasztást [158]. A ciklodextrinek enantioszelektív komplexképzését számos egyéb tényező befolyásolja a fentebb említett töltés mellett, például a puffer koncentrációja, szerves additívum jelenléte az elválasztó pufferben, a hőmérséklet és a ciklodextrin koncentrációja [158]. Megfelelő koncentráció szükséges a jó felbontás eléréséhez, azonban további emelése általában felesleges, javulást nem mutató eredménnyel jár. A megfelelő térerősség megválasztása szintén elengedhetetlen. Túl alacsony feszültség hosszú futásidővel jár, mely a komponensek diffúziója miatt széles csúcsokat fog eredményezni; másik oldalról a túl nagy feszültség alkalmazása nagyon lerövidíti a futásidőt, nem hagyva elegendő időt a királis szelektornak, hogy az enantiomereket egymástól teljesen elválassza (felbontás $\geq 1,5$). A jó királis elválasztáshoz általánosságban az EOF nem kívánatos, ugyanis jelenlétében a kiralitás centrumokhoz köthető speciális kölcsönhatásból adódó migrációs különbség marginális lehet, ellehetetlenítve a királis elválasztást. A fentiek jól szemléltetik, hogy a pH szerepe rendkívül fontos az elválasztás során, hiszen azzal biztosítható a megkívánt töltésállapot elérése az elválasztandó vegyület, valamint a ciklodextrin részére.

Előfordul a gyakorlatban, hogy több királis szelektort tartalmazó rendszereket használnak [189]. Több királis szelektor egyidejű jelenléte esetén az enantiomerek eredő mobilitáskülönbségét az egyes szelektorok hatására létrejött mobilitás különbségek súlyozott összegeként kaphatjuk meg:

$$8. \Delta\mu_{ov} = \sum i \Delta\mu_i = \sum i \frac{(\mu_f^i - \mu_c^i)(K_2^i - K_1^i)[C_i]}{1 + (K_1^i + K_2^i)[C_i] + K_1^i K_2^i [C_i]^2}$$

Az enantioszelektivitás abban az esetben nő, ha az egyes szelektorok hatására kialakuló mobilitás különbség azonos előjelű. A töltéssel nem rendelkező szelektorok esetén akkor érhetünk el növekedést az enantioszelektivitásban, ha minden szelektor azonos enantiomer felé rendelkezik nagyobb affinitással. Töltéssel rendelkező szelektorok esetében a komplexált forma mobilitása akár ellenkező irányú is lehet. Abban az esetben, ha több, töltéssel rendelkező szelektor van egyidejűleg jelen, csak akkor nő az enantioszelektivitás, ha az egyes szelektorok eltérő enantiomerek felé rendelkeznek nagyobb affinitással, és eltérő irányban befolyásolják az enantiomerek mobilitását. A töltéssel rendelkező szelektor ugyanakkor betölthet csupán szállító funkciót is. Ekkor nem szükséges enantioszelektivitással rendelkeznie [20, 102, 118, 172]. Kettő vagy több enantiomerpár egyidejű elválasztására gyakran használnak két királis szelektort tartalmazó rendszert [45, 103, 175]. Ekkor jellemzően az egyik szelektor az enantioszelektivitást, a másik a kémiai szelektivitást biztosítja [44, 80]. A gyakorlatban elterjedt a töltéssel rendelkező, illetve neutrális ciklodextrinek kombinációja [102].

1.5.3 Detektálási módszerek

A kapilláris elektroforézis többféle detektálási módra ad lehetőséget különböző előnyökkel és hátrányokkal. Az analitikus feladata a megfelelő detektálási mód kiválasztása az analitikai feladatnak megfelelően. A kapilláris elektroforézis sajátosságai (kis mintamennyiség, detektor csatlakoztatása a kapillárisához) miatt a megfelelő detektor megválasztása nem könnyű feladat. A detektálás lehet direkt és indirekt. Indirekt detektálást abban az esetben lehet alkalmazni, ha a mérendő komponens nem rendelkezik detektálható tulajdonsággal. Ez esetben inverz módon a pufferhez képest kapott negatív csúcs jellemzi a koncentrációját e vegyületnek. A direkt meghatározás a vizsgálandó komponensek valamilyen detektálható tulajdonságából nyert kvantitatív információ alapján történik [133]. A legfontosabb technikák:

- Optikai detektálás (UV és fluoreszcens detektálás)
- Elektrokémiai detektálás
- Tömegspektrométer használata detektorként

Az optikai detektálás két legismertebb módja az UV detektálás, illetve a fluoreszcencia mérése. Az UV elnyelés során feltételezett, hogy az elválasztandó komponensek rendelkeznek kromofór csoporttal, mely a detektálás hullámhosszán elnyeléssel rendelkezik. Kapilláris elektroforézis alkalmazásakor előnyös, hogy a kapilláris anyaga az elválasztást nem zavarja, azonban a flexibilitást biztosító külső poliimid réteget el kell távolítani a detektorablaknál, amely a kapilláris sérülékenységét nagyban növeli. Az UV elnyelés a legszélesebb körben használt detektálási mód, azonban alacsony koncentrációérzékenysége korlátozza a használatát kapilláris elektroforézis során. Speciális technikákkal növelhető az UV detektálás érzékenysége (buborék cella, Z-cella). E speciális technikákkal azonban a megnövekedett átmérő zónakiszélesedéshez, így a csúcsok torzulásához vezethet. A leggyakoribb forrása a deutérium lámpa. Az UV mérések szelektivitását növeli, ha nagyobb hullámhosszon történik a mérés. Ez azonban csak akkor megvalósítható, ha a vizsgálandó komponensek rendelkeznek nagyobb hullámhosszon is elnyelő kromofór csoporttal. Minél kisebb hullámhosszt használnak a detektáláshoz, annál nagyobb lesz a háttér puffer UV-elnyelése is, mely zavarja a mintakomponensek meghatározását. Némelyik puffer csak kifejezetten alacsony hullámhosszon rendelkezik elnyeléssel, ezért méréstervezéskor a puffer minőségét, illetve elnyelési tulajdonságát (ún. cut-off hullámhosszát) is figyelembe kell venni [127]. Az UV detektorok közül a legmodernebbek a diódasoros (ún. PDA) detektorok. Ezesetben a detektor nem csak meghatározott hullámhosszon/hullámhosszakon méri meg a detektorablak előtt elhaladó vegyületek abszorbanciáját, hanem egy adott hullámhossz tartományban készít felvételt, így az elválasztás során idő, intenzitás és hullámhossz görbéket kapunk, mely a módszerfejlesztés szempontjából nagyon lényeges információkat szolgáltat [81].

A fluoreszcens detektálás a legszelektívebb detektálási forma, ami használatos kapilláris elektroforézis során, mellyel az érzékenység általában egy-két nagyságrenddel növelhető az UV detektáláshoz képest. Fluoreszcens folyamatok során egy fluorofór

(fluoreszcenciát mutató molekula) alapállapotú π vagy nemkötő elektronja egy adott hullámhosszú foton elnyelése következtében gerjesztődik (excitáció), amely során egy magasabb energiaállapotú π^* -lazítópályára kerül. A gerjesztett állapotból az alapállapotba való visszatérés történhet foton kibocsájtás (emisszió), vagy egyéb, nem sugárzással járó folyamatok során. Az emisszióval járó folyamatok arányának jellemzésére a kvantumhatásfokot (Φ_f), míg a fluorofór gerjeszthetőségére a moláris abszorptivitást (ϵ) használjuk. Fontos követelmény a gyakorlatban alkalmazott fluorofórokkal szemben, hogy magas kvantumhatásfokkal és moláris abszorptivitással, valamint kellő fotostabilitással rendelkezzenek. 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 (lásd következő fejezet). A fluoreszcens detektálás során a megfelelő gerjesztőforrást általában lézertérnyel biztosítják, mely az érzékenységet nagyon megnöveli. A lézertérnyel előnye, hogy egy adott hullámhosszon szelektíven képes gerjeszteni. A legnagyobb hátrányuk, hogy drágák, valamint csak egy adott hullámhosszon tudnak általában gerjeszteni [152]. Biológiai minták kapilláris elektroforézissel történő vizsgálata során érzékenysége és szelektivitása révén a lézer-indukálta fluoreszcencia (LIF) az egyik leggyakrabban alkalmazott detektálási mód [130, 171]. Az LIF során a leggyakrabban használt lézertérnyel:

- Ar-ion lézer (488/520 nm)
- He-Cd lézer (325/442 nm)
- Diódalézerek (különböző hullámhossz)

Az amperometriás, illetve a vezetőképességen alapuló módszerek az optikai úton történő detektálás alternatívái lehetnek. Ezen módszerekkel ugyanakkor nem érhető el jelentős érzékenységbeli javulás, megfelelő kivitelezésük viszont speciális elektronikai egységet és módosított kapillárist igényel.

A kapilláris elektroforézis tömegspektrométerrel történő összekapcsolása lehetőséget teremt az elválasztott vegyületek szerkezetének tanulmányozására. A rendkívül alacsony injektált mintatérfogat miatt azonban ez a detektálási mód alig haladja meg az UV-elnyelésen alapuló módszer érzékenységét. További problémát jelent a két berendezés megfelelő csatolása, az alkalmazható segédanyagok és pufferek szűk köre pedig megnehezíti a módszerfejlesztést. Fehérjék és biomolekulák analízise során értékes szerkezeti információkat szolgáltat, ezért alkalmazása főleg ezen a területen gyakori [20].

1.5.4 Fluoreszcens származékképzés

Az elválasztástechnikában derivatizálásnak nevezünk minden olyan kémiai módosítást a mintán, mely során a mintából olyan származékot nyerünk, amely megfelel az analitikai feladat elvégzéséhez. Kémiai módosítás egy fluorofór, kromofór vagy elektroaktív csoport/molekula kovalens kötését jelenti a vizsgálandó vegyületekhez és végeredményben jól detektálható termék képződik. Ha a származékképző önmagában is rendelkezik fluoreszcenciával akkor fluorofór, ha csak a kialakult termék fluoreszkál akkor fluorogén tulajdonságú vegyületről beszélünk. Leggyakrabban a detektálás segítségét, vagy lehetővételét célozzák meg a származékképzéssel, legáltalánosabban az UV/VIS spektrumban történő abszorbancia elősegítésével. A származékképzés kapilláris elektroforézis technikában gyakran használt eljárás, melyet a klinikumban, biológiai kutatásban, igazságügyben, környezettudományi területeken és élelmiszeriparban is kiterjedten használnak [171, 201]. A származékképzés során csak bizonyos vegyületekhez kapcsolódik a származékképző reagens, és fluoreszcencia detektálás során így elérhető, hogy a módszer szelektivitása növekedjen [201].

Négy típusát különböztetjük meg a származékképzésnek, attól függően, hogy mikor történik meg a reakció az elválasztás során.

- Pre-kapilláris vagy off-line származékképzés
- In-line származékképzés

- Kapillárisban történő származékképzés
- Post-kapilláris származékképzés

Pre-kapilláris származékképzéskor az injektálás előtt történik meg a minta származékképzése. Ennek előnye, hogy nagy rugalmasságot biztosít a származékképzés idejére, a reagens típusára és a származékképzés körülményeire (pl. hőmérséklet, közeg). Ekkor a származékképzés jobban kontrollálható a többi módhoz képest, azonban a keresztreakciók elkerüléséhez sokszor mintaelőkészítést igényel a származékképzés [201]. Elmondható, hogy a legelterjedtebb eljárás kapilláris elektroforézis során. Ugyanis a megfelelő időfaktor biztosítása a reakció teljes végbemenetelét eredményezi. Hátránya a kis mintatérfogatok (< 2 µl) nehéz kezelése a hígulás elkerülése érdekében. Lehetőség van viszont minta-koncentrációra, illetve a reagensfelesleg eltávolítására is.

In-line származékképzés esetében maga a származékképzés a kapilláris elektroforézis futásnak egy szerves része. A származékképzést injektálás előtt végzik el a készüléken belül. A reakció egy külön kamrában történik, mely az elválasztó kapillárishoz csatlakozik. A reakció kamra és az elválasztó rendszer csatlakoztatása egy ún. T-csatlakozón keresztül történhet. In-line származékképzéskor relatív gyors származékképzésre van szükség (kevesebb, mint 5 perc), ezért az alábbi származékképzők jöhetnek szóba: az NDA (naftalén-2,3-dikarboxaldehid), a FACE-SH (2-((5-fluoreszceinil) aminokarbonil)etil-merkaptán) és az OPA (orto-ftalaldehid) gyors reakciókinetikával képes reagálni primer aminokkal. Akár neurotranszmitterek mérésére is alkalmazhatók cerebrospinális folyadékából az LIF detektálás előtt. Az NDA származékképzéséhez azonban egy nukleofil, általában cianid jelenléte szükséges, melyből veszélyességi hátránya fakad [201].

A kapillárisban történő származékképzés során a reakció elválasztáskor magában a kapillárisban megy végbe, még detektálás előtt. Könnyen belátható, hogy a származékképzést ekkor befolyásolja a diffúzió, valamint az elektromigrációja is a származékképző reagensnek, illetve a vizsgálat tárgyát képező komponensnek. Ezeket, illetve, ha kell, hidrodinamikus nyomást kihasználva egy keverő hatás lép fel a reagens és a célkomponensek között. Nagy előnye, hogy a rendszerbe való bevitel könnyen

automatizálható. A pre-kapilláris származékképzéshez képest a reagens és a mintaigény sokkal kevesebb ebben az esetben, ezért gyors származékképzés esetén jól használható és a hígítás is minimalizálható. Fontos követelmény a gyors származékképzés mellett, hogy a főleges származékképző a vizsgálandó anyag-származékképzett komplexétől váljon el detektálás előtt, vagy a származékképző önmagában ne adjon detektálható jelet (fluorogén származékképzők), mely zavarná a mintakomponensek kvantitatív meghatározását. A származékképzés körülményeit nagyon alaposan meg kell tervezni kapillárisban történő származékképzéskor. A legfontosabb paraméterek közé tartozik a szeparációs puffer összetétele, az injektálási szekvenciája a különböző reagenseknek és a mintának, a reagens és minta keverésének biztosítása, valamint a származékképzésre szánt idő. Általában a hidrodinamikus injektálásokat (vizsgálandó vegyület és reagens) egy kivárási periódus követi, vagy feszültség rákapcsolásával biztosított keverés. Előnyei közül a legfontosabb, hogy könnyen automatizálható, azonban nagy hátránya, hogy a mérések megfelelő reprodukálhatósága nehezen kivitelezhető [201].

Poszt-kapilláris származékképzés esetén az elválasztásra a származékképzés előtt kell sort keríteni. Ekkor a származékképzés és a detektálás között a lehető legkevesebb idő teljen el. Az elválasztásra azért lehet előbb szükség, mert többféle (zavaró) derivátum is képződhet a vizsgálandó komponensekből, valamint a minta mátrixból, melyek zavarhatják a detektálást. A származékképzés az elválasztó kapilláris után történik meg egy kis térfogatú reakció kamrában. Az előzőekhez képest itt még fontosabb a gyors származékképző reakció. [201].

Az aminosav neurotranszmitterek biológiai mintákból történő meghatározásához a detektálásra az egyik legalkalmasabb módszer az LIF használata, ugyanis az aminosavak önmagukban nem rendelkeznek szelektíven detektálható funkciós csoporttal, továbbá a komplex mátrixal rendelkező biológiai mintákban kis mennyiségben előforduló D-aminosavak vizsgálatához egy megfelelően szenzitív és szelektív detektálás szükséges, melyet az LIF tud biztosítani. Az aminosav neurotranszmitterek esetén a legcélszerűbb az amin csoporton keresztül történő származékképzés, ezért az LIF-ben használatos amin csoporton keresztül reagáló származékképzőket foglalom össze az alábbiakban.

Az LIF során a származékképzők felhasználhatóságát alapvetően befolyásolja, hogy milyen csoportokkal képes reagálni a származékképző. A legfontosabb csoportok: amin, tiol, keto, aldehid és hidroxil csoport. Másik fontos kérdés, hogy milyen lézert használ az analitikus a gerjesztéshez, ugyanis az adott származékképző csak a megfelelő hullámhosszon történő gerjesztés során mutat fluoreszcenciát. A kereskedelmi forgalomban a leggyakoribb lézer az argonion lézer, mely 488 nm-en képes gerjeszteni, és az így gerjesztett fluoreszcens vegyületek 520 nm-en emittálnak fotont, ami detektálható [201]. Amin származékképzőkre jellemző, hogy megfelelő körülmények között szelektíven képesek a vizsgálandó vegyületek primer, vagy szekunder aminocsoportjaival reagálni. A reakció feltétele a deprotonált amino csoport, ezért ezen reakciók enyhén lúgos pH-jú közegben (pH 8-10) zajlanak.

Az egyik legrégebben használatos származékképző az OPA, melyet több kutatócsoport is használt aminszármazék meghatározására [148-151]. Hashimoto és mtsai. OPA származékképző használatával választottak el D-szerint patkányagyból HPLC módszerük segítségével [152]. Az OPA, fluorogén származékképző előnye, hogy gyors származékképző reakcióval bír, azonban csak tiolcsoportokkal képes reagálni. A kutatócsoport ezért az aminosavakat előzetesen derivatizáltatta N-izobutiril-L-ciszteinnel. Hátránya, hogy az OPA származékok meglehetősen instabilak, ami miatt nehéz pontos módszert fejleszteni.

Az egyik legismertebb amin származékképző a FITC. Fluorofór jellege miatt nagy feleslege, valamint számos reakcióterméke miatt azonban komplex elválasztási feladatot ad. A FITC-el való származékképzés körülbelül egy napot vesz igénybe és fényérzékeny volta miatt sötét helyiséget igényel. Számos kutatócsoport írt le biológiai mintákból történő aminosavmeghatározást e származékképző reagenssel [74, 104, 162, 209, 212] köztük a mi kutatócsoportunk is [190]. Li és mtsai. 13 aminosavat választottak el és kvantifikáltak FITC származékképzés segítségével agyi mikrodializátumból, validált kapilláris elektroforézis segítségével. Királis szelektornak HP- β -CD-t használtak, közel húsz perces futásidővel [104]. Huang kutatócsoportja a miniaturizálás irányában mikrochip kapilláris elektroforézis módszert dolgozott ki FITC származékképzővel, mely alkalmas a D-aszpartát és D-glutamát meghatározására. A

módszer nagyon gyors meghatározást biztosít (kevesebb, mint három perc) [74], azonban validálás híján az eredményei megkérdőjelezhetőek.

A FITC-hez hasonló szerkezetű származékképző a CFSE, mely szintén fluorofór tulajdonsággal rendelkezik. A FITC-hez képest viszont kevésbé hajlamosak hidrolízisre és reaktívabbak és a gerjesztési maximumuk 488 nm közelébe esik, akár csak a FITC-nek. Kutatócsoportunk határozott meg aszpartátot és glutamátot CFSE származékképző segítségével [190].

Thongkhao-On és mtsai. CBQCA származékképző segítségével választottak el 17 aminosavat patkány vitreális perfuzátumból. A CBQCA nagy előnye, hogy fluorogén származékképző, azonban használatához cianid ionok jelenléte szükséges, így jelentős veszélyforrást jelenthet az analitikai munka során. A származékképzés két órát vesz igénybe. A módszer egy királis MEKC, mely alkalmas a 17 aminosav kvantifikálására 11 perc alatt [177]. Hasonló a CBQCA-hoz az NDA származékképző, mely érzékenysége jobb a CBQCA-nál. Hátránya szintén a cianiddal való munka, valamint a drága lézerforrás igénye. Több kutatócsoport mellett [52] Miao és mtsai. dolgoztak ki módszert D-aszpartát meghatározására NDA származékképzés segítségével. Módszerük közel húsz perces futásidővel bír [114], mely jelentősen hosszabb, mint a kutatócsoportunk által kidolgozott módszereknél tapasztalt. Miao kutatócsoportjának módszeréhez hasonló módszert dolgoztak ki Zhao és mtsai. szintén NDA származékképzést használva azonos futamidővel D-aszpartát meghatározásra [208].

Másik közkezdvelt származékképző az NBD-F. Intézetünk már korábban is sikerrel alkalmazta a fluorogén NBD-F származékképzőt [174, 190]. Az utóbbi években több kutatócsoport is írt le sikeres módszerfejlesztéseket e származékképző segítségével [57, 73, 92, 126, 185, 186, 207, 211]. Zhao és mtsai. NBD-F-et használták szerin enantiomerek elválasztásához kapilláris elektroforézissel lúgos pH-n. Módszerüket patkányból nyert biológiai mintákon is tesztelték, ahol átlagosan 117 nmol/g mennyiségben mutatták ki a D-szerint [210]. Lorenzo és mtsai. humán plazmában választottak el és határozottak meg 14 aminosavat szintén NBD-F származékképző segítségével. Módszerük során királis szelektornak β -ciklodextrint használtak fel. Módszerük analízisideje azonban közel harminc perces, ahol az belső standard migrációja a leglassabb [108]. Érdekes publikáció Tsunoda és munkatársai eredménye,

melyben biológiai mintából heptakis(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciklodextrin (TM- β -CD) segítségével választott el aszpartát enantiomereket NBD-F-dal történő származékképzést követően, enyhén savas (pH=4) körülmények között [186].

Általánosságban elmondható, hogy a származékképzők aromás gyűrűrendszert tartalmazó szénhidrogének, illetve kondenzált heterociklusos rendszereket tartalmazó vegyületek. A gyűrűkhöz kapcsolódó funkciós csoportok ugyanakkor nagyban módosíthatják a vegyületek fluoreszcens tulajdonságait. Alapvető szabályként azt mondhatjuk, hogy az elektronküldő csoportok (-NH₂, -NHR, -NR₂, -OH) jelenléte magas kvantumhatásfokot eredményez és az excitációs maximumot a hosszabb hullámhosszak irányába tolja, míg az elektronszívó csoportok (-CHO, -COOH, -NO₂, -F) negatívan befolyásolják a kvantumhatásfokot. A fluoreszcenciát befolyásolja továbbá az oldószer polaritása, valamint savas vagy bázikus karakterű funkciós csoportok esetén az alkalmazott pH is. Természetesen ahhoz, hogy egy fluorofórt származékképzőként alkalmazhassunk, rendelkeznie kell egy reaktív funkciós csoporttal is.

Elmondható, hogy az ideális származékképző oldható és kellően stabil abban a közegben, amiben a reakció gyorsan és enyhe körülmények között végbemegy. Míg a származékképző önmagában nem fluoreszkál, a képződő termék stabil és erős fluoreszcenciát mutat. Mindemellett az ideális származékképző nem toxikus és megfelelő tisztaságban, kereskedelmi forgalomban hozzáférhető. A valóságban egyetlen származékképző sem felel meg az összes, itt felsorolt követelménynek. A gyakorlatban történő alkalmazhatóságukat azonban jórészt e tulajdonságaik szabják meg [6, 194]. A kapilláris elektroforézisben alkalmazott származékképzők esetén fontos, hogy a képződő termék ne legyen túlságosan lipofil, ekkor ugyanis a kapillárisfalhoz történő adszorpció miatt csúcstorzulás következhet be.

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, D- 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 Felhasznált anyagok

Standardok: az L-aszparaginsavat, D-aszparaginsavat, D-glutaminsavat, L-szerint, taurint, glicint, valamint a D-szerint, GABA-t, treonint, valint és alanint a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA), a mononátrium-L-glutamát monohidrátot, valamint az L-ciszteinsavat a Fluka-tól (Buchs, Svájc) vásároltuk. A vegyületeket 10^{-2} M koncentrációban oldottuk mesterséges gerincvelő folyadékban (ACSF), melyet a Semmelweis Egyetem Gyógyszertára biztosított számunkra. A törzsoldatokat a felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

Származékképző: a származékképzéshez használt 7-fluoro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazolt (NBD-F) a Sigma-Aldrich-től szereztük be. Az NBD-F-et abszolút etanolban oldottuk $1,2$ mg/ml koncentrációban.

A királis szelektorként használt izomertiszta 6-monodeoxi-6-mono(3-hidroxi)propilamino- β -ciklodextrin hidrokloridot (HPA- β -CD) a Cyclolab Kft.-től (Budapest) vásároltuk.

A kapillárisfal borításához használt akrilamidot a Fluka-tól, a reakció kivitelezéséhez szükséges N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamint (TEMED) ugyancsak a Fluka-tól, míg a 3-(trimetoxi-szilil)propil-metakrilátot a Sigma-Aldrich-től vásároltuk.

Egyéb vegyszerek: a bórsav, a 4-(2-hidroxi-1-piperazin-etánszulfonsav (HEPES) a nátrium-hidroxid a Sigma-Aldrich-től származott. Az abszolút etanol a Reanaltól (Budapest, Magyarország).

Az összes kísérletet reverz ozmózis elven működő MilliQ Direct 8 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) víztisztító berendezésből nyert bidesztillált víz felhasználásával végeztük.

Az állatkísérletek során használt ketamin hidroklorid/xylazin hidroklorid oldatot és a metil-antranilt a Sigma-Aldrich-től szereztük be. A mikrodialízis szonda rögzítéséhez fogászati cementet használtunk (Duracryl, Spofa Dental, Prága, Cseh Köztársaság).

3.2 Készülékek

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 kidolgozott protokoll szerint végeztük [70].

A mikrodialízis szonda EI-A-Z 1; 1,5 mm aktív felületi hosszúsággal rendelkezett (származása Eicom, Kyoto, Japán). Magát a szondát egy pumparendszerhez kötöttük (Stoelting, Dublin, Írország), mely biztosította a keringést a szondában. A perfúziós médiumok cseréjét egy polietilén csővezetékekből és váltórendszerből álló készülékkel biztosítottuk (CMA Mikrodialízis AB, Solna, Svédország).

3.3 Származékképzés

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. Kutatócsoportunk korábban kidolgozott módszere során a származékképzés ideje 15 perc volt. A D-szerinre optimalizálva a hosszabb, 20 perces reakcióidőre a csúcsterület növekedés miatt került sor.

3.4 Elválasztási körülmények

Az excitátoros aminosavak 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 kapilláris hosszban. Az elválasztás 25°C-on történt 400 V/cm alkalmazott feszültség mellett. A mintainjektálás hidrodinamikusan történt (20 s – 6,89 kPa). A készülék vezérlését, az adatgyűjtést, valamint az elektroferogramok kiértékelését a gyártó által biztosított 32 Karat szoftver 5.0-as verziójával végeztük. A kettős ciklodextrin rendszer szükséges volt a kémiai és a királis szelektivitás biztosítására. A DM- β -CD biztosította az aszpartát és a glutamát közötti kémiai szelektív választást, míg a HPA- β -CD felelt a királis elválasztásért az egyes enantiomerek esetében. A detektáláshoz NBD-F származékképzést használtunk LIF detektorral. Módszerünk alkalmas a D-aszpartát, L-aszpartát, D-glutamát és L-glutamát kvantitatív meghatározására [189]. 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 μ M-nak adódott.

Az excitátoros aminosavak és D-szerin elválasztására fejlesztett módszerem esetén 50 mM pH 7 HEPES pufferben oldottuk fel a 6 mM HPA- β -CD királis szelektort. Az effektív és a teljes kapilláris hossz 50 és 60 cm volt. Minden futás előtt vízzel és elválasztó pufferrel mostuk a kapilláris csövet. A mintainjektálás akárcsak az excitátoros aminosav rendszerénél, itt is hidrodinamikusan 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-as verziójával végeztük.

3.5 Állatkísérletek

3.5.1 Szövetekből történő meghatározáshoz használt állatok

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 (n=8), amelyek a helyi tenyészetből származtak (Semmelweis Egyetem Anatómiai-, Szövet és Fejlődéstani Intézet, Budapest). Csirkék esetén tízes csoportokban tartottuk őket egy 33 x 40 x 25 cm-es műanyag dobozban nyolc napos korukig, majd utána négy fős csoportokra osztva nagyobb ketrecekben lettek elhelyezve, amíg elérték a felnőtt kort (62 nap). A patkányokat standard laboratóriumi ketrecekben tarottuk.

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 tarottuk.

Az összes állatkísérlet során betartottuk a Semmelweis Egyetem Etikai Tanácsának laboratóriumi állatok tartására és kezelésére vonatkozó szabályzatát, mely összhangban van az Európa Tanács laboratóriumi állatok tartására vonatkozó direktíváival (86/609/EEC). Az állatokat klimatizált helyiségben (22 ± 2 °C), 12 órás sötét/világos ciklus mellett tartottuk, és ad libitum fogyaszthattak standard laboratóriumi tápot és csapvizet.

3.5.2 Tanulási folyamatok vizsgálata szövetmintákból

A napos csirkéket 20 x 25 x 25 cm-es nyitott dobozokban tároltuk érkezésükkor. A csirkéket (n=84) a kísérletek során párosan tartottuk, csökkentve így az izolációs stresszt. Legalább három órás (maximum 24 órás) akkomodációs periódust követően egy száraz, fekete üveggyöngyöt helyeztünk a dobozukba, előzetes gyakorlati stimulusként. Ingerként vékony fémszálat használtunk, melyet egy színes üveggyöngy végéhez erősítettünk. Öt perccel később egy piros gyöngyöt helyeztünk be, amit vagy vízzel, vagy metil-antranillal vontuk be, mely keserű, de ártalmatlan reagens. A metil-antranillal találkozott csirkék esetében undort lehetett felfedezni (fejrázás,

visszavonulás, szájtátás). Öt perccel, 6 órával, vagy 24 órával később száraz kék és piros gyöngyöket helyeztünk be a csirkéknek fél percre egyenként, tesztelve így a memóriájuk megtartását.

A memóriatesztek ideje alatt az összes csirke kétnapos volt. A 24 órás csoportnál a csirkék a kísérlet előtti napon lettek tanítva. Azok a csirkék, akik nem mutattak érdeklődést egyik inger iránt sem az előzetes, valamint a normál gyakorlatkor (nem voltak éberek), ki lettek zárva a vizsgálatból (n=12). Amelyik csirkék gyöngyén víz volt és ennek ellenére visszafogták magukat, valamint azok a csirkék melyeknél a metil-antranil nem váltott ki undort szintén ki lettek zárva (n=16). A kizárási procedúráknak köszönhetően két homogén csoportot hoztunk létre. Egyik csoportban a metil-antranil hatására elkerülést mutató csirkék, míg a másikban a víz hatására elkerülést nem mutató csirkék kerültek.

3.5.3. Szövet és mikrodialízis minták az excitátoros aminosavak méréshez

3.5.3.1 Szövetminták a kémiai vizsgálathoz

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 [4], nucleus accumbens az mSt-vel, míg az amygdala az arcopalliummal [147].

Az összes szövetmintához mg-onként 10 µl acetonitril-víz elegyet (2:1) adtunk, ultrahanggal rövid ideig (5 s) homogenizáltuk, majd ezt követően centrifugáltuk (3,000×g, 10 perc, 4 °C). A felülúszókat ACSF-el tízszeres térfogatra hígítottuk, majd a

kutatócsoportunk korábbi módszerében leírtaknak megfelelően végeztük a származékképzést (3.3 fejezet).

3.5.3.2 Mikrodialízis szonda beültetése

A mikrodialízis eszköz műtéti behelyezésére az érkezés napján került sor. Az érzéstelenítéshez intramuszkuláris ketamin-xilazin injekciót használtunk (40 és 8 mg/ttkg dózisban). A megfelelő pozicionálás érdekében az állat fejét sztereotaxiás készülékkel rögzítettük. A mikrodialízis-szondát a baloldali mediális striátumba ültettük és fogászati cement használatával rögzítettük a koponyacsonton. A pontos koordináták: bregmától 4 mm-el előrébb, a koponya középvonalától 0,85 mm-re lateralisán, az agy külső felszínétől 5,8 mm-re ventrálisán. Az implantáció után az állatok 12 órán át regenerálódtak étel és víz nélkül. A mikrodialízis mintákat egy nappal a műtét után kezdtük el gyűjteni. A kísérletek után a csirkéket a fentebb említett eljárási körülmények között dekapitáltuk, hogy a szonda lokalizációját verifikálni tudjuk.

3.5.3.3 Mikrodialízis procedúra

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 Ca²⁺, 125 mM Mg²⁺, 129 mM Cl⁻, 125 mM H₂PO₄⁻, 21 mM HCO₃⁻, 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. Az analitikai vizsgálathoz a fehérjementesítés lépéseit mikrodializátumoknál nem kellett elvégezni, ezért közvetlenül a származékképzéssel folytattuk (3.3 fejezet).

A kísérlet során három mintavétel után (60 perc) a madarak ihattak vizet szabadon 20 percen keresztül (1 mintavétel), 100 perccel később 50 mM KCl tartalmú ACSF került átáramoltatásra 20 percen keresztül (1 mintavétel), majd minden stimulus után a perfúziós médiumot visszaváltottuk standard ACSF-re további mintagyűjtés céljából. A nátriumionokat KCl adagolásakor lecsökkentettük, fenntartva így az ozmolalitást.

3.5.4 Szövetminták a D-szerin és D-aszpartát egyidejű 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 metszetekhez a rostrocaudális sztereotaxiás koordinátákat, valamint az agyi régiók lokalizációjának megválasztásához az Allen Mouse Brain Atlas-t használtuk fel [101]. A metszetek hozzávetőlegesen 1,5 mm vastagok. A bulbus olfactorius és a cerebellum dorsalis része közvetlenül a teljes agyból került leválasztásra. A többi rész esetében sztereomikroszkóp segítségével történt meg a megfelelő metszetrész kinyerése. A szövetminták tömegét lemértük, majd azonnal szárazjeges közegbe helyeztük. A mintákat a további feldolgozásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A mintaelőkészítés hasonló módon történt az excitátoros aminosav meghatározásához nyert biológiai minták előkészítéséhez, azonban a felülűzők végső hígítása nem tízszeresére történt ACSF-el, hanem kétszeresére.

3.6 Módszervvalidálás

Az excitátoros aminosavak mellett történő D-szerin meghatározásra kidolgozott módszert az FDA irányelvei alapján validáltuk [41]. A kvantitatív meghatározás érdekében belső standardként (IS) $1\text{ }\mu\text{M}$ L-ciszteinsavat alkalmaztunk. A validálás során hat különböző koncentrációt (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; $1,5\text{ }\mu\text{M}$) használtunk a D-aszpartát és D-szerin standardokból a kalibrációs görbe megszerkesztéséhez. Ahhoz,

hogy az L-aminosavak biológiai mintákban jelenlévő mennyiségét imitáljuk, a validálást ötvenszeres koncentrációjú (2,5; 5; 12,5; 25; 50, 75 μM) L-glutamátot, L-aszpartátot, L-szerint, taurint és glicint is tartalmazó standardok keverékével végeztük.

A minőségellenőrzési (QC) mintákat alacsony, közepes és magas koncentrációban használtuk a D-aszpartátra és a D-szerinre nézve (0,08; 0,04; 1,25 μM), mellyel a napon belüli és a napok közötti pontosságot és torzítatlanságot 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 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 mintakonzentrációt tekintettük.

Stabilitási méréseket ennél a módszernél nem végeztünk, mivel kutatócsoportunk előzőleg fejlesztett módszere validálásakor megállapítottuk, hogy a feldolgozott és származékképezett mintákat -20 fokon maximum két napig lehet tárolni [189]. Ennek ellenére minden esetben egy napon belül történt a biológiai minták lemérése, naponként új kalibrációs görbe felvételével.

3.7 Statisztikai és számítási módszerek

A kalibrációs pontokra történő egyenes illesztést a Sigma Plot szoftverrel végeztük. Minden esetben súlyozott lineáris regressziót alkalmaztunk.

A csirkék és a patkányok vizsgálatánál az excitátoros aminosav (EAA) koncentrációkat ANOVA full faktoriális általános lineáris modellel (GLM) hasonlítottuk össze az alábbi faktorokat használva: kor és faj a különböző kísérletekben. Az adott egyedek különböző agyterületeit egyedeken belüli faktorként jellemeztük (RM ANOVA). Az adatokat

logaritmizáltuk, amikor szükséges volt, hogy az ANOVA hipotézisekhez megfelelőek legyenek. A szabadsági fokokat korrigáltuk RM ANOVA használatakor az ún. Greenhouse-Geisser módszerrel, amennyiben a szfericitás nem volt feltételezhető. A kísérleti csoportok kor és faj szerinti összehasonlítását Tukey post hoc teszttel végeztük el. Az azonos állatok agyterületeinek összehasonlításához páros t-próbát használtunk kiegészítve a p érték Sidak-Holm féle beállításával.

