



**Egér agyi alfa-tokoferol homeosztázisának bioanalitikai
tanulmányozása a fizioiógiás öregedés folyamatában és az MPTP-
indukált neurotoxicitásban**

című doktori disszertáció összefoglalója

Nánási Nikolett

Kísérletes és Klinikai Idegtudomány képzési alprogram

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ

Neurológiai Klinika

Témavezető: Dr. habil. Zádori Dénes

Szeged

2020

A doktori disszertáció témájához közvetlenül kapcsolódó eredeti közlemények:

- I. **Nánási N.**, Veres G., Cseh E.K., Szentirmai M., Martos D., Sümegi E., Hadady L., Klivényi P., Vécsei L., Zádori D. The detection of age-, gender-, and region-specific changes in mouse brain tocopherol levels via the application of different validated HPLC methods. *Neurochem. Res.* 2018, 43:2081–2091 (eredeti közlemény; IF: 2,782; **Q2**)
- II. **Nánási N.**, Veres G., Cseh E.K., Martos D., Hadady L., Klivényi P., Vécsei L., Zádori D. The assessment of possible gender-related effect of endogenous striatal alpha-tocopherol level on MPTP neurotoxicity in mice. *Heliyon* 2020, 6:e04425. (eredeti közlemény; IF: –; **Q1**)
- III. **Nánási N.**, Cseh E.K., Szentirmai M., Veres G., Klivényi P., Vécsei L., Zádori D. Development and validation of high performance liquid chromatography methods for vitamin E measurements. *Proceeding of the 23rd International Symposium on Analytical and Environmental Problems.* 2017. pp. 469-473. Alapi T., Ilisz I. (eds). University of Szeged, Department of Inorganic and Analytical Chemistry, H-6720 Szeged, Dóm tér 7, Hungary. **ISBN 978-963-306-563-1** (konferencia kiadvány).
- IV. **Nánási N.**, Hadady L., Cseh E., Veres G., Klivényi P., Vécsei L., Zádori D. Development and validation of high performance liquid chromatography method for the measurements of biogenic amines. *Proceeding of the 24th International Symposium on Analytical and Environmental Problems.* 2018. pp. 368-372. Alapi T., Ilisz I. (eds). University of Szeged, H-6720 Szeged, Dugonics tér 13, Hungary. **ISBN 978-963-306-623-2** (konferencia kiadvány).

A kapcsolódó közlemények kvartilis besorolása összesen: **Q1 + Q2**

A doktori disszertációhoz közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

- I. Cseh E.K., **Nánási N.**, Veres G., Klivényi P., Danics K., Vécsei L., Kovács G.G., Zádori D. The assessment of concentrations of certain tryptophan metabolites in Creutzfeldt-Jakob disease. *Proceeding of the 23rd International Symposium on Analytical and Environmental Problems*. 2017. **ISBN 978-963-306-563-1** (konferencia kiadvány).
- II. Cseh, E.K., **Nánási N.**, Veres G., Polyák H., Körtési T., Vécsei L., Zádori D. Development, validation and application of a HPLC method for the assessment of some tryptophan metabolites from murine samples. *Analysis of Carboxylic Acids with Ion Chromatography L36*. 2019. **ISBN: 978-615-527-057-4** (konferencia kiadvány).
- III. Cseh E.K., Veres G., Danics K., Szalárdy L., **Nánási N.**, Klivényi P., Vécsei L., Zádori D. Additional value of tau protein measurement in the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ideggy. Sz.* 2019, 72: 39 (eredeti közlemény; IF: 0,337; **Q4**)
- IV. Cseh E.K., Veres G., Szentirmai M., **Nánási N.**, Szatmári I., Fülöp F., Vécsei L., Zádori D. HPLC method for the assessment of tryptophan metabolism utilizing separate internal standard for each detector. *Anal. Biochem.* 2019, 574:7 (eredeti közlemény; IF: 2,877; **Q3**)
- V. Cseh E.K., Veres G., Körtési T., Polyák H., **Nánási N.**, Tajti J., Klivényi P., Vécsei L., Zádori D. Neurotransmitter and tryptophan metabolite concentration changes in the Complete Freund's adjuvant model of orofacial pain. *J. Head. Pain.* 2020, 21:35 (eredeti közlemény; IF: 4,797; **Q1**)

A nem kapcsolódó közlemények kvartilis besorolása összesen: **Q1 + Q3 + Q4**

Összesített kvartilis besorolás: **2 Q1 + Q2 + Q3 + Q4**

Összesített impact faktor: **10,793**

1. Bevezetés

A neurodegeneráció fő jellemzője a neuronok progresszív sérülése és pusztulása egyes agyi régiókban. A kialakuló funkciócsökkenés különböző kórképek megjelenéséhez vezethet, mint például Parkinson-kór (PK), Huntington-kór és Alzheimer-kór (AK). E betegségek ugyan számos klinikai, biokémiai és hisztopatológiai tulajdonságaikban különböznek, mégis kialakulásuk hátterében találhatunk közös jellemzőket, mint a mitokondriális diszfunkció, a glutamáterg excitotoxicitás, vagy a csökkent antioxidáns kapacitás.