Mikrodialízis minták esetén a relatív változásokat (a kontrollhoz képest) nem-parametrikus teszttel vizsgáltuk (Wilcoxon Signed Rank teszt). Meg kell említeni, hogy a D-aszpartát esetében öt állaton alapuló eredmények lettek bemutatva, ugyanis a másik három állatnál nem sikerült kimutatni D-aszpartátot. A szignifikancia szint $p < 0,05$.

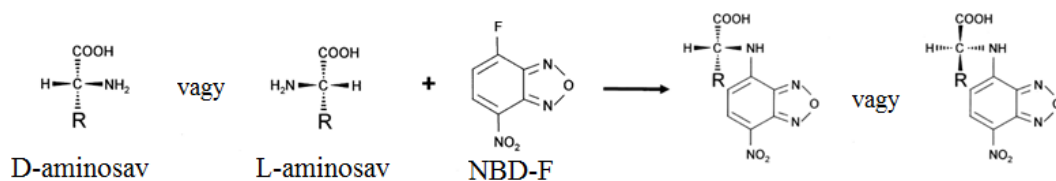
Az egér minták egyes agyterületeit kor szerint, vagy régió szerint hasonlítottuk össze kétmintás t-próba használata mellett.

4. Eredmények:

4.1 CE-LIF módszer kidolgozása

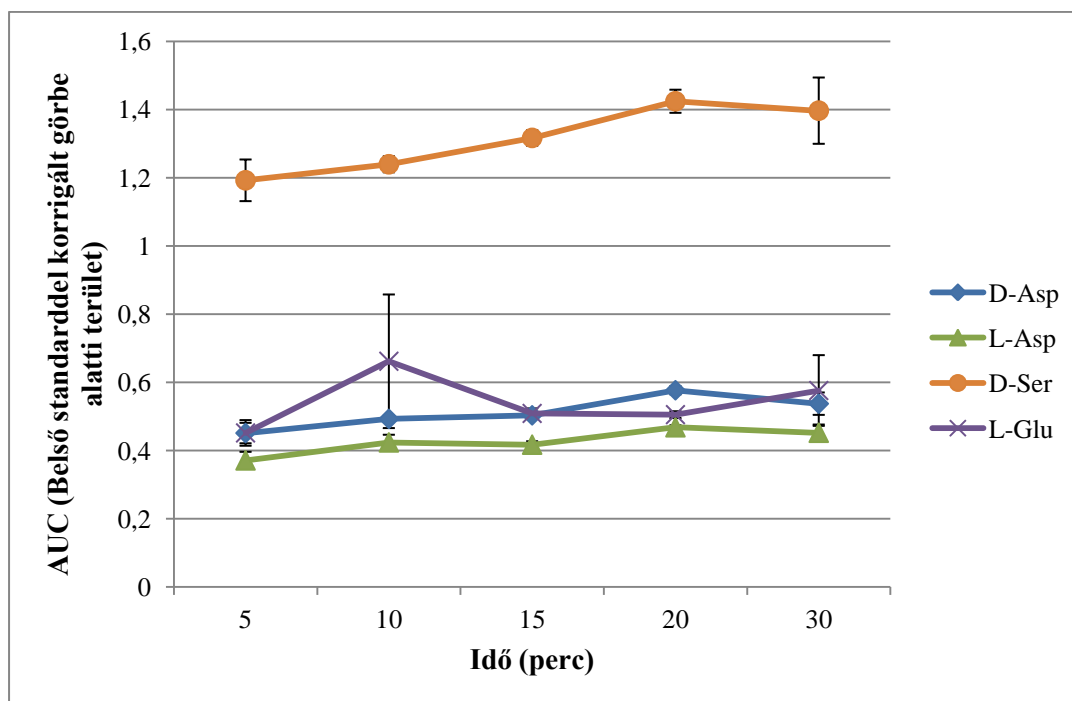
4.1.1 A származékképzés optimalizálása

A Gyógyszerhatástani Intézetben már régebben is alkalmaztak NBD-F-et, mint származékképző reagenst diaminok, valamint lizin meghatározására [174]. 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 származékképző aminosavakkal való általános reakcióját a 7. ábra mutatja.



7. ábra: NBD-F-el történő származékképzési reakció aminosavakkal

A D-szerinrel 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 (8. ábra). Ezért 20 percre emeltük a származékképzési reakcióidőt.

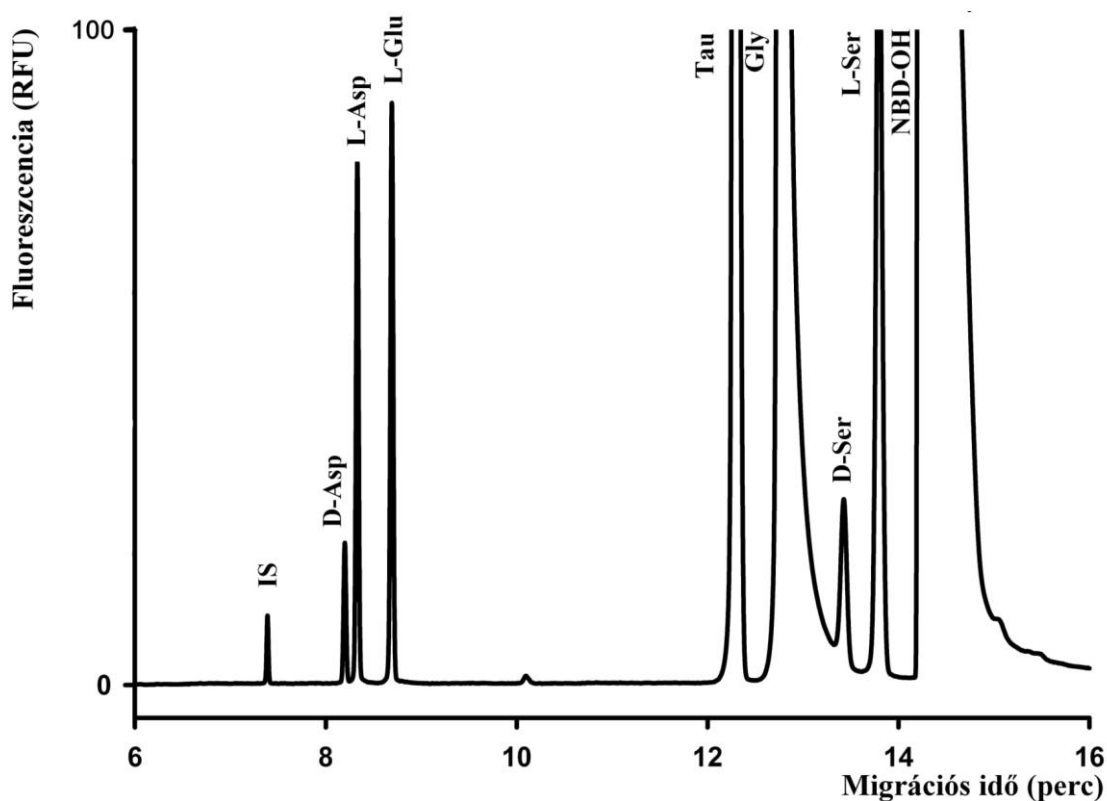


8. ábra: Az L-glutamát, L-aszpartát, D-aszpartát és a D-szerin származékképzésének időfüggése NBD-F-el. A csúcsterületeket a belső standard ciszteinsav csúcsterületével korrigáltuk.

4.1.2 Az elválasztási körülmények optimalizálása

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 szupresszáljuk. Ennek eléréséhez lineáris poliakrilamiddal borítottuk a kapillárist, 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). Figyelembe véve, hogy az aminosav enantiomerek megfelelő elválasztásához feltehetően hosszabb effektív kapilláris hossz szükséges, az elválasztásokat 50 cm effektív kapilláris hosszra végeztük.

Az excitátoros aminosavak királis elválasztása során a HPA- β -CD megfelelőnek bizonyult enantioszelektivitását tekintve az aszpartát és glutamát enantiomerek elválasztásához. Módszerünket szeretnénk volna továbbfejleszteni, és az NMDA receptorokon ko-agonista funkciójú molekula, a D-serin meghatározásával kiegészíteni. Mivel a módszer biológiai mintára való alkalmazhatóságának tesztelésekor a házi csirkék agyából származó mintákban D-glutamát nem volt detektálható [189], a 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 (9. ábra).



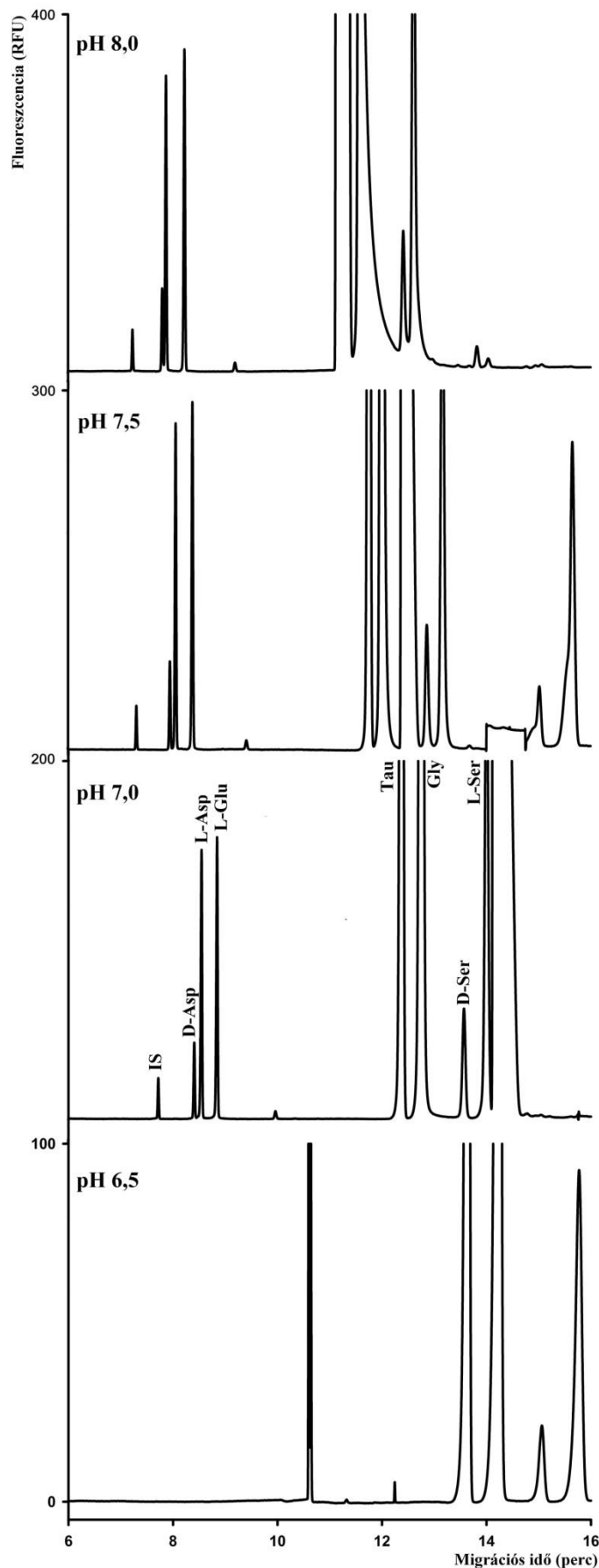
9. ábra: 10^{-6} M L-ciszteinsav belső standard (IS), 5 μ M D-Asp és D-Ser, 25 μ M L-Asp, L-Glu és L-Ser, 50 μ M glicin (Gly) és taurin (Tau) tartalmú standard minta.

Elválasztási körülmények: 50/60 cm x 75 μ m poliakrilamiddal borított ömlesztett szilika kapilláris; injektálás: 6,89 kPa 20 s; 5 mM HPA- β -CD-t tartalmazó 100 mM borát puffer pH 8; -24 kV.

Az amin-derivatizált aszpartát és glutamát két negatív töltésével a többi aminosav előtt éri el a detektor ablakot, míg a D-szerin a többi aminosavhoz hasonlóan csak egy negatív töltéssel rendelkezik. Látható, hogy ezekkel a kondíciókkal a D-aszpartát, L-aszpartát, az L-glutamát, valamint a D- és az L-szerin elválasztása kevesebb, mint 14 perc alatt megvalósítható. 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 egyéb melléktermékeivel részben ko-migrált, meggátolva így a pontos kvantifikálását.

A pH csökkentése 8-ról 7-re javította mind a kémiai, mind a királis szelektivitást (10. ábra). A pH 8 alá csökkentése azonban a borát pufferről a megfelelő pufferkapacitású zwitterionos HEPES-re történő váltást indokolta. Látható, hogy a pH 7-re való csökkentésekor minden vizsgált komponens az L-szerin előtt migrált, valamint a királis felbontás javult a komplex és a szabad formában lévő aminosavak közti nagyobb mobilitáskülönbségek miatt. A királis szelektivitás mellett a kémiai szelektivitás is javult a pH csökkenésének hatására. A glicin, valamint a származékképzőből származó melléktermékek alapvonalon elváltak a vizsgált D-szerintől. További csökkentése a pH-nak 6,5-re az aszpartát és a glutamát ko-migrációját eredményezte, ezért végül 50 mM pH 7 HEPES puffert választottuk a háttér elektrolitnak.

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 (11. ábra). Látható, 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 (1. és 2. táblázat).



10. ábra: A szerin és aszpartát enantiomerek elválasztásának pH függése 50 mM HEPES pufferben

1 μ M L-ciszteinsav belső standard (IS), 5 μ M D-Asp és D-Ser, 25 μ M L-Asp, L-Glu és L-Ser, 50 μ M glicin (Gly) és taurin (Tau) tartalmú standard minta ACSF-ben oldva.

Elválasztási körülmények: 50/60 cm x 75 μ m poliakrilamiddal borított ömlesztett szilika kapilláris; injektálás: 6,89 kPa 20 s; 5 mM HPA- β -CD, 50 mM HEPES puffer; -24 kV

1. táblázat: A vizsgálandó komponensek felbontása különböző pH értékeken végzett elválasztás esetén. Ha a felbontás értéke $\geq 1,5$ akkor a két komponens alapvonalon elvált egymástól.

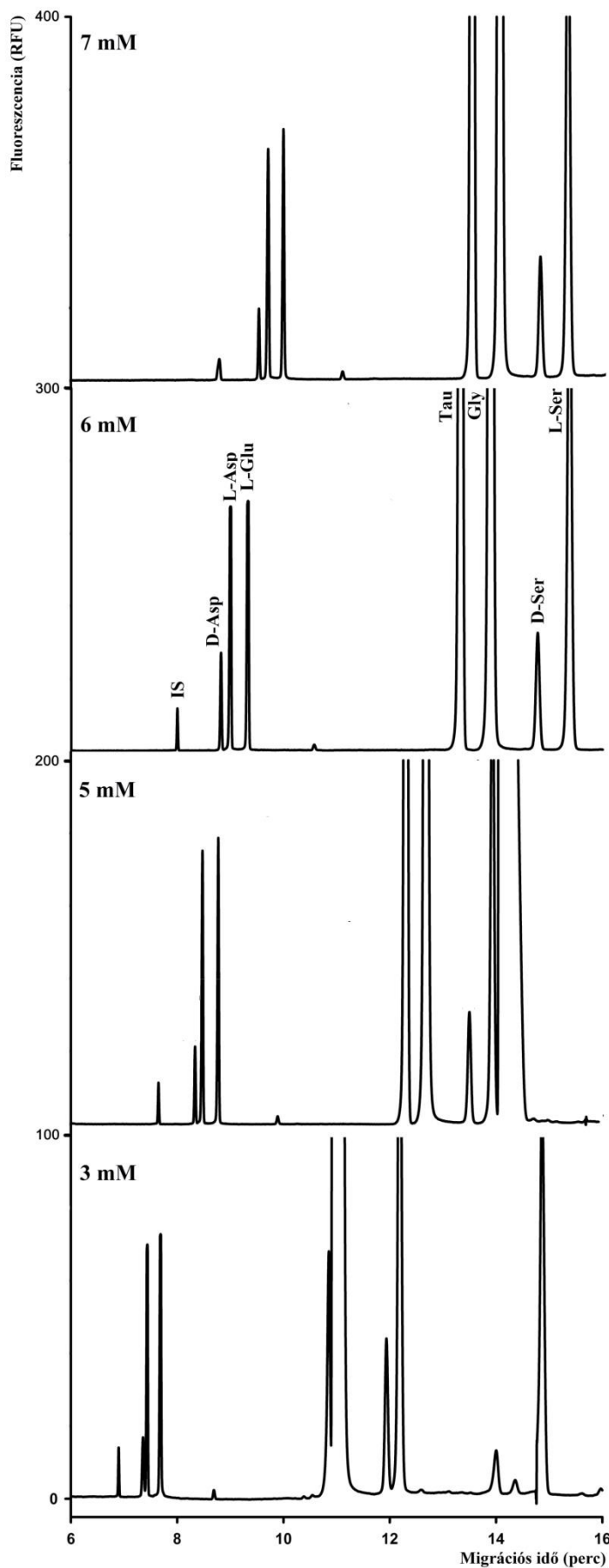
pH	6,5	7	7,5	8
R (D-Asp/L-Asp)	-	1,63	1,52	1,15
R (D-Ser/L-Ser)	2	1,84	1,52	1,17
R (Gly/D-Ser)	2,21	2,68	-	1,44

R: Felbontás, melyet a 32 Karat 5.0-ás szoftverrel számoltattuk ki az alábbi képlet alapján: $\frac{1}{4} \times \left(\frac{\Delta\mu_p \sqrt{N}}{\mu_p + \mu_o} \right)$ ahol μ_p a komponens elektroforetikus mobilitása, μ_o az EOF mobilitása (elektroozmotikus mobilitás), míg az N az elméleti tányérszám

2. táblázat: A vizsgálandó komponensek felbontása különböző királis szelektor koncentráció alkalmazásakor. Ha a felbontás értéke $\geq 1,5$ akkor a két komponens alapvonalon elvált egymástól.

HPA- β -CD konc.	3 mM	5 mM	6 mM	7 mM
R (D-Asp/L-Asp)	1,38	1,63	1,76	1,79
R (D-Ser/L-Ser)	1,49	1,84	2,21	2,32
R (Gly/D-Ser)	-	2,68	2,73	2,89

R: Felbontás, melyet a 32 Karat 5.0-ás szoftverrel számoltattuk ki az alábbi képlet alapján: $\frac{1}{4} \times \left(\frac{\Delta\mu_p \sqrt{N}}{\mu_p + \mu_o} \right)$ ahol μ_p a komponens elektroforetikus mobilitása, μ_o az EOF mobilitása (elektroozmotikus mobilitás), míg az N az elméleti tányérszám

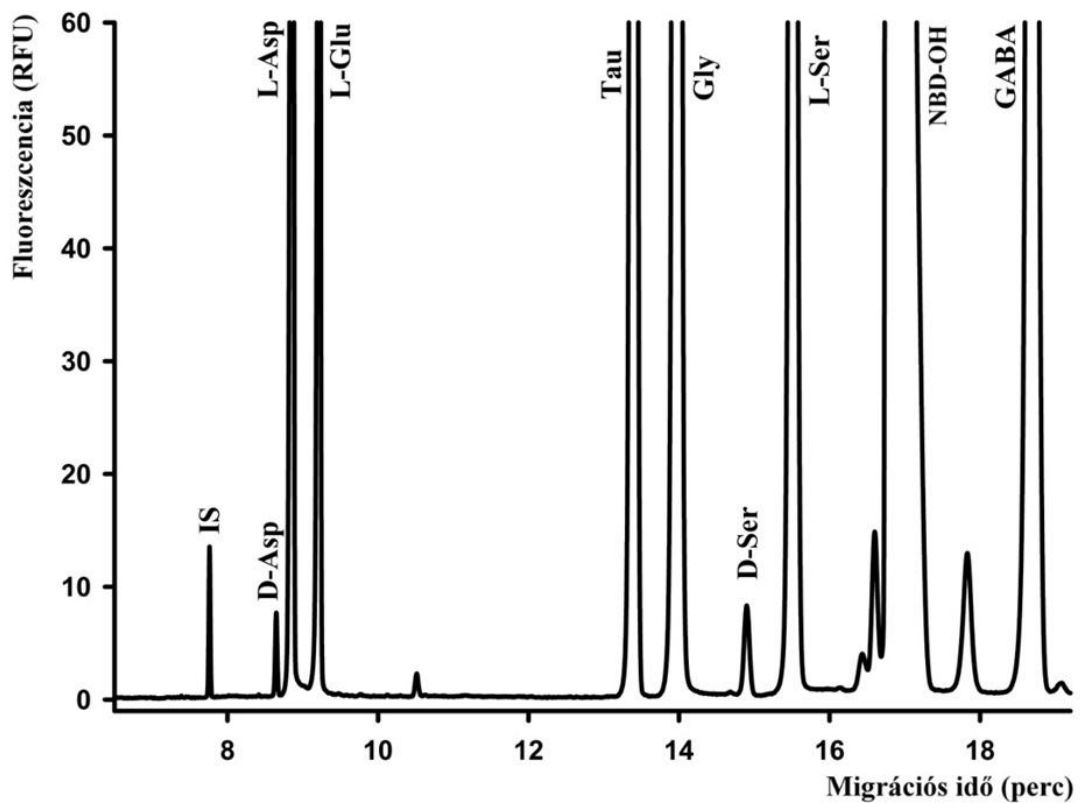


11. ábra: A D-szerin és D-aszpartát elválasztásának CD koncentrációfüggése 50 mM pH 7,0 HEPES pufferben

1 μ M L-ciszteinsav belső standard (IS), 5 μ M D-Asp és D-Ser, 25 μ M L-Asp, L-Glu és L-Ser, 50 μ M glicin (Gly) és taurin (Tau) tartalmú standard minta.

Elválasztási körülmények: 50/60 cm x 75 μ m poliakrilamiddal borított ömlesztett szilika kapilláris; injektálás: 6,89 kPa 20 s; 50 mM pH 7,0 HEPES puffer; 24 kV

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 (12. ábra).



12. 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.

4.1.3 A módszer validálása

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.

3. táblázat: A módszer napon belüli megbízhatóság értékei (n=5)

Torz.: torzítatlanság; **Pont:** pontosság; **c) D-Asp és D-Ser; d) L-Asp és L-Glu**

QC	0,08 μM_c / 0,4 μM_d		0,4 μM_c / 20 μM_d		1,25 μM_c / 62,5 μM_d	
	Torz. (%)	Pont. (RSD%)	Torz. (%)	Pont. (RSD%)	Torz. (%)	Pont. (RSD%)
D-Asp	104,83	7,57	105,94	5,56	96,17	5,35
D-Ser	85,1	7,9	88,69	7,44	92,23	2,09
L-Asp	85,15	4,07	109,66	5,51	96,18	5,26
L-Glu	91,48	3,93	88,69	5,23	92,23	6,55

A napon belüli és a napok közti pontosság és torzítatlanság is meghatározásra került az alábbi QC mintakonzentrációkkal: 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 (3. táblázat) 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 (4. táblázat) 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. táblázat: A módszer napok közti megbízhatóság értékei (QC n=3)

Torz.: torzítatlanság; Pont.: pontosság; a) D-Asp és D-Ser; b) L-Asp és L-Glu

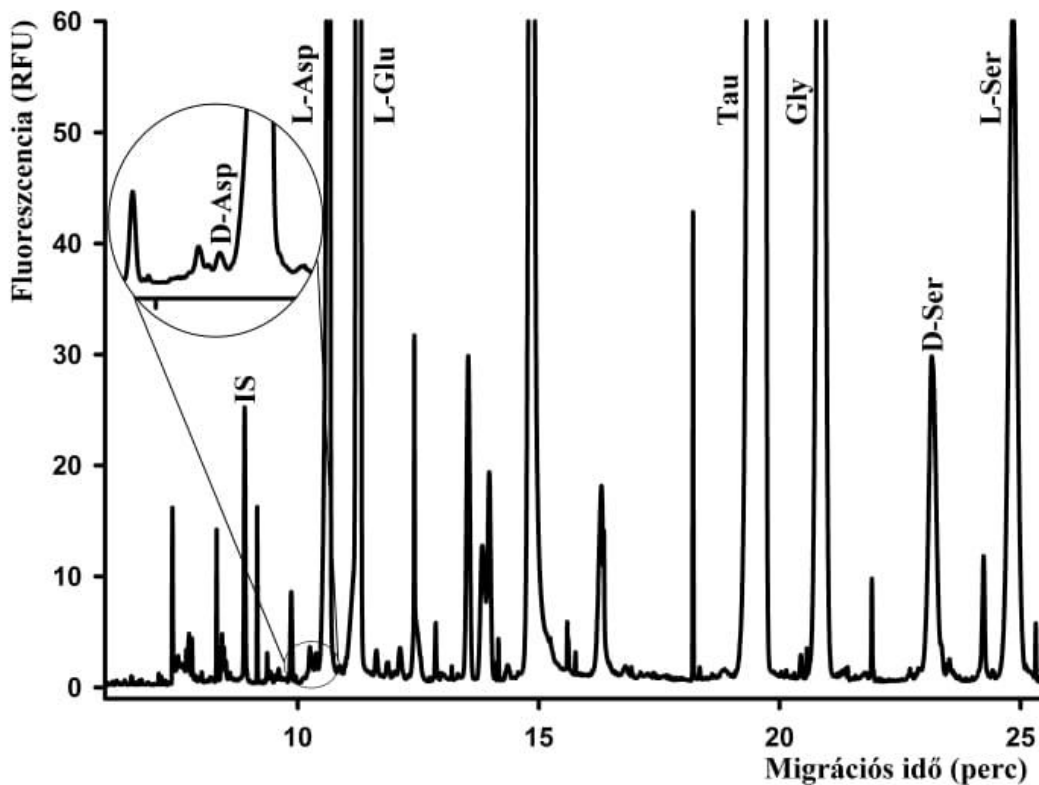
QC	0,08 μM_a / 0,4 μM_b		0,4 μM_a / 20 μM_b		1,25 μM_a / 62,5 μM_b	
	Torz. (%)	Pont. (RSD%)	Torz. (%)	Pont. (RSD%)	Torz. (%)	Pont. (RSD%)
D-Asp	97,93	9,47	101,07	6,74	100,24	5,72
D-Ser	85,21	0,44	93,46	6,87	98,16	8,41
L-Asp	85,05	0,95	106,61	3,77	103,25	9,45
L-Glu	95,29	4,4	109,98	4,96	112,11	14,9

4.2. Biológiai minták analízise

4.2.1 D-szerin és D-aszpartát agyterületek közötti eloszlásának vizsgálata

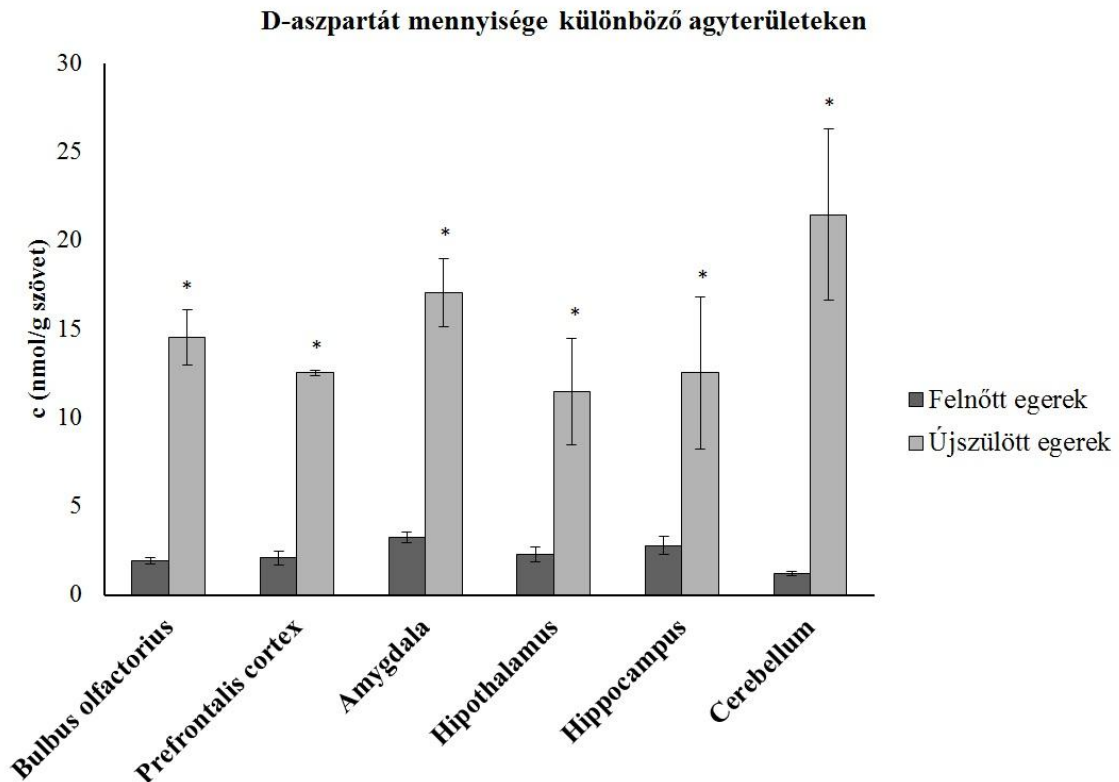
A módszerünket biológiai minták analízisére is felhasználtuk, ahol a D-aminosavak eloszlását követtük nyomon különböző egér agyterületekben. Egy reprezentatív elektroferogramot a 13. ábra mutat be.

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 összemérhető nagyságrendileg (D-aszpartát esetén 11-22 nmol/g szövet, míg D-szerin esetében 11-26 nmol/g szövet).



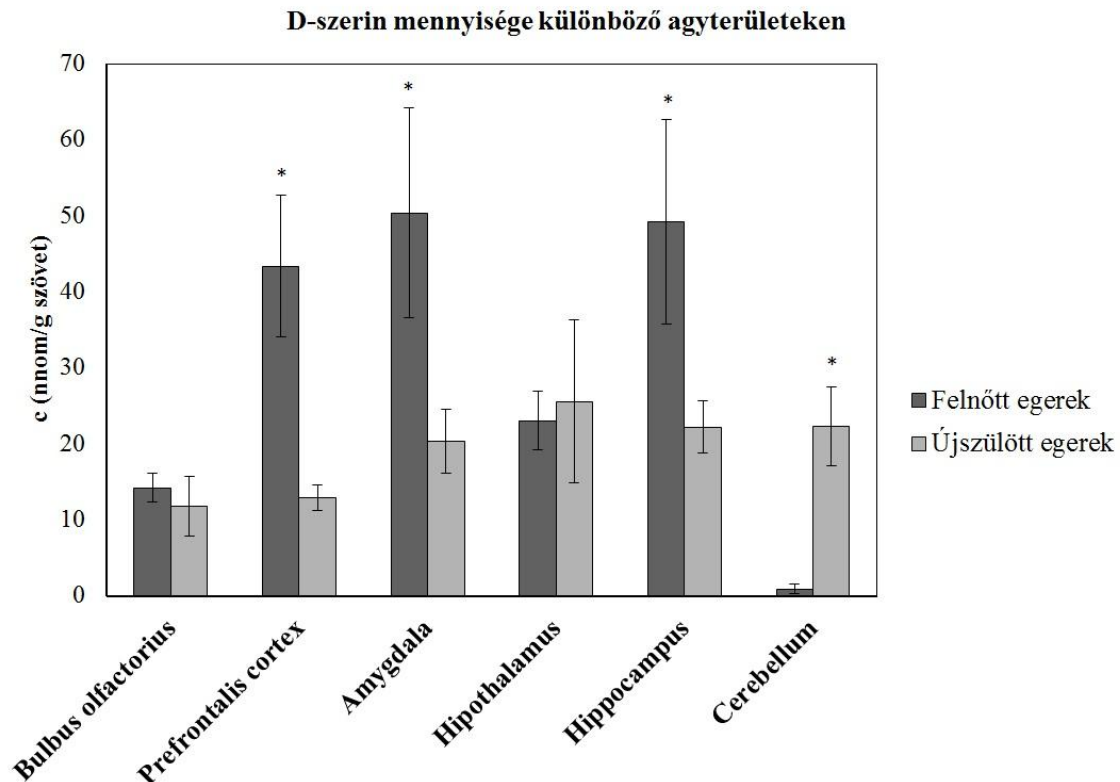
13. ábra: Reprezentatív elektroferogram egy C57BL/6 felnőtt egér prefrontális cortexéből előkészített mintából. Elválasztási körülmények: 50/60 cm x 75 μ m poliakrilamiddal borított ömlesztett szilika kapilláris; injektálás: 6,89 kPa 20 s; 1 μ M ciszteinsav belső standard, 6 mM HPA- β -CD, 50mM pH 7,0 HEPES puffer; -24 kV.

Az újszülött egereknél körülbelül egy nagyságrenddel nagyobb a D-aszpartát mennyisége, mint felnőtt korban, mely a neurogenesisben betöltött fontos szerepét támasztja alá. Látható, hogy a D-serin mennyisége a felnőtt egereknél három agyterületen kimagaslik az újszülöttekhez képest, még hozzá az amygdalában, a hippocampusban és a prefrontális 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-serin csökkenés felnőtt egyedeknél. Az eredményeket a 14. és 15. ábra foglalja össze.



14. ábra: A D-aszpartát mennyisége felnőtt és újszülött C57BL/6 egerek hat agyterületén (n=5).

A csillaggal jelölt agyterületeken szignifikáns eltérés mutatkozott a felnőtt és az újszülött egerek között (kétmintás t-próba $\alpha=0,05$, bulbus olfactorius: $p= 0,0068$; prefrontalis cortex: $p= 0,0022$; amygdala: $p= 0,016$; hypothalamus: $p=0,028$ hippocampus: $p= 0,018$, cerebellum: $p=0,0026$)



15. ábra: A D-szerin mennyisége felnőtt és újszülött C57BL/6 egerek hat agyterületén (n=5).

A csillaggal jelölt agyterületeken szignifikáns eltérés mutatkozott a felnőtt és az újszülött egerek között (kétmintás t-próba $\alpha=0,05$: prefrontalis cortex: $p= 0,001$; amygdala: $p= 0,017$; hippocampus: $p= 0,037$, cerebellum: $p=0,009$).