Az antioxidáns védelem komplex rendszer, amely enzimatikus (például szuperoxid-diszmutáz, kataláz, glutation-peroxidáz) és nem-enzimatikus mechanizmusokból áll. A nem-enzimatikus folyamatokban olyan kisméretű molekulák vesznek részt, mint a β -karotin, koenzim Q10, C-vitamin, E-vitamin és flavonoidok. A lipofil E-vitamin-csoportot 4-4 tokoferol és tokotrienol alkotja, szerkezetük egy alifás oldallánccal rendelkező kromanolgyűrűt tartalmaz, amely tokoferolok esetén telített, tokotrienoloknál telítetlen. Az izomerek különböző formái (α , β , γ és δ) a metilcsoportok számával és helyzetével azonosíthatóak. Ezen antioxidáns védelemnek kiemelkedő szerepe lehet az agyban, hiszen e szerv a magas energiaigénye és lipidtartalma miatt különösen érzékeny az oxidatív sérülésekre. Az E-vitamin-hiány, ezen belül is főleg az α -tokoferol (α T) hiánya gyakran társul neurológiai tünetekkel, továbbá a szakirodalomban szép számmal találni olyan tanulmányokat, melyekben szignifikánsan alacsonyabb szérumszámú vagy plazma α T koncentrációkat találtak egyes neurológiai megbetegedésekben, például AK-ban és PK-ban. Ezek azon megbetegedések, melyek növekvő prevalenciát mutatnak időskorúakban.

A tokoferol homeosztázisra vonatkozó rágcsáló tanulmányok esetén csupán limitált adat érhető el arról, hogyan befolyásolja az életkor és a nem a perifériás és agyi tokoferol koncentrációkat. A szakirodalomban található egér és patkány tokoferol vizsgálatok többsége az állatokat nem választotta külön a későbbi statisztikai összehasonlításokhoz szükséges csoportokra (biológiai nem vagy életkor szerint, vagy nem közlik ezeket az adatokat). Gohil és munkatársai (mtsai.) arra a következtetésre jutottak, hogy 5 hónapos C57Bl/6 nőtények esetén az összes vizsgált agyi régióban jelentősen magasabb szintek mérhetőek, mint a hímekben, de mivel csak egy adott életkorban határozták meg ezeket az értékeket, a fiziológiás öregedés hatását nem elemezték. Csupán egyetlen kéziratot találni a szakirodalomban, amely az életkor hatását vizsgálta a tokoferolok vonatkozásában C57Bl/6Ncr hím egerekben, azzal a megállapítással, hogy a plazma szintekben nincs szignifikáns változás, ugyanakkor néhány agyi régióban szignifikáns

emelkedés mutatkozott az életkorral. Mivel ez utóbbi tanulmányba nem vontak be nőstény egereket, így nyitott kérdés maradt, hogy a Gohil és mtsai. által meghatározott nemi különbségek vajon az életkor előrehaladtával ugyanígy megmutatkoznak-e vagy más tendencia lesz mérvadó. A PK egy gyógyíthatatlan progresszív neurodegeneratív kórkép, melynél kardinális motoros tünetek (bradikinézia, rigor, tremor) kialakulásában a középagyban elhelyezkedő substantia nigra pars compacta (SNpc) dopaminerg idegsejtjeinek pusztulása okozta striatális dopaminhiány, és a basalis ganglionok rendszerének ebből adódó funkciózavara áll. A motoros tünetek mellett a dopamin (DA), valamint a többi biogén amin egyéb agyi területeken jelentkező hiánya jellegzetes nem-motoros tünetek kialakulását eredményezi (például alvászavar, pszichiátriai és kognitív eltérések). A PK-ban jelentkező neuronális apoptózist többek között összefüggésbe hozták az oxidatív stresszel és a mitokondriális diszfunkcióval is.

A PK állatkísérletes modellezésére talán mind a mai napig legszélesebb körben a mitokondriális légzési lánc I-es komplexének működését gátló 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) toxint használják. Az MPTP aktív metabolitja, az 1-metil-4-fenilpiridínium ion szelektíven károsítja a SNpc dopaminerg neuronjait, ami a betegségre jellemző striatális DA koncentrációcsökkenést okoz. Az MPTP toxinra legérzékenyebben a C57Bl/6 egértörzs reagál, így legtöbb esetben a kísérletekbe C57Bl/6 egereket vonnak be. A neurotoxicitás fokozott érzékenységet mutat az állatok öregedésével, emellett nemi különbségeket is megfigyeltek a C57Bl/6 egértörzsben MPTP intoxikálást követően. Bár a kapott eredmények ellentmondásosak, a vizsgálatok többsége fokozott érzékenységet mutatott ki a hímeknél, különösen a nigrostriatális sérülés kapcsán. Ennek pontos oka a mai napig feltáratlan. Több állatkísérletes tanulmány is foglalkozott a neuronpusztulás megóvása érdekében exogén módon alkalmazott α T adminisztrációval MPTP kezelt C57Bl/6 egerekben, azonban neuroprotektív hatását tekintve nem született egységes álláspont. Összességében azon kísérletekben bizonyult neuroprotektívnek az α T, melyekben azt nagy dózisban alkalmazták.