4.2.2 Az aszpartát enantiomerek és glutamát enantiomerek agyterületek közötti eloszlásának vizsgálata

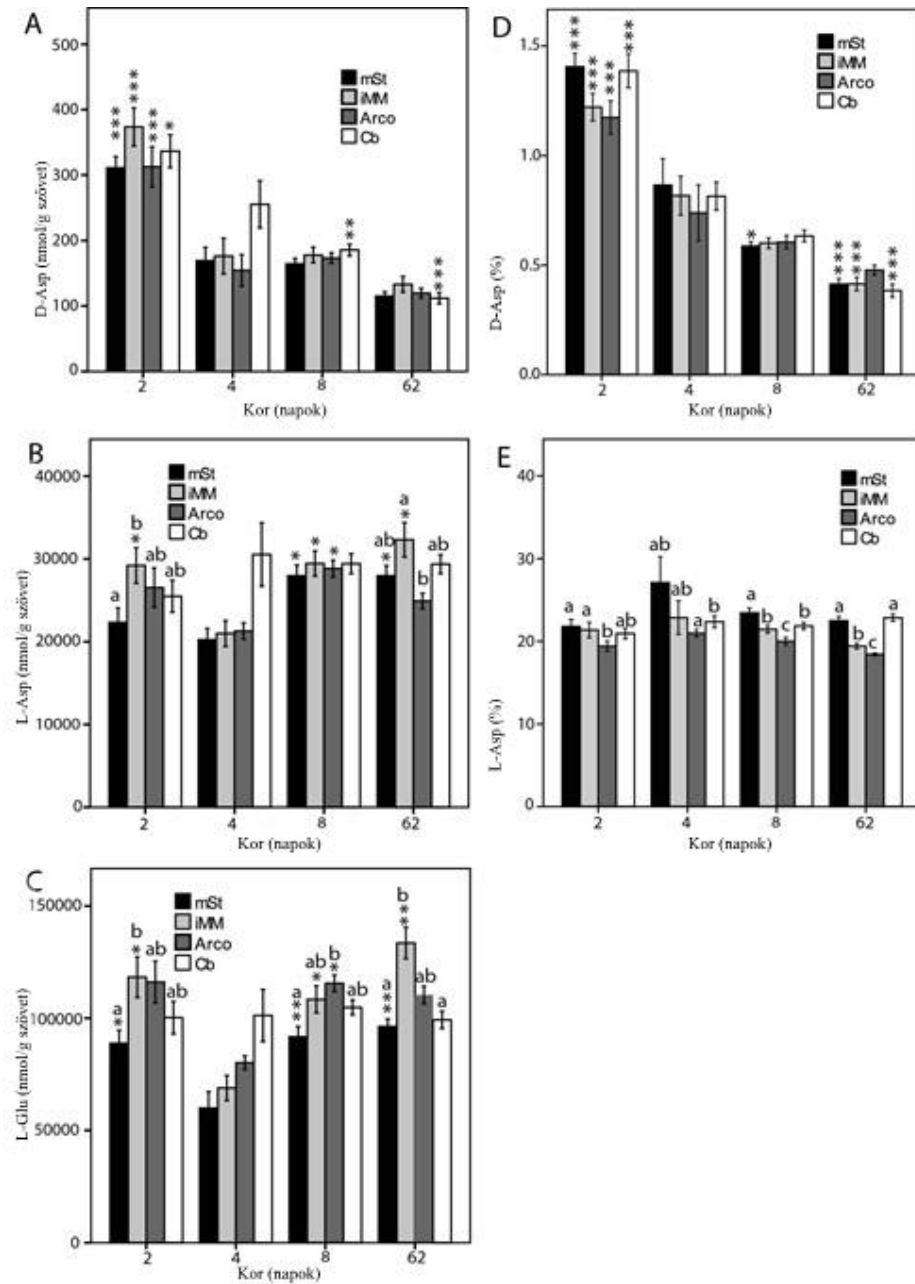
Módszerünk alkalmazásakor nem sikerült a mintákban D-glutamátot kimutatni, szemben a D- és L-aszpartáttal, illetve L-glutamáttal, melyek mindegyik mintában megtalálhatóak voltak. A házi csirkékben az L-aszpartát mennyiségére nézve nem találtunk szignifikáns hatást sem az agyterületek vonatkozásában ($F_{3,177}=2,29$,

$p=0,09$), sem az adott régió és kor közötti interakció vizsgálatakor ($F_{9,177}=0,82$, $p=0,58$).

Kortól függő változást tapasztaltunk mind az L-aszpartát (kor, ANOVA: $F_{3,59}=6,61$, $p=0,018$, 16. B ábra) és az L-glutamát (kor, ANOVA: $F_{3,57}=4,79$, $p=0,005$, 16. C ábra) esetében, főleg a 4. napon bekövetkezett tranzien csökkenésnek köszönhetően. Az L-glutamát koncentrációban szignifikáns különbség volt az agyterületek között. A legkevesebb L-glutamát az mSt/Ac területeken volt (RM ANOVA: $F_{3,171}=12,52$, $df=3$, $p=0,005$ 17 C. ábra).

A kornak szignifikáns hatása van a D-aszpartát koncentrációra az általunk vizsgált négy csirke agyterületen (ANOVA: $F_{3,57}=23,28$, $p<0,001$), ami egy jelentős csökkenést mutat a második és a negyedik nap között (Tukey post-hoc teszt: $p<0,001$) és alacsony is marad innentől kezdve (16.A ábra). Az egyes agyterületek D-aszpartát koncentrációja nem mutatott szignifikáns különbséget ($F_{3,171}=1,64$, $p=0,18$), valamint az adott régió és kor között sem találtunk összefüggést a D-aszpartát koncentrációjára vonatkozóan ($F_{9,171}=0,82$, $p=0,60$). Ha az L- és a D-aszpartát koncentrációját százalékosan fejezzük ki (L-aszpartát kifejezve az össz L-aszpartát plusz L-glutamára nézve, illetve a D-aszpartát kifejezve az össz D-aszpartát plusz L-aszpartára nézve), akkor tisztán látható a D-aszpartát korfüggő csökkenése egy egyensúlyi L-aszpartát szint mellett. (A kor hatása a D-aszpartát arányra: $F_{3,57}=33,6$, $p<0,001$ 16. D ábra). Az L-aszpartát/L-glutamát arány ezzel szemben nem mutatott változást a korról ($F_{3,57}=1,17$, $p<0,331$), sőt a feljebb említett tranzien csökkenés (melyet az abszolút koncentrációból számoltunk) is megszűnt. Azonban meg kell említeni, hogy ez az arány agyterületfüggően változik ($F_{3,57}=20,16$, $p<0,001$ 16. E ábra).

Nem találtunk különbséget a felnőtt csirkék és patkányok L-aszpartát koncentrációja között (ANOVA: $F_{1,16}=4,03$, $p=0,06$, 17. B ábra), azonban az agyterületi hatás (RM ANOVA: $F_{3,48}=3,25$, $p=0,04$) és a két faktor közötti interakció (faj és agyterület RM ANOVA: $F_{3,48}=6,79$, $p=0,002$) szignifikánsnak mutatkozott. A post-hoc páros t-próbákkal felfedezésre került, hogy a csirkék arcopalliumában csökkent L-aszpartát szint figyelhető meg, de csak ha a cerebellumhoz hasonlítjuk ($p=0,025$), míg a patkányoknál a cerebellumban találtuk a legkisebb L-aszpartát szintet ($p<0,05$, 17. B ábra).

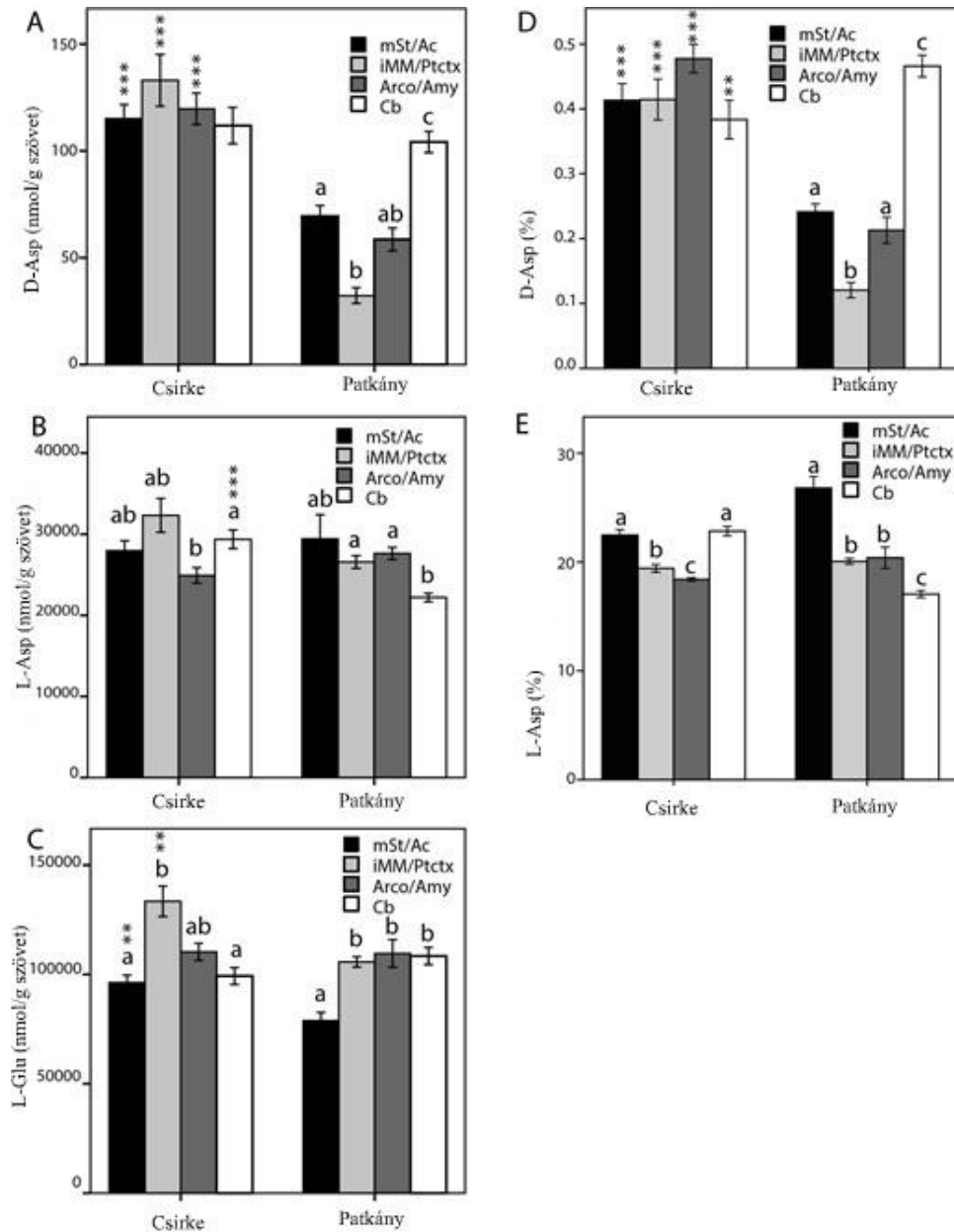


16. ábra: A kor hatása a D-aszpartát (A), L-aszpartát (B) és L-glutamát koncentrációra (C) (átlag±standard hiba) a házi csirkék négy agyterületében. A D-aszpartát százalékos eloszlása az összaszpartát mennyiséghez képest (D). Az L-aszpartát százalékos eloszlása az excitátoros aminosavakhoz képest (E). A csillagok a szignifikáns különbséget jelölik a 2. napi értékekhez viszonyítva (Tukey post hoc tesztek *:p<0,05, ***:p<0,001). A különböző betűk az oszlopok felett a szignifikáns eltéréseket jelzik az egyes agyterületek között azonos korú csirkék esetén (páros t-próbák: p<0,05).

Az L-aszpartátnak a két faj közti különbsége szignifikánsan kisebb értéknek adódott a patkány cerebellumban ($F_{1,16}=29,24$, $p<0,001$). Ha összehasonlítjuk az arányokat (L-aszpartát/L-aszpartát + L-glutamát), akkor már azt tapasztaljuk, hogy nincs eltérés a két faj között ($F_{3,15}=0,45$, $p=0,51$ 17. E ábra), de szignifikáns az eltérés az agyterületek között ($F_{3,15}=43,1$, $p<0,001$).

A patkányoknál kicsivel kisebb L-glutamát koncentrációt mértünk, mint csirkéknél (ANOVA: $F_{1,16}=6,37$, $p=0,023$), de csak némely agyterületen volt szignifikáns eltérés (faj és terület faktorok: RM ANOVA: $F_{3,48}=19,12$, $p<0,001$): az mSt/Ac és az iMM/Ptctx területeknél mutatkozott meg ez a szignifikáns eltérés (17. C ábra). Csirkékben az L-glutamát koncentráció kisebb volt az mSt-ben (páros t-próbák: $p=0,001$) és a cerebellumban ($p=0,029$), mint az iMM-ben, míg patkányoknál a nucleus accumbens mutatott alacsonyabb L-glutamát koncentrációt bármelyik másik agyterülettel szemben (páros t-próbák: $p<0,05$). Az L-glutamát koncentráció nem volt egyforma az összes agyterületben ($F_{3,129}=5,61$, $p=0,001$, 17. C ábra). A fajon belüli eltéréseket elemezve az mSt tartalmazta a legkevesebb L-glutamátot a másik három agyterülethez képest csirkéknél ($F_{1,43}>5,76$, $p<0,022$).

A felnőtt csirkéknél, három agyterületnél a négyből magasabb D-aszpartát szinteket mértünk, mint a patkányoknál (17. A ábra, fajok: ANOVA: $F_{1,15}=106,96$, $p<0,001$). Azonban a cerebellum esetében nem találtunk eltérést (Tukey post-hoc: $p>0,05$). A D-aszpartát koncentráció agyterületenként változónak adódott, amikor mind a patkányokat, mind a csirkéket együttesen vizsgáltuk (RM ANOVA: $F_{3,48}=14,39$, $p<0,001$). Az eltéréseknél fajok közötti különbségeket is felfedeztünk (fajok közti és agyterületek közötti interakció: ANOVA: $F_{3,48}=24,28$, $p<0,001$). Nem találtunk szignifikáns különbséget csirkék agyterületei között (páros t-próbák: $p>0,84$), míg patkányoknál a D-aszpartát szintje a cerebellumban volt a legmagasabb és a Ptctx-ben volt a legkevesebb (17. A ábra). Azonos eredményt kaptunk, amikor az arányokat (D-aszpartát / D-aszpartát + L-aszpartát) vizsgáltuk (17. D ábra).



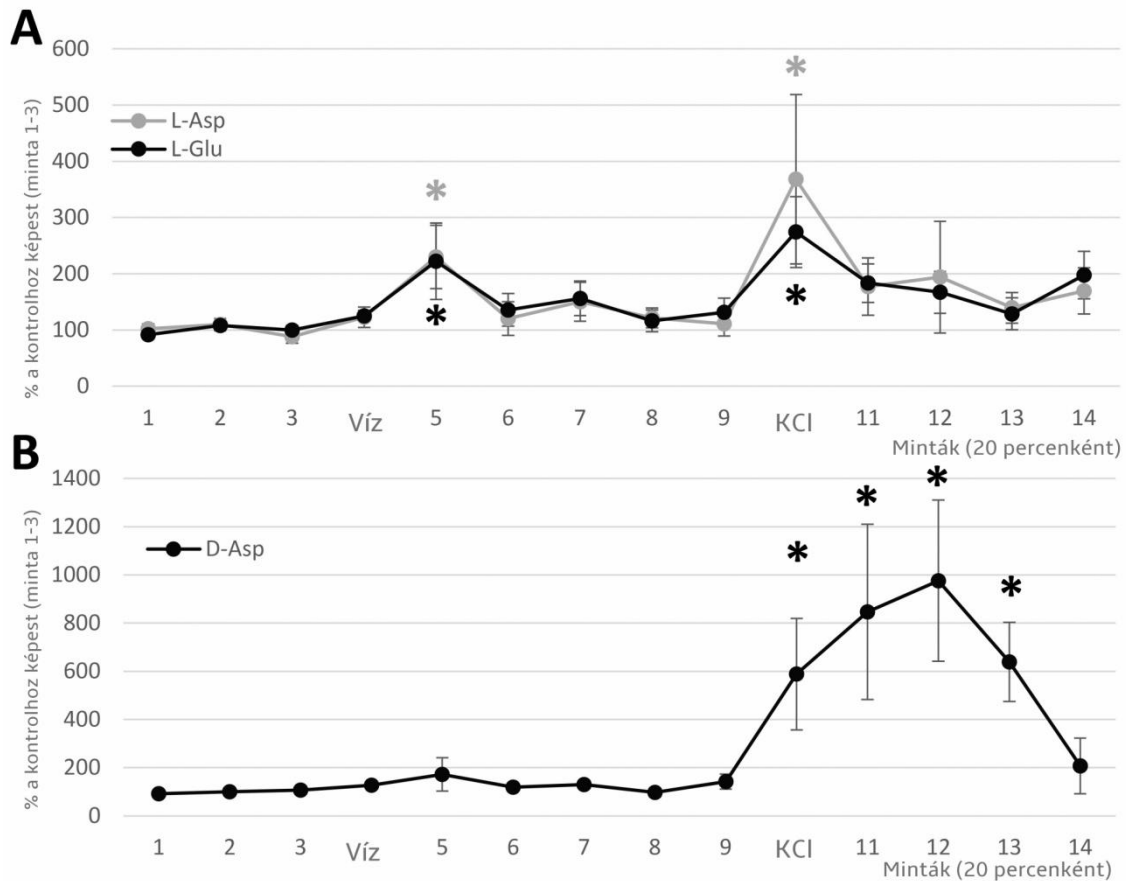
17. ábra: A D-aszpartát (A), L-aszpartát (B) és L-glutamát koncentrációjának (C) (átlag±standard hiba) összehasonlítása négy ekvivalens agyterületen felnőtt házicsirkék és patkányok esetében. A D-aszpartát százalékos eloszlása az összeszpartát mennyiséghez képest (D). Az L-aszpartát százalékos eloszlása az excitátoros aminosavakhoz képest (E). A csillagok a szignifikáns különbséget jelölik a fajok közt (Tukey post-hoc tesztek *:p<0,05, **:p<0,01, ***:p<0.001). A különböző betűk az oszlopok felett a szignifikáns eltéréseket jelzik az egyes agyterületek között azonos fajok esetén (páros t-próbák: p<0,05).

A D-aszpartát szintjének változására irányuló tanulási kísérlet során (n=84) egyik tanulási folyamat (víz, metil-antranil $F_{1,44}=1,54$, $p=0,22$), valamint a visszaidézés sem (5 perc, 6 vagy 24 óra $F_{2,44}=0,75$, $p=0,48$), illetve a tanulási folyamatok és a visszaidézés közti interakció vizsgálata ($F_{2,44}=0,70$, $p=0,48$) sem mutatott szignifikáns eltérést a D-aszpartát koncentrációjára vonatkozóan. Továbbá a négy vizsgált agyterületben sem tudtunk különbséget kimutatni az egyes csoportok között D-aszpartát mennyiségére vonatkozóan ($F_{3,132}=1,00$, $p=0,40$). Hasonló eredményeket kaptunk az L-aszpartát és L-glutamát koncentrációjára vonatkozóan. Semelyik tanulási folyamat és visszaidézés, sem a köztük lévő interakció nem mutatott szignifikáns különbséget.

4.2.3 Az aszpartát enantiomerek és L-glutamát extracelluláris koncentrációjának meghatározása mikrodializátum miuntákban

4.2.3.1 Mennyiségi változása tanulás/jutalmazás hatására, kémiai depolarizáció hatására

Vizsgálataink során az Ac/mSt régiókban mérhető L- és D-aszpartát szintre, valamint az L-glutamát mennyiségre voltunk kíváncsiak, melyhez mikrodialízis eljárást alkalmaztunk, ahol is a csirkék szabadon mozoghattak. Mindkét vizsgált L-aminosav emelkedést mutatott víz adásakor (jutalom a szomszédos csirkéknek, 18. ábra). Hasonló, de nagyobb excitátoros L-aminosav-szint emelkedést tapasztaltunk magas kálium-klorid koncentráció adagolásakor. A D-aszpartát esetén egy kisebb, nem szignifikáns emelkedés volt tapasztalható víz fogyasztásakor, azonban egy robosztus (körülbelül tízszeres) emelkedés volt tapasztalható káliumion perfundálásakor (18. ábra). A D-aszpartát emelkedése azonban a magas kálium-klorid adagolása után késve jelent meg (legalább 20 perc, 18. ábra).



18. ábra: Az *in vivo* mikrodialízis méréseket bemutató ábra, melyen szabadon mozgó, kétnapos házicsírkék agyába helyezett szondán keresztül nyertük a mintát (mSt/Ac régióból $n=8$, illetve $n=5$ D-aszpartát esetén). A: A jutalmazási stimulus és depolarizáció (víz illetve KCl) hatása az L-aszpartát és L-glutamát szintekre. B.: A jutalmazási stimulus és depolarizáció (víz illetve KCl) hatása a D-aszpartát szintre. Átlag \pm standard hibával ábrázolva. A csillagok a szignifikáns különbséget jelölik a kontroll értékhez képest (Wilcoxon Signed Rank teszt $p<0,05$).

4.2.3.2 Az aminosavak agyi és extracelluláris mennyiségeinek összehasonlítása

Az 5. táblázat foglalja össze az aminosav koncentrációkat, melyeket a mikrodialízis, illetve a szöveti mérések során nyertünk. Az L-aszpartát aránya mind a mikrodialízis,

mind a szöveti mintákban hasonlóan adódott. Érdekes, hogy a D-aszpartát mennyisége közel megduplázódott a kálium-kloriddal történt stimuláció hatására (40%-át adva így az össz aszpartát mennyiségnek), míg a szövet kivonatban lévő koncentrációja közel két nagyságrenddel kisebb volt az L-aszpartáthoz viszonyítva.

5. Táblázat: Aszpartát és glutamát koncentrációk mikrodialízis mintákból (standard, víz hatásának vizsgálata, kálium-kloriddal történő vizsgálat), valamint medial striatumból származó szövetmintákból

A koncentráció nmol/g szövetre van megadva agyi szövetkivonatok esetén, míg nmol/ml mikrodialízis minták esetén (átlag \pm standard hiba). Az L-aszpartát arány: $100 \times [L\text{-Asp}/(L\text{-Asp}+L\text{-Glu})]$; A D-aszpartát arány: $100 \times [D\text{-Asp}/(D\text{-Asp}+L\text{-Asp})]$. *: Szignifikáns eltérés jelölése

	D-Asp (nmol/g vagy nmol/ml)	L-Asp (nmol/g vagy nmol/ml)	L-Glu (nmol/g vagy nmol/ml)	L-Asp arány	D-Asp arány
Mikrodialízis kontroll minták	104 \pm 45	397 \pm 75	3585 \pm 1356	23,8 \pm 5,7	19,0 \pm 7,8
Mikrodialízis (víz stimulus hatása)	149 \pm 55	598 \pm 101 *	4050 \pm 1203 *	27,1 \pm 6,2	21,0 \pm 8,0
Mikrodialízis (KCl stimulus hatása)	467 \pm 153	819 \pm 185 *	6123 \pm 1608 *	25,4 \pm 6,2	37,0 \pm 10,8*
Szöveti homogenizátum	30 \pm 2,2	2308 \pm 217	8644 \pm 632	21,8 \pm 0,9	1,3 \pm 0,07

5. Megbeszélés

A tudomány jelenlegi állása szerint a D-szerin és D-aszpartát tekinthető az agyban lévő legjelentősebb mennyiségben előforduló, valamint legszélesebb körben tanulmányozott D-aminosavaknak. Feltételezett szerepük a neuroplaszticitásban, a memóriaformációban és a tanulásban van. Ismeretes, hogy embrionális fejlődés alatt az emlősöknél, valamint a csirkéknél az L-aszpartáttal összevethető mennyiségben fordul elő a D-enantiomere, amely a születés utáni néhány hétben jelentősen lecsökken és szintje alacsony is marad [21]. Szemben a D-szerinnel, aminek mennyisége idősebb korban nagyobb a tanulásban és memóriaképződésben fontos agyterületeknél. A D-szerin mennyisége jól korrelál az NMDA receptor disztribúcióval, mely további bizonyítékként szolgál arra a feltételezésre, hogy a glicin kötőhelyhez kötődő, valódi endogén ko-agonistája eme receptornak [111].

Az aminosavak általában hidrofil, ionos állapotban előforduló molekulák, így elválasztásukhoz tökéletesen alkalmazhatóak az elektromigrációs technikák. A királis elválasztáson kívül meghatározásuknál nehézséget jelent, hogy az aminosavak nem rendelkeznek megfelelő érzékenységgel detektálható funkciócsoporttal, ezért optikai detektálásukhoz valamilyen származékképző használata szükséges [172]. Számos kutató vizsgálta a D-szerint és a D-aszpartátot. Az irodalom áttekintése során tapasztaltam, hogy nagyon különböző szöveti koncentrációjukat publikálták az egyes szerzők, és e két aminosav egyidejű meghatározására alkalmas validált módszert nem találtam a szakirodalomban. A közölt módszerek egyik nagy hátránya, hogy a módszerfejlesztés során nem veszik figyelembe az L-enantiomerek nagy feleslegben való jelenlétét, amely a megfelelő szelektív felbontást biztosító körülmények meghatározásához elengedhetetlen. Módszerünk validálásakor ezeket a paramétereket mind számításba vettük, felkészülve így a biológiai közegből történő méréshez. Sok szerzőnél a módszerfejlesztés során a standard minták oldása nem a biológiai mátrixhoz hasonló közegben történt, mely szintén pontatlansághoz vezethet. Kidolgozott módszereink során az agyi milliőt legjobban utánzó mesterséges gerincvelő folyadékban (ACSF) oldottuk a standardjainkat. Módszereinket többféle állati szövetextraktumon, valamint csirkék agyából származó mikrodializátumon is sikeresen használtuk.

5.1 Módszerfejlesztés

5.1.1 Származékképzés

Ha a mintafeldolgozáskor bekövetkező hígulást figyelembe vesszük, látható, hogy μM -os tartományban történő meghatározásra van szükség a biológiai minták analízise során. Ilyen alacsony koncentrációnál limitált a detektálási módszerek közötti válogatás lehetősége. Az UV detektálás nem éri el a megfelelő érzékenységet ebben az esetben. Szelektivitása miatt érzékeny detektálást biztosít a fluoreszcens detektálás, különösképpen, ha lézert használunk a gerjszítéshez (LIF). Lévén, hogy a meghatározandó aminosavak (excitátoros aminosavak, valamint a D-szerin) önmagukban nem rendelkeznek fluoreszcens tulajdonságokkal, a származékképzés elengedhetetlen. A származékképzők közül előnyösebb lehet egy fluorogén származékképző a fluorofórnál, ugyanis önmagában nem mutat fluoreszcenciát, valamint kevesebb fluoreszcens melléktermék keletkezésével kell számolni [128], melyek elválasztása a meghatározandó aminosav-származékoktól nehézkes, sokszor egyéb módosítók (például micellaképző) használatát teszi szükségessé [2, 124]. Az aminosavak meghatározása esetén az amin-reaktív származékképzők használata terjedt el az irodalomban. Ahhoz, hogy a származékképzés végbemenjen, mindenképp deprotonált amin-csoport jelenléte szükséges. A túlzott lúgos tartomány viszont a származékképző hidrolízisét növelné meg, ezért az optimális pH tartomány kiválasztása elengedhetetlen. Kutatócsoportunk is a köztes pH értékeket találta optimálisnak (pH 8,5-9,0) a származékképzéshez, ami alátámasztja ezt a megfontolást, és nem tér el jelentősen az irodalomban korábban közölt értékektől [116, 124, 187, 206].

Az argonion lézer hullámhosszán gerjeszthető egyik legismertebb és leggyakrabban alkalmazott amin származékképző a FITC, ami ismertetésre került az irodalmi áttekintés részben. Kiemelendő a fluorofór jellege, mely nehezíti az analitikai elválasztást, hisz a mintában nagymennyiségű jelenléte óriási csúcsot ad, emellett sok fluoreszcens melléktermék is képződik. További hátránya a hosszú származékképzési reakcióidő (≈ 1 nap).

A FITC-hez hasonló szerkezetű származékképző a CFSE hátránya szintén a fluorofór jellegéből adódik. A FITC-hez képest azonban kevesebb fluoreszcens melléktermék

képződésével kell számolni. Előnyei ellenére kevésbé elterjedt a gyakorlatban szerkezeti analógiához képest.

Az NBD-F számos előnnyel rendelkezik, mely miatt célszerű választás aminosavak meghatározásakor. Fluorogén természetű miatt önmagában nem mutat fluoreszcenciát és sokkal kevesebb fluoreszcens melléktermék képződésére kell számítani. Származékképzési reakciója gyorsan, kvantitatíve végbemegy (10-20 perc), miközben nem igényel bonyolult reakcióközeget, valamint veszélyes cianid ionok jelenlétét sem. Kutatócsoportunk ezért az NBD-F mellett döntött a megfelelő származékképző kiválasztásakor.

5.1.2 Elválasztási körülmények optimalizálása

A módszerfejlesztés következő lépése a megfelelő pH-jú közeg megválasztása. A szakirodalomban közölt módszerek többségében semleges és lúgos pH-n történik meg az aminosavak elválasztása, hisz a származékképzők többsége lúgos közegben rendelkezik fluoreszcens tulajdonsággal. Ilyen pH alkalmazásakor az aminosavak karboxil csoportja ($pK=2-3$) deprotonált állapotban van, elektroforetikus mobilitásuk anód irányú [13, 69, 108, 177, 208, 210]. Lúgos (és semleges) pH-n azonban jelentős az EOF, ami katód irányú áramlást idéz elő, az aminosavak katód irányú vándorlása viszonylag lassú, ami hosszú elválasztási időt eredményez [2, 124, 176]. Ezért célszerű az EOF csökkentése és gyors anód irányú elválasztás alkalmazása. Az EOF visszaszorítására a legalkalmasabb a kapilláris falának borítása, mely hatására az EOF minimálisra csökkenthető ($EOF \approx 0$). Kutatócsoportunk Hjertén és mtsai. által kidolgozott poliakrilamiddal történő kapillárisfal módosítást használt a módszerfejlesztés, valamint a biológiai minták meghatározása során [70]. A kapilláris borítása és az anód irányú elválasztás a két negatív töltéssel rendelkező aszpartát és glutamát esetében nagyon gyors vándorlást biztosít, míg az egy negatív töltésű D-szerin valamivel lassabban migrál és halad el a detektorablak előtt.

A D-szerin és D-aszpartát egyidejű meghatározására alkalmas módszerünk esetén a semleges pH-t találtuk optimálisnak, ahol az ebben a tartományban jó pufferkapacitással bíró, kis áramot generáló, zwitterionos HEPES-t használtuk. A HEPES gyakran alkalmazott puffer biológiai rendszerekben történő meghatározáskor [121]. Belső standardnak az aminosavakhoz hasonló tulajdonságú L-ciszteinsavat választottuk. A módszervalidálás során az ismert koncentrációjú aminosav törzsoldatok, valamint a megfelelő hígítások elkészítéséhez mesterséges gerincvelő folyadékot használtunk, mellyel a biológiai minták ionösszetételéhez hasonló mintamátrixot kaptunk.

Az aminosavak királis elválasztásánál törekedtünk a lehető leggyorsabb elválasztásra, ugyanakkor szem előtt tartva azt is, hogy megfelelő időt kell biztosítani a mintakomponensek és az enantiomerek egymástól történő elválására, azaz a megfelelő kémiai és enantioszelektivitás elérésére. Az elmúlt évek során a királis kapilláris elektroforézis módszerek esetében alkalmazott szelektorok jelentős részét a ciklodextrinek tették ki [13, 69, 74, 172]. A megfelelő ciklodextrin kiválasztása általában empirikus alapon történik. Befolyásolja a származékképző, valamint a pH és a háttérelktrolit is a zárványkomplex kialakulását. Ebből következik, hogy a különböző kutatócsoportok által leírt eredményes enantiomer elválasztások során alkalmazott ciklodextrin királis szelektor más körülmények fennállása esetén (pl. más származékképző) nem biztos, hogy alapvonalon történő elválást fog eredményezni.

A leggyakrabban a kutatócsoportok a natív β -CD-t [13, 51, 69, 114, 160, 161, 208] vagy a γ -CD-t [74] használták aminosavak elválasztására. Ez a két természetes CD azonban nem alkalmas valamennyi aminosav esetében enantioszelektív kölcsönhatásra, ezért számos CD-származékot is használtak a királis analízis megvalósítására. A β -ciklodextrin üregmérete általában megfelelő az aromás szerkezetű fluoreszcens származékképző-aminosav komplexekkel való zárványkomplex képzéshez [158], ezért főleg módosított β -ciklodextrineket alkalmaztak királis szelektorként. Bowser és mtsai. hidroxipropil- β -ciklodextrin (HP- β -CD) segítségével fejlesztettek ki D-aszpartát és egyéb aminosavak meghatározására alkalmas módszert [9].

Számos kutatócsoportnál megfigyelhető volt, hogy akkor értek el sikeres elválasztást enantiomerek esetében, ha ellentétes töltésű ciklodextrin származékot alkalmaztak királis szelektorként [48, 149]. Az új, savas vagy bázikus csoportot tartalmazó

ciklodextrinek egyre inkább elterjednek az analitikai gyakorlatban [158]. Abban az esetben, amikor mind a vendégmolekula, mind a komplexképző töltéssel rendelkezik, a Van der Waals, valamint a hidrogén-híd kölcsönhatások mellett lehetőség van ionos kölcsönhatás kialakulására is. A megfelelő erősségű ionos kölcsönhatás következtében javul a komplexképzés, ami hozzájárulhat a megfelelő enantioszelektivitás kialakításához [14, 89, 158]. Semleges molekulák esetén használhatóak, mint carrier molekulák is, biztosítva így a vizsgálandó komponensek migrációját [158]. Esetünkben a negatív töltéssel bíró aminosav származékok királis elválasztását kíséreltük meg egy aminociklodextrin, a HPA- β -CD alkalmazásával. Semleges, vagy enyhén lúgos pH-n az aminomódosított ciklodextrin egységnyi pozitív töltéssel rendelkezik ($pK_a=8,7$ [78]). A HPA- β -CD királis szelektor segítségével elválaszthatóak az általunk vizsgált excitátoros aminosavak és a szerin enantiomerei.

Előfordulhat, hogy az elválasztás optimalizálásához két ciklodextrin egyidejű használata szükséges. Ekkor az egyik ciklodextrin felelős az enantiomerek közt fennálló megfelelő királis szelektió biztosításáért, míg a másik ciklodextrin az együtt migráló komponensek közt biztosítja a kémiai szelektiót, elválasztva így e komponenseket. Kettős ciklodextrin rendszer fejlesztésével kutatócsoportunk sikerrel választott el egymástól aszpartát és glutamát enantiomereket, ahol is a DM- β -CD-re a D-glutamát és az L-aszpartát közötti kémiai szelektivitás növelése miatt volt szükség, míg a HPA- β -CD biztosította a királis elválasztást [189].

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 tartalmazó rendszerhez. Kiindulásként az 5 mM HPA- β -CD tartalmú 100 mM pH 8 borát puffert választottuk (9. ábra). A D-szerin szemben az aszpartáttal és a glutamáttal csak egy negatív töltéssel rendelkezik, ezért semleges és lúgos környezetben lassabb az anód irányú vándorlása. 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.

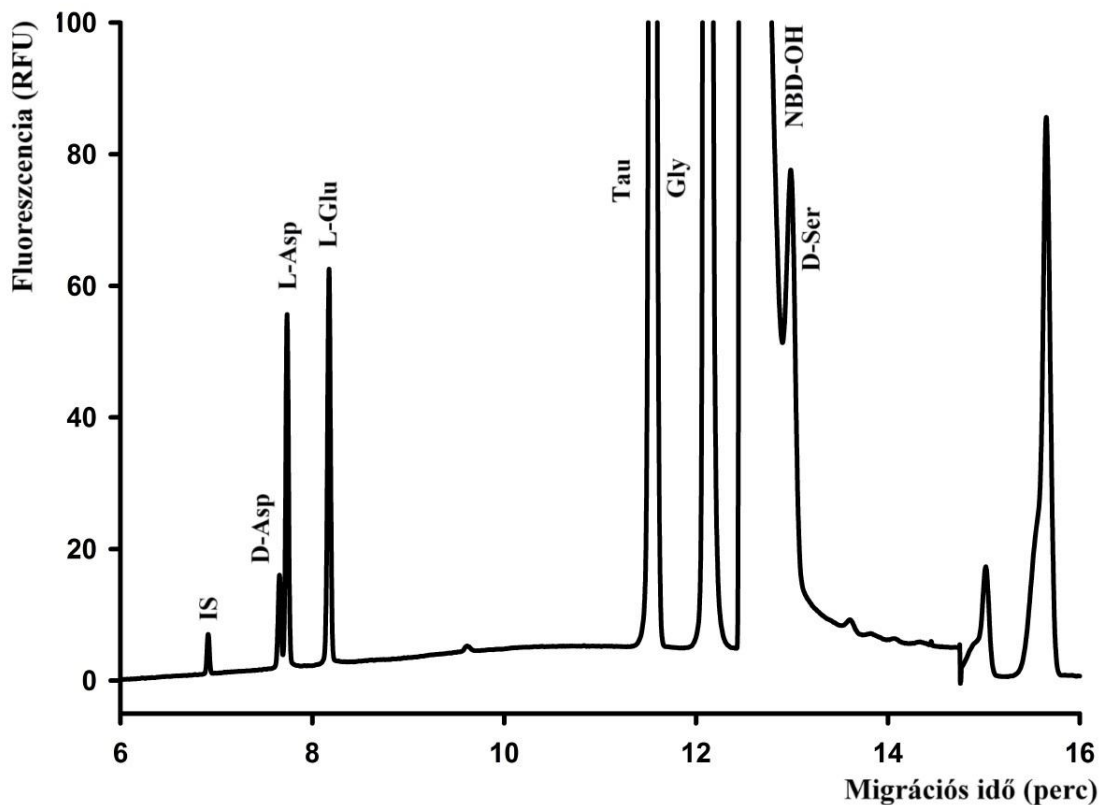
A D-szerin, valamint a glicin és az NBD-F származékképző reakció során főleg hidrolízissel képződő termékeinek elválasztásakor a pH hatása volt az egyik

legfontosabb tényező, mellyel a kémiai szelektivitást növelhettük. A háttélelektrolit egyéb módosítása (pl. szerves módosító metanol alkalmazása) nem járt eredménnyel. A szakirodalomból ismeretes [193], 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 mobilitáskülönbséget növeli. A pH csökkentése ebben a rendszerben ezért szignifikáns hatással lehet a királis és a kémiai szelektivitásra is.