Az E-vitamin vegyületek abszorpciós maximuma az UV-tartományban van, ami lehetővé teszi a diódasoros detektorral (DSD) csatolt módszerek alkalmazását, bár a metodika szelektivitását erősen befolyásolhatják a biológiai mintákban esetlegesen jelen lévő egyéb UV-aktív vegyületek. Ezenkívül a DSD alacsonyabb érzékenységgel dolgozik a következő detektálási módszerekhez képest. A fluoreszcens detektálási (FLD) módszer az E-vitamin natív fluoreszcenciájából profitál, és szelektivebb, érzékenyebb detektálást biztosít. A kromanolgyűrű aromás hidroxilcsoportja miatt az elektrokémiai mérés is kivitelezhető, ezért az elektrokémiai

detektálás (EKD) is népszerű az FLD mellett, mert hasonló, ha nem jobb érzékenység érhető el. Rágcsálók, különösen egerek plazma- vagy szérum- és agymintái esetében a tokoferolok mérése – az α T kivételével – kis koncentrációjuk miatt kihívást jelent.

A biogén aminok biológiai mintákból történő mérése nagyon szelektív és érzékeny módszert igényel, mivel azok alacsony koncentrációban vannak jelen. Az EKD-vel kombinált nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiai (HPLC) metodika az egyik legjobb alternatíva a monoaminok és rokon vegyületeik kvantitatív kimutatására biológiai mintákból elektroaktív funkcióscsoportjaik és az EKD kivételes érzékenysége miatt. A módszer alkalmazhatóságát számos tényező befolyásolja, használata és optimalizálása nagy szakértelmet igényel. A mobilfázis összetétele jelentős hatást gyakorol a metabolitok meghatározására. A minta előkészítésének komplex folyamatát illetően, különösen az agyminták esetében, a belső standardok (BS) alkalmazása elengedhetetlen a mintaveszteségek felméréséhez és a szükséges korrekciók elvégzése végett. Nagyszámú biogén amin méréshez párhuzamosan több BS egyidejű alkalmazását a hosszú mérési idő és a mért vegyületek (katekolaminok és szerotonin) eltérő kémiai szerkezete teszi indokolttá, amelyekre az alkalmazott módszernek szelektívnek is kell lennie. A metodika szelektivitásának több agyi régió vizsgálatának vonatkozásában történő beállítása is akadályokba ütközhet.

2. Célkitűzések

I., HPLC-EKD és HPLC-FLD módszerek alkalmazhatóságának összehasonlítása C57Bl/6N eger agymintákból történő α T szintek mérésére.

II., C57Bl/6N nőstény és hím egerek központi idegrendszerében (KIR), valamint vérében az α T szintekre gyakorolt lehetséges életkor- és nemi hatások vizsgálata a továbbfejlesztett és validált HPLC módszerekkel.

III., HPLC-EKD módszer kidolgozása bizonyos biogén amin és néhány rokon vegyületük (levodopa, 3,4-dihidroxifenilecetsav (DOPAC), noradrenalin, 5-hidroxiindolecetsav, homovanillinsav (HVA), DA, szerotonin és 3-metoxitiramin) párhuzamos meghatározására C57Bl/6N egerek különböző agyi régióiból 3 BS használatával.

IV., A PK MPTP-indukált neurotoxicitási állatmodelljében C57Bl/6N nőstény és hím egerek striatális α T és DA szintjei közötti lehetséges nemfüggő kapcsolatok felderítése továbbfejlesztett és validált HPLC módszerek segítségével.

3. Anyagok és módszerek

Mindkét kísérletünkhöz C57Bl/6N egértörzs hím és nőstény egyedeit vontuk be. Az állatokat normál laboratóriumi körülmények között tartottuk ($50\% \pm 2\%$ páratartalom, $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleti tartomány és 12 – 12 órás fény és sötét ciklus) ketrecekben (maximum 4 állat ketrecenként) szabad hozzáféréssel az ivóvízhez és a standard rágcsáló táphoz. Első tanulmányunkban, ahol az életkor és a nem hatásait vizsgáltuk, az egereket hat csoportba osztottuk, melyek 6, 16 és 66 hetes korú nőstény és hím egerekből, csoportonként 9 egyedből álltak. A következő kísérletünkben az állatokból 4 csoportot alkottunk, amelyek a kontroll és MPTP-vel kezelt 16 hetes hím és nőstény egerekből álltak (kezdeti elemszám 15 egyed volt csoportonként). Kísérleteinket az Állatok Védelmével Foglalkozó Tudományos Etikai Bizottság és Tanácsadó Testület jóváhagyásával hajtottuk végre (XXIV./352/2012.). Kutatásunkat a Szegedi Tudományegyetem Állatkísérleti Bizottsága is engedélyezte (XI./243/2019.).

Az MPTP hidrokloridot fiziológias sóoldatban frissen feloldottuk, és intraperitoneálisan adtuk be. Két csoport 12 mg/testtömeg kg MPTP injekciót kapott ötször, 2 órás időközönként. A másik két csoportot kontrollként fiziológias sóoldattal oltottuk ötször, 2 órás időközönként. Az utolsó MPTP oltás után egy nőstény és két hím egér elpusztult. Egy kontroll nőstényt pedig ki kellett zárunk a kísérletből szokatlan viselkedése miatt.