Az elválasztás pH-függésének vizsgálatához 50 mM HEPES puffert használtunk. A HEPES rendszert, hogy összehasonlítható legyen a korábban fejlesztett módszerünkben alkalmazott borát rendszerrel, szintén teszteltük pH 8-on (10. ábra). Ekkor a HEPES puffer alkalmazása módosított a királis szelektor HPA- β -CD kémiai és királis szelektivitásán. A királis rezolúció csökkenését, továbbá a bomlástermékek migrációs idejének jelentős változását tapasztaltuk, mely a D-szerin és a glicin (valamint a bomlástermékek) jelentősebb ko-migrációjával járt a borát rendszerhez képest. Felmerült, hogy az eltéréseket okozhatja a lehetséges komplexképződés a borát és a cukrok (jelen esetben a királis szelektor ciklodextrin) között [166].

A pH csökkentése nagyban növeli a nem enantiospecifikus ionos kölcsönhatást a ciklodextrin és a savas excitátoros aminosav csoportok között, ezért 50 mM HEPES puffer alkalmazásakor pH 6,5-nél a két negatív töltéssel rendelkező aszpartát és glutamát esetében megszűnt az elválasztás, az enantio- és a kémiai szelektivitás egyaránt elveszett (lásd 10. ábra). Ugyanekkor tapasztaltuk, hogy lúgosabb közegben, pH 8,5-nél az aszpartát enantiomerek felbontása 1,5 alatti értéknek adódott, míg a D-szerin ko-migrált a glicinnel, valamint a származékképzőből származó melléktermékekkel (19. ábra). Ennek magyarázata lehet a királis szelektor töltéssel rendelkező arányának oly mértékű csökkenése, mely már nem biztosította a megfelelő ionos kölcsönhatás kialakulását, mely mind a királis, mind a kémiai szelektivitás

rovására ment. A pH csökkentése 8-ról 7-re 50 mM HEPES rendszerben javította mind a királis, mind a kémiai szelektivitást (10. ábra és 1. táblázat). A pH csökkenésének hatására a származékképzőből származó bomlástermékek lassabban, az L-szerin után migráltak. Ezzel egyidejűleg a királis szelektivitás is javult a szabad aminosav és a ciklodextrinnel képzett komplex mobilitáskülönbségének növekedése miatt.



19. ábra: A pH növelés hatása az aszpartát enantiomerek, az L-glutamát és a D-szerin elválasztására

10^{-6} M L-ciszteinsav belső standard (IS), 5 μ M D-Asp és D-Ser, 25 μ M L-Asp, L-Glu és L-Ser, 50 μ M glicin (Gly) és taurin (Tau) tartalmú standard minta.

Elválasztási körülmények: 50/60 cm x 75 μ m poliakrilamiddal borított ömlesztett szilika kapilláris; injektálás: 6,89 kPa 20 s; 5 mM HPA- β -CD, 100 mM borát puffer pH 8,5; -24 kV.

Méréseink során pH 7 alatt, a fentebb már tárgyalt túl erős ionos kölcsönhatás miatt, a királis szelektivitás megszűnését tapasztaltuk a két negatív töltéssel bíró aminosavak esetén. Az optimalizálás folytatásához 50 mM HEPES pH 7 puffert választottuk.

A módszerünk további optimalizálásához a HPA- β -CD királis szelektor koncentrációjának hatását vizsgáltuk meg. Emelve a koncentrációt 3 és 7 mM között javította a királis és kémiai szelektivitást is (11. ábra és 2. táblázat), azonban 6 és 7 mM között számottevő különbséget nem találtunk, így 6 mM-t választottuk a végleges ciklodextrin koncentrációjának. A végleges BGE összetétel tehát 50 mM HEPES pH 7, mely 6 mM HPA- β -CD királis szelektort tartalmaz.

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 (12. ábra).

5.2 A módszer teljesítőképessége

A szakirodalomban számos közleményt találunk aminosavak kapilláris elektroforézissel történő meghatározására [137, 138, 139, 140, 141]. Előfordult olyan közlemény is, ahol a módszer validálás nem történt meg vagy nem vett számításba minden felmerülő problémát, mely a biológiai rendszerekben történő méréskor felmerülhet. Elfogadott, hogy a detektálás alsó határának (LOD) a jel/zaj arány 3:1-hez tartozó mintakoncentrációt, míg a kvantitatív meghatározás alsó határának (LOQ) a jel/zaj arány 10:1-hez tartozó mintakoncentrációt veszik figyelembe [206, 212]. Az irodalom tanulmányozása során több szerző a kalibrációs görbe alsó pontját fogadja el LOQ értéknek [2, 124, 187]. Ha a kalibrációs egyenes nagy koncentráció tartományt ölel fel (10-100x), akkor ez az eljárás még a nagyon jónak számító 0,995 R^2 -es értéknél is

félrevezető lehet. Ekkor ugyanis az alsóbb koncentráció tartományoknál lévő szórás minimális hatással van a kalibrációs egyenes regressziós koefficiensére, hiszen az a regressziós koefficiens a mért adatoknak az illesztett egyenestől való abszolút eltérését tükrözi. Ebből következik, hogy az alacsony koncentrációk esetében a legalacsonyabb koncentráció értéknél kapott eltérés relatív értéke akár a 70%-ot is elérheti, még abban az esetben is, amikor az R^2 meghaladta a 0,999-es értéket [117]. A validálás során kutatócsoportunk törekedett megfelelő koncentráció tartományok kiválasztására, amely a biológiai mintákban várható excitátoros aminosavak, valamint a D-szerin koncentrációjával korrelál. Megfelelően kivitelezett módszervalidálás során legalább három, a mérési tartományt átfogó ismert koncentrációjú standard minták napon belüli, valamint napok közötti mérési adataiból kell megállapítani a pontosság és a torzítatlanság értékeket. Az FDA irányelvei [41] szerint az a legalacsonyabb koncentrációérték fogadható el kvantitatív mérési határnak, ahol a torzítatlanság értéke 80% és 120% közé esik, a pontosság (a mérések relatív szórása) pedig nem haladja meg a 20%-ot. Származékképzés során sokszor akár két nagyságrend eltérés van az LOD és az LOQ között, ami azzal magyarázható, hogy nagyon kis koncentrációknál a származékképzési reakció már nem kvantitatív, ugyanis a származékképző hidrolízis lép előtérbe. Míg magasabb koncentrációkon a hidrolízis sebessége összevethető a származékképzési reakció sebességével, alacsony aminosav koncentrációk esetében a származékképzési reakció sebessége lényegesen lecsökken [86]. Számos, az irodalomban fellelhető módszert fejlesztettek biológiai minták vizsgálatára, azonban e módszerek többnyire egyáltalán nem vagy részlegesen lettek csak validálva, így a biológiai minták analíziséből nyert eredmények pontossága megkérdőjelezhető [13, 25, 69, 105, 106, 124, 187, 206]. Thorsén és munkatársai (+/-)-1-(9-antranil)-2-propil-kloroformáttal (APOC) történő diasztereomer származékképzést követően választottak el aszpartát, glutamát, illetve egyéb aminosav enantiomereket. Bár a detektálási határ D-glutamát esetében 7 nM volt, a módszer a megfelelő validációs adatok hiányában kvantitatív meghatározásra nem, csak a vizsgált mintában lévő D-aminosavak százalékos arányának megadására volt alkalmas [178]. A kvantitatív mérés pontossága ismeretének hiányában így is megkérdőjelezhető a mérések eredménye az aminosavak nM-os koncentrációi esetében. Simó és mtsai több aminosavat, köztük aszpartát és glutamát enantiomereket választottak el narancslé mintákból. Munkájuk során FITC

származékképzőt használtak. A módszerüket nem validálták, nem végeztek kalibrációt, hanem korrigált csúcsterületben adták meg az abszolút koncentrációt. Ezt a módszert további biológiai közegből történő mérésekkor is használták, azonban ekkor sem történt meg a módszer validálása [160]. Chen és mtsai 19 aminosavat választottak el 9-fluorenilmetilkloroformát származékképző segítségével. Módszerük során sem validálás, sem biológiai közegben történő módszerfejlesztés nem történt. Az elválasztáshoz kettős ciklodextrin rendszert használtak a szerzők (β -ciklodextrin és taurodeoxikolát) [15]. Bowser és mtsai. amin transzmittereket vizsgáltak mikrodializátumból. Módszerük a bemutatott elektroferogrammokon nagyon gyors (20s körüli) futásokat eredményez, azonban a felbontás némely komponens esetében nem érte el az 1,5-ös értéket. valamint a módszer validálása sem történt meg. Módszerünkkel szemben itt királis elválasztás nem történt [9].

A biológiai mintákban többszörös feleslegben találhatóak meg az L-enantiomerek a D-aszpartáthoz és a D-szerinhez képest. A módszervalidálás során ezért az L-enantiomereket, valamint a glicint és a taurint ötvenszeres feleslegben alkalmaztuk, utánozva így a biológiai mintákban található nagy koncentráció különbséget. A biológiai mintákra jellemző koncentrációviszonyokat figyelembe vevő validálásra nem találtunk korábbi példát a kapilláris elektroforézissel foglalkozó szakirodalomban. A módszerek validálása során 0,05 μM -nak találtuk a kvantifikálás alsó határát (LOQ). Az irodalmi adatokkal összehasonlítva hasonló, vagy jobb kvantifikálási határt értünk el fejlesztett módszerünkkel [208, 212]. A kvantitatív reakció egyik feltétele a megfelelő reagensfelesleg jelenléte. A származékképző reakcióval párhuzamosan azonban a reagens hidrolízise is végbemegy, amely a reagens koncentrációt csökkenti. Alacsonyabb mintakoncentrációk esetében, míg a hidrolízis sebessége közel állandó marad, a származékképzés sebessége olyan mértékben lelassul, hogy a reakció már nem megy kvantitatívan végbe. Feltételezzük, hogy a származékképzés kinetikája mindkét enantiomer esetében azonos, vagyis a reagens nem diszkriminál az izomerek között. Ekkor a nagy feleslegben jelenlévő L-enantiomer miatt a származékképzés sebessége nem csökken a kritikus szint alá, és a 0,1 μM alatti koncentrációjú D-enantiomer származékképzése is kvantitatívan végbemegy. Így bár a magas L-enantiomer felesleg megnehezíti az elválasztást, ugyanakkor hozzájárulhat az alacsony koncentrációban lévő D-enantiomer kvantitatív származékképzéséhez.

5.3 Szövetminták és mikrodializátumok vizsgálata

A szövetmintákból történő D- és L-aminosav meghatározás során fiatal, 2, 4, 8 és 62 napos csirkékből, valamint felnőtt, 100-150 napos nőtény patkányokból, valamint egerekből származó agyszöveteket használtunk, míg a mikrodializátumokat 2 napos csirkékből nyertük.

5.3.1 D-szerin és D-aszpartát meghatározása C57BL/6 egerekből

A D-szerin, mint NMDA receptor ko-agonista a glicin kötőhelyhez kötődik nagy affinitással. Méréseink során egér agymintákból határoztunk meg D-szerin mennyiségeket. Azokon az agyterületeken mértünk nagyobb D-szerin mennyiségeket, melyek kiemelten fontosak a neuroplaszticitásban, a memóriaformációban és a tanulási folyamatokban felnőtt állatoknál [111, 123, 145] (15. ábra). A kisagyban található alacsony D-szerin koncentráció összhangban van az irodalomban találtakkal, amit a nagy cerebelláris DAAO jelenlétével magyaráznak. DAAO enzim kiütött mutáns egereknél magas D-szerin szintet mértek a kisagyban is. Megfigyelhető volt továbbá az NMDA receptorok mennyiségi növekedése is a knock-out egereknél [119, 120], ami alátámasztja az előbbi feltevést. A vizsgálat során a mutáns és a vad típusú egerek között semmilyen különbséget nem találtak egyéb fiziológias paramétereiket tekintve. Az újonnan fejlesztett, validált módszerünk célja, hogy megfelelően pontosan, egyidejűleg tudjuk mérni biológiai mintákban a D-szerin és D-aszpartát mennyiségének változását. Az irodalom áttekintése során számos szerző számolt be D-szerin meghatározásról biológiai mintákból. Fajtól és agyterülettől függően 7-340 nmol/g koncentrációban mértek D-szerint. Eredményeink nagyságrendileg hasonló tartományba esnek (11-50 nmol/g), mint az irodalomban található adatok. A D-aszpartát vizsgálata során jelentős korszpecifikus eltérést találtunk a fiatal és a felnőtt egerek közt (14. ábra). A fiatal egereken közel egy nagyságrenddel nagyobb mennyiségben található meg a D-aszpartát, mint a felnőtt egyedekben, agyterülettől függetlenül, mely szintén összhangban van az irodalmi adatokkal [21].

5.3.2 Aszpartát és glutamát enantiomerek vizsgálata szöveti extraktumból, valamint mikrodializátumból

Korábbi méréseink során a biológiai közegben nem sikerült D-glutamátot kimutatnunk. Az aminosavak meghatározására alkalmas módszereink a szabad aminosav mennyiséget mérik, ugyanis a mintaelőkészítés fehérjementesítéssel jár. Korábbi eredményeink [204] alapján a striatumból az L-aszpartát és L-glutamát együttesen szabadul fel csirkék esetén és az excitátoros axonok végében mindkét neurotranszmitter megtalálható [1], mely állítás igaz patkányokra is [59].

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 (16. ábra).

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 robusztus korreláció figyelhető meg az mSt/nucleus accumbens régiók között, ahol is alacsonyabb L-glutamát szint figyelhető meg mindkét fajnál a többi agyterülethez viszonyítva (17. ábra). 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.

Mérési eredményeink során 0,3-0,4 $\mu\text{mol/g}$ koncentrációban találtunk D-aszpartátot két napos csirkék agyában, mely jól korrelál az irodalomban leírt értékkel (0,4 $\mu\text{mol/g}$) [122], amit 20 napos csirkeembrióból mértek [21]. A 36 órás újszülött patkányokhoz képest (0,1 \pm 0,022 $\mu\text{mol/g}$ D-aszpartát [34]) nagyobb koncentrációban található meg a D-aszpartát két napos csirkéknél (17. A ábra). Az irodalomban leírtakhoz hasonló eredményeket kaptunk D-aszpartát mennyiségre patkány agyterületek vizsgálatakor is

[21, 22, 67, 208]. Zhao és mtsai méréseik során szintén kapilláris elektroforézis technikát alkalmaztak lézer-indukálta fluoreszcenciával D-aszpartát szint meghatározásához patkány cerebrumból (maximális érték 81 nmol/g szövet). A méréseik során szintén megfigyelhető volt a korfüggés. Prenatális patkányoknál mérték a legnagyobb koncentrációt, amely a korrallal haladva egyre inkább csökkent [208], mely eredmény nagyságrendileg szintén hasonló az általunk nyert eredményekkel. Egy 2011-es publikációban Han és mtsai HPLC-vel történő D-aszpartát meghatározása hat hetes patkányok agyából hasonló mennyiségeket mutatott ki, mint a mi módszerünk [58].

A csirkéken végzett passzív elkerülési teszt során nem találtunk szignifikáns különbséget a D-aszpartát szintekben azon agyterületeknél, melyek a memóriaképződésben szerepet játszatnak (mSt, iMM), illetve egyéb végagyi és végagy alatti régiókban sem (Arco, Cb) a 24 órás megfigyelés során. Egy lehetséges magyarázat erre, hogy a fiatal csirkék agyában nagy mennyiségben előforduló D-aszpartát szint nem függ a viselkedési ingerektől. Valószínűleg fontosabb szerepe van a tónusos ingerelésben, fenntartva így a szinaptikus plaszticitást a korai tanulási folyamatokhoz [168]. Feltehető, hogy a D-aszpartát extracelluláris emelkedésének hiánya abból adódik, hogy maga a D-aszpartát nem egy azonnali jelátvivő molekula a viselkedési válaszoknál.

A mikrodialízis kísérletek során az ivás jutalmazó hatására, szemben az L-aminosavaknál tapasztaltnal, nem sikerült szignifikáns D-aszpartát emelkedést kimutatnunk, addig kémiai depolarizáció hatására (magas KCl koncentrációjú dialízis puffer bejuttatása) jelentős D-aszpartát szint emelkedést mutatott a kontroll értékekhez képest. A kálium hatása, szemben az L-aszpartát és L-glutamátnál tapasztalt (szintén nagyon robusztus) extracelluláris koncentráció emelkedéssel, a D-aszpartát esetén sokkal elhúzódóbb (kb egy órán át tartó) felszabadulást eredményezett, mielőtt visszatért volna a kiindulási értékhez (18. ábra). Ennek magyarázata lehet valamilyen másodlagos mechanizmus, mely felelős a D-aszpartát folyamatos felszabadításáért a K^+ gyors felszabadító hatása után. A kutatócsoportunk korábbi munkája során az L-aminosavak esetében tapasztalt [204], hirtelen történő nagymennyiségű felszabadulás a vezikuláris felszabadulásra jellemző, míg a D-aszpartát esetében egy sokkal összetettebb tárolási, valamint felszabadulási mechanizmust feltételezhető. Ennek egy

lehetséges bizonyítéka, hogy irodalomban leírásra került vezikuláris felszabadulása a D-aszpartátnak, azonban a vezikuláris gátlás hatására a D-aszpartát felszabadulásának teljes megszüntetése nem volt lehetséges. Felvételéért a glutamát-reuptake transzport fehérjék felelősek, melyek azonban a glia sejteken is megtalálhatóak [36]. Így felmerül, hogy a D-aszpartát egy része nem vezikulárisan, sőt nem neuronálisan szabadul fel, amint az a D-szerin esetében leírásra került (glia eredetű felszabadulás [145]). 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 összeszpartát mennyiségének egyharmadát teszi ki a D-enantiomer (5. táblázat). Az, hogy a D-aszpartát ilyen módon hogy képes hozzájárulni a szinaptikus plaszticitás kialakításához, még további vizsgálatokat igényel.

Összefoglalásként elmondható, hogy a szöveti koncentrációja a D-aszpartátnak jelentősen változik a csirkék életének első egy hetében agyterülettől függetlenül. Csirkéknél a vizsgált periódus az ún. szenzitív szakasz lezáródása, mely a korai tanulást szolgálja (bevésődés (imprinting), nem megfelelő íz elkerülése stb.). A mikrodialízis eredményekből arra következtethetünk, hogy az aszpartát extracelluláris koncentrációjának egy jelentős mennyiségét a D-enantiomer teszi ki.

A fentebb ismertetett irodalmi eredmények és a módszereinkkel mért mennyiségek alapján kijelenthetjük, hogy a fejlesztett módszereink által kapott eredmények jó korrelációt mutatnak az irodalmi eredményekkel, amely validitásukat igazolja.

6. Következtetések

Célunk volt olyan módszer kidolgozása, mely alkalmas az excitátoros aminosavak, valamint a D-aszpartát és a D-szerin egyidejű meghatározására. A megfelelő érzékenység elérése érdekében lézerindukálta fluoreszcencia detektálást alkalmaztunk és NBD-F származékképző vegyületre épülő módszert dolgoztunk ki. Az elválasztásokat borított falú kapillárisban végeztük. Az elválasztást azonban nemcsak a D-enantiomerek alacsony koncentrációja, hanem az egyidejűleg jelen lévő nagy L-enantiomer felesleg is megnehezítette.

A biológiai minták analízisére alkalmas megfelelő érzékenységű módszert tudtunk kidolgozni, megfelelő analízis idővel, kis mintamennyiség igényvel. A validálás során a kvantifikálás alsó határa 0,05 μM -nak adódott. Fejlesztett módszerünk alkalmas az excitátoros aminosavak, a D-aszpartát és a D-szerin meghatározására különböző biológiai mátrixból. Eredményeink alapján az alábbi következtetéseket vonatjuk le:

- A szöveti koncentrációja a D-aszpartátnak jelentősen változik a csirkék életének első egy hétben agyterülettől függetlenül.
- A mikrodialízis eredményekből arra következtethetünk, hogy depolarizációt követően az aszpartát extracelluláris koncentrációjának egy jelentős mennyiségét a D-enantiomer teszi ki.
- A D-aszpartát felszabadulásának módja még vizsgálat tárgyát képezi, azonban feltételezzük a nem neuronális és nem vezikuláris felszabadulás (legalább is a D-aszpartát jelentős hányadánál)
- A D-szerin mennyisége a memóriaképzésben fontos agyterületeknél (amygdala, cortex és hippocampus) korfüggően magas volt az egérkísérletek során.

CE-LIF módszereink felhasználhatóak a D-aminosavak központi idegrendszeri előfordulásának és szerepének vizsgálatához. A D-aminosavaknak a fiziológiás folyamatokban játszott szerepük mellett a patofiziológiás folyamatokban való jelentőségük is vizsgálható. Ilyen körülmények között módszereink alkalmasak lehetnek különböző állatmodellekből történő D-aminosav és excitátoros aminosav meghatározásra, melyekkel további értékes információt nyerhetünk az adott

betegségekről. Továbbá esetlegesen gyógyszeres kezelések eredményessége is vizsgálható lehet, monitorozva a D- és excitátoros aminosavak szintjének változását.

7. Összefoglalás

Az NMDA receptor központi szerepet játszik a neuronális plaszticitás, tanulás és memóriaképződés folyamatában. Az NMDA receptor aktiválásához az agonista mellett egy ko-agonista kötődése is szükséges. A receptor aktiválásában két D-aminosavnak is szerepe lehet. A fő agonista L-glutamát mellett a glutamát kötőhelyhez képes kötődni az L- és a D-aszpartát is. A D-aszpartátnak, az NMDA receptoron keresztül közvetített hatásain kívül egyéb neuromodulátor szerepet is tulajdonítanak. Emellett fontos szerepet játszik az idegrendszeri fejlődésben is. A közelmúltban igazolták, hogy az NMDA receptor ko-agonista glicin kötőhelyéhez nagy affinitással kötődni képes a D-szerin is, ami számos agyi régióban az elsődleges ko-agonistája a receptornak. Kutatócsoportunk munkája során olyan királis kapilláris elektroforézis módszerek kidolgozásában vettem részt, melyek alkalmasak az excitátoros aminosavak (D- és L-aszpartát, L-glutamát), valamint a D-szerin biológiai mintákból történő kvantitatív meghatározására. Módszerünk segítségével, a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetével együttműködésben, házicsírkék különböző agyterületéből határoztuk meg az excitátoros aminosavak mennyiségét. A kémiai és a királis szelekció biztosítására kettős ciklodextrin rendszert fejlesztettünk ki. A D-aszpartát százalékosan kifejezve a teljes aszpartát mennyiségre a két napos állatoknál volt szignifikánsan a legmagasabb. A tanulási folyamat vizsgálata során a különböző stimulusok hatására csak nem szignifikáns emelkedése volt tapasztalható az extracelluláris térben. KCl perfundálás hatására jelentős mennyiségű D-aszpartát felszabadulást mértünk. A továbbiakban olyan validált királis kapilláris elektroforetikus módszert fejlesztettem, mely alkalmas az aszpartát enantiomerek, a D-szerin, valamint az L-glutamát kvantitatív meghatározására. A HPA- β -CD királis szelektor megfelelő enantioszelektivitást biztosított a vizsgált mintakomponensekre. Az elválasztás megfelelő kémiai szelektivitásának biztosításához a módszerfejlesztés során optimalizáltuk a pH-t, valamint a királis szelektor koncentrációját. Kidolgozott módszerünk alkalmasságát újszülött és felnőtt C57BL/6 egereken teszteltük. Eredményeink során a különböző agyterületeknél ott találtunk magas D-szerin mennyiséget, ahol az NMDA receptorok száma is magas. Mind a D-aszpartát, mind a D-szerin agyi mennyisége jelentős korfüggést mutat.

Summary

The NMDA-glutamate receptor has many physiological roles in the CNS, like in neuronal plasticity, learning and memory formation. To activate NMDA receptor simultaneous binding of an agonist and a co-agonist are required. L-glutamate acts as the main agonist of NMDA receptor, but L- and D-aspartate can also bind to the glutamate binding site. In the literature for D-aspartate, other than its effect on NMDA receptor, a neuromodulator role was described and it plays also a very important role in the development of the CNS. Recently it was revealed that D-serine can bind to the NMDA receptor glycine binding site with high affinity. This amino acid shows a similar distribution in the entire brain like NMDA receptors. I was involved in the development of capillary electrophoresis methods by our research group, which are capable to quantify excitatory amino acids (D- and L-aspartate, L-glutamate) and D-serine in biological samples. A dual cyclodextrin system was developed by our research group to achieve chemical and chiral selectivity. In collaboration with Department of Anatomy, Histology and Embryology, Semmelweis University we have determined the amounts of excitatory amino acids in different brain regions of domestic chickens and have made conclusions. The percentage of D-aspartate of total aspartate level was significantly the highest in the brain of two-days old chicks. In microdialysis samples the reward stimulus (water drinking) did not evoke significant elevation in D-aspartate level, however, perfusing KCl through the tube showed a remarkable D-aspartate release into the extracellular space. During my research, I have developed a validated, chiral capillary electrophoresis method capable of D-aspartate and D-serine quantitative determination simultaneously. Chiral selector HPA- β -CD was able to provide baseline separation for D- and L-aspartate, L-glutamate and D- and L-serine. For proper chemical selectivity we have optimized the pH of the electrolyte and the concentration of chiral selector as well. Our developed method was tested on brain samples from newborn and adult C57BL/6 mice. We found high D-serine levels in different brain regions, where the NMDA receptors are also highly distributed. Both D-aspartate and D-serine brain concentration show age-dependence.

8. Irodalomjegyzék

1. Adam AS, Csillag A. (2006) Differential distribution of L-aspartate- and L-glutamate-immunoreactive structures in the arcopallium and medial striatum of the domestic chick (*Gallus domesticus*). *J Comp Neurol*, 498(2):266-276.
2. Arlt K, Brandt S, Kehr J. (2001) Amino acid analysis in five pooled single plant cell samples using capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 926(2):319-325.
3. Ashe KH, Zahs KR. (2010) Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron*, 66(5):631-645.
4. Balint E, Csillag A. (2007) Nucleus accumbens subregions: hodological and immunohistochemical study in the domestic chick (*Gallus domesticus*). *Cell Tissue Res*, 327(2):221-230.
5. Balla J. Gázkromatográfia. In: Lengyel J, Kalász H, editors. *A gyógyszerek szervezetbeni sorsa és vizsgáló módszerei*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2007: 149-175.
6. Bardelmeijer HA, Lingeman H, de Ruiter C, Underberg WJ. (1998) Derivatization in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 807(1):3-26.
7. Bauer D, Hamacher K, Broer S, Pauleit D, Palm C, Zilles K, Coenen HH, Langen KJ. (2005) Preferred stereoselective brain uptake of d-serine--a modulator of glutamatergic neurotransmission. *Nucl Med Biol*, 32(8):793-797.
8. Bishop NA, Lu T, Yankner BA. (2010) Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464(7288):529-535.
9. Bowser MT, Kennedy RT. (2001) In vivo monitoring of amine neurotransmitters using microdialysis with on-line capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 22(17):3668-3676.
10. Brown ER, Piscopo S, Chun JT, Francone M, Mirabile I, D'Aniello A. (2007) Modulation of an AMPA-like glutamate receptor (SqGluR) gating by L- and D-aspartic acids. *Amino Acids*, 32(1):53-57.
11. Bruckner H, Schieber A. (2001) Ascertainment of D-amino acids in germ-free, gnotobiotic and normal laboratory rats. *Biomed Chromatogr*, 15(4):257-262.

12. Buckner RL, Andrews-Hanna JR, Schacter DL. (2008) The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1124:1-38.
13. Carlavilla D, Moreno-Arribas MV, Fanali S, Cifuentes A. (2006) Chiral MEKC-LIF of amino acids in foods: analysis of vinegars. *Electrophoresis*, 27(13):2551-2557.
14. Chankvetadze B. (2009) Separation of enantiomers with charged chiral selectors in CE. *Electrophoresis*, 30 Suppl 1:S211-221.
15. Chen F, Zhang S, Qi L, Chen Y. (2006) Chiral capillary electrophoretic separation of amino acids derivatized with 9-fluorenylmethylchloroformate using mixed chiral selectors of beta-cyclodextrin and sodium taurodeoxycholate. *Electrophoresis*, 27(14):2896-2904.
16. Citron M. (2010) Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov*, 9(5):387-398.
17. Coyle JT. (2006) Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cell Mol Neurobiol*, 26(4-6):365-384.
18. Coyle JT, Konopaske GT. Chapter 58 - The Neurochemistry of Schizophrenia A2 - Brady, Scott T. In: Siegel GJ, Albers RW, Price DL, editors. *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*. Academic Press, New York, 2012: 1000-1011.
19. Coyle JT, Tsai G. (2004) The NMDA receptor glycine modulatory site: a therapeutic target for improving cognition and reducing negative symptoms in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*, 174(1):32-38.
20. Crego AL, Mateos M, Nozal L. (2018) Recent contributions for improving sensitivity in chiral CE. *Electrophoresis*, 39(1):67-81.
21. D'Aniello A. (2007) D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain Res Rev*, 53(2):215-234.
22. D'Aniello A, D'Onofrio G, Pischetola M, D'Aniello G, Vetere A, Petrucelli L, Fisher GH. (1993) Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. Effects of D-amino acids. *J Biol Chem*, 268(36):26941-26949.
23. D'Aniello A, Di Fiore MM, Fisher GH, Milone A, Seleni A, D'Aniello S, Perna AF, Ingrosso D. (2000) Occurrence of D-aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in rat neuroendocrine tissues and their role in the modulation of luteinizing hormone and growth hormone release. *Faseb j*, 14(5):699-714.
24. D'Aniello A, Giuditta A. (1978) Presence of D-aspartate in squid axoplasm and in other regions of the cephalopod nervous system. *J Neurochem*, 31(4):1107-1108.

25. D'Aniello A, Lee JM, Petrucelli L, Di Fiore MM. (1998) Regional decreases of free D-aspartate levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 250(2):131-134.
26. D'Aniello A, Nardi G, De Santis A, Vetere A, di Cosmo A, Marchelli R, Dossena A, Fisher G. (1995) Free l-amino acids and d-aspartate content in the nervous system of Cephalopoda. A comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112(4):661-666.
27. D'Aniello A, Spinelli P, De Simone A, D'Aniello S, Branno M, Aniello F, Fisher GH, Di Fiore MM, Rastogi RK. (2003) Occurrence and neuroendocrine role of D-aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in *Ciona intestinalis*. *FEBS Lett*, 552(2-3):193-198.
28. D'Aniello A, Vetere A, Petrucelli L. (1993) Further study on the specificity of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase and time course for complete oxidation of D-amino acids. *Comp Biochem Physiol B*, 105(3-4):731-734.
29. D'Aniello G, Tolino A, D'Aniello A, Errico F, Fisher GH, Di Fiore MM. (2000) The role of D-aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in the regulation of prolactin release. *Endocrinology*, 141(10):3862-3870.
30. D'Aniello S, Somorjai I, Garcia-Fernandez J, Topo E, D'Aniello A. (2011) D-Aspartic acid is a novel endogenous neurotransmitter. *Faseb j*, 25(3):1014-1027.
31. Davies LP, Johnston GA. (1976) Uptake and release of D- and L-aspartate by rat brain slices. *J Neurochem*, 26(5):1007-1014.
32. Delgado JM, DeFeudis FV, Roth RH, Ryugo DK, Mitruka BM. (1972) Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 198(1):9-21.
33. Dore K, Stein IS, Brock JA, Castillo PE, Zito K, Sjostrom PJ. (2017) Unconventional NMDA Receptor Signaling. *J Neurosci*, 37(45):10800-10807.
34. Dunlop DS, Neidle A, McHale D, Dunlop DM, Lajtha A. (1986) The presence of free D-aspartic acid in rodents and man. *Biochem Biophys Res Commun*, 141(1):27-32.
35. Ehlers MD, Zhang S, Bernhardt JP, Hagan RL. (1996) Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell*, 84(5):745-755.
36. Errico F, Mothet JP, Usiello A. (2015) D-Aspartate: An endogenous NMDA receptor agonist enriched in the developing brain with potential involvement in schizophrenia. *J Pharm Biomed Anal*, 116:7-17.

37. Errico F, Napolitano F, Nistico R, Usiello A. (2012) New insights on the role of free D-aspartate in the mammalian brain. *Amino Acids*, 43(5):1861-1871.
38. Errico F, Nistico R, Napolitano F, Mazzola C, Astone D, Pisapia T, Giustizieri M, D'Aniello A, Mercuri NB, Usiello A. (2011) Increased D-aspartate brain content rescues hippocampal age-related synaptic plasticity deterioration of mice. *Neurobiol Aging*, 32(12):2229-2243.
39. Errico F, Rossi S, Napolitano F, Catuogno V, Topo E, Fisone G, D'Aniello A, Centonze D, Usiello A. (2008) D-aspartate prevents corticostriatal long-term depression and attenuates schizophrenia-like symptoms induced by amphetamine and MK-801. *J Neurosci*, 28(41):10404-10414.
40. Fagg GE, Matus A. (1984) Selective association of N-methyl aspartate and quisqualate types of L-glutamate receptor with brain postsynaptic densities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(21):6876-6880.
41. FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. FDA, editor. US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD: FDA; 2001.
42. Ferraris DV, Tsukamoto T. (2011) Recent advances in the discovery of D-amino acid oxidase inhibitors and their therapeutic utility in schizophrenia. *Curr Pharm Des*, 17(2):103-111.
43. Fieber LA, Carlson SL, Capo TR, Schmale MC. (2010) Changes in D-aspartate ion currents in the *Aplysia* nervous system with aging. *Brain Res*, 1343:28-36.
44. Fillet M, Chankvetadze B, Crommen J, Blaschke G. (1999) Designed combination of chiral selectors for adjustment of enantioselectivity in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 20(13):2691-2697.
45. Fillet M, Hubert P, Crommen J. (1997) Enantioselective separation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis using mixtures of anionic and uncharged beta-cyclodextrins as chiral additives. *Electrophoresis*, 18(6):1013-1018.
46. French D. (1957) The Schardinger dextrans. *Adv Carbohydr Chem*, 12:189-260.
47. Fuchs SA, Berger R, Klomp LW, de Koning TJ. (2005) D-amino acids in the central nervous system in health and disease. *Mol Genet Metab*, 85(3):168-180.
48. Galaverna G, Corradini R, Dossena A, Marchelli R, Vecchio G. (1997) Histamine-modified beta-cyclodextrins for the enantiomeric separation of dansyl-amino acids in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 18(6):905-911.