Az első tanulmányunkban a 6, 16 és 66 hetes egereket mély altatásba helyeztük izoflurán gáz inhaláltatásával. Torakotómiát követően a jobb pitvarból vérvétel történt intrakardiális punkció segítségével. A vért EDTA-t tartalmazó Eppendorf csőbe helyeztük, majd további felhasználásig 4°C -on tároltuk. Az állatokat ezután 8 ml/perc sebesség mellett 5 percig egy perisztaltikus pumpával mesterséges agy-gerincvelői folyadékkal perfundáltuk. Miután a vérmintákat 5 percig 4°C -on centrifugáltuk, percenként 3500 fordulatszám (RPM) mellett, a felülúszó plazmát (200 μl) azonnal homogénre vortexeltük frissen készített 200 μl -nyi 15 mg/ml aszkorbinsav oldattal és 400 μl 250 mg/L butilhidroxitoluol (BHT) etanos (EtOH) oldatával. A mintákat -80°C -on tároltuk a további felhasználásig. A mérések előtt 250 mg/L BHT-t és 3 μM rac-tokolt (rT, BS) tartalmazó 600 μl -nyi n-hexán adtunk a frissen felolvasztott plazmamintákhoz. Egy percig tartó intenzív kevertetés után a mintákat 4°C -on 10 percig 12 000 RPM sebességgel centrifugáltuk. A következő lépésben 450 μl térfogatú n-hexán felülúszót nitrogén gáz alatt bepároltunk. A maradékot 75 μl acetonitril (ACN) és 50 μl EtOH:1,4-dioxán (1:1) keverékével oldottuk vissza, majd sötétített üvegekbe helyeztük a mérésekhez.

Dekapitáció után az agyat kifejtettük a koponyából, majd hideg ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) felületen disszekáltuk az öt agyi régiót (striátum, striátum feletti agykéreg, hippocampusz, kisagy és agytörzs). A pontos kimetszések kivitelezése az online elérhető egér agyi térkép alapján történt (Allen Brain Atlas: Mouse Brain; Allen Institute for Brain Science, Seattle, Washington, Amerikai Egyesült Államok; <http://mouse.brain-map.org/static/atlas>). Felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk őket. Az agyi régiókat a mérések előtt analitikai mérlegen, fagyott állapotban lemértük és ultrahanggal homogenizáltuk $1020\text{ }\mu\text{L}$ térfogatú jéghideg oldatban. A mintákat ezután $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 10 percig $12\ 000\text{ RPM}$ sebességgel centrifugáltuk, a felülúszókat összegyűjtöttük, majd a plazma esetében leírt módszerrel stabilizáltuk. A mintaelőkészítés folyamatai is megegyeztek, azzal az eltéréssel, hogy a bepárlási maradékot a mobilfázisokban oldottuk fel, ahogy arról később lesz szó.

Az MPTP állatkísérletes tanulmányunkban az állatokat 1 héttel az utolsó kezelést követően termináltuk izoflurán gáz inhaláltatásával. A mintavétel és a stabilizációs folyamat hasonló volt a fent leírtakhoz. Röviden, az αT és a katekolaminok koncentrációjának meghatározásához plazmát és mediálisan felezett striatális mintákat gyűjtöttünk. Az αT bioanalízise ugyanúgy történt, mint korábban említettük. A DA, DOPAC és HVA mérések előtt a felezett striátumokat lemértük és ultrahanggal roncsoltuk jég-hűtött oldatban. A mintákat 30 percig $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk $12\ 000\text{ RPM}$ sebességgel, és a felülúszók összegyűjtése után $10\text{ }\mu\text{L}$ -t injektált a HPLC.

A plazma minták mérését validált DSD-vel kapcsolt HPLC metodikával végeztük. Az elválasztáshoz Agilent 1260 HPLC rendszert (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) használtunk, mely során a mobilfázist $2,1\text{ ml/perc}$ áramlási sebesség mellett juttattuk a 25°C -on termosztált, Kinetex C18 típusú oszlopra ($150 \times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$ részecske méret; Phenomenex Inc., Torrance, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok), amit egy ugyanilyen fázisú előoszlop védett (SecurityGuard, $4 \times 3.0\text{ mm}$, Phenomenex Inc., Torrance, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok). A mobilfázis $66,54\text{ V/V}\%$ ACN-ből, $21,40\text{ V/V}\%$ tetrahydrofuránból, $6,61\text{ V/V}\%$ metanolból, $5,45\text{ V/V}\%$ vízből és $272,4\text{ mg/L}$ ammónium acetát keverékből állt, melyet $0,45\text{ }\mu\text{m}$ pórusméretű polivinilidén difluorid membránon szűrtünk alkalmazása előtt. Az automata mintaadagoló a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtött mintákból $50\text{ }\mu\text{L}$ mennyiségű térfogatokat injektált az analitikai oszlopra. Az αT és rT vegyületeket szimultán detektáltuk maximális abszorbanciájuk hullámhosszain, azaz 292 és 297 nm -en.