49. Garey L. (1999) Cortex: Statistics and Geometry of Neuronal Connectivity, 2nd edn. *Journal of Anatomy*, 194(Pt 1):153-157.
50. Genchi G. (2017) An overview on D-amino acids. *Amino Acids*.
51. Giuffrida A, Tabera L, Gonzalez R, Cucinotta V, Cifuentes A. (2008) Chiral analysis of amino acids from conventional and transgenic yeasts. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 875(1):243-247.
52. Gobert A, Rivet JM, Billiras R, Parsons F, Millan MJ. (2011) Simultaneous quantification of D- vs. L-serine, taurine, kynurenate, phosphoethanolamine and diverse amino acids in frontocortical dialysates of freely-moving rats: differential modulation by N-methyl-D-aspartate (NMDA) and other pharmacological agents. *J Neurosci Methods*, 202(2):143-157.
53. Golde TE, Schneider LS, Koo EH. (2011) Anti- β therapeutics in Alzheimer's disease: the need for a paradigm shift. *Neuron*, 69(2):203-213.
54. Gomez-Galan M, De Bundel D, Van Eeckhaut A, Smolders I, Lindskog M. (2013) Dysfunctional astrocytic regulation of glutamate transmission in a rat model of depression. *Mol Psychiatry*, 18(5):582-594.
55. Grandel H, Brand M. (2013) Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates. *Dev Genes Evol*, 223(1-2):131-147.
56. Guttman A. Capillary electrophoresis separation of enantiomers by cyclodextrin array chiral analysis. *Handbook of Capillary Electrophoresis* ed. Landers JP, editor. New York: CRC Press; 1996. 75-100 p.
57. Hamase K. (2007) Sensitive two-dimensional determination of small amounts of D-amino acids in mammals and the study on their functions. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 55(4):503-510.
58. Han H, Miyoshi Y, Ueno K, Okamura C, Tojo Y, Mita M, Lindner W, Zaitso K, Hamase K. (2011) Simultaneous determination of D-aspartic acid and D-glutamic acid in rat tissues and physiological fluids using a multi-loop two-dimensional HPLC procedure. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879(29):3196-3202.
59. Hanics J, Balint E, Milanovich D, Zachar G, Adam A, Csillag A. (2012) Amygdalofugal axon terminals immunoreactive for L-aspartate or L-glutamate in the nucleus accumbens of rats and domestic chickens: a comparative electron microscopic immunocytochemical study combined with anterograde pathway tracing. *Cell Tissue Res*, 350(3):409-423.

60. Hannan AJ, Henke RC, Seeto GS, Capes-Davis A, Dunn J, Jeffrey PL. (1999) Expression of doublecortin correlates with neuronal migration and pattern formation in diverse regions of the developing chick brain. *J Neurosci Res*, 55(5):650-657.
61. Hardingham GE, Bading H. (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, 11(10):682-696.
62. Hasegawa H, Shinohara Y, Masuda N, Hashimoto T, Ichida K. (2011) Simultaneous determination of serine enantiomers in plasma using Mosher's reagent and stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 46(5):502-507.
63. Hashimoto A, Kumashiro S, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Mito T, Takashima S, Doi N, Mizutani Y, Yamazaki T, et al. (1993) Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex. *J Neurochem*, 61(1):348-351.
64. Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, Fujii N, Harada K, Oka T, Takahashi K. (1992) The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Lett*, 296(1):33-36.
65. Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Hayashi T. (1992) Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cysteine and o-phthalaldehyde. *J Chromatogr*, 582(1-2):41-48.
66. Hashimoto A, Oka T. (1997) Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery. *Prog Neurobiol*, 52(4):325-353.
67. Hashimoto A, Oka T, Nishikawa T. (1995) Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery. *Eur J Neurosci*, 7(8):1657-1663.
68. Hassel B, Dingledine R. Chapter 17 - Glutamate and Glutamate Receptors A2 - Brady, Scott T. In: Siegel GJ, Albers RW, Price DL, editors. *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*. Academic Press, New York, 2012: 342-366.
69. Herrero M, Ibanez E, Martin-Alvarez PJ, Cifuentes A. (2007) Analysis of chiral amino acids in conventional and transgenic maize. *Anal Chem*, 79(13):5071-5077.
70. Hjertén S, Kiessling-Johansson M. High-performance displacement electrophoresis in 0.025- to 0.050-mm capillaries coated with a polymer to suppress adsorption and electroendosmosis 1991. 811-822 p.

71. Homma H. (2007) Biochemistry of D-aspartate in mammalian cells. *Amino Acids*, 32(1):3-11.
72. Horio M, Ishima T, Fujita Y, Inoue R, Mori H, Hashimoto K. (2013) Decreased levels of free D-aspartic acid in the forebrain of serine racemase (Srr) knock-out mice. *Neurochem Int*, 62(6):843-847.
73. Hu S, Li PC. (2000) Micellar electrokinetic capillary chromatographic separation and fluorescent detection of amino acids derivatized with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. *J Chromatogr A*, 876(1-2):183-191.
74. Huang Y, Shi M, Zhao S. (2009) Quantification of D-Asp and D-Glu in rat brain and human cerebrospinal fluid by microchip electrophoresis. *J Sep Sci*, 32(17):3001-3006.
75. Hunt DL, Castillo PE. (2012) Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications. *Curr Opin Neurobiol*, 22(3):496-508.
76. Iacobucci GJ, Popescu GK. (2017) NMDA receptors: linking physiological output to biophysical operation. *Nat Rev Neurosci*, 18(4):236-249.
77. Ito T, Hayashida M, Kobayashi S, Muto N, Hayashi A, Yoshimura T, Mori H. (2016) Serine racemase is involved in d-aspartate biosynthesis. *J Biochem*, 160(6):345-353.
78. Ivanyi R, Jicsinszky L, Juvancz Z, Roos N, Otta K, Szejtli J. (2004) Influence of (hydroxy)alkylamino substituents on enantioseparation ability of single-isomer amino-beta-cyclodextrin derivatives in chiral capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 25(16):2675-2686.
79. Jako T, Szabo E, Tabi T, Zachar G, Csillag A, Szoko E. (2014) Chiral analysis of amino acid neurotransmitters and neuromodulators in mouse brain by CE-LIF. *Electrophoresis*, 35(19):2870-2876.
80. Jakubetz H, Juza M, Schurig V. (1998) Dual chiral recognition system involving cyclodextrin derivatives in capillary electrophoresis II. Enhancement of enantioselectivity. *Electrophoresis*, 19(5):738-744.
81. Jenő F. Folyadékkromatográfia elmélete és gyakorlata. Jenő F, editor. Budapest: Edison House Kft.; 2006. 553-604 p.
82. Jones DL, McNamara JO. Chapter 40 - The Epilepsies: Phenotypes and Mechanisms A2 - Brady, Scott T. In: Siegel GJ, Albers RW, Price DL, editors. *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*. Academic Press, New York, 2012: 705-718.

83. Karakawa S, Shimbo K, Yamada N, Mizukoshi T, Miyano H, Mita M, Lindner W, Hamase K. (2015) Simultaneous analysis of d-alanine, d-aspartic acid, and d-serine using chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to the rat plasma and tissues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 115:123-129.
84. Kartvelishvily E, Shleper M, Balan L, Dumin E, Wolosker H. (2006) Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem*, 281(20):14151-14162.
85. Katane M, Homma H. (2011) D-Aspartate--an important bioactive substance in mammals: a review from an analytical and biological point of view. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879(29):3108-3121.
86. Kei Lau S, Zaccardo F, Little M, Banks P. (1998) Nanomolar derivatizations with 5-carboxyfluorescein succinimidyl ester for fluorescence detection in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 809(1):203-210.
87. Kim PM, Duan X, Huang AS, Liu CY, Ming GL, Song H, Snyder SH. (2010) Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(7):3175-3179.
88. Kinoshita K, Jingu S, Yamaguchi J-i. (2013) A surrogate analyte method to determine d-serine in mouse brain using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 432(2):124-130.
89. Kirschner DL, Jaramillo M, Green TK. (2007) Enantioseparation and stacking of Cyanobenz[f]isoindole-amino acids by reverse polarity capillary electrophoresis and sulfated beta-cyclodextrin. *Anal Chem*, 79(2):736-743.
90. Kitagawa F, Sudaki H, Sueyoshi K, Otsuka K. (2013) Open-tubular Electrochromatographic Chiral Separation of Amino Acids Using an Organic Nanocrystals Immobilized Capillary. *Analytical Sciences*, 29(1):107-112.
91. Kleckner NW, Dingledine R. (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, 241(4867):835-837.
92. Klinker CC, Bowser MT. (2007) 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorogenic labeling reagent for the in vivo analysis of amino acid neurotransmitters using online microdialysis-capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 79(22):8747-8754.
93. Konradi C, Heckers S. (2003) Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol Ther*, 97(2):153-179.

94. Koyama H, Adachi M, Sekine M, Katane M, Furuchi T, Homma H. (2006) Cytoplasmic localization and efflux of endogenous D-aspartate in pheochromocytoma 12 cells. *Arch Biochem Biophys*, 446(2):131-139.
95. Kremmel T, Tokos K. *Elválasztástechnikai Módszerek Elmélete és Gyakorlata*. In: Kremmel T, Tokos K, editors. *Elválasztástechnikai Módszerek Elmélete és Gyakorlata*. Akadémia Kiadó, Budapest, 2010: 169-176.
96. Krystal JH, D'Souza DC, Petrakis IL, Belger A, Berman RM, Charney DS, Abi-Saab W, Madonick S. (1999) NMDA agonists and antagonists as probes of glutamatergic dysfunction and pharmacotherapies in neuropsychiatric disorders. *Harv Rev Psychiatry*, 7(3):125-143.
97. Labrie V, Wong AH, Roder JC. (2012) Contributions of the D-serine pathway to schizophrenia. *Neuropharmacology*, 62(3):1484-1503.
98. Lapainis T, Sweedler JV. (2008) Contributions of capillary electrophoresis to neuroscience. *J Chromatogr A*, 1184(1-2):144-158.
99. Larkum ME, Nevian T. (2008) Synaptic clustering by dendritic signalling mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*, 18(3):321-331.
100. Lau CG, Zukin RS. (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*, 8(6):413-426.
101. Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramee AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR. (2007) Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445(7124):168-176.
102. Lelievre F, Gareil P, Bahaddi Y, Galons H. (1997) Intrinsic selectivity in capillary electrophoresis for chiral separations with dual cyclodextrin systems. *Anal Chem*, 69(3):393-401.

103. Lelievre F, Gareil P, Jardy A. (1997) Selectivity in capillary electrophoresis: application to chiral separations with cyclodextrins. *Anal Chem*, 69(3):385-392.
104. Li H, Li C, Yan Z-y, Yang J, Chen H. (2010) Simultaneous monitoring multiple neurotransmitters and neuromodulators during cerebral ischemia/reperfusion in rats by microdialysis and capillary electrophoresis. *Journal of Neuroscience Methods*, 189(2):162-168.
105. Li H, Wang H, Chen JH, Wang LH, Zhang HS, Fan Y. (2003) Determination of amino acid neurotransmitters in cerebral cortex of rats administered with baicalin prior to cerebral ischemia by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 788(1):93-101.
106. Li YM, Qu Y, Vandenbussche E, Arckens L, Vandesande F. (2001) Analysis of extracellular gamma-aminobutyric acid, glutamate and aspartate in cat visual cortex by in vivo microdialysis and capillary electrophoresis-laser induced fluorescence detection. *J Neurosci Methods*, 105(2):211-215.
107. Long Z, Homma H, Lee JA, Fukushima T, Santa T, Iwatsubo T, Yamada R, Imai K. (1998) Biosynthesis of D-aspartate in mammalian cells. *FEBS Lett*, 434(3):231-235.
108. Lorenzo MP, Villasenor A, Ramamoorthy A, Garcia A. (2013) Optimization and validation of a capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for amino acids determination in human plasma: application to bipolar disorder study. *Electrophoresis*, 34(11):1701-1709.
109. Major G, Larkum ME, Schiller J. (2013) Active properties of neocortical pyramidal neuron dendrites. *Annu Rev Neurosci*, 36:1-24.
110. Malthe-Sorensen D, Skrede KK, Fonnum F. (1979) Calcium-dependent release of D-[3H]aspartate evoked by selective electrical stimulation of excitatory afferent fibres to hippocampal pyramidal cells in vitro. *Neuroscience*, 4(9):1255-1263.
111. Martineau M, Baux G, Mothet JP. (2006) D-serine signalling in the brain: friend and foe. *Trends Neurosci*, 29(8):481-491.
112. McBain CJ, Mayer ML. (1994) N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev*, 74(3):723-760.
113. Mezey S, Krivokuca D, Balint E, Adorjan A, Zachar G, Csillag A. (2012) Postnatal changes in the distribution and density of neuronal nuclei and doublecortin antigens in domestic chicks (*Gallus domesticus*). *J Comp Neurol*, 520(1):100-116.

114. Miao H, Rubakhin SS, Sweedler JV. (2005) Subcellular analysis of D-aspartate. *Anal Chem*, 77(22):7190-7194.
115. Miller RF. (2004) D-Serine as a glial modulator of nerve cells. *Glia*, 47(3):275-283.
116. Molina M, Silva M. (2002) Analytical potential of fluorescein analogues for ultrasensitive determinations of phosphorus-containing amino acid herbicides by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 23(7-8):1096-1103.
117. Mulholland M, Hibbert DB. (1997) Linearity and the limitations of least squares calibration. *J Chromatogr A*, 762(1-2):73-82.
118. Mullerova L, Dubsy P, Gas B. (2014) Twenty years of development of dual and multi-selector models in capillary electrophoresis: a review. *Electrophoresis*, 35(19):2688-2700.
119. Nagata Y. (1992) Involvement of D-amino acid oxidase in elimination of D-serine in mouse brain. *Experientia*, 48(8):753-755.
120. Nagata Y, Horiike K, Maeda T. (1994) Distribution of free D-serine in vertebrate brains. *Brain Res*, 634(2):291-295.
121. Naruishi N, Tanaka Y, Higashi T, Wakida S. (2006) Highly efficient dynamic modification of plastic microfluidic devices using proteins in microchip capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 1130(2):169-174.
122. Neidle A, Dunlop DS. (1990) Developmental changes in free D-aspartic acid in the chicken embryo and in the neonatal rat. *Life Sci*, 46(21):1517-1522.
123. Nishikawa T. (2005) Metabolism and functional roles of endogenous D-serine in mammalian brains. *Biol Pharm Bull*, 28(9):1561-1565.
124. Nouadje G, Rubie H, Chatelut E, Canal P, Nertz M, Puig P, Couderc F. (1995) Child cerebrospinal fluid analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 717(1-2):293-298.
125. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307(5950):462-465.
126. O'Brien KB, Miller RF, Bowser MT. (2005) D-Serine uptake by isolated retinas is consistent with ASCT-mediated transport. *Neurosci Lett*, 385(1):58-63.

127. Oda RP, Landers JP. Introduction to capillary electrophoresis. Handbook of Capillary Electrophoresis ed. Landers JP, editor. New York: CRC Press; 1996. 1-48 p.
128. Ohkura Y, Kai M, Nohta H. (1994) Fluorogenic reactions for biomedical chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 659(1-2):85-107.
129. Ota N, Shi T, Sweedler JV. (2012) D-Aspartate acts as a signaling molecule in nervous and neuroendocrine systems. *Amino Acids*, 43(5):1873-1886.
130. Paez X, Hernandez L. (2001) Biomedical applications of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Biopharm Drug Dispos*, 22(7-8):273-289.
131. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, 14(6):383-400.
132. Patzold R, Schieber A, Bruckner H. (2005) Gas chromatographic quantification of free D-amino acids in higher vertebrates. *Biomed Chromatogr*, 19(6):466-473.
133. Pentoney SL, Sweedler JV, Sweedler JV. Optical detection techniques for capillary electrophoresis. Handbook of Capillary Electrophoresis ed. Landers JP, editor. New York: CRC Press; 1996. 379-424 p.
134. Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM. (2009) Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature*, 461(7266):916-922.
135. Peters JL, Michael AC. (1998) Modeling voltammetry and microdialysis of striatal extracellular dopamine: the impact of dopamine uptake on extraction and recovery ratios. *J Neurochem*, 70(2):594-603.
136. Plitman E, Iwata Y, Caravaggio F, Nakajima S, Chung JK, Gerretsen P, Kim J, Takeuchi H, Chakravarty MM, Remington G, Graff-Guerrero A. (2017) Kynurenic Acid in Schizophrenia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Schizophr Bull*, 43(4):764-777.
137. Poinot V, Bayle C, Couderc F. (2003) Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 24(22-23):4047-4062.
138. Poinot V, Carpena MA, Bouajila J, Gavard P, Feurer B, Couderc F. (2012) Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 33(1):14-35.
139. Poinot V, Gavard P, Feurer B, Couderc F. (2010) Recent advances in amino acid analysis by CE. *Electrophoresis*, 31(1):105-121.

140. Poinso V, Lacroix M, Maury D, Chataigne G, Feurer B, Couderc F. (2006) Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 27(1):176-194.
141. Poinso V, Rodat A, Gavard P, Feurer B, Couderc F. (2008) Recent advances in amino acid analysis by CE. *Electrophoresis*, 29(1):207-223.
142. Price DL, Sisodia SS. (1998) Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu Rev Neurosci*, 21:479-505.
143. Price DL, Tanzi RE, Borchelt DR, Sisodia SS. (1998) Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models. *Annu Rev Genet*, 32:461-493.
144. Querfurth HW, LaFerla FM. (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 362(4):329-344.
145. Radzishevsky I, Sason H, Wolosker H. (2013) D-serine: physiology and pathology. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 16(1):72-75.
146. Rebola N, Carta M, Lanore F, Blanchet C, Mulle C. (2011) NMDA receptor-dependent metaplasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Nat Neurosci*, 14(6):691-693.
147. Reiner A, Perkel DJ, Bruce LL, Butler AB, Csillag A, Kuenzel W, Medina L, Paxinos G, Shimizu T, Striedter G, Wild M, Ball GF, Durand S, Gunturkun O, Lee DW, Mello CV, Powers A, White SA, Hough G, Kubikova L, Smulders TV, Wada K, Dugas-Ford J, Husband S, Yamamoto K, Yu J, Siang C, Jarvis ED. (2004) Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *J Comp Neurol*, 473(3):377-414.
148. Rosenberg D, Kartvelishvily E, Shleper M, Klinker CM, Bowser MT, Wolosker H. (2010) Neuronal release of D-serine: a physiological pathway controlling extracellular D-serine concentration. *Faseb j*, 24(8):2951-2961.
149. Rudaz S, Geiser L, Souverain S, Prat J, Veuthey JL. (2005) Rapid stereoselective separations of amphetamine derivatives with highly sulfated gamma-cyclodextrin. *Electrophoresis*, 26(20):3910-3920.
150. Ruiz-Jiménez J, de Castro MDL. (2006) Coupling microdialysis to capillary electrophoresis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(6):563-571.
151. Sakai K, Homma H, Lee JA, Fukushima T, Santa T, Tashiro K, Iwatsubo T, Imai K. (1998) Emergence of D-aspartic acid in the differentiating neurons of the rat central nervous system. *Brain Res*, 808(1):65-71.

152. Sanchez-Lopez E, Marina ML, Crego AL. (2016) Improving the sensitivity in chiral capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 37(1):19-34.
153. Sato M, Inoue F, Kanno N, Sato Y. (1987) The occurrence of N-methyl-D-aspartic acid in muscle extracts of the blood shell, *Scapharca broughtonii*. *Biochem J*, 241(1):309-311.
154. Scanlan C, Shi T, Hatcher NG, Rubakhin SS, Sweedler JV. (2010) Synthesis, accumulation, and release of d-aspartate in the *Aplysia californica* CNS. *J Neurochem*, 115(5):1234-1244.
155. Schell MJ, Brady RO, Jr., Molliver ME, Snyder SH. (1997) D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci*, 17(5):1604-1615.
156. Schell MJ, Cooper OB, Snyder SH. (1997) D-aspartate localizations imply neuronal and neuroendocrine roles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(5):2013-2018.
157. Schieber A, Bruckner H, Rupp-Classen M, Specht W, Nowitzki-Grimm S, Classen HG. (1997) Evaluation of D-amino acid levels in rat by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry: no evidence for subacute toxicity of orally fed D-proline and D-aspartic acid. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 691(1):1-12.
158. Scriba GK. (2008) Cyclodextrins in capillary electrophoresis enantioseparations-recent developments and applications. *J Sep Sci*, 31(11):1991-2011.
159. Shleper M, Kartvelishvily E, Wolosker H. (2005) D-serine is the dominant endogenous coagonist for NMDA receptor neurotoxicity in organotypic hippocampal slices. *J Neurosci*, 25(41):9413-9417.
160. Simo C, Barbas C, Cifuentes A. (2002) Sensitive micellar electrokinetic chromatography-laser-induced fluorescence method to analyze chiral amino acids in orange juices. *J Agric Food Chem*, 50(19):5288-5293.
161. Simo C, Martin-Alvarez PJ, Barbas C, Cifuentes A. (2004) Application of stepwise discriminant analysis to classify commercial orange juices using chiral micellar electrokinetic chromatography-laser induced fluorescence data of amino acids. *Electrophoresis*, 25(16):2885-2891.
162. Singh NS, Paul RK, Sichler M, Moaddel R, Bernier M, Wainer IW. (2012) Capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence (CE-LIF) assay for measurement of intracellular D-serine and serine racemase activity. *Anal Biochem*, 421(2):460-466.

163. Skrede KK, Malthé-Sorensen D. (1981) Increased resting and evoked release of transmitter following repetitive electrical tetanization in hippocampus: a biochemical correlate to long-lasting synaptic potentiation. *Brain Res*, 208(2):436-441.
164. Song Y, Feng Y, LeBlanc MH, Zhao S, Liu YM. (2006) Assay of trace D-amino acids in neural tissue samples by capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 78(23):8121-8128.
165. Spinelli P, Brown ER, Ferrandino G, Branno M, Montarolo PG, D'Aniello E, Rastogi RK, D'Aniello B, Baccari GC, Fisher G, D'Aniello A. (2006) D-aspartic acid in the nervous system of *Aplysia limacina*: possible role in neurotransmission. *J Cell Physiol*, 206(3):672-681.
166. Sponer JE, Sumpter BG, Leszczynski J, Sponer J, Fuentes-Cabrera M. (2008) Theoretical study on the factors controlling the stability of the borate complexes of ribose, arabinose, lyxose, and xylose. *Chemistry*, 14(32):9990-9998.
167. Stamatakis A, Barbas H, Dermon CR. (2004) Late granule cell genesis in quail cerebellum. *J Comp Neurol*, 474(2):173-189.
168. Stewart MG, Rusakov DA. (1995) Morphological changes associated with stages of memory formation in the chick following passive avoidance training. *Behav Brain Res*, 66(1-2):21-28.
169. Sugimoto H, Kakehi M, Jinno F. (2015) Bioanalytical method for the simultaneous determination of d- and l-serine in human plasma by LC/MS/MS. *Analytical Biochemistry*, 487:38-44.
170. Suzuki M, Sasabe J, Furuya S, Mita M, Hamase K, Aiso S. (2012) Type 1 diabetes mellitus in mice increases hippocampal D-serine in the acute phase after streptozotocin injection. *Brain Res*, 1466:167-176.
171. Szoko E, Tabi T. (2010) Analysis of biological samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal*, 53(5):1180-1192.
172. Szoko E, Vincze I, Tabi T. (2016) Chiral separations for d-amino acid analysis in biological samples. *J Pharm Biomed Anal*, 130:100-109.
173. Szökő É. Kapilláris elektroforézis. In: Lengyel J, Kalász H, editors. *A gyógyszerek szerkezetbeni sorsa és vizsgáló módszerei*. 17. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2007.

174. Tabi T, Lohinai Z, Palfi M, Levine M, Szoko E. (2008) CE-LIF determination of salivary cadaverine and lysine concentration ratio as an indicator of lysine decarboxylase enzyme activity. *Anal Bioanal Chem*, 391(2):647-651.
175. Tabi T, Magyar K, Szoko E. (2003) Chiral characterization of deprenyl-N-oxide and other deprenyl metabolites by capillary electrophoresis using a dual cyclodextrin system in rat urine. *Electrophoresis*, 24(15):2665-2673.
176. Takizawa K, Nakamura H. Separation and Determination of Fluorescein Isothiocyanate-Labeled Amino Acids by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection 1998. 925-928 p.
177. Thongkhao-On K, Kottegoda S, Pulido JS, Shippy SA. (2004) Determination of amino acids in rat vitreous perfusates by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 25(17):2978-2984.
178. Thorsen G, Bergquist J. (2000) Chiral separation of amino acids in biological fluids by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 745(2):389-397.
179. Todoroki N, Shibata K, Yamada T, Kera Y, Yamada R. (1999) Determination of N-methyl-D-aspartate in tissues of bivalves by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 728(1):41-47.
180. Tong G, Shepherd D, Jahr CE. (1995) Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. *Science*, 267(5203):1510-1512.
181. Topo E, Soricelli A, Di Maio A, D'Aniello E, Di Fiore MM, D'Aniello A. (2010) Evidence for the involvement of D-aspartic acid in learning and memory of rat. *Amino Acids*, 38(5):1561-1569.
182. Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF. (1995) Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science*, 268(5212):873-876.
183. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*, 62(3):405-496.
184. Tsai G, Yang P, Chung LC, Lange N, Coyle JT. (1998) D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 44(11):1081-1089.
185. Tseng HM, Li Y, Barrett DA. (2007) Profiling of amine metabolites in human biofluids by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem*, 388(2):433-439.

186. Tsunoda M, Kato M, Fukushima T, Santa T, Homma H, Yanai H, Soga T, Imai K. (1999) Determination of aspartic acid enantiomers in bio-samples by capillary electrophoresis. *Biomed Chromatogr*, 13(5):335-339.
187. Tucci S, Rada P, Sepulveda MJ, Hernandez L. (1997) Glutamate measured by 6-s resolution brain microdialysis: capillary electrophoretic and laser-induced fluorescence detection application. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 694(2):343-349.
188. Verdoorn TA, Dingleline R. (1988) Excitatory amino acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes: agonist pharmacology. *Mol Pharmacol*, 34(3):298-307.
189. Wagner Z, Tabi T, Jako T, Zachar G, Csillag A, Szoko E. (2012) Chiral separation and determination of excitatory amino acids in brain samples by CE-LIF using dual cyclodextrin system. *Anal Bioanal Chem*, 404(8):2363-2368.
190. Wagner Z, Tabi T, Zachar G, Csillag A, Szoko E. (2011) Comparison of quantitative performance of three fluorescence labels in CE/LIF analysis of aspartate and glutamate in brain microdialysate. *Electrophoresis*, 32(20):2816-2822.
191. Waldhier MC, Almstetter MF, Nurnberger N, Gruber MA, Dettmer K, Oefner PJ. (2011) Improved enantiomer resolution and quantification of free D-amino acids in serum and urine by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1218(28):4537-4544.
192. Wang C, McInnis J, Ross-Sanchez M, Shinnick-Gallagher P, Wiley JL, Johnson KM. (2001) Long-term behavioral and neurodegenerative effects of perinatal phencyclidine administration: implications for schizophrenia. *Neuroscience*, 107(4):535-550.
193. Watanabe Y, Imai K. (1982) Pre-column labelling for high-performance liquid chromatography of amino acids with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole and its application to protein hydrolysates. *Journal of Chromatography A*, 239:723-732.
194. Waterval JC, Lingeman H, Bult A, Underberg WJ. (2000) Derivatization trends in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 21(18):4029-4045.
195. Watson RE, Desesso JM, Hurtt ME, Cappon GD. (2006) Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 77(5):471-484.
196. Westerink BH. (1995) Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. *Behav Brain Res*, 70(2):103-124.

197. Wollmuth LP, Kuner T, Seeburg PH, Sakmann B. (1996) Differential contribution of the NR1- and NR2A-subunits to the selectivity filter of recombinant NMDA receptor channels. *J Physiol*, 491 (Pt 3):779-797.
198. Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH. (1999) Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(23):13409-13414.
199. Wolosker H, D'Aniello A, Snyder SH. (2000) D-aspartate disposition in neuronal and endocrine tissues: ontogeny, biosynthesis and release. *Neuroscience*, 100(1):183-189.
200. Wong PC, Savonenko A, Li T, Price DL. Chapter 46 - Neurobiology of Alzheimer's Disease. *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*. Academic Press, New York, 2012: 815-828.
201. Wuethrich A, Quirino JP. (2018) Derivatisation for separation and detection in capillary electrophoresis (2015-2017). *Electrophoresis*, 39(1):82-96.
202. Xing Y, Li X, Guo X, Cui Y. (2016) Simultaneous determination of 18 D-amino acids in rat plasma by an ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: application to explore the potential relationship between Alzheimer's disease and D-amino acid level alterations. *Anal Bioanal Chem*, 408(1):141-150.
203. Yang H, Peters JL, Allen C, Chern SS, Coalson RD, Michael AC. (2000) A theoretical description of microdialysis with mass transport coupled to chemical events. *Anal Chem*, 72(9):2042-2049.
204. Zachar G, Wagner Z, Tabi T, Balint E, Szoko E, Csillag A. (2012) Differential changes of extracellular aspartate and glutamate in the striatum of domestic chicken evoked by high potassium or distress: an in vivo microdialysis study. *Neurochem Res*, 37(8):1730-1737.
205. Zeiler FA. (2015) Activated NMDA receptor imaging: a step forward in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 86(10):1053.
206. Zhang L, Chen H, Hu S, Cheng J, Li Z, Shao M. (1998) Determination of the amino acid neurotransmitters in the dorsal root ganglion of the rat by capillary electrophoresis with a laser-induced fluorescence-charge coupled device. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 707(1-2):59-67.
207. Zhang LY, Tang XC, Sun MX. (2005) Simultaneous determination of histamine and polyamines by capillary zone electrophoresis with 4-fluor-7-nitro-2,1,3-

benzoxadiazole derivatization and fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 820(2):211-219.

208. Zhao S, Feng Y, LeBlanc MH, Liu YM. (2001) Determination of free aspartic acid enantiomers in rat brain by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 762(1):97-101.

209. Zhao S, Wang B, He M, Bai W, Chen L. (2006) Determination of free d-alanine in the human plasma by capillary electrophoresis with optical fiber light-emitting diode-induced fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 569(1):182-187.

210. Zhao S, Yuan H, Xiao D. (2005) Detection of d-Serine in rat brain by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 822(1-2):334-338.

211. Zhu X, Shaw PN, Pritchard J, Newbury J, Hunt EJ, Barrett DA. (2005) Amino acid analysis by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection: application to nanolitre-volume biological samples from *Arabidopsis thaliana* and *Myzus persicae*. *Electrophoresis*, 26(4-5):911-919.

212. Zinellu A, Sotgia S, Pisanu E, Scanu B, Sanna M, Usai MF, Chessa R, Deiana L, Carru C. (2010) Quantification of neurotransmitter amino acids by capillary electrophoresis laser-induced fluorescence detection in biological fluids. *Anal Bioanal Chem*, 398(5):1973-1978.

9. Saját közlemények

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

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 BIOLOGICA HUNGARICA 69: (1) pp. 1-15. DOI: 10.1556/018.68.2018.1.1 (2018)

Folyóiratcikk/Szaccikk/Tudományos

IF:0,506

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)

Folyóiratcikk/Szaccikk/Tudományos

IF: 3,028

Wagner Zs, Tabi T, **Jako T**, Zachar G, Csillag A, Szoko E.

Chiral separation and determination of excitatory amino acids in brain samples by CE-LIF using dual cyclodextrin system

ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY 404: (8) pp. 2363-2368. (2012)

Folyóiratcikk/Szaccikk/Tudományos

IF: 3,659

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Szökő Éva Professor Asszonynak**, aki tudományos diákkörös munkámtól kezdve folyamatosan támogatott, és tanácsaival irányította kutatói munkámat.

Köszönettel tartozom **Dr. Bagdy György Professor Úrnak** a Gyógyszerhatástani Intézet Igazgatójának, hogy az intézetben végzett kutatómunkámat lehetővé tette.

Továbbá köszönettel tartozom **Dr. Tábi Tamás** kollegámnak, a kísérletek során nyújtott szakmai segítségéért, valamint folyamatos gyakorlati útmutatásaiért, melyek lehetővé tették munkám létrejöttét.

Szeretnék köszönetet mondani a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet munkatársainak, **Dr. Zachar Gergelynek** és **Dr. Csillag András Professor Úrnak** az állatkísérletekben nyújtott segítségükért, valamint a töretlen együttműködésért, melyet végig tanusítottak felém.

Köszönettel tartozom a **Gyógyszerhatástani Intézet** munkatársainak a segítségüket, hogy munkámat színvonalas szakmai környezetben végezhettem.

Köszönettel tartozom családomnak, akik munkám alatt végig támogattak és biztos hátteret nyújtottak tudományos munkámhoz, és a dolgozat létrejöttéhez.

AGE-RELATED AND FUNCTION-DEPENDENT REGIONAL ALTERATIONS OF FREE L- AND D-ASPARTATE IN POSTEMBRYONIC CHICK BRAIN

GERGELY ZACHAR,^{1*} TAMÁS JAKÓ,² ISTVÁN VINCZE,² ZSOLT WAGNER,² TAMÁS TÁBI,²
ESZTER BÁLINT,¹ SZILVIA MEZEY,¹ ÉVA SZÖKŐ² and ANDRÁS CSILLAG¹

¹Department of Anatomy, Histology and Embryology, Semmelweis University,
Tűzoltó u. 58, H-1094 Budapest, Hungary

²Department of Pharmacodynamics, Semmelweis University,
Tűzoltó u. 58, H-1094 Budapest, Hungary

(Received: October 6, 2017; accepted: December 8, 2017)

D-aspartate (D-Asp) modulates adult neural plasticity and embryonic brain development by promoting cell proliferation, survival and differentiation. Here, developmental changes of the excitatory amino acids (EAAs) L-Glu, L-Asp and D-Asp were determined during the first postembryonic days, a time window for early learning, in selected brain regions of domestic chickens after chiral separation and capillary electrophoresis. Extracellular concentration (ECC) of EAAs was measured in microdialysis samples from freely moving chicks. ECC of D-Asp (but not L-EAAs) decreased during the first week of age, with no considerable regional or learning-related variation. ECC of L-Asp and L-Glu (but not of D-Asp) were elevated in the mSt/Ac in response to a rewarding stimulus, suggesting importance of Asp-Glu co-release in synaptic plasticity of basal ganglia. Potassium-evoked release of D-Asp, with a protracted transient, was also demonstrated. D-Asp constitutes greater percentage of total aspartate in the extracellular space than in whole tissue extracts, thus the bulk of D-Asp detected in tissue appears in the extracellular space. Conversely, only a fraction of tissue L-EAAs can be detected in extracellular space. The lack of changes in tissue D-Asp following avoidance learning indicates a tonic, rather than phasic, mechanism in the neuromodulatory action of this amino acid.

Keywords: D-aspartic acid – avian brain – postembryonic development – arcopallium – amygdala

INTRODUCTION

L-Aspartic acid (L-Asp) has neurotransmitter properties in the brain of various vertebrates [17, 28]. L-Asp together with L-glutamate (L-Glu) are co-released in the striatum of young domestic chicks [45]. Of particular interest is the potential role of excitatory amino acids (EAAs) during the first postembryonic days, a sensitive time window for early adaptive brain plasticity such as imprinting of precocial birds. Another extensively studied early learning model is passive avoidance learning (PAL), in which hatchlings of domestic chicks learn to avoid bad tasting food-like objects [36]. Early learning leads to an increased number of new neurons in the medial striatum (mSt) [10] – an area partially corresponding to the nucleus accum-

*Corresponding author; e-mail address: e-mail: gzachar@gmail.com

bens, as confirmed also by our laboratory [3] – and the intermediate medial mesopallium (iMM), an associative cortex homologue. Both regions participate in PAL of chicks together with a third key area called the arcopallium (Arco), which is largely homologous to the mammalian amygdala [35]. Both in the mSt and iMM glutamate dependent LTP has been already detected [24].

Unlike D-glutamate, the enantiomer of L-Asp, D-aspartic acid (D-Asp) occurs in the brain of mollusks [8], mammals [11, 21] and birds [30]. As recently discovered, D-Asp is synthesized by the serine-racemase enzyme [23]. Although its function remains disputed, D-Asp has been implicated in the early development of the brain due to its relatively high concentration during embryonic development [20, 21]. Dynamic changes of D-Asp in the CNS during embryonic development have been described by several studies, however, less data is available on postembryonic alterations [20, 43]. It is suggested that D-Asp also modulates adult neural and behavioural plasticity as a signaling factor [12, 39]. Glutamate transmission dependent synaptic potentiation [24] and synaptic remodeling [38] are required in the mSt and iMM for memory formation during PAL. In order to assess the relevance of EAAs to brain development and (early adaptive) learning, it is essential to measure their resting levels in the brain regions crucial for PAL. Given the known variability and age dependence of D-Asp in embryonic mammalian brain [20, 30], it seemed logical to extend tissue analysis of D-Asp (parallel with the L-enantiomers) to postembryonic development of the chicken until adulthood. By doing so, any developmental alterations, which could otherwise confound the analysis of functional (e.g. learning-evoked) changes, can duly be taken into account. To separate that contingent of amino acids which contributes to the metabolic pool of cells from that which participates in signaling, we investigated the percentage of tissue EAAs appearing in the extracellular space, as well as the ratios between the different L- and D-enantiomers.

In the present study, L-Glu and L-Asp were measured in tissue samples from brain regions relevant to PAL (iMM, mSt, Arco), and from the cerebellum (Cb) as control region. The above regions were also tested for age-related changes of L-Asp as well as L-Glu, in chickens of 2 to 62 days of age. We also measured amino acid concentrations in the above mentioned regions after passive avoidance training to detect any changes related to behavioral/synaptic plasticity. For a refined analysis of the questions posed, capillary electrophoresis coupled with laser induced fluorescence detection was used to quantify the excitatory amino acids (EAAs) extracted from tissue homogenates [41]. Separation of D- and L-enantiomers was supported by a recently reported method of chiral separation [42]. A further extension of the method, an attempt was made here to detect D-Asp also in microdialysis samples, collected from freely moving chicks, enabling the monitoring of function-dependent dynamic changes.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Young unsexed Hunnia-broiler chicks (153 in total), purchased from a local company (Bábolna Kft., Budapest, Hungary) were used. Chicks were kept in groups of 10 in 33×40×25 cm plastic boxes, unless stated otherwise, until the 8th day of age, and then transferred to larger cages in groups of 4 individuals until they have reached maturity (62 days of age). For all animals water and food were available *ad libitum* and light/dark cycles were 12/12 h. All animals were kept and treated according to regulations of the ethical committee of the Semmelweis University, and all experiments were approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation, and permitted by the Food Chain Safety and Animal Health Directorate of the Government Office for Pest County (Permit Number: XIV-I-001/2269-4/2012). Procedures were in harmony with the EU Council directives on laboratory animals (86/609/EEC).

Behavioural procedure of passive avoidance training and recall

The training procedure was carried out as described by Gibbs et al. [16]. Briefly, day-old chicks were placed in small open boxes (20×25×25 cm) upon arrival. Chicks (n = 84) were kept in pairs during the experiment to reduce isolation stress. After an at least 3-hour accommodation period a dry black bead was introduced as a pre-training stimulus. Colored glass beads fixed to the end of thin metal stick were used as stimuli. Five minutes later a red bead was presented, covered either with water or methyl anthranilate (MeA), a harmless but bitter substance. The chicks in the MeA trained group displayed disgust response (head shake, retreat, gaping) when they tasted MeA. Five minutes, 6 hours or 24 hours later, dry blue and red beads were presented to the chicks for 30 seconds each, to test the retention of memory. All chicks were two days old at the time of memory tests, therefore, the accommodation period at the beginning of the training varied between 3 and 24 hours according to the delay of the recall. In the 24 h group, chicks were trained on the preceding day. Those chicks that did not peck on any stimulus during pretraining or training (due to lack of alertness, drowsiness) were excluded from the experiment (n = 12). Those chicks in the water trained group that refrained from pecking during recall, as well as those chicks in the MeA-trained group that pecked on the red bead were also excluded from further analysis (n = 16). The elimination procedure meant to ensure that two homogeneous experimental groups (one that was exposed to MeA and did duly show avoidance, and another that was not even exposed to the aversive substance and did not show avoidance either).

Tissue sampling for chemical analysis

Chicks (n = 61) were euthanized (by deep ketamine-xylazine anaesthesia) and decapitated at different ages (2, 4, 8 and 62 days). Their brains were dissected and coronal slabs containing the respective brain regions were prepared by standardized dissection using a plastic brain mold. Rectangular samples of 1–3 mm width were dissected under a stereomicroscope with a pointed scalpel blade (Fig. 1). For samples from the mSt, iMM the slab extending between the rostrocaudal coordinates 6.16 and 4.72 mm were used, whereas for samples of the arcopallium, the rostral and caudal limits of the slab were 4.72 and 3.28 mm respectively (for the coordinates see Puelles et al. [32]), (Fig. 1A, B). The cerebellar samples were taken from the dorsal cerebellum, dissected directly from the whole brain (not shown). Tissue samples were weighed and frozen immediately in pre-weighed vials on dry ice and stored at -80°C until further processing. Further processing was carried out as described below.

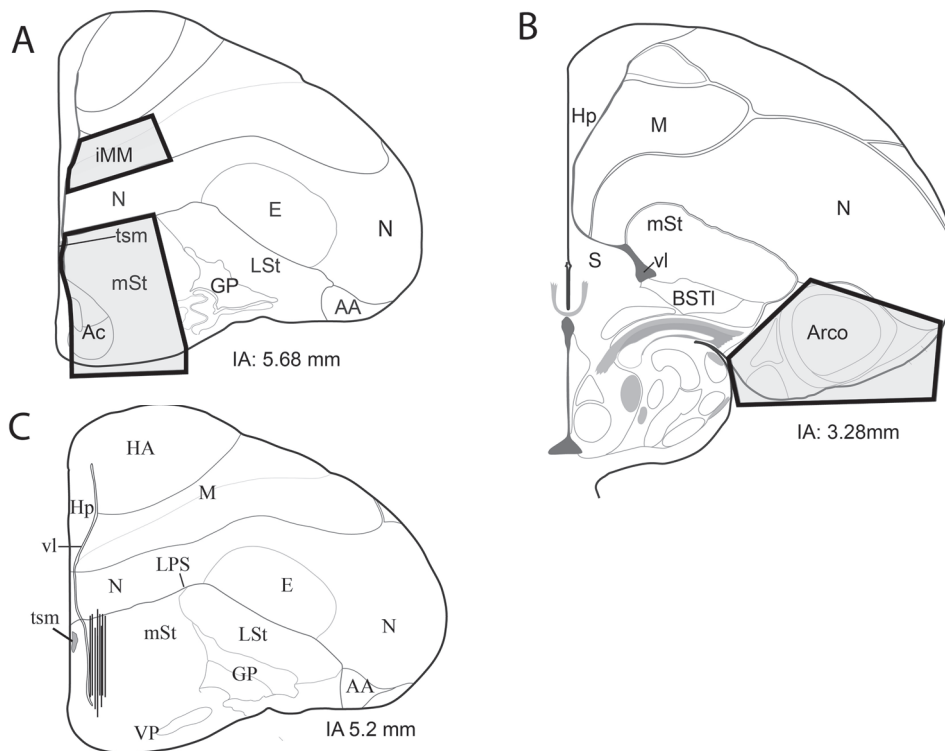


Fig. 1. Approximate borders (bold frames) of regions dissected from the brains of domestic chicks (A, B) and the location of the active part of the microdialysis probes (C) as represented according to the stereotaxic atlas of Puelles et al. [32]. IA: rostrocaudal coordinates as distances from the interaural plane. *Abbreviations:* AA: anterior arcopallium, Ac: n. accumbens, Arco: arcopallium, BSTI: lateral bed nucleus of the stria terminalis, E: entopallium, GP: globus pallidus, HA: hyperpallium apicale, Hp: hippocampus, iMM: intermediate medial mesopallium, LPS: lamina palliosubpallialis, LSt: lateral striatum, M: mesopallium, mSt: medial striatum, N: nidopallium, S: septum, tsm: tractus septomesencephalicus, vl: lateral ventricle, VP: ventral pallidum

Surgery and histology

Chicks were operated on the day of arrival. The animals were anaesthetised by intramuscular injection of mixed ketamine and xylazine (40 and 8 mg/bwkg, respectively). The chicks were fixed onto a stereotaxic frame. A microdialysis probe (EI-A-Z-1; 1.5 mm active surface length, Eicom, Kyoto, Japan) was implanted into the left medial striatum and fixed onto the skull with dental cement (Duracryl, Spofa Dental, Praha, Czech Republic). Implantation coordinates were 4.0 mm anterior from bregma, 0.85 mm lateral from midline and 5.8 mm ventral from brain surface. The coordinates were in agreement with previous lesion and pathway tracing studies on the ventrobasal forebrain of the domestic chicken [3, 26, 46]. After the implantation, the animals were allowed to recover from the operation for at least 12 h without food and water (this is standard procedure for day-old domestic chicks supported by their yolk sac). Microdialysis samples were collected 1 day after surgery. After the experiments the chicks were sacrificed by decapitation under deep ketamine-xylazine anaesthesia. For verification of probe location, the brains were dissected and immersed into fixative (4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer) for at least 24 h. Sixty-micrometer-thick coronal sections were cut from the brain of each animal covering the area adjacent to the insertion point of the probe. The sections were counterstained with cresyl violet (Nissl stain), the location of the probe was determined by microphotography, and documented on a composite diagram (Fig. 1C).

In vivo microdialysis procedure

Immediately after surgery the chicks ($n = 8$) were placed into an open-field box with a one-way mirror wall, where they were allowed to recover. The microdialysis probe was perfused with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) [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)], at a flow rate of 0.3 $\mu\text{l}/\text{min}$, using a microinjection pump (Stoelting, Dublin, Ireland). The probe was attached to the pump through polyethylene tubing via a liquid switch and swivel (CMA Microdialysis AB, Solna, Sweden) to enable rapid changing of the perfusion media and to avoid convolution of the tubing. The post-stimulus delay of response was adjusted according to the flow rate and the length of the tubing. After a stabilization period of 18–20 h, samples were collected in 200 μl polypropylene tubes at 20 min intervals, placed on dry ice and later stored at -80°C until further analysis.

In the experiment, after collecting 3 samples (60 min) the birds were allowed to drink tap water ad libitum for 20 min (1 sample). One hundred minutes later, 50 mM KCl containing ACSF was perfused through the probe for 20 min. The Na^+ content of ACSF was reduced correspondingly to maintain osmolality. After each stimulus the perfusion medium was switched back to standard ACSF and further samples were collected.

Analysis of samples

For brain tissue extracts, samples were mixed with 10 µl/mg (wet tissue) ice-cold acetonitrile/water (2:1) mixture and homogenized by sonication for 5 s, followed by centrifugation at 3,000×g for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected and further diluted ten times with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) prior to derivatization. Once in a liquid phase, the samples (including microdialysis samples) were further processed for analysis as follows.

Capillary electrophoresis measurements were performed with a P/ACE MDQ capillary electrophoresis system controlled by the 32 Karat software version 5.0 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The instrument was coupled with a laser-induced fluorescence detector, equipped with an argon-ion laser. Excitation and emission wavelengths were 488 and 520 nm, respectively. Separations were carried out in fused-silica capillaries of 75 µm internal diameter and 365 µm outer diameter (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, USA), coated with in situ polymerized linear polyacrylamide. The total and the effective capillary lengths were 60 and 50 cm respectively. We applied a recently developed method of chiral separation [42] for the simultaneous measurement of excitatory amino acid (EAA) enantiomers. D-amino acids are rarely incorporated into proteins [15, 27], therefore most tissue content is expected to represent the unbound (free) form. Our method exclusively measures this form of amino acids. To achieve appropriate detection sensitivity, fluorescent derivatization with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole was applied together with 1 µM g-carboxy-glutamate as an internal standard. Samples were introduced into the capillary by pressure (20 s, 6895 Pa). The background electrolyte was 100 mM borate buffer pH 8.5 containing 8 mM heptakis (2,6-di-O-methyl)-β-cyclodextrin and 5 mM 6-monodeoxy-6-mono(3-hydroxy)propylamino-β-cyclodextrin as chiral selectors. Typically, 400 V/cm electric field was applied. For detailed description of the derivatization and electrophoresis methods see [42]. Detection limit (LOD) and quantification limit (LOQ) for D-Asp were 17 and 50 nmol/L, respectively.

Statistical analysis

The EAA concentrations were compared by ANOVA using a full factorial general linear model (GLM, factors: age, training type, recall time in different experiments). Different brain regions of the same individual were used as within subject factors (RM ANOVA). Data were logarithmically (ln) transformed when required for matching the data assumptions of ANOVA. Degrees of freedom (d.f.) statistics were corrected in RM ANOVAs using the Greenhouse-Geisser method when sphericity was not assumed, however, uncorrected d.f. are reported under Results. Experimental groups by age or species were compared pairwise using Tukey's post hoc tests. Comparisons between brain regions within the same animals were carried out using paired *t*-tests with Sidak-Holm adjustment of *p* values. In the case of microdialysis

samples, relative changes standardized by baseline concentrations were compared by non-parametric test (Wilcoxon Signed Rank test). It has to be noted that the results on D-Asp concentration in microdialysis samples were based on those 5 animals, in which the detection limit was attained. Level of significance was $p < 0.05$.

RESULTS

Age- and brain region-related changes in the tissue content of amino acids

D-Glu was not detected in any of the samples, whereas D- and L-Asp as well as L-Glu could be measured in all samples. In the domestic chicken, neither the brain region ($F_{3,177} = 2.29$, $p = 0.09$) nor the interaction between region and age ($F_{9,177} = 0.82$, $p = 0.58$) had significant effect on the concentration of L-Asp (Fig. 2B). Both L-Asp (age, ANOVA: $F_{3,59} = 6.61$, $p = 0.018$, Fig. 2B) and L-Glu (age, ANOVA: $F_{3,57} = 4.79$, $p = 0.005$, Fig. 2C) showed some dependence on age, mainly due to a transient decrease around day 4. Region also had a significant effect on L-Glu concentration: it was least abundant in the mSt/Ac (RM ANOVA: $F_{3,171} = 12.52$, $df = 3$, $p = 0.005$).

Age had a significant effect on D-Asp concentration in four observed regions in the chicken brain (ANOVA: $F_{3,57} = 23.28$, $p < 0.001$) with a marked drop between days 2 and 4 (Tukey's post-hoc test: $p < 0.001$) and remaining low afterwards (Fig. 2A). Brain region had no effect on D-Asp concentration ($F_{3,171} = 1.64$, $p = 0.18$) and there was no interaction between region and age either ($F_{9,171} = 0.82$, $p = 0.60$). When the concentration of D-Asp was expressed as percentage ratio (D-Asp over L-Asp *plus* D-Asp), the difference between a clear and monotonous, age-dependent decrease of D-Asp became even more evident (effect of age on D-Asp ratio: $F_{3,57} = 33.6$, $p < 0.001$, Fig. 2D).

Effect of passive avoidance training and recall on the tissue content of amino acids (data not shown)

Neither the training type (water, MeA, $F_{1,44} = 1.54$, $p = 0.22$), nor recall time (5 min, 6 hours or 24 hours, $F_{2,44} = 0.75$, $p = 0.48$), nor their interaction ($F_{2,44} = 0.70$, $p = 0.48$) had a significant effect on the concentration of D-Asp. There was no overall difference in D-Asp concentration between the four brain regions either ($F_{3,132} = 1.00$, $p = 0.40$) and none of the interactions between the main effects were significant. Similar results were obtained in the case of L-Asp concentrations: neither the main effects, nor the interactions were significant. Similarly to the previously described age-related changes, again, the concentration of L-Glu was not found to be uniform in all brain regions ($F_{3,129} = 5.61$, $p = 0.001$). As revealed by tests of within-subject contrasts, mSt contained less L-Glu than any of the other three regions ($F_{1,43} > 5.76$,

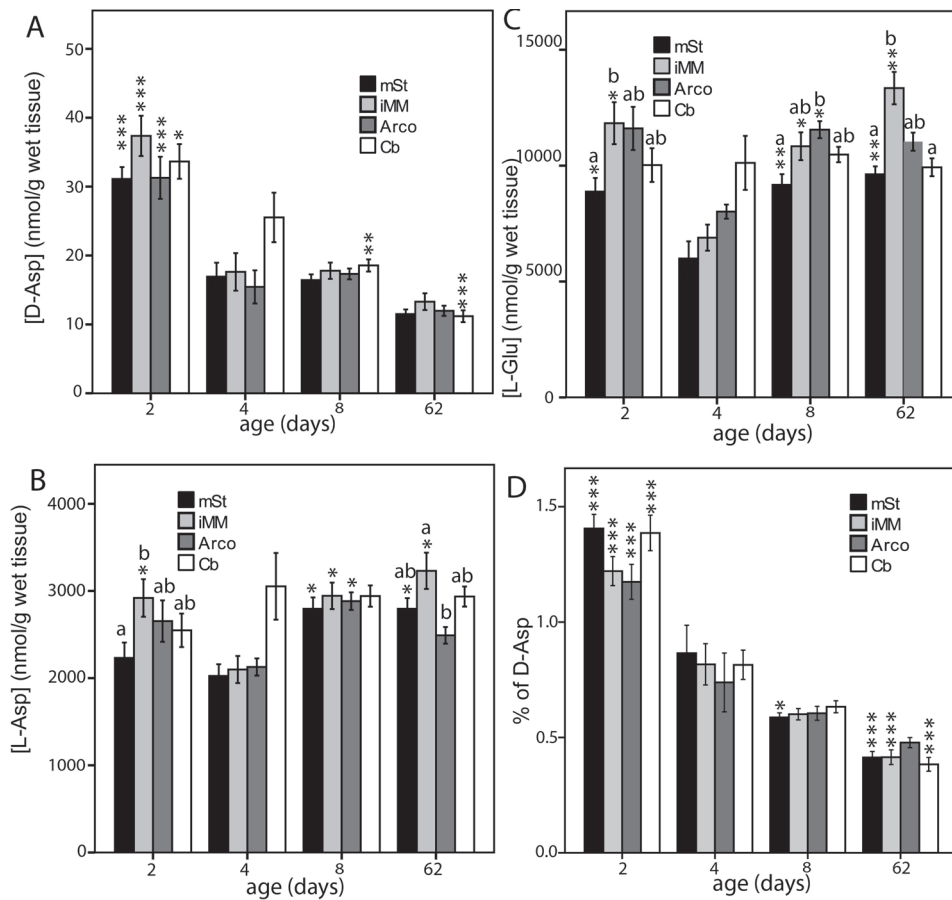


Fig. 2. Effect of age on D-Asp (A, D), L-Asp (B) and L-Glu (C) concentrations (mean \pm s.e.m.) in four brain regions of the domestic chick. (D) – D-Asp over total Asp ratio. Asterisks represent significant difference with day 4 values as base value (Tukey post-hoc tests * p <0.05, *** p <0.001). The different letters of alphabet above columns represent significant difference between the brain regions within the same age group (paired t -tests: p <0.05)

p <0.022). None of the other main effects (training type, recall time) or any of the interactions were significant.

Effect of reward and high potassium stimuli on the extracellular levels of amino acids

Against the background of known free EAA concentrations in tissue extracts, we then tested the dynamic changes of extracellular L- and D-Asp and L-Glu in the Ac/MSt region, using in vivo microdialysis of freely moving chicks. Both L-amino acids

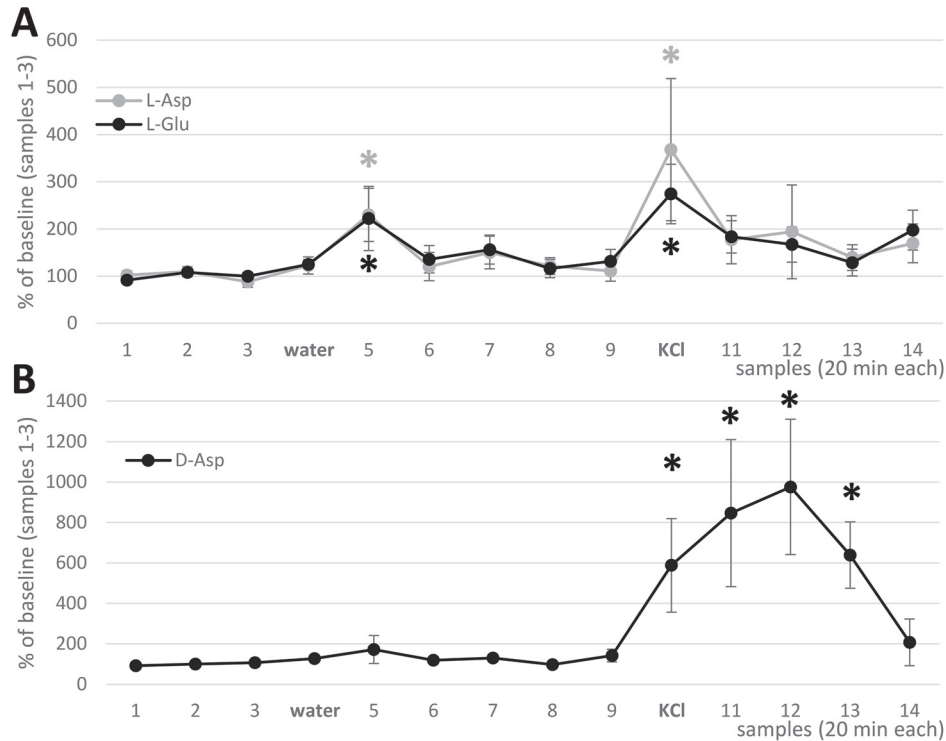


Fig. 3. In vivo microdialysis recordings from 2-day-old freely moving domestic chicks, with probe location in the mSt/Ac region. A: Effect of rewarding stimulus and high potassium on the extracellular level of L-Asp and L-Glu. B: Effect of rewarding stimulus and high potassium on the extracellular level of D-Asp. Mean \pm S.E.M., asterisks represent significant difference with baseline values (Wilcoxon Signed Rank test, $p < 0.05$)

showed simultaneous transient elevation on water administration (a reward stimulus for thirsty chicks) (Fig. 3A). Similar but greater elevation of L-EAA levels was evoked by the non-specific stimulus, high potassium. Both L-Glu and L-Asp showed similar characteristics of transients, the overall Asp/Glu ratio being 20–30% (Table 1). D-Asp showed only a slight, non-significant elevation after water administration, but a robust (ca. ten-fold) increase did follow potassium stimulation (Fig. 3B). Notably, the peak of D-Asp transient does not coincide with the period of high K administration, it merely follows the event with a delay of at least 20 min.

Comparison of extracellular and whole tissue concentrations of amino acids

The amino acid concentrations and ratios in microdialysis samples in various experimental conditions are tabulated in Table 1, also compared with the relevant values

from tissue extracts. The L-Asp ratio proved to be remarkably stable throughout the microdialysis samples and also similar to the ratio observed in tissue extracts. Notably, however, the ratio of D-Asp was almost doubled during potassium stimulation, amounting to 40% of total (both L and D) aspartate, whereas its concentration detected in tissue extract was considerably lower than that of L-Asp by ca. two orders of magnitude (Table 1).

Table 1

Concentrations of Asp and Glu in dialysate samples in relation to experimental treatment, and in tissue homogenates from the medial striatum of domestic chicks

	D-Asp (nmol/g)	L-Asp (nmol/g)	L-Glu (nmol/g)	L-Asp ratio (%)	D-Asp ratio (%)
Microdialysis baseline samples (1–3 in Fig. 3)	104±45	397±75	3585±1356	23.8±5.7	19.0±7.8
Microdialysis water stimul.	149±55	598±101	4050±1203	27.1±6.2	21.0±8.0
Microdialysis KCl stimul.	467±153	819±185	6123±1608	25.4±6.2	37.0±10.8
Tissue homogenate	30±2.2	2308±217	8644±632	21.8±0.9	1.3±0.07

The concentrations are expressed as nmol/g wet tissue weight (for brain extracts), or nmol/g (i.e. nmol/ml) for microdialysates (mean±S.E.M). L-Asp ratio: $100 \times [L-Asp / (L-Asp + L-Glu)]$; D-Asp ratio: $100 \times [D-Asp / (D-Asp + L-Asp)]$.

DISCUSSION

L-amino acids

The analytical method applied in the present study enabled the monitoring of minor local changes of EAAs in the brain. Our detection method used for tissue samples did not distinguish between intra- and extracellular amino acids but it excluded protein-bound amino acids from the analysis. By the other approach, *in vivo* microdialysis, selective measurement of extracellular L-Glu and L-Asp was made possible. The recently introduced method of chiral separation ensured that, unlike in our previous report [45], the L enantiomers of EAAs could selectively be assessed. These amino acids in their free form may either play a role in synaptic transmission (as neurotransmitters or neuromodulators) or they may also represent signaling molecules, e.g. for brain development.

Given the anatomical foundation [1, 18, 19] for correlated action of EAAs, at least in the striatal/Ac regions [45] of chicks (together with electrophysiological evidence on potential interplay between Asp and Glu at the receptor/transporter level, see the study by Balázs et al. [2] on striatal slices), it seemed to be important first to assess the occurrence and distribution of free (unbound) L-Asp and L-Glu in the brain of the domestic chicken, together with the pattern of postembryonic development.

The concentrations of L-Glu and L-Asp in the chicken did not show monotonous (monophasic) age-specific changes (as did D-Asp, see below). Instead, over the entire period of observation, there appeared one remarkable trough (valley) around day 4, whereas the values were rather uniform before or after this time. Notably, this period of reduced EAA may coincide with the closure of the sensitive period for early adaptive learning (e.g. taste aversion learning, imprinting) [4, 22, 25, 36].

Our study on the regional distribution of L-amino acids was focused on three of those regions which are known to participate in imprinting or passive avoidance learning of chicks [5, 22, 36] the intermediate medial mesopallium (iMM), medial striatum/accumbens (mSt) and the arcopallium (Arco). Cb was used as control region. In the mSt/Ac region, the concentration of L-Glu proved to be lower than in other regions, in independent datasets (see Fig. 2 and passive avoidance results). This finding makes sense, since the mSt/Ac contains mostly medium spiny GABAergic neurons and abundant excitatory terminals (containing Glu and Asp) but practically no Gluergic/Aspergic perikarya.

Selective determination of L-Glu and L-Asp in microdialysis samples collected from the chick mSt/Ac region enabled a more precise reproduction of our previous finding on correlated, predominantly synaptic, release of L-Asp and L-Glu [45], including a surge evoked by high potassium. Moreover, in the present study, a correlated phasic elevation of L-Asp and L-Glu was elicited not only by handling stress, i.e. aversive stimulus (as shown before, [45]) but also in response to an appetitive reward stimulus. Correlated amino acid response to an appetitive stimulus may represent another robust argument supporting the importance of Asp – Glu co-release in the avian basal ganglia.

D-amino acids

No previous data are known to us on post-hatch D-Asp levels in the brain regions of domestic chicks, yet the 0.03–0.04 $\mu\text{mol/g}$ concentration, measured in different brain regions in the 2-day-old chicks (Fig. 2) is lower than the 0.4 $\mu\text{mol/g}$, reported by [30] for the whole brain of the 20-day-old chick embryo (recalculated in D'Aniello [7]). In brain microdialysates, the D-asp/Total Asp ratio was found to be 17–18% (our calculation based on the published data by Punzo et al. [33]), whereas the same ratio in our current study was 19% (Table 1).

To our knowledge, the present study is the first report on dynamic changes of D-Asp in the extracellular space, using *in vivo* microdialysis combined with a high specificity chiral separation procedure for the analysis of samples [42]. Surprisingly, while water reward failed to increase D-Asp, high potassium brought about a marked elevation of D-Asp, when compared to baseline values. Unlike with the L-EAAs, the robust peak after high potassium stimulus was more protracted in the case of D-Asp, the elevation phase lasting well over an hour before returning to near-baseline value. This would indicate an activation of some secondary mechanism, temporally sepa-

rated from the first stimulus of K^+ , whereas L-EAAs respond more immediately to high potassium. Whilst the abrupt surge of L-EAAs is in harmony with synaptic vesicular release, corroborating our previous report [45], the different time course of D-Asp elevation indicates a different storage, release or clearance mechanism. In particular, a contingent of the released D-Asp may be non-vesicular or even non-neuronal, similarly to the situation with D-serine (for review see Radzishevsky et al., [34]). Furthermore, the present results indicate that, while tissue content of D-Asp is a great deal less than that of L-Asp (by ca. two orders of magnitude), a surprisingly high percentage of tissue D-Asp gets released into the extracellular space, and, at the peak of high potassium response, the D enantiomer may constitute well over a third of total extracellular aspartate. By contrast, L-Asp (as indeed L-Glu) is far more abundant in tissue, and only a small fraction of it can be released on stimulation (Table 1), which is why any changes [6] in L-EAA flux accompanying passive avoidance training are likely masked by the huge non-specific pools of L-Glu and L-Asp, when measured in whole tissue samples.

In the present study, passive avoidance training did not cause detectable changes of the tissue concentration of free D-Asp in the regions known to be responsible for memory formation (mSt, iMM), or in other telencephalic and subtelencephalic regions (Arco, Cb) within the 24h time window observed. One possible explanation is that the high level of D-Asp in the brain of young domestic chicks (Fig. 2) does not depend on behavioural stimulation. Rather, it is required as a tonic stimulus to maintain synaptic plasticity for early learning mechanisms [38, 40, 36, 29]. The lack of elevation of extracellular D-Asp after positive reinforcement stimulus (in the microdialysis study) also suggests that D-Asp is not an immediate signal transducer for actual behavioural responses.

Unlike D-serine, an important co-agonist of NMDA receptors [20, 37] (similar to glycine), D-Asp has a more direct affinity to the main glutamate binding site of the NMDA receptor (similar to the artificial ligand NMDA) [14, 9, 44]. A substantial contingent (ca. one third) of total aspartate might appear in the extracellular space in the form of D-Asp, at least at the peak of potassium-evoked response (as reported here). Contribution of D-Asp may partially explain our earlier observation [45] on the increase of extracellular Asp/Glu ratio during evoked release. How (and if) this process could be related to synaptic plasticity is yet to be clarified. In any case, D-Asp has been shown to enhance cognitive capabilities [12, 39, 31], and to improve synaptic plasticity [13].

In summary, tissue concentration of D-Asp shows marked changes during the first week of age of the domestic chicken with no considerable regional variation. This needs to be taken into account in any experiment investigating the role of this amino acid in synaptic plasticity during early learning (imprinting, taste aversion learning). Furthermore, with any extracellular measurement of aspartic acid one needs to consider that a significant amount of released Asp belongs to the D enantiomer.

ACKNOWLEDGEMENT

Grant sponsors: Hungarian National Research, Development and Innovation Office (OTKA K109077, 63415) and Támop-4.2.1/B-09/1/KMR.

REFERENCES

1. Ádám, A. S., Csillag, A. (2006) Differential distribution of L-aspartate- and L-glutamate-immunoreactive structures in the arcopallium and medial striatum of the domestic chick (*Gallus domesticus*). *J. Comp. Neurol.* 498, 266–276.
2. Balázs, D., Csillag, A., Gerber, G. (2012) L-aspartate effects on single neurons and interactions with glutamate in striatal slice preparation from chicken brain. *Brain Res.* 1474, 1–7.
3. Bálint, E., Csillag, A. (2007). Nucleus accumbens subregions: hodological and immunohistochemical study in the domestic chick (*Gallus domesticus*). *Cell Tissue Res.* 327, 221–230.
4. Bateson, P. (1966) The characteristics and context of imprinting. *Biol. Rev.* 41, 177–220.
5. Csillag, A. (1999) Striato-telencephalic and striato-tegmental circuits: relevance to learning in domestic chicks. *Behav. Brain Res.* 98, 227–236.
6. Daisley, J. N., Gruss, M., Rose, S. P. R., Braun, K. (1998) Passive avoidance training and recall are associated with increased glutamate levels in the intermediate medial hyperstriatum centrale of the day-old chick. *Neural Plast.* 6, 53–61.
7. D’Aniello, A. (2007) D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain Res. Rev.* 53, 215–234.
8. D’Aniello, A., Guiditta, A. (1977) Identification of D-aspartic acid in the brain of *Octopus vulgaris* Lam. *J. Neurochem.* 29, 1053–1057.
9. D’Aniello, S., Somorjai, I., Garcia-Fernández, J., Topo, E., D’Aniello, A. (2011) D-Aspartic acid is a novel endogenous neurotransmitter. *FASEB J.* 25, 1014–1027.
10. Dermon, C. R., Zikopoulos, B., Panagis, L., Harrison, E., Lancashire, C. L., Mileusnic, R., Stewart, M. G. (2002) Passive avoidance training enhances cell proliferation in 1-day-old chicks. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1267–1274.
11. Dunlop, D. S., Neidle, A., McHale, D., Dunlop, D. M., Lajtha, A. (1986) The presence of free D-aspartic acid in rodents and man. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 27–32.
12. Errico, F., Rossi, S., Napolitano, F., Catuogno, V., Topo, E., Fisone, G., D’Aniello, A., Centonze, D., Usiello, A. (2008) D-aspartate prevents corticostriatal long-term depression and attenuates schizophrenia-like symptoms induced by amphetamine and MK-801. *J. Neurosci.* 28, 10404–10414.
13. Errico, F. et al. (2014) Free D-aspartate regulates neuronal dendritic morphology, synaptic plasticity, gray matter volume and brain activity in mammals. *Transl Psychiatry* 4, e417.
14. Fagg, G. E., Matus, A. (1984) Selective association of N-methyl aspartate and quisqualate types of L-glutamate receptor with brain postsynaptic densities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6876–6880.
15. Fujii, N. (2005) D-amino acid in elderly tissues. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1585–1589.
16. Gibbs, M., Johnston, A. N. B., Mileusnic, R., Crowe, S. F. (2008) A comparison of protocols for passive and discriminative avoidance learning tasks in the domestic chick. *Brain Res. Bull.* 76, 198–207.
17. Gundersen, V., Storm-Mathisen, J. (2000) Chapter II Aspartate–neurochemical evidence for a transmitter role. In: Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J. (eds), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, vol. 18. pp. 45–62. Amsterdam, Elsevier.
18. Hanics, J., Bálint, E., Milanovich, D., Zachar, G., Adám, A., Csillag, A. (2012) Amygdalofugal axon terminals immunoreactive for L-aspartate or L-glutamate in the nucleus accumbens of rats and domestic chickens: a comparative electron microscopic immunocytochemical study combined with anterograde pathway tracing. *Cell Tissue Res.* 350, 409–423.
19. Hanics, J., Teleki, G., Alpár, A., Székely, A. D., Csillag, A. (2016) Multiple amygdaloid divisions of arcopallium send convergent projections to the nucleus accumbens and neighboring subpallial amy-

- dala regions in the domestic chicken: a selective pathway tracing and reconstruction study. *Brain Struct. Funct.* 222, 301–315.
20. Hashimoto, A., Kumashiro, S., Nishikawa, T., Oka, T., Takahashi, K., Mito, T., Takashima, S., Doi, N., Mizutani, Y., Yamazaki, T., Kaneko, T., Ootomo, E. (1993) Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex. *J. Neurochem.* 61, 348–351.
 21. Hashimoto, A., Oka, T., Nishikawa, T. (1995) Anatomical Distribution and Postnatal Changes in Endogenous Free D-Aspartate and D-Serine in Rat-Brain and Periphery. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1657–1663.
 22. Horn, G. (2004) Pathways of the past: the imprint of memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 108–120.
 23. Ito, T., Hayashida, M., Kobayashi, S., Muto, N., Hayashi, A., Yoshimura, T., Mori, H. (2016) Serine racemase is involved in d-aspartate biosynthesis. *J. Biochem.* 160, 345–353.
 24. Matsushima, T., Izawa, E.-I., Yanagihara, S. (2001) D1-receptor dependent synaptic potentiation in the basal ganglia of quail chick. *NeuroReport* 12, 2831–2837.
 25. McCabe, B. J. (2013) Imprinting. *Interdiscip. Rev. Cogn. Sci.* 4, 375–390.
 26. Mezey, S., Krivokuca, D., Balint, E., Adorjan, A., Zachar, G., Csillag, A. (2012) Postnatal changes in the distribution and density of neuronal nuclei and doublecortin antigens in domestic chicks (*Gallus domesticus*). *J. Comp. Neurol.* 520, 100–116.
 27. Miller J. A. (1950) Do tumor proteins contain d-amino acids? A review of the controversy. *Cancer Res.* 10, 65–72.
 28. Nadler, J. V., Vaca, K. W., White, W. F., Lynch, G. S., Cotman, C. W. (1976) Aspartate and glutamate as possible transmitters of excitatory hippocampal afferents. *Nature* 260, 538–540.
 29. Nakamori, T., Maekawa, F., Sato, K., Tanaka, K., Ohki-Hamazaki, H. (2013) Neural basis of imprinting behavior in chicks. *Dev Growth Differ.* 55, 198–206.
 30. Neidle, A., Dunlop, D. S. (1990) Developmental changes in free D-aspartic acid in the chicken embryo and in the neonatal rat. *Life Sci.* 46, 1517–1522.
 31. Nuzzo, T. et al. (2017) Decreased free d-aspartate levels are linked to enhanced d-aspartate oxidase activity in the dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenia patients. *npj Schizophrenia* 3, 16.
 32. Puelles, L. (2007) *The chick brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego.
 33. Punzo, D., Errico, F., Cristino, L., Sacchi, S., Keller, S., Belardo, C., Luongo, L., Nuzzo, T., Imperatore, R., Florio, E., De Novellis, V., Affinito, O., Migliarini, S., Maddaloni, G., Sisalli, M. J., Pasqualetti, M., Pollegioni, L., Maione, S., Chiariotti, L., Usiello, A. (2016) Age-Related Changes in D-Aspartate Oxidase Promoter Methylation Control Extracellular D-Aspartate Levels and Prevent Precocious Cell Death during Brain Aging. *J. Neurosci.* 36, 3064–3078.
 34. Radzishhevsky, I., Sason, H., Wolosker, H. (2013) D-serine: physiology and pathology. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 16, 72–75.
 35. Reiner, A. (2004) Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *J. Comp. Neurol.* 473, 377–414.
 36. Rose, S. P. (2000) God's organism? The chick as a model system for memory studies. *Learn. Mem.* 7, 1–17.
 37. Schell, M. J., Cooper, O. B., Snyder, S. H. (1997) D-aspartate localizations imply neuronal and neuroendocrine roles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2013–2018.
 38. Stewart, M. G., Rusakov, D. A. (1995) Morphological changes associated with stages of memory formation in the chick following passive avoidance training. *Behav Brain Res.* 66, 21–28.
 39. Topo, E., Soricelli, A., Di Maio, A., D'Aniello, E., Di Fiore, M. M., D'Aniello, A. (2010) Evidence for the involvement of D-aspartic acid in learning and memory of rat. *Amino acids* 38, 1561–1569.
 40. Venero, C., Sandi, C. (1997) Effects of NMDA and AMPA receptor antagonists on corticosterone facilitation of long-term memory in the chick. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1923–1928.
 41. Wagner, Z., Tabi, T., Zachar, G., Csillag, A., Szoko, E. (2011) Comparison of quantitative performance of three fluorescence labels in CE/LIF analysis of aspartate and glutamate in brain microdialysate. *Electrophoresis* 32, 2816–2822.