Az agyi minták méréséhez két különböző detektálási módszert választottunk, melyek közül az egyik esetben EKD-t, a másikon pedig FLD-t alkalmaztunk. Mindkét módszerhez egy Agilent

1100 HPLC rendszer (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) használtunk, amely Model 105 EKD (Precision Instruments, Marseille, Franciaország) és FLD (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) modulokkal van felszerelve. A méréseket izokratikus körülmények között hajtottuk végre. Az EKD technika esetén a mobilfázis 91,25 V/V% metanolt, 4,25 V/V% vizet, 4,50 V/V% izopropanolt és 2,81 g/L NaClO₄-ot tartalmazott, melyet 0,45 µm pórusméretű polivinilidén difluorid membránon szűrtünk alkalmazása előtt. A mobilfázist 1,2 ml/perc sebességgel a 25°C-on termosztál oszlopra (Luna C18, 75 × 4,6 mm, 3 µm szemcseméret, Phenomenex Inc., Torrance, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) juttattuk, amit egy ugyanilyen fázisú előoszlop védett (SecurityGuard, 4 x 3.0 mm, Phenomenex Inc., Torrance, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok). Tíz µL alikvotot injektált mintánként az automata mintaadagoló, és a mintákat 4 °C-on termosztáltuk. A másik metodika esetén (FLD), a mozgófázis tiszta metanoból állt, Yuan és mtsai. által publikált, általunk kissé módosított módszerét alkalmaztuk. Az áramlási sebesség 1,8 ml/perc volt és további beállítások megegyeztek az EKD-nél leírtaknál (hőmérséklet, oszlop típusa, injektálás mennyisége). A gerjesztési és az emissziós hullámhosszakat 292 nm-re, illetve 330 nm-re állítottuk be, mind az αT, mind az rT szimultán mérésére. A validálási folyamat során minden esetben meghatároztuk a kimutatási határt, a meghatározási határt, a szelektivitást, a napon belüli és a napok közötti pontosságokat, valamint a visszanyerési értékeket. Az egerek agymintáiban az αT-ra gyakorolt lehetséges életkorral és nemmel kapcsolatos hatások tanulmányozása során 2 párhuzamos mérést végeztünk mindegyik mintán, hogy összehasonlítsuk az FLD és az EKD módszerek alkalmazhatóságát.

A 3 biogén amin (DA, noradrenalin, szerotonin) és ezek prekursorainak és metabolitjainak (levodopa, DOPAC, HVA, 3-metoxitiramin, 5-hidroxiindolecetsav) mérése egér agyi mintákból 3 BS (3,4-dihidroxibenzilamin, izoproterenol és Nω-metilszerotonin) adaptálásával az alábbiak szerint végeztük. A módszer kidolgozásához a kezdeti mobilfázis 2,80 mM nátrium oktil szulfátot (NaOS), 75 mM NaH₂PO₄-t, 100 µM Na₂EDTA-t és 7,0 V/V% ACN-t tartalmazott. Az ACN hozzáadása előtt a vizes fázis pH-értékét 3,0-ra állítottuk 85 tömeg%-os foszforsavval. A metodikafejlesztés során négy paraméter hatását vizsgáltuk az említett 11 komponensre, amelyek közül az első a pH érték volt, majd az ionpárképző komponens (NaOS) koncentrációja, a szerves oldószer mennyisége (ACN) és végül az EKD cella munkapotenciálja. A validálási folyamat során meghatároztuk a linearitást, a kimutatási és a meghatározási határokat, az érzékenységet, a napon belüli és napok közötti pontosságot és a visszanyerhetőséget is.

4. Eredmények

Megfelelő mintaelőkészítés után robusztus és precíz módon tudtuk meghatározni az αT koncentrációkat egér plazmából és az agyszövetből. Továbbá megfelelő szelektivitást elérve mindkét vegyületet (αT és rT) zavaró tényezőktől mentesen tudtuk detektálni.

Az első kísérletünkben, a plazma mintákat illetően az alkalmazott két utas ANOVA szignifikáns különbséget mutatott az életkorra ($F_{2,48} = 10,55$; $p < 0,001$; $\omega^2 = 0,0276$), ugyanakkor a nemre ($F_{1,48} = 0,64$; $p = 0,427$) és az életkor *vs.* nem ($F_{2,48} = 1,11$; $p = 0,339$) változóra és interakcióra nem. A *post hoc* analízis eredménye kimutatta, hogy életkoron belül a 16 és 66 hetes hím egerek között szignifikáns eltérés van ($p < 0,01$ Hiba! A hivatkozási forrás nem található.), melynek Cohen-féle d értéke 2,234 volt.

Agyminták vizsgálatok az EKD alkalmazásával szélesebb lineáris tartomány vizsgálható, ami érzékenyebb meghatározást biztosít az FLD-vel szemben. FLD segítségével az agyminták αT tartalma precízebben és lényegesen gyorsabban határozható meg, továbbá a mérési feltételek is lényegesen egyszerűbbek, mint az EKD-nél, ezen felül az alapvonal és a jel/zaj arány lényegesen jobb. A validációs paraméterek fényében mind az EKD, mind az FLD mérés alkalmazható az αT meghatározására agymintákból, valamint a kapott eredmények detektortól függetlenül statisztikailag nem különböztek, így az FLD és EKD mérések eredményeit átlagoltuk minden egyes agyminta esetén. A következő lépésekben ezek az átlagok lettek felhasználva két szempontos ANOVA vizsgálatokhoz, melyek Tukey HSD *post hoc* tesztekkel egészültek ki.

A striátumban szignifikáns eltérés volt mind életkor ($F_{2,48} = 120,02$; $p < 0,001$; $\omega^2 = 0,0752$), nem ($F_{1,48} = 23,06$; $p < 0,001$; $\omega^2 = 0,0070$) és életkor *vs.* nem ($F_{2,48} = 3,59$; $p < 0,05$; $\omega^2 = 0,0016$) interakciójában. Az alkalmazott Tukey HSD *post hoc* teszt korrall szignifikánsan emelkedő αT koncentrációt mutatott a következő páronkénti összehasonlításokban, melyeket figyelembe vettünk: 6 *vs.* 16 hetes korú nőstények ($p < 0,001$) és hímek csoportjaiban ($p < 0,01$); a 16 *vs.* 66 hetes korú nőstényeknél ($p < 0,001$) és hímeknél ($p < 0,001$); 6 *vs.* 66 hetes korú nőstényeknél ($p < 0,001$) és hímeknél ($p < 0,001$); a 16 hetes korú hímek és nőstények ($p < 0,05$) és a 66 hetes korú hímek és nőstények összehasonlításában ($p < 0,001$). A striátum feletti agykéregben szintén mindkét változó és interakciója szignifikáns különbségeket mutatott az αT szintekben. (életkorra: $F_{2,48} = 159,59$; $p < 0,001$; $\omega^2 = 0,1042$; nemre: $F_{1,48} = 17,38$; $p < 0,001$; $\omega^2 = 0,0054$; és ezek interakciójára: $F_{2,48} = 5,47$; $p < 0,01$; $\omega^2 = 0,0029$). A *post hoc* teszt megmutatta, hogy csoportonként milyen eltérések vannak. Életkorrall emelkedő αT koncentrációk mutatkoztak a 6

vs. 16 hetes nőstényeknél ($p < 0,001$) és hímeknél ($p < 0,05$); a 16 vs. 66 hetes nőstényeknél és hímeknél (mindkettő összehasonlítás esetén $p < 0,001$); a 6 vs. 66 hetes nőstények és hímek között (mindkét összehasonlítás esetén $p < 0,001$) és a 66 hetes nőstények és hímek között ($p < 0,001$). Továbbá a hippokampuszban, hasonlóan, mint a korábbi két agyi régió esetén, a két szempontos ANOVA szignifikáns különbséget mutatott életkor ($F_{2,48} = 195,50$; $p < 0,001$; $\omega^2 = 0,1056$), nem ($F_{1,48} = 24,34$; $p < 0,001$, $\omega^2 = 0,0063$) és életkor vs. nem ($F_{2,48} = 7,05$; $p < 0,01$; $\omega^2 = 0,0033$) interakcióra. Az ezt követően lefuttatott Tukey HSD *post hoc* teszt szignifikánsan emelkedett szintet jelzett a 6 vs. 16 hetes korú nőstények ($p < 0,001$) és hímek esetén ($p < 0,001$); a 16 vs. 66 hetes korú nőstények ($p < 0,001$) és hímek esetén ($p < 0,001$); a 6 vs. 66 hetes korú nőstények ($p < 0,001$) és hímek esetén ($p < 0,001$); valamint a 66 hetes korú hímek és nőstények között ($p < 0,001$). A kisagy és az agytörzs esetén csak az életkor ($F_{2,48} = 17,09$; $p < 0,001$; $\omega^2 = 0,0134$ és $F_{2,48} = 3,49$; $p < 0,05$; $\omega^2 = 0,0021$; sorrendben) és a nem ($F_{1,48} = 10,66$; $p < 0,01$; $\omega^2 = 0,0040$ és $F_{1,48} = 13,30$; $p < 0,001$; $\omega^2 = 0,0051$; sorrendben) változók befolyásolták szignifikánsan ezen agyi régiók αT szintjeit, az interakciójuk nem ($F_{2,48} = 2,90$; $p = 0,065$ és $F_{2,48} = 0,82$; $p = 0,446$; sorrendben). A páronkénti összehasonlítás (*post hoc* teszt) szignifikánsan emelkedett αT koncentrációt jelzett a kisagyi régióban a 6 vs. 16 hetes korú nőstényekben ($p < 0,01$) és a 6 vs. 66 hetes korú nőstényeknél ($p < 0,001$). Agytörzs esetén a lényegi összehasonlításokban nem volt különbség.

Második tanulmányunk elvégzéséhez továbbfejlesztettünk és validáltunk egy HPLC-EKD módszert is a biogén aminok mérésére. A fejlesztés során sikeresen optimalizáltuk az ionpárpépző reagens és a mobilfázisban lévő szerves oldószer mennyiségét, az EKD cella munkapotenciálját, és két új BS-t tudtunk adni a módszerhez.