42. Wagner, Z., Tabi, T., Jako, T., Zachar, G., Csillag, A., Szoko, E. (2012) Chiral separation and determination of excitatory amino acids in brain samples by CE-LIF using dual cyclodextrin system. *Anal. Bioanal. Chem.* *404*, 2363–2368.
43. Wolosker, H., D'Aniello, A., Snyder, S. H. (2000) D-aspartate disposition in neuronal and endocrine tissues: ontogeny, biosynthesis and release. *Neuroscience* *100*, 183–189.
44. Yamanaka, M., Miyoshi, Y., Ohide, H., Hamase, K., Konno, R. (2012) D-Amino acids in the brain and mutant rodents lacking D-amino-acid oxidase activity. *Amino Acids* *43*, 1811–1821.
45. Zachar, G., Wagner, Z., Tabi, T., Balint, E., Szoko, E., Csillag, A. (2012) Differential Changes of Extracellular Aspartate and Glutamate in the Striatum of Domestic Chicken Evoked by High Potassium or Distress: An In Vivo Microdialysis Study. *Neurochem Res* *37*, 1730–1737.
46. Zachar, G., Tóth, A. S., Balogh, M., Csillag, A. (2017) Effect of nucleus accumbens lesions on socially motivated behaviour of young domestic chicks. *Eur. J. Neurosci.* *45*, 1606–1612.

Chiral analysis of amino acid neurotransmitters and neuromodulators in mouse brain by CE-
LIF

Tamás Jakó¹, Eszter Szabó¹, Tamás Tábi¹, Gergely Zachar², András Csillag², Éva Szökő¹

¹Department of Pharmacodynamics, Semmelweis University, Budapest

²Department of Anatomy, Histology and Embryology, Semmelweis University, Budapest

Tamás Jakó: Hungary, 1089 Budapest Nagyváradi tér 4. Email: jako.tamas88@gmail.com

Eszter Szabó: Hungary, 1089 Budapest Nagyváradi tér 4. Email: szabo.mirtusz@gmail.com

Tamás Tábi: Hungary, 1089 Budapest Nagyváradi tér 4. Email:

tabi.tamas@pharma.semmelweis-univ.hu

Gergely Zachar: Hungary, 1094 Budapest Tűzoltó utca 58. Email: gzachar@gmail.com

Professor András Csillag: Hungary, 1094 Budapest Tűzoltó utca 58. Email:

csillag@ana.sote.hu

Professor Éva Szökő: Hungary, 1089 Budapest Nagyváradi tér 4. Email:

szoko.eva@pharma.semmelweis-univ.hu

Abbreviations: ACSF: Artificial cerebrospinal fluid, FDA: Food and Drug Administration,

HPA- β -CD: 6-monodeoxy-6-mono(3-hydroxy)propylamino- β -CD, NBD-F: 7-fluoro-4-nitro-

2,1,3-benzoxadiazole, NMDA: N-methyl-D-aspartate

Keywords: chiral separation, CE-LIF, amino acids, NMDA receptor modulators

Number of words: 4004

Received: 25-Apr-2014; Revised: 05-Jun-2014; Accepted: 07-Jun-2014

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/elps.201400224.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

Abstract

Chiral capillary electrophoresis method has been developed for quantitative determination of D-amino acid modulators of NMDA glutamate receptor; D-serine and D-aspartate along with L-glutamate and L-aspartate in biological samples. These ligands are suggested to be involved in regulation of NMDA receptor related brain functions, such as neurogenesis, neuronal plasticity and memory formation.

For sensitive determination of the amino acids LIF detection was chosen, and a fluorogenic reagent, 7-fluoro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazole was used for derivatization. An amino-modified β -cyclodextrin, 6-monodeoxy-6-mono(3-hydroxy)propylamino- β -CD (HPA- β -CD) was applied as chiral selector. Determinations were accomplished in a polyacrylamide coated capillary and reverse polarity was used for the analysis of the negatively charged analytes. The method was optimized and validated; 6 mM HPA- β -CD in 50 mM HEPES buffer, pH 7 was appropriate to achieve baseline separation of the analytes. The limit of quantification with acceptable accuracy is 0.05 μ M for both D-amino acids. The method was used for the determination of D-aspartate and D-serine content in various brain regions of adult mice.

Introduction

Contrary to long time belief recent results suggest that beside L-amino acids, smaller amount of their D-enantiomers are also formed in mammalian tissues. D-serine and D-aspartate are e.g. present in the brain and are suggested neuromodulators of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor [1, 2]. NMDA glutamate receptor plays a crucial role in higher brain functions, e.g. in memory formation and learning processes, which are amongst the most complicated neuronal activities [3]. The receptor shows diverse subunit composition and their distribution in various brain regions results in different individual receptor activation and function. Simultaneous binding of an agonist and a co-agonist is needed to activate the receptor [4]. The typical agonist is L-glutamate, while L-aspartate and D-aspartate can also bind to the primary binding site of the receptor [1, 5] however, their function has not been clarified so far. D-Aspartate probably has an important role in neurogenesis, as its concentration has been found significantly higher in brain tissues of newborn animals compared to elder ones from various species [6]. Its neuroendocrine modulator function has also been suggested [7].

Previously, glycine has been identified and regarded as the main ligand of the co-agonist binding site. However, recent data suggest that D-serine plays an even more important role as a co-agonist of the NMDA receptor [4, 8]. Its distribution correlates with NMDA receptor abundance in the brain [2], although its regulatory function is only partially understood.

Determination of the NMDA receptor agonist amino acids and the co-agonist D-serine in biological samples can be problematic, since the sample volume is limited and the concentration of the D-enantiomers can be rather low compared to their L-enantiomers. Although there are some HPLC methods reported for the analysis of various D-amino acids [9-11], the outstanding separation power of capillary electrophoresis makes this technique ideal for chiral resolution and analysis [12, 13]. The optical detection of the amino acids

needs some chemical modifications, because the lack of easily detectable group. Since LIF provides higher sensitivity compared to conventional UV absorbance detection, it could have significant advantage in the analysis of low level of D-amino acids in biological samples. There are several amine derivatization reagents suitable for amino acid analysis by CE. The most common laser source used in commercially available CE-LIF instruments is the 488 nm Argon ion laser. Labeling reagents with excitation fitting this wavelength, like the fluorescein based labeling tags; FITC, carboxyfluorescein succinimidyl ester, etc. are thus widely used [14-16]. However, they possess fluorophore moiety, and the high excess of the reagent together with the many fluorescent side products formed in the derivatization reaction make the separation task rather complicated. Previously, another labeling reagent with excitation wavelength fitting the Argon ion laser, 7-fluoro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) was successfully used for CE analysis of amino acids and amines by our research group [15, 17, 18]. NBD-F is a fluorogenic tag and only a few fluorescent decomposition products are formed during derivatization, which is especially important in chiral separations, where the number of peaks to be separated is doubled. At a relatively high temperature (55-75 °C) NBD-F reacts rapidly (5-20 min) with primary and secondary amines and because of these advantages it is getting to be a popular labeling reagent [11, 19].

In order to achieve chiral separation addition of a chiral selector to the separation buffer is indispensable. Cyclodextrins (CD) are the most preferred chiral selectors, due to their versatile complex forming ability [20, 21]. The most commonly used cyclodextrins for separation of amino acid enantiomers are β -CD and γ -CD and their methylated and hydroxypropylated derivatives [20]. However, cyclodextrins with ionizable groups have gained interest in electrophoretic separations, because they possess electrophoretic mobility and may form more stable complexes with oppositely charged analytes [22]. Previously our research group has successfully used a dual CD system containing an amino-CD derivative,

6-monodeoxy-6-mono(3-hydroxy)propylamino- β -cyclodextrin (HPA- β -CD) providing chiral recognition in the separation of aspartate and glutamate enantiomers [17].

The aim of the present study is to extend our previous work for the analysis of D-amino acid modulators of NMDA glutamate receptor, including D-serine, and the simultaneous quantitative determination of NMDA receptor ligands: D-serine, D- and L-aspartate and L-glutamate by capillary electrophoresis.

Materials and methods

Instrumentation

All the experiments were carried out on a P/ACE MDQ capillary electrophoresis system controlled by 32 Karat software version 5.0 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). For the determination of amino acids the system was coupled with LIF detector, containing an Argon-ion laser source, with excitation and emission wavelengths of 488 and 520 nm, respectively. For the separations fused silica capillaries of 75 μ m i.d. and 365 μ m o.d. (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) were applied. Before use the inner surface of the capillaries were coated with linear polyacrylamide according to the method of Hjertén et al. [23]. The effective and total lengths of the capillaries were 50 and 60 cm, respectively. Before each run the capillary was rinsed with water and separation buffer. The samples were introduced with hydrodynamic injection (6894 Pa for 20 sec). All separations were carried out at 25°C by applying constant voltage of -24 kV (400 V/cm).

Chemicals

L-Glutamate, D-serine, L-serine, L-aspartate, D-aspartate, cysteic acid (internal standard), NBD-F, HEPES and boric acid were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). The pH of the borate and the HEPES buffer was adjusted with 1 M sodium hydroxide solution. HPA- β -

CD was provided by Cyclolab (Budapest, Hungary). All amino acids were dissolved in artificial cerebrospinal fluid (ACSF), which was prepared at the Central Pharmacy of Semmelweis University (Budapest, Hungary). In all experiments ultrapure water from MilliQ Direct 8 water purification system (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) was applied.

Samples

Five adult male C56BL/6 mice were decapitated and their brains were dissected immediately. A rostral slice containing the medial orbitofrontal cortex, and a caudal one containing part of the amygdala, hippocampus and hypothalamus were cut using brain matrices. The rostrocaudal stereotaxic coordinates for the slices and the location of brain regions were chosen according to the Allen Mouse Brain Atlas [24]. Slices were approximately 1.5 mm thick. The bulbus olfactorius and the dorsal part of the cerebellum were dissected directly from the whole brain. The other regions of interest were dissected from the slices using a stereomicroscope. Tissue samples were weighed and put on dry ice immediately after dissection. They were stored at -80 °C until further processing. Brain tissue samples were homogenized by sonication for 5 s in acetonitrile : water 2:1 solution (10 µL/mg). To remove precipitated proteins samples were centrifuged at 3000 g for 10 min at 4°C. The supernatants were collected and diluted twofold with ACSF.

Derivatization procedure

In order to derivatize amino acids 5 µL sample was mixed with 5 µL derivatization buffer of 20 mM pH 8.5 borate, containing 1 µM cysteic acid as internal standard and 5 µL 5 mg/mL ethanolic NBD-F solution. The mixture was heated at 65°C for 20 minutes and the derivatized samples were kept at -20°C until analysis.

Method validation

Validation procedure was completed according to the FDA Guidance for Industry [25]. Standard samples of six different concentrations (0.05; 0.1; 0.25; 0.5; 1; 1.5 μM) of D-aspartate and D-serine were used to construct the calibration curve with three parallels. To imitate the biological samples L-glutamate, L-aspartate, L-serine, taurine and glycine were used in fifty times higher concentrations. The concentration of the internal standard in the samples was 1 μM . 1/x Weighted linear regression was used to construct the calibration curves. Quality control samples at three concentration levels (0.08; 0.4; 1.25 μM of D-aspartate and D-serine) were prepared to test intra- and inter-day accuracy and precision of the method. Intra-day data result from five parallel measurements and inter-day data are from determinations performed in five consecutive days with three parallel runs. The LOQ was determined as the lowest concentration of the amino acid enantiomers that could be derivatized and measured with precision and accuracy values below 20 % and within 80–120 %, respectively. The LOD was determined as the concentration where the signal-to-noise ratio was 3:1.

Results and Discussion

The derivatized amino acids possess one or two negative charge at alkaline or neutral pH, thus they have considerable electrophoretic mobility towards the anode. Their rapid analysis can be achieved by using anodic separation with suppression of the EOF. Linear polyacrylamide coated capillary was thus used for the separations. Cysteic acid was chosen as an internal standard, because of its similar characteristics of charge and size to those of aspartate and glutamate.

Previously we have found that a positively chargeable amino cyclodextrin, HPA- β -CD was appropriate for the chiral separation of aspartate and glutamate [17]. In those previous

Accepted Article

experiments we studied the D-aspartate and D-glutamate content in various brain regions in experimental animals. Only D-aspartate has been found and quantified, while D-glutamate could not be detected. In the present experiments we aimed to extend our work to separate serine enantiomers, as well. Since detectable amount of D-glutamate was not expected in the biological samples, the method development was started with 100 mM pH 8 borate buffer containing 5 mM HPA- β -CD as chiral selector. As amine derivatized aspartate and glutamate bear two negative charges they migrate ahead of the other amino acids, while serine is more similar to the majority of the amino acids having one negative charge. Various amino acids were thus included in the standard mixture sample to study their separation from serine enantiomers. Taurine and glycine have been found to migrate in their close proximity. Most of the other amino acids, e.g. alanine, threonine, valine and γ -aminobutyric acid have slower velocity. Using these separation conditions baseline separation of analytes of interest; D-aspartate, L-aspartate, L-glutamate, D-serine and L-serine (Fig. 1) was achieved in less than 14 minutes. However, D-serine migrates just behind a broad tailing peak corresponding to glycine and some decomposition products of NBD-F that may compromise its accurate quantification. The improvement of their resolutions was thus aimed. Further increase in the cyclodextrin concentration or incorporation of methanol as organic modifier to the BGE could not improve the chemical selectivity. The main decomposition products of NBD-F were claimed to be its phenolic derivatives [26] and as the phenolic hydroxyl group is considerably less acidic compared to the carboxylic moiety of the amino acids, the charge and migration characteristic of these compounds are pH dependent in the neutral and slightly alkaline range. Moreover the charge of the chiral selector ($pK_a=8.7$ [27]) also alters in this pH range. At lower pH the charge and mobility of the phenolic compounds decrease, while those of the amino acids are largely unaffected. On the other hand the charge of the chiral selector increases resulting in a stronger electrostatic interaction with the amino acids and

slower mobility of the complexes. This latter provides a more considerable difference between the mobility of the free analytes and their complexed forms. Reducing the pH thus may have significant effect on both chiral and chemical selectivity.

Since below pH 8 the buffer capacity of borate declines, 50 mM HEPES buffer was used in the further experiments. At pH 8 in HEPES buffer altered chemical and chiral selectivity were observed compared to borate. Besides decreased chiral resolution the migration time of the main decomposition products changed considerably resulting in more pronounced co-migration of D-serine with glycine. This may be explained by the complex forming property of borate with sugars [28].

Decreasing the pH of HEPES buffer between 8 and 7 both chemical and chiral selectivity improved (Fig. 2/A and Table 1). According to our expectations the migration time of decomposition products increased considerably and at pH 7 all migrated behind L-serine. At the same time the chiral resolution enhanced likely due to the greater mobility difference between the complex and free forms of amino acids. As further pH decrease to 6.5 resulted in compromised separation of aspartate and glutamate, 50 mM HEPES buffer of pH 7 was chosen to use.

To continue method optimization the effect of chiral selector concentration on the separation was also studied. Increasing the concentration of HPA- β -CD between 3 and 7 mM resulted in enhanced chiral resolution and chemical selectivity: separation of D-serine from glycine and the decomposition product (Fig. 2/B and Table 1). Since no considerable difference in separations using 6 or 7 mM cyclodextrin concentration was found 6 mM HPA- β -CD was chosen as final chiral selector concentration.

Validation

Because of the significant difference in the concentration of D- and L-amino acids in biological samples, a fifty-fold excess over D-enantiomers of L-aspartate, L-glutamate, taurine, glycine and L-serine was kept in all the samples used during the validation process. The calibration curves for D-aspartate, D-serine and L-aspartate, L-glutamate were constructed in the 0.05-1.5 μM and 2.5-75 μM concentration range, respectively and found linear. The equations of calibration curves for D-aspartate and D-serine were $y = 0.7009 (\pm 0.08969) - 0.0151 (\pm 0.03524)$ and $y = 0.2689 (\pm 0.03196) - 0.0076 (\pm 0.03644)$ with R^2 values 0.9988 and 0.9985, respectively (n=5). The equations of calibration curves for L-aspartate and L-glutamate were $y = 1.1053 (\pm 0.13167) - 0.8281 (\pm 1.51156)$ and $y = 1.1036 (\pm 0.14967) - 0.1076 (\pm 1.49164)$ with R^2 values 0.9972 and 0.9972, respectively (n=5). Intra- and inter-day precision and accuracy using quality control samples of 0.08; 0.4; 1.25 μM for D-aspartate and D-serine and 4; 20; 62.5 μM for L-aspartate and L-glutamate were within the required range. The intra-day accuracy for D-amino acids was between 85.10-105.94% and for L-amino acids between 85.05-112.11%. The intra-day precision was within 2.09-7.90 % for D-amino acids and 3.93-6.55 % for L-amino acids, respectively. The inter-day precision was within 0.44-9.47 % for D-amino acids and 0.95-14.90 % for L-amino acids, respectively. The LOQ values were determined for D-enantiomers on the basis of acceptable accuracy and found 0.05 μM for both D-aspartate and D-serine. The LOD values given as signal to noise ratio 3:1 were estimated 8 and 12 nM for D-aspartate and D-serine, respectively.

Biological samples

The method has been applied for the determination of D-amino acid distribution in mouse brain. A representative electropherogram of brain sample is shown in Fig. 3. Six different brain regions; amygdala, bulbus olfactorius, cerebellum, hippocampus, hypothalamus and

prefrontal cortex were analyzed. In all examined brain areas D-aspartate and D-serine were detected and quantified. The concentration of D-serine (14-50 nmol/mg wet tissue) was about one order of magnitude higher compared to that of D-aspartate (1.9-3.2 nmol/mg wet tissue) in all brain areas but cerebellum, where their concentrations were comparable (0.9 and 1.2 nmol/mg wet tissue, respectively), as shown in Fig. 4. Both D-serine and D-aspartate seemed to be most abundant in brain regions known as important in memory and learning. Amygdala is suggested to be involved in implicit memory, while hippocampus and prefrontal cortex in explicit memory formation [3, 29-31].

Concluding remarks

NMDA receptor activation has been justified to be important in learning processes and memory formation. The precise function of D-serine and D-aspartate is not well established, although their modulator function on NMDA receptors has been known. To simultaneously determine these amino acids a validated, sensitive chiral capillary electrophoresis method with laser induced fluorescence detection has been developed. The optimized method using 6 mM HPA- β -CD as chiral selector in 50 mM HEPES buffer of pH 7 was appropriate for separation and quantification of D-aspartate and D-serine along with L-aspartate and L-glutamate. D-Amino acids have been determined with an LOQ of 0.05 μ M concentration. The method was used to measure neuromodulator amino acids in different regions of murine brain. According to our preliminary results areas involved in memory formation e.g. amygdala, hippocampus and prefrontal cortex showed higher level of D-serine and D-aspartate compared to other brain regions. These results indicate that the elaborated method is capable of determination of these D-amino acids in various biological samples.

Acknowledgments

This work was supported by the Hungarian Scientific Research Found (OTKA, 109077).

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

- [1] Errico, F., Napolitano, F., Nistico, R., Usiello, A., *Amino Acids* 2012, 43, 1861-1871.
- [2] Schell, M. J., Brady, R. O., Jr., Molliver, M. E., Snyder, S. H., *J. Neurosci.* 1997, 17, 1604-1615.
- [3] Izquierdo, I., *Faseb. j.* 1994, 8, 1139-1145.
- [4] Nishikawa, T., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2011, 879, 3169-3183.
- [5] Curras, M. C., Dingleline, R., *Mol. Pharmacol.* 1992, 41, 520-526.
- [6] D'Aniello, S., Somorjai, I., Garcia-Fernandez, J., Topo, E., D'Aniello, A., *Faseb. j.* 2011, 25, 1014-1027.
- [7] D'Aniello, A., *Brain. Res. Rev.* 2007, 53, 215-234.
- [8] Wolosker, H., Dumin, E., Balan, L., Foltyn, V. N., *Febs. j.* 2008, 275, 3514-3526.
- [9] D'Aniello, A., Lee, J. M., Petrucelli, L., Di Fiore, M. M., *Neurosci. Lett.* 1998, 250, 131-134.
- [10] Gobert, A., Rivet, J. M., Billiras, R., Parsons, F., Millan, M. J., *J. Neurosci. Methods.* 2011, 202, 143-157.
- [11] Hamase, K., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 2007, 55, 503-510.
- [12] Kitagawa, F., Otsuka, K., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2011, 879, 3078-3095.
- [13] Kirschner, D. L., Green, T. K., *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 2305-2318.
- [14] Herrero, M., Ibanez, E., Fanali, S., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2007, 28, 2701-2709.
- [15] Wagner, Z., Tábi, T., Zachar, G., Csillag, A., Szökő, É., *Electrophoresis* 2011, 32, 2816-2822.
- [16] Szökő, É., Tábi, T., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 53, 1180-1192.
- [17] Wagner, Z., Tábi, T., Jakó, T., Zachar, G., Csillag, A., Szökő, É., *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 404, 2363-2368.
- [18] Tábi, T., Lohinai, Z., Pálfi, M., Levine, M., Szökő, É., *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391, 647-651.
- [19] Lorenzo, M. P., Villasenor, A., Ramamoorthy, A., Garcia, A., *Electrophoresis* 2013, 34, 1701-1709.
- [20] Scriba, G. K., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 1991-2011.
- [21] Juvancz, Z., Kendrovics, R. B., Ivanyi, R., Szente, L., *Electrophoresis* 2008, 29, 1701-1712.
- [22] Chankvetadze, B., *Electrophoresis* 2009, 30 Suppl 1, S211-221.
- [23] Hjertén, S., Kiessling-Johansson, M., *J. Chromatogr. A* 1991, 550, 811-822.
- [24] Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., Chen, L., Chen, L., Chen, T. M., Chin, M. C., Chong, J., Crook, B. E., Czaplinska, A., Dang, C. N., Datta, S., Dee, N. R., Desaki, A. L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T. A., Donelan, M. J., Dong, H. W., Dougherty, J. G., Duncan,

- B. J., Ebbert, A. J., Eichele, G., Estin, L. K., Faber, C., Facer, B. A., Fields, R., Fischer, S. R., Fliss, T. P., Frensley, C., Gates, S. N., Glatfelder, K. J., Halverson, K. R., Hart, M. R., Hohmann, J. G., Howell, M. P., Jeung, D. P., Johnson, R. A., Karr, P. T., Kawal, R., Kidney, J. M., Knapik, R. H., Kuan, C. L., Lake, J. H., Laramée, A. R., Larsen, K. D., Lau, C., Lemon, T. A., Liang, A. J., Liu, Y., Luong, L. T., Michaels, J., Morgan, J. J., Morgan, R. J., Mortrud, M. T., Mosqueda, N. F., Ng, L. L., Ng, R., Orta, G. J., Overly, C. C., Pak, T. H., Parry, S. E., Pathak, S. D., Pearson, O. C., Puchalski, R. B., Riley, Z. L., Rockett, H. R., Rowland, S. A., Royall, J. J., Ruiz, M. J., Sarno, N. R., Schaffnit, K., Shapovalova, N. V., Sivisay, T., Slaughterbeck, C. R., Smith, S. C., Smith, K. A., Smith, B. I., Sodt, A. J., Stewart, N. N., Stumpf, K. R., Sunkin, S. M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C. D., Thaller, C., Thompson, C. L., Varnam, L. R., Visel, A., Whitlock, R. M., Wohnoutka, P. E., Wolkey, C. K., Wong, V. Y., Wood, M., Yaylaoglu, M. B., Young, R. C., Youngstrom, B. L., Yuan, X. F., Zhang, B., Zwingman, T. A., Jones, A. R., *Nature* 2007, 445, 168-176.
- [25] US-FDA (2001) Guidance for industry—bioanalytical method validation.
- [26] Watanabe, Y., Imai, K., *Journal of Chromatography A* 1982, 239, 723-732.
- [27] Ivanyi, R., Jicsinszky, L., Juvancz, Z., Roos, N., Otta, K., Szejtli, J., *Electrophoresis* 2004, 25, 2675-2686.
- [28] Sponer, J. E., Sumpter, B. G., Leszczynski, J., Sponer, J., Fuentes-Cabrera, M., *Chemistry* 2008, 14, 9990-9998.
- [29] Morris, R. G., *Neuropharmacology* 2013, 74, 32-40.
- [30] Davis, M., *Dialogues Clin. Neurosci.* 2011, 13, 463-474.
- [31] Warburton, E. C., Barker, G. R., Brown, M. W., *Neuropharmacology* 2013, 74, 41-47.

Fig. 1: An electropherogram of standard mixture containing 25 μM L-glutamate (L-Glu), L-aspartate (L-Asp) and L-serine (L-Ser); 5 μM D-aspartate (D-Asp) and D-serine (D-ser); 50 μM glycine (Gly) and taurine (Tau) with 1 μM cysteic acid internal standard (IS). Separation conditions: BGE:100 mM pH 8 borate buffer with 5 mM HPA- β -CD; 50/60 cm x 75 μm id coated fused-silica capillary, -24 kV. Sample introduced by 6894 Pa pressure for 20 sec.

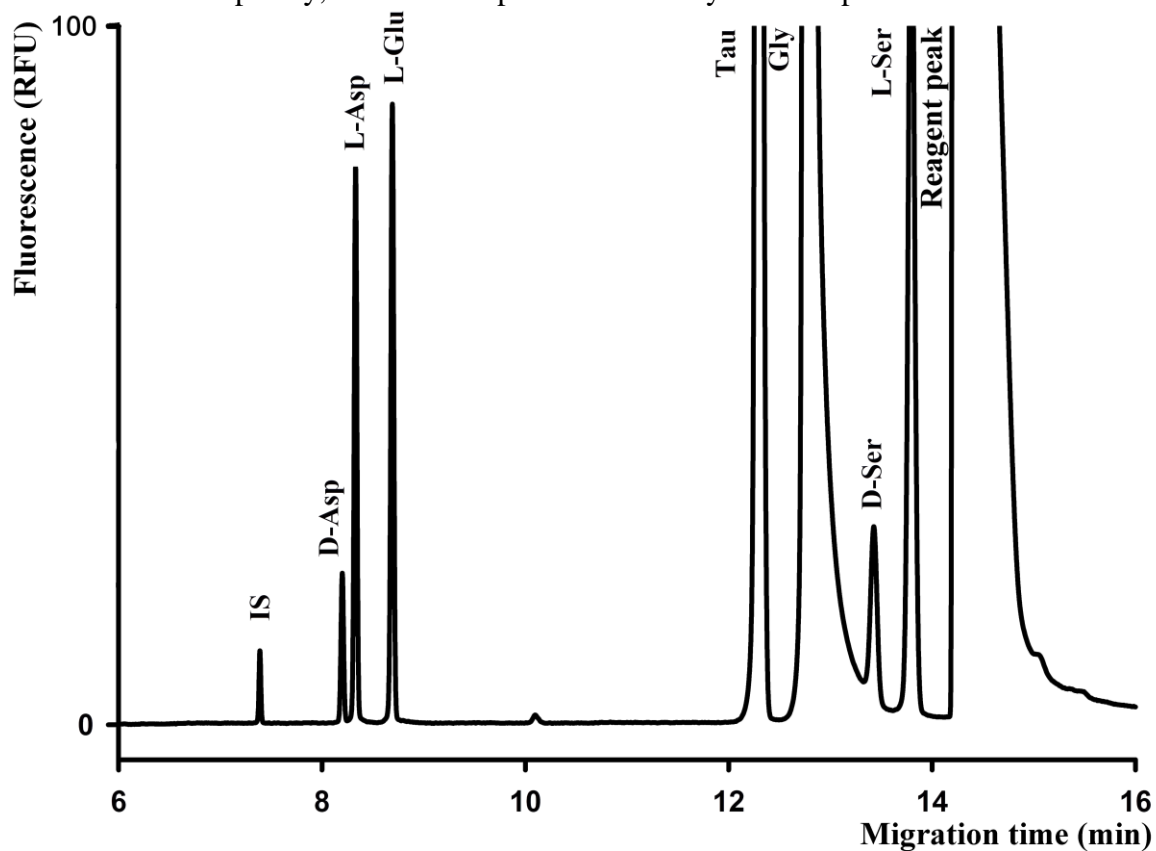


Fig. 2: Electropherograms of standard mixture containing 25 μ M L-Glu, L-Asp and L-Ser; 5 μ M D-Asp and D-ser; 50 μ M Gly and Tau with 1 μ M cysteic acid internal standard (IS). Separation conditions: (A) BGE:50 mM pH 8; 7.5; 7; 6.5 HEPES buffer with 5 mM HPA- β -CD, (B) BGE:50 mM pH 7 HEPES buffer with 7; 6; 5; 3 mM HPA- β -CD; 50/60 cm x 75 μ m id coated fused-silica capillary, -24 kV. Sample introduced by 6894 Pa pressure for 20 sec.

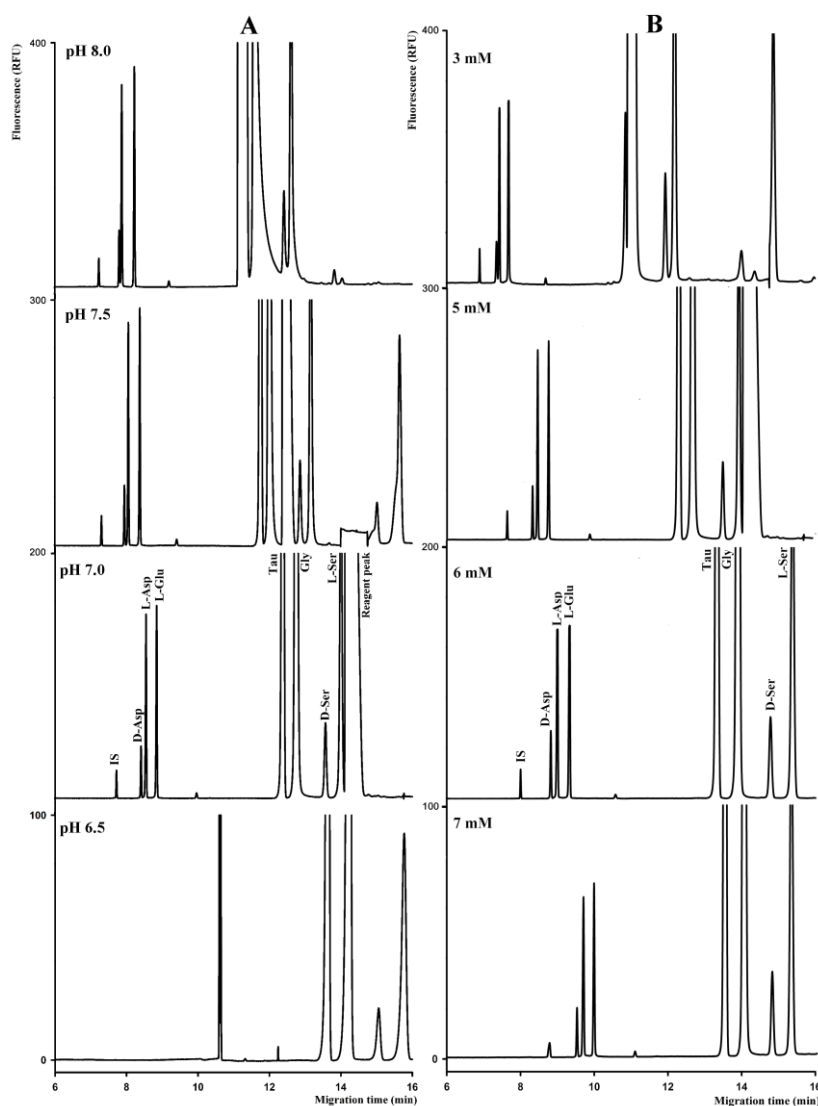


Fig. 3: An electropherogram of a prefrontal cortex of an adult mouse. BGE:50 mM pH 7 HEPES buffer with 6 mM HPA- β -CD; 50/60 cm x 75 μ m id coated fused-silica capillary, -24 kV. Sample introduced by 6894 Pa pressure for 20 sec.

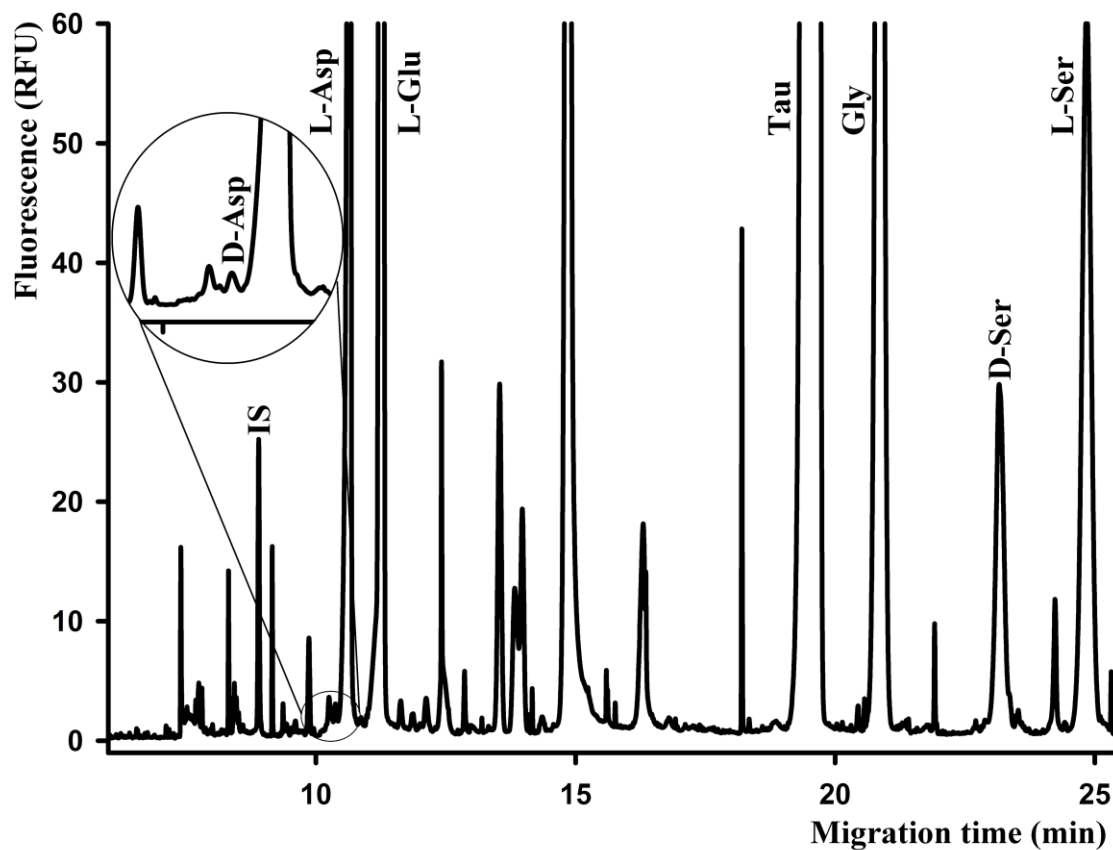


Fig. 4: Diagrams show the amount of D-aspartate (A) and D-serine (B) in different brain regions.