Az MPTP kísérletből nyert felezett striátumokból a következő eredmények születtek. A kétutas ANOVA Tukey HSD *post hoc* teszttel a következő eredményeket hozta. Jelentős különbségeket figyeltünk meg a DA szintekben a kezelés ($F(1, 52) = 196,355$; $p < 0,001$; $\omega^2 = 0,2201$), valamint a kezelés vs. nem interakció vonatkozásában is ($F(1, 52) = 5,703$; $p < 0,05$; $\omega^2 = 0,0053$), de a biológiai nem esetében nem ($F(1, 52) = 3,627$; $p = 0,062$). A Tukey HSD teszttel végzett *post hoc* elemzés szignifikánsan csökkent DA koncentrációt mutatott az MPTP-vel kezelt vs. kontroll nőstényeknél ($p < 0,001$; hatásértéke $-2,600$ (Cohen-féle d)); továbbá az MPTP-vel kezelt vs. kontroll hímeknél ($p < 0,001$; hatásértéke $-5,925$ (Cohen-féle d)); valamint az MPTP-vel kezelt hímeknél vs. nőstényeknél ($p < 0,05$; Cohen-féle d értéke $-1,303$). A DA koncentráció fent említett változásaihoz hasonlóan a DOPAC szintekben is szignifikáns különbségeket mutatott ki

a statisztikai teszt a kezelés ($F(1, 52) = 143,741$; $p < 0,001$; $\omega^2 = 0,1769$) és a kezelés *vs.* nem interakció esetében ($F(1, 52) = 12,481$; $p < 0,001$; $\omega^2 = 0,0141$), de a biológiai nem esetében nem ($F(1, 52) = 2,373$; $p = 0,129$). A Tukey HSD teszttel végzett *post hoc* elemzés szignifikánsan csökkent DOPAC koncentrációt igazolt MPTP-vel kezelt *vs.* kontroll nőstényeknél ($p < 0,001$; Cohen-féle d értéke $-2,309$); MPTP-vel kezelt *vs.* kontroll hímeknél ($p < 0,001$; Cohen-féle d : $-4,094$); valamint MPTP-vel kezelt hímeknél *vs.* nőstényeknél ($p < 0,01$; Cohen-féle d $-1,491$). Jelentős különbségeket figyeltünk meg a HVA szintekben is a kezelés ($F(1, 52) = 59,920$; $p < 0,001$; $\omega^2 = 0,1137$) és a kezelés *vs.* nem interakciójában is ($F(1, 52) = 5,704$; $p < 0,05$; $\omega^2 = 0,0090$), de a biológiai nem esetében nem ($F(1, 52) = 0,464$; $p = 0,499$). A Tukey HSD teszttel végzett *post hoc* elemzés szignifikánsan csökkent HVA koncentrációt mutatott MPTP-vel kezelt *vs.* kontroll nőstényeknél ($p < 0,01$; Cohen-féle d értéke $-1,629$); és MPTP-vel kezelt *vs.* kontroll hímeknél ($p < 0,001$; Cohen-féle d : $-2,464$). Számításaink során egy metabolit arányt is meghatároztunk mind a négy csoportban, és az értékeket összehasonlítottuk kétutas ANOVA és Tukey HSD *post hoc* tesztekkel. Jelentősen nőtt a számított (DOPAC + HVA)/DA arány (DA turnover) a kezelés ($F(1, 52) = 26,129$; $p < 0,001$; $\omega^2 = 0,0538$) hatására, de a biológiai nem ($F(1, 52) = 1,842$; $p = 0,181$) és a kezelés *vs.* nem interakció eseteiben nem ($F(1, 52) = 0,779$; $p = 0,382$). A Tukey HSD *post hoc* teszt szignifikánsan megnövekedett DA turnovert mutatott az MPTP-vel kezelt *vs.* kontroll nőstényeknél ($p < 0,05$; Cohen-féle d értéke $1,335$); és MPTP-vel kezelt *vs.* kontroll hímeknél ($p < 0,001$; Cohen-féle d értéke $1,438$).

Az egér plazma (HPLC-DSD metodika) és a striatális mintákból (HPLC-FLD módszer) történt αT meghatározás eredményeit az alábbiakban részletezzük. Az alkalmazott kétutas ANOVA teszt szignifikáns változást igazolt a plazma αT szintjében a kezelés szempontjából ($F(1, 52) = 18,227$; $p < 0,001$; $\omega^2 = 0,0396$), de a biológiai nem ($F(1, 52) = 0,006$; $p = 0,938$) és a nem *vs.* kezelés interakció vonatkozásaiban nem ($F(1, 52) = 0,115$; $p = 0,736$). A páronként összehasonlításokhoz használt Tukey HSD *post hoc* teszttel végzett elemzés szignifikánsan csökkent αT koncentrációt mutatott az MPTP-vel kezelt *vs.* kontroll nőstényeknél ($p < 0,05$; Cohen-féle d értéke $-1,958$); továbbá az MPTP-vel kezelt *vs.* kontroll hímeknél ($p < 0,05$; Cohen-féle d értéke $-0,829$). A striátum tekintetében szignifikáns különbség volt a nemek között ($F(1, 52) = 29,680$; $p < 0,001$; $\omega^2 = 0,0055$), de a kezelés szempontjából ($F(1, 52) = 2,543$; $p = 0,117$) és a nem *vs.* kezelés interakció esetén nem volt ($F(1, 52) = 0,029$; $p = 0,865$). A Tukey HSD *post hoc* teszt szignifikánsan magasabb αT koncentrációt mutatott ki a kontroll nőstény *vs.* hím

egerek esetén ($p < 0,01$; Cohen-féle d értéke 1,811), valamint az MPTP-vel kezelt nőstény vs. hím egereknél is ($p < 0,01$; Cohen's d értéke 1,261).

Azt illetően, hogy az endogén αT tartalom befolyásolhatja-e a DA szint változását az MPTP kezelés során, az adatokat ANCOVA elemzésnek vetettük alá. Ennek a komplex statisztikai elemzésnek az eredményei azt mutatták, hogy az MPTP kezelés szignifikánsan befolyásolja a striatális DA szintet ($F(1, 52) = 8,689$; $p < 0,01$; részleges $\eta^2 = 0,761$), de a striatális endogén αT szint nem volt szignifikáns hatással sem a DA szint alakulására ($F(1, 52) = 0,487$; $p = 0,488$), sem az MPTP kezelést követő DA szint csökkenésén sem (interakciójuk; $F(1, 52) = 1,879$; $p = 0,176$). E megállapítások megerősítéséhez mindegyik csoportban korrelációs elemzéseket végeztünk, amelyek hasonlóan nem mutattak szignifikáns összefüggést a striatális DA és az αT szintek között (Pearson R^2 és p értékek a Bonferroni korrekció előtt: kontroll nőstények: 0,0069 és 0,779; kontroll hímek: 0,036 és 0,495; MPTP-vel kezelt nőstények: 0,023 és 0,603; MPTP-vel kezelt hímek: 0,369 és 0,028).

5. Diskusszió

A tokoferolok különleges szerepet játszhatnak az antioxidáns védelemben a lipidben gazdag szövetekben, például a KIR-ben. Mivel az agy működése egyértelműen hanyatlik az idő múlásával, számos kutatás vizsgálta, hogy az exogén αT rendelkezik-e neuroprotektív hatással. Az endogén tokoferolszintek változásairól azonban csak korlátozott mennyiségű adat áll rendelkezésre humán vagy rágcsáló agymintákban az életkor vonatkozásában. Ezért különösen fontos az αT szintek életkorhoz kapcsolódó változásainak mélyrehatóbb kutatása. Az egyértelmű trendek azonosítása bizonyos agyi régiókban és a két nemből segíthet megérteni az oxidatív károsodásokkal szembeni érzékenység különbségeit. A humán kutatások mellett a rágcsálók ezirányú vizsgálata is releváns lehet, figyelembe véve azt a tényt, hogy a neurodegeneráció preklinikai kutatásainak legtöbb vizsgálatát ebbe az alcsaládba tartozó állatokon végzik.

Ennek megfelelően a jelen dolgozat egyik célja az volt, hogy megfelelő metodikai fejlesztések és validálások után a C57Bl/6 egértörzs egyedének agyi αT szintjének régió-, életkor- és nemspecifikus változásait meghatározzuk. Vizsgálatunkat ezenkívül a plazma minták bioanalízisével egészítettük ki, hogy meg lehessen ítélni a perifériás változások lehetséges hatását az agy αT szintjére. Az eredmények azt mutatták, hogy az agy αT koncentrációja szignifikánsan emelkedett a striátumban, az agykéregben és a hippokampuszban, méghozzá életkorral monoton mértékben mindkét nemből. Ez a növekedés nőstényekben kifejezettebb

mértékű volt és az eltérés nagysága az életkorral együtt nőtt az összes fent említett agyi régió esetében. A plazma minták tekintetében nem volt egyértelmű tendencia, szignifikáns különbséget csak a 16 és 66 hetes hímek között találtunk. E tanulmányunk újdonsága az, hogy a striatális αT szint ilyen kifejezett emelkedést mutat, miközben az agytörzs αT szintje nem változik, továbbá elsőként jelenthetjük ki, hogy a nemek közötti különbség az öregedéssel jelentősen növekszik a striátum, agykéreg és hippokampusz régiókban.

A PK a második leggyakoribb neurodegeneratív megbetegedés a világon, amely növekvő prevalenciát mutat az idősebb társadalomban és azon belül férfiaknál gyakrabban fordul elő. E jelenségeket, vagyis a nigrostriatális károsodás fokozódását az életkorral és a férfiak fokozott érintettségét, a PK MPTP állatkísérletes modelljeinek eredményei is több alkalommal bizonyították. Bár számos kutatás feltételezi a nemi hormonok lehetséges szerepét jelen megállapítások mögött, e tapasztalati tényre a mai napig nincs pontos magyarázat.

Kutatócsoportunkat elgondolkodtatta, hogy vajon a striatális, magasabb αT szint legalább részben megmagyarázhatja-e a C57Bl/6 nőtény egerek csökkent érzékenységét a PK MPTP modelljében. Ezt a hipotézist, vagyis azt, hogy a nőtények szignifikánsan nagyobb striatális αT szintje korrelál-e az MPTP-intoxikációt követően a striatális DA szintjének csökkenésével, még soha nem tesztelték. Ennek megfelelően a következő tanulmányunk célja annak megvizsgálása volt, hogy az endogén striatális αT szint nemi különbségei befolyásolják-e az MPTP-vel kezelt C57Bl/6 nőtény és hím egerek csökkent DA szintjeit.

Ezt megelőzően azonban egy