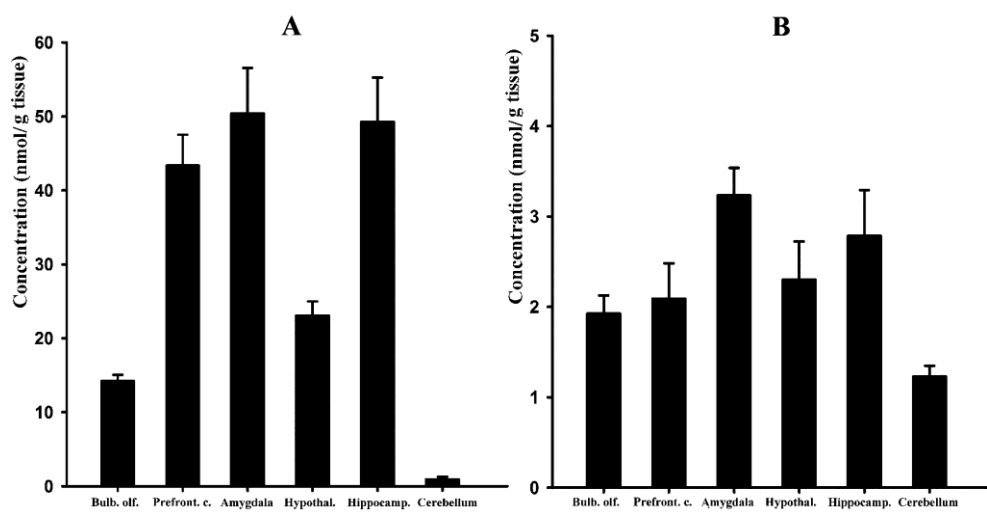


Table 1 The resolution and selectivity data of D/L-asparatate, D/L-serine, glycine/D-serine at different separation conditions.

Conditions	Peaks	Resolution (Rs)	Selectivity (α)
100 mM pH 8 Borate buffer 5 mM HPA- β -CD	D/L-Asp	1,71	1,016
	Gly/D-Ser	1,39	1,052
	D/L-Ser	1,71	1,027
50 mM pH 8 HEPES buffer 5 mM HPA- β -CD	D/L-Asp	1,15	1,009
	Gly/D-Ser	1,44	1,072
	D/L-Ser	1,17	1,016
50 mM pH 7.5 HEPES buffer 5 mM HPA- β -CD	D/L-Asp	1,52	1,013
	Gly/D-Ser	2,53	1,072
	D/L-Ser	1,52	1,023
50 mM pH 7.0 HEPES buffer 5 mM HPA- β -CD	D/L-Asp	1,63	1,017
	Gly/D-Ser	2,68	1,064
	D/L-Ser	1,84	1,032
50 mM pH 6.5 HEPES buffer 5 mM HPA- β -CD	D/L-Asp	NR	NR
	Gly/D-Ser	2,21	1,057
	D/L-Ser	2,00	1,048
50 mM pH 7.0 HEPES buffer 3mM HPA- β -CD	D/L-Asp	1,38	1,011
	Gly/D-Ser	2,61	1,088
	D/L-Ser	1,49	1,021
50 mM pH 7.0 HEPES buffer 6mM HPA- β -CD	D/L-Asp	1,76	1,020
	Gly/D-Ser	2,73	1,063
	D/L-Ser	2,21	1,040
50 mM pH 7.0 HEPES buffer 7mM HPA- β -CD	D/L-Asp	1,79	1,020
	Gly/D-Ser	2,89	1,057
	D/L-Ser	2,32	1,037

Chiral separation and determination of excitatory amino acids in brain samples by CE-LIF using dual cyclodextrin system

Zsolt Wagner · Tamás Tábi · Tamás Jakó · Gergely Zachar ·
András Csillag · Éva Szökő

Received: 13 June 2012 / Revised: 22 August 2012 / Accepted: 24 August 2012 / Published online: 9 September 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Chiral capillary electrophoresis method has been developed to separate aspartate and glutamate enantiomers to investigate the putative neuromodulator function of D-Asp in the central nervous system. To achieve appropriate detection sensitivity fluorescent derivatization with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole and laser-induced fluorescence detection was applied. Although, simultaneous baseline separation of the two enantiomer pairs could be achieved by using 3 mM 6-monodeoxy-6-mono(3-hydroxy)-propylamino- β -cyclodextrin (HPA- β -CD), further improvement of the chemical selectivity was required because of the high excess of L-enantiomers in real samples to be analyzed. The system selectivity was fine-tuned by combination of 8 mM heptakis(2,6-di-*O*-methyl)- β -cyclodextrin and 5 mM HPA- β -CD in order to increase the resolution between aspartate and glutamate enantiomers. The method was validated for biological application. The limits of detection for D-Asp and D-Glu were 17 and 9 nM, respectively, while the limit of quantification for both analytes was 50 nM. This is the lowest quantification limit reported so far for NBD-tagged D-Asp and D-Glu obtained by validated capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method. The applicability of the method was demonstrated by analyzing brain samples of 1-day-old chickens. In all the studied brain areas, the D-enantiomer contributed 1–2 % of the total aspartate content, corresponding to 17–45 nmol/g wet tissue.

Keywords Chiral capillary electrophoresis · Neurotransmitter amino acids · D-Aspartate · NBD-F · Dual cyclodextrin system

Introduction

A few decades ago, D-amino acids were thought to have no biological relevance at all as only L-amino acids are the building blocks of proteins, and the presence of D-amino acids in living organisms were not detected for a long time. However, along with the continuous development of various analytical methods, the presence of D-amino acids was discovered first in bacteria and invertebrates [1]. Further investigations then revealed that these amino acids, especially D-Ser and D-Asp also occur in the neuronal and some other tissues of higher organisms, such as avian and mammals [2, 3]. While the neuromodulator function of D-Ser is rather well established, that of D-Asp [2–4] is less well understood. Further clarification of the biological functions of D-Asp requires its accurate quantification in various biological matrices.

Numerous analytical methods capable of quantifying amino acid enantiomers have been reported so far (for review, see [5–7]); majority of them are gas chromatography, high-performance liquid chromatography, or capillary electrophoresis (CE)-based methods. Capillary electrophoresis laser-induced fluorescence (CE-LIF) is especially valuable in neurochemical studies, where compounds in the nanomolar concentration range are to be analyzed in a complex sample matrix, and the available sample quantity is rather limited [8]. Although some of the reported methods, using other than 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) as labeling reagent, claimed excellent limit of detection (LOD) values down to or below 1 nM [9–12], majority of them were not validated and optimized for biological samples, and limit of quantification (LOQ)

Z. Wagner · T. Tábi · T. Jakó · É. Szökő (✉)
Department of Pharmacodynamics, Semmelweis University,
Nagyvárad tér 4,
1089 Budapest, Hungary
e-mail: eva.szoko@net.sote.hu

G. Zachar · A. Csillag
Department of Anatomy, Histology and Embryology,
Semmelweis University,
Tűzoltó u. 58,
1094 Budapest, Hungary

values, which can differ considerably from LOD mainly because of the inefficient labeling at low analyte concentrations [13], were not provided.

In this present work, our aim was to develop a validated chiral CE-LIF method capable of simultaneous separation and quantification of D-Asp and D-Glu and high excess of their L-enantiomers. The applicability of the developed method was demonstrated by analyzing brain tissue samples from 1-day-old chickens.

Materials and methods

Instrumentation

All experiments were performed on a P/ACE MDQ capillary electrophoresis system controlled by 32 Karat software version 5.0 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). The instrument was coupled with a LIF detector, equipped with an argon-ion laser. Excitation and emission wavelengths were 488 and 520 nm, respectively. Separations were carried out in fused silica capillaries 75 μm i.d., 365 μm o.d. (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, USA), coated with polyacrylamide by in situ polymerization. The total and the effective capillary length were 60 and 50 cm, respectively. The capillary was washed successively with ultrapure water and separation buffer between runs. Samples were introduced into the capillary by pressure (20 s–6.89 kPa). The optimized composition of the background electrolyte was 100 mM borate buffer pH8.0 containing 8 mM heptakis (2,6-di-*O*-methyl)- β -cyclodextrin (DM- β -CD) and 5 mM 6-monodeoxy-6-mono(3-hydroxy)propylamino- β -cyclodextrin (HPA- β -CD). Reverse-polarity mode was applied for separation, providing -400 V/cm electric field. All the separations were performed at 25 $^{\circ}\text{C}$.

Chemicals

Chemicals used were of the highest purity available from commercial sources. Boric acid, L-glutamic acid monosodium hydrate, and D-glutamic acid were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). NBD-F, L- and D-aspartic acid, and L-cysteic acid were supplied by Fluka (Buchs, Switzerland). CE-grade cyclodextrin derivatives, namely β -cyclodextrin (β -CD), γ -cyclodextrin (γ -CD), DM- β -CD, hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), and randomly methylated β -cyclodextrin (RM- β -CD) were purchased from Cyclolab Ltd. (Budapest, Hungary). HPA- β -CD was a kind gift of Cyclolab Ltd.

The ultrapure water used in the CE experiments was obtained from a MilliQ⁺ Water system (Millipore, Bedford, MA, USA). Amino acid stock solutions (10 mM) were prepared in artificial cerebrospinal fluid (ACSF, provided

by the Pharmacy of the Semmelweis University), stored frozen at -20 $^{\circ}\text{C}$ and diluted just prior to use. NBD-F was dissolved in ethanol at 5.5 mM concentration for stock solution, stored at -20 $^{\circ}\text{C}$, and further diluted with ethanol just prior to use.

Tissue sample preparation and pre-column derivatization

One-day-old unsexed Hunnia-broiler chicks purchased from a local company (Babolna Kft., Budapest, Hungary) were used. Chicks were kept and treated according to regulations of the ethical committee of the Semmelweis University, and the procedures were in harmony with the EC Council directives on laboratory animals (86/609/EEC). Chicks were decapitated, and their brains were removed. To standardize the position of the tissue samples, a plastic mold and razor blade were used to prepare a coronal section. The anterior and posterior borders of the section were approximately 6.16 and 4.72 mm, respectively, according to the coordinates of the brain atlas of Puelles et al. [14]. The subventricular zone and the lateral telencephalon were dissected under stereomicroscope. Tissue samples were frozen immediately in pre-weighted vials on dry ice and stored on -80 $^{\circ}\text{C}$ until further process. Samples were mixed with 10 $\mu\text{L}/\text{mg}$ wet tissue ice-cold acetonitrile/water (2:1) mixture. The samples were homogenized by sonication for 5 s, followed by centrifugation at $3,000\times g$ for 10 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. Supernatants were collected and further diluted by ten times with ACSF prior to derivatization.

Pre-column derivatization of standard amino acid mixture or brain tissue samples was described in our previous papers [13, 15]. Briefly, 5 μL of amino acid solution or biological sample was mixed with 5 μL derivatization buffer (20 mM borate pH8.5) containing 1 μM cysteic acid as internal standard and 5 μL labeling solution to give a final NBD-F concentration of 1 mM. The labeling reaction was carried out at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. The derivatized samples were stored frozen at -20 $^{\circ}\text{C}$ and diluted fourfold with distilled water prior to analysis.

Method validation procedure

All the validation data have been determined according to the FDA Guidance for Industry [16]. Intra- and inter-day accuracy and precision have been assayed at three different concentration levels which covered the expected concentration range of the analytes in biological samples. The composition of quality control (QC) samples thus were 0.05, 0.5, and 1 μM and 0.1, 25, and 50 μM for D- and L-amino acids in ACSF, respectively. The LOD was determined as the concentration where the signal-to-noise ratio was 3:1. The LOQ was determined as the lowest concentration of the amino acid enantiomers that could be derivatized and measured with

accuracy and precision values within 80–120 % and below 20 %, respectively.

Results and discussion

Among labeling reagents providing derivatives fitting to the excitation wavelength of the commercially available argon-ion laser, fluorescein-based tags are widely used for derivatization of amine analytes. However, when these fluorophore labels are chosen, the high excess of the reagent and its numerous hydrolysis byproducts make the separation difficult [17]. Because of the abundance of interfering peaks, complex background electrolyte composition is usually needed for separation, which may compromise the robustness of the method [11, 12, 17]. In order to avoid this problem, a fluorogenic reagent NBD-F offering rapid and efficient labeling reaction while providing relatively stable fluorescent products excitable at 488 nm line of argon-ion laser was applied. Optimization of the reaction conditions for amino acid labeling with NBD-F has been described in our previous papers [13, 15].

Recently, we have demonstrated rapid and highly selective CE-LIF method for determination of Asp and Glu using reverse-polarity analysis mode in polyacrylamide-coated capillary [13]. Under alkaline conditions, NBD-labeled Asp and Glu possess two negatively charged carboxylate groups, thus in the absence of strong EOF, they migrate ahead of other amino acids, biogenic amines, and reagent peaks towards the anode. Because of the high selectivity, similar starting conditions were chosen in the present method development for simultaneous enantioseparation of Asp and Glu. Cysteic acid was used as an internal standard, as it also possesses two negative charges, thus similar migration characteristics to the analytes of interest. During the method development, amino acid standards were dissolved in ACSF to mimic the ionic composition of the real biological samples.

Optimization of the chiral separation

In the last few years, vast variety of cyclodextrin derivatives has been used to separate amino acid enantiomers [6, 18]. However, the type of the fluorescent derivatization used has a great impact on chiral resolution as the label may also participate in the inclusion complex formation. The previously reported chiral separation conditions thus could hardly be adopted. There are a few previous studies presenting simultaneous separation of both aspartate and glutamate enantiomers in biological samples [9, 11, 12, 19–22], but none of them used NBD-F as a labeling reagent for LIF detection. In majority of these methods, a single chiral selector alone could not provide proper separation; several

further additives such as detergents or organic modifiers had to be included into the background electrolyte (BGE), or a composition of multiple chiral selectors had to be used. The analysis time typically exceeded 15 min [11, 20–22].

Starting the method development, several cyclodextrin derivatives have been screened. Among native cyclodextrins, β -CD provided slight chiral recognition only for Glu enantiomers while Asp could be partially separated by γ -CD. The widely used neutral β -CD derivatives were next tested. HP- β -CD and DM- β -CD did not provide any real improvement compared with β -CD, as only separation of Glu could be achieved without any resolution of Asp enantiomers. In case of DM- β -CD, however, a higher strength of interaction with Glu compared with Asp could be observed, indicated by the increasing difference in their migration times as the concentration of the chiral selector was increased (Fig. 1). The effect of RM- β -CD either on the chiral recognition or on the migration time differences was inferior compared with DM- β -CD.

When neutral cyclodextrin derivatives are not successful for enantioseparation of ionic analytes, selectors with opposite charge often provide better chiral recognition likely due to the stronger host–guest interaction [23, 24]. While anionic cyclodextrins have been well established for separation of amine analytes [23, 25, 26], the amine-modified cyclodextrins have also been introduced for the enantioseparation of anionic compounds [27]. In the present study, we tested a novel single-isomer amino modified cyclodextrin derivative HPA- β -CD [28] for the separation of the NBD-labeled anionic amino acid analytes. The selector has been found appropriate for the enantioseparation of both Asp and Glu at

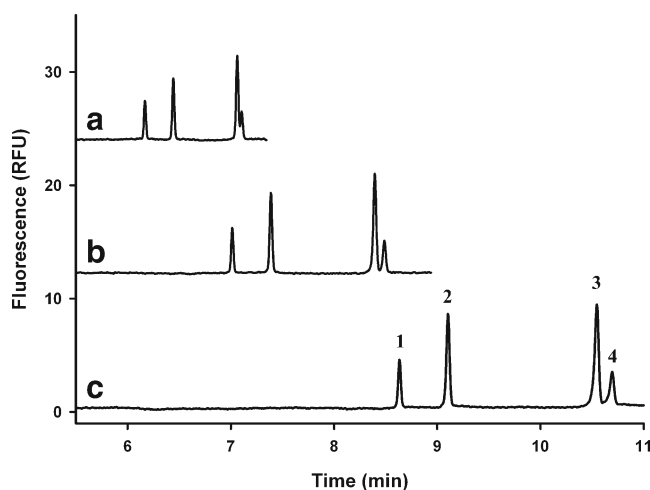


Fig. 1 Effect of DM- β -CD concentration on the separation of a standard solution containing 2 μ M D-aspartate (peak 2), 1 μ M L-aspartate (peak 2), 2 μ M D-glutamate (peak 3), 1 μ M L-glutamate (peak 4), and IS (peak 1) derivatized with NBD-F. BGE: 100 mM borate pH8.0 containing 10 mM (a), 25 mM (b), 50 mM (c) DM- β -CD; voltage: -24 kV; temperature: 25 $^{\circ}$ C; capillary: 50/60 cm \times 75 μ m i.d. polyacrylamide-coated fused silica

a relatively low concentration. Besides the selector concentration, the effect of buffer pH (between 7.0 and 9.0) on the separation has also been studied, since separation pH has a great influence not only on electromigration but also on enantioselectivity, which can be ionoselective, non-ionoselective, or duoselective [29, 30]. At lower pH, increase in the migration times of Asp and Glu enantiomers indicated the formation of more stable complexes between the guest and the host molecules, likely due to the more pronounced ionic interaction; however, at the same time, the chiral recognition was lost. At higher pH, the enantioseparation of both analytes was achieved, but the peaks became broader, and co-migration of L-Asp and D-Glu were observed at and above pH8.5 (data not shown). BGE, pH8.0, was thus chosen to use in the further optimization studies.

Increasing the HPA- β -CD concentration in the BGE improved the chiral resolution; however, the chemical selectivity was impaired, as L-Asp and D-Glu tended to co-migrate (Fig. 2). Although 3 mM HPA- β -CD provided baseline separation for enantiomers of both amino acids, further improvement of selectivity was needed in order to gain proper resolution even in the presence of the expected large excess of L-enantiomers in the biological samples. Various additives such as organic solvents or detergents are usually used to improve separation selectivity [31, 32]; furthermore, in case of enantioseparation, dual selector systems can also be applied [33–36]. The main advantage of this latter approach is the more predictable effect on migration properties of the various analytes. When two selectors are present in the system, they compete for complex formation, resulting in combined enantioselectivity that can either improve or impair the chiral

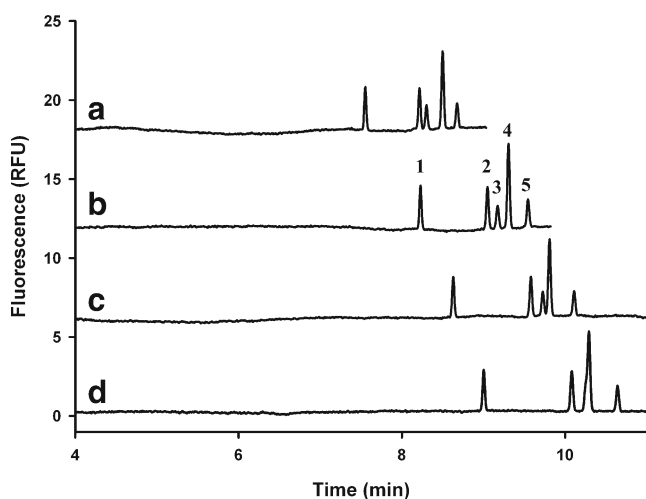


Fig. 2 Effect of HPA- β -CD concentration on the separation of a standard solution containing 2 μ M D-aspartate (peak 2), 1 μ M L-aspartate (peak 3), 2 μ M D-glutamate (peak 4), 1 μ M L-glutamate (peak 5), and IS (peak 1) derivatized with NBD-F. BGE: 100 mM borate pH8.0 containing 2 mM (a), 3 mM (b), 4 mM (c), 5 mM (d) HPA- β -CD; voltage: -24 kV; temperature: 25 $^{\circ}$ C; capillary: 50/60 cm \times 75 μ m i.d. polyacrylamide-coated fused silica

separation, depending on their affinity pattern and effect on analyte mobility [37]. The second selector could also be used only to adjust chemical selectivity of the system without great impact on chiral recognition [33, 36, 38].

As during the cyclodextrin screening, DM- β -CD was found to increase the migration time of Asp and Glu in a rather different extent, it seemed to be appropriate for adjustment of the chemical selectivity. Various combinations of HPA- β -CD and DM- β -CD were tried as shown in Fig. 3. Three millimolar HPA- β -CD was combined with 5–10 mM DM- β -CD. As it was expected, DM- β -CD provided more extensive retardation effect on the migration of glutamate enantiomers, resulting in better separation of L-Asp from D-Glu. However, at the same time, the enantioresolution of Asp was impaired, because of the competitive complex formation of the two selectors (Fig. 3b–c). This problem could be overcome by increasing the concentration of HPA- β -CD at a cost of a longer analysis time (Fig. 3d–e). A mixture containing an intermediate concentration of both selectors, 5 mM HPA- β -CD and 8 mM DM- β -CD (Fig. 3f), was thus chosen as a compromise. The total analysis time was less than 10 min, providing faster separation than the majority of the previously reported methods [11, 21, 22] and is reasonable even in case of large number of samples to be analyzed.

Method validation

After setting the optimized separation conditions, the method was validated. Previous literature data indicate about one

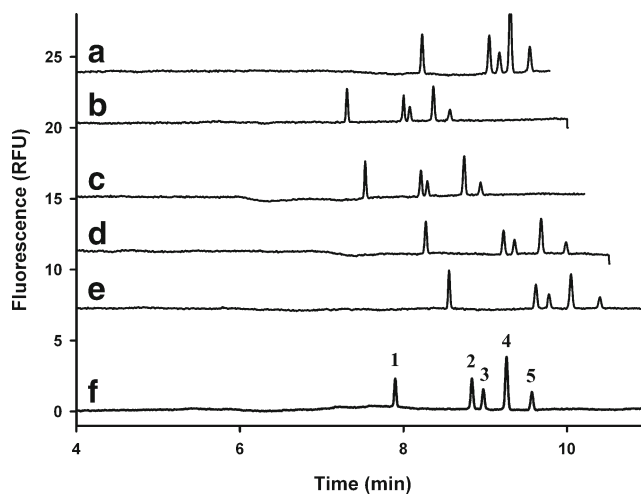


Fig. 3 Effect of concentrations of HPA- β -CD and DM- β -CD in a mixture on the separation of a standard solution containing 2 μ M D-aspartate (peak 2), 1 μ M L-aspartate (peak 3), 2 μ M D-glutamate (peak 4), 1 μ M L-glutamate (peak 5), and IS (peak 1) derivatized with NBD-F. The 100 mM borate pH8.0 containing 3 mM HPA- β -CD (a) and mixture of 3+5 mM (b), 3+10 mM (c), 5+10 mM (d), 6+10 mM (e), and 5+8 mM (f) HPA- β -CD and DM- β -CD, respectively; voltage: -24 kV; temperature: 25 $^{\circ}$ C; capillary: 50/60 cm \times 75 μ m i.d. polyacrylamide-coated fused silica

to two orders of magnitude lower concentration of D-Asp compared with its L-isomer in various biological samples [39]. As in our preliminary studies, we have found about 50-fold concentration difference of D- and L-Asp; this ratio of enantiomers was kept throughout the entire validation process. Six-point calibration curves were prepared at concentrations ranging from 0.05 to 1 μM for D-enantiomers and from 2.5 to 50 μM for L-enantiomers. The concentration of the internal standard in the samples was 1 μM . By using $1/x$ weighted linear regression, R^2 values better than 0.995 confirmed the linear relationship between peak area ratios and concentration values. In order to determine the precision and accuracy of the elaborated method, three sets of QC samples were assayed as it is given in the “Materials and methods” section. All validation data were within the acceptable range (Table 1). LOQ for both D-amino acids was 0.05 μM , which is the lowest quantification limit reported so far for their NBD-tagged derivatives obtained by validated CE-LIF method. The LOD was found to be 17 and 9 nM for D-Asp and D-Glu, respectively. Sample stability under various conditions was also investigated. The samples standing in the autosampler garage of the electrophoresis device were stable for at least 1 h. Samples stored in sealed vials at 4 $^{\circ}\text{C}$ were found stable for at least 24 h, while the frozen samples at -20°C were stable for at least 2 days.

Biological application

The applicability of the method was tested by analyzing samples from various brain regions of 1-day-old domestic chickens. A typical electropherogram of brain tissue sample is shown in Fig. 4. The peak corresponding to D-Asp was confirmed by its migration time and by spiking with known amount of standard. The concentration of D-Asp found in extracts from different areas of chicken brain ranged from

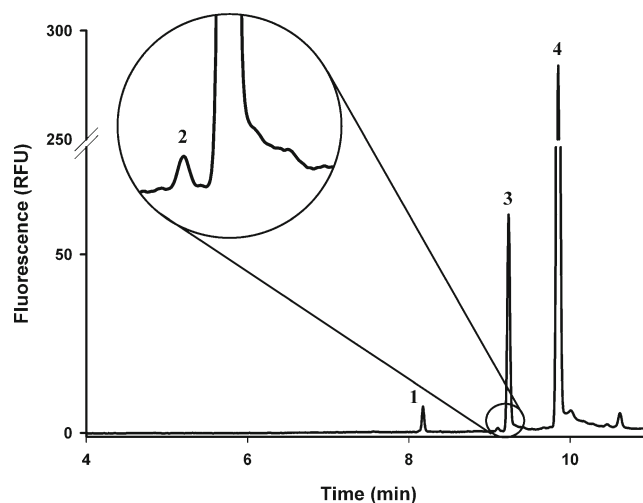


Fig. 4 Typical electropherogram of chicken brain tissue sample derivatized with NBD-F. Peaks: IS (1), D-aspartate (2), L-aspartate (3), and L-glutamate (4). BGE: 100 mM borate pH8.0 containing 5 mM HPA- β -CD and 8 mM DM- β -CD; voltage: -24 kV; temperature: 25°C ; capillary: 50/60 cm \times 75 μm i.d. polyacrylamide-coated fused silica

0.17 to 0.45 μM corresponding to 17 to 45 nmol/g wet tissue concentrations, while D-Glu was not detected in these samples. The D-enantiomer represented 1–2 % of the total aspartate content in all the studied brain areas. This ratio is in line with data reported previously for the brain of adult chicken and other animals [2, 39]. The concentration of L-Glu in the brain samples exceeded the highest concentration measured during calibration. If its quantitative determination is needed, higher dilution of the samples should be used. However, the accurate determination of aspartate enantiomers is achievable in one single run.

Conclusion

A rapid and highly selective method has been developed for the analysis of D-Asp and D-Glu in brain tissue samples. Dual cyclodextrin system containing HPA- β -CD and DM- β -CD was applied for simultaneous chiral separation of NBD-derivatives of the excitatory amino acids. During the method development and validation 50-fold L-to-D ratio of the analytes was applied. To best of our knowledge, this is the first validated CE-LIF method capable of simultaneous quantification of aspartate and glutamate enantiomers in brain tissue samples using NBD-F as labeling reagent. Our method can serve as a valuable tool for studying brain level and function of D-Asp.

Acknowledgments This work has been supported by the Hungarian National Scientific Research Fund (OTKA 63415 and 73219) and TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0001.

Conflict of interest The authors have declared no conflict of interest.

Table 1 Accuracy and precision data of determination of aspartate and glutamate enantiomers

	Concentration (μM)	Intra-day (%)	Inter-day (%)
D-Asp	0.05	104 \pm 17.2	97 \pm 14.7
	0.5	106 \pm 2.4	101 \pm 8.3
	1.0	107 \pm 11.5	97 \pm 6.8
D-Glu	0.05	89 \pm 15.3	94 \pm 14.3
	0.5	107 \pm 10.3	103 \pm 7.4
	1.0	107 \pm 4.0	96 \pm 7.1
L-Asp	2.5	94 \pm 13.9	90 \pm 5.8
	25	106 \pm 9.8	103 \pm 4.9
	50	112 \pm 12.7	106 \pm 11.9
L-Glu	2.5	107 \pm 4.3	97 \pm 3.7
	25	106 \pm 7.0	103 \pm 6.7
	50	114 \pm 8.7	99 \pm 7.9

References

1. D'Aniello A, Guiditta A (1977) Identification of D-aspartic acid in the brain of *Octopus vulgaris* Lam. *J Neurochem* 29(6):1053–1057
2. D'Aniello A (2007) D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain Res Rev* 53(2):215–234
3. D'Aniello S, Somorjai I, Garcia-Fernandez J, Topo E, D'Aniello A (2011) D-Aspartic acid is a novel endogenous neurotransmitter. *FASEB J* 25(3):1014–1027
4. Kim PM, Duan X, Huang AS, Liu CY, Ming GL, Song H, Snyder SH (2010) Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(7):3175–3179
5. Kirschner DL, Green TK (2009) Separation and sensitive detection of D-amino acids in biological matrices. *J Sep Sci* 32(13):2305–2318
6. Kitagawa F, Otsuka K (2011) Recent progress in capillary electrophoretic analysis of amino acid enantiomers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879(29):3078–3095
7. Perry M, Li Q, Kennedy RT (2009) Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters. *Anal Chim Acta* 653(1):1–22
8. Lapainis T, Sweedler JV (2008) Contributions of capillary electrophoresis to neuroscience. *J Chromatogr A* 1184(1–2):144–158
9. Kirschner DL, Jaramillo M, Green TK (2007) Enantioseparation and stacking of cyanobenz[*f*]isindole-amino acids by reverse polarity capillary electrophoresis and sulfated beta-cyclodextrin. *Anal Chem* 79(2):736–743
10. Miao H, Rubakhin SS, Sweedler JV (2005) Subcellular analysis of D-aspartate. *Anal Chem* 77(22):7190–7194
11. Thorsen G, Bergquist J (2000) Chiral separation of amino acids in biological fluids by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl* 745(2):389–397
12. Wang S, Fan L, Cui S (2009) CE-LIF chiral separation of aspartic acid and glutamic acid enantiomers using human serum albumin and sodium cholate as dual selectors. *J Sep Sci* 32(18):3184–3190
13. Wagner Z, Tábi T, Zachar G, Csillag A, Szökő E (2011) Comparison of quantitative performance of three fluorescence labels in CE/LIF analysis of aspartate and glutamate in brain microdialysate. *Electrophoresis* 32(20):2816–2822
14. Puellas L, Martínez-de-la-Torre M, Paxinos G, Watson C, Martínez S (2007) The chick brain in stereotaxic coordinates: an atlas featuring neuromeric subdivisions and mammalian homologies. Academic, Amsterdam
15. Tábi T, Lohinai Z, Pálfi M, Levine M, Szökő E (2008) CE-LIF determination of salivary cadaverine and lysine concentration ratio as an indicator of lysine decarboxylase enzyme activity. *Anal Bioanal Chem* 391(2):647–651
16. US-FDA (2001) Guidance for industry—bioanalytical method validation.
17. Szökő E, Tábi T (2010) Analysis of biological samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal* 53(5):1180–1192
18. Scriba GK (2008) Cyclodextrins in capillary electrophoresis enantioseparations—recent developments and applications. *J Sep Sci* 31(11):1991–2011
19. Huang Y, Shi M, Zhao S (2009) Quantification of D-Asp and D-Glu in rat brain and human cerebrospinal fluid by microchip electrophoresis. *J Sep Sci* 32(17):3001–3006
20. Samakashvili S, Ibanez C, Simo C, Gil-Bea FJ, Winblad B, Cedazo-Minguez A, Cifuentes A (2011) Analysis of chiral amino acids in cerebrospinal fluid samples linked to different stages of Alzheimer disease. *Electrophoresis* 32(19):2757–2764
21. Simo C, Barbas C, Cifuentes A (2002) Sensitive micellar electrokinetic chromatography-laser-induced fluorescence method to analyze chiral amino acids in orange juices. *J Agric Food Chem* 50(19):5288–5293
22. Song Y, Feng Y, LeBlanc MH, Zhao S, Liu YM (2006) Assay of trace D-amino acids in neural tissue samples by capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 78(23):8121–8128
23. Fillet M, Bechet I, Hubert P, Crommen J (1996) Resolution improvement by use of carboxymethyl-beta-cyclodextrin as chiral additive for the enantiomeric separation of basic drugs by capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 14(8–10):1107–1114
24. Lelievre F, Gareil P, Jardy A (1997) Selectivity in capillary electrophoresis: application to chiral separations with cyclodextrins. *Anal Chem* 69(3):385–392
25. Lurie IS, Klein RF, Dal Cason TA, LeBelle MJ, Brenneisen R, Weinberger RE (1994) Chiral resolution of cationic drugs of forensic interest by capillary electrophoresis with mixtures of neutral and anionic cyclodextrins. *Anal Chem* 66(22):4019–4026
26. Rudaz S, Geiser L, Souverain S, Prat J, Veuthey JL (2005) Rapid stereoselective separations of amphetamine derivatives with highly sulfated gamma-cyclodextrin. *Electrophoresis* 26(20):3910–3920
27. Galaverna G, Corradini R, Dossena A, Marchelli R, Vecchio G (1997) Histamine-modified beta-cyclodextrins for the enantiomeric separation of dansyl-amino acids in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 18(6):905–911
28. Ivanyi R, Jicsinszky L, Juvancz Z, Roos N, Otta K, Szejtli J (2004) Influence of (hydroxy)alkylamino substituents on enantioseparation ability of single-isomer amino-beta-cyclodextrin derivatives in chiral capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 25(16):2675–2686
29. Guttman A, Cooke N (1994) Practical aspects of chiral separations of pharmaceuticals by capillary electrophoresis I. Separation optimization. *J Chromatogr A* 680(1):157–162
30. Rawjee YY, Williams RL, Vigh G (1994) Efficiency optimization in capillary electrophoretic chiral separations using dynamic mobility matching. *Anal Chem* 66(21):3777–3781
31. Chen F, Zhang S, Qi L, Chen Y (2006) Chiral capillary electrophoretic separation of amino acids derivatized with 9-fluorenylmethylchloroformate using mixed chiral selectors of beta-cyclodextrin and sodium taurodeoxycholate. *Electrophoresis* 27(14):2896–2904
32. Jin LJ, Rodriguez I, Li SF (1999) Enantiomeric separation of amino acids derivatized with fluoresceine isothiocyanate isomer I by micellar electrokinetic chromatography using beta- and gamma-cyclodextrins as chiral selectors. *Electrophoresis* 20(7):1538–1545
33. Fillet M, Chankvetadze B, Crommen J, Blaschke G (1999) Designed combination of chiral selectors for adjustment of enantioseparation selectivity in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 20(13):2691–2697
34. Fillet M, Hubert P, Crommen J (1997) Enantioseparation of non-steroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis using mixtures of anionic and uncharged beta-cyclodextrins as chiral additives. *Electrophoresis* 18(6):1013–1018
35. Jakubetz H, Juza M, Schurig V (1998) Dual chiral recognition system involving cyclodextrin derivatives in capillary electrophoresis II. Enhancement of enantioselectivity. *Electrophoresis* 19(5):738–744
36. Lelievre F, Gareil P, Bahaddi Y, Galons H (1997) Intrinsic selectivity in capillary electrophoresis for chiral separations with dual cyclodextrin systems. *Anal Chem* 69(3):393–401
37. Abushoffa AM, Fillet M, Hubert P, Crommen J (2002) Prediction of selectivity for enantiomeric separations of uncharged compounds by capillary electrophoresis involving dual cyclodextrin systems. *J Chromatogr A* 948(1–2):321–329
38. Tábi T, Magyar K, Szökő E (2003) Chiral characterization of deprenyl-N-oxide and other deprenyl metabolites by capillary electrophoresis using a dual cyclodextrin system in rat urine. *Electrophoresis* 24(15):2665–2673
39. Katane M, Homma H (2011) D-Aspartate—an important bioactive substance in mammals: a review from an analytical and biological point of view. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879(29):3108–3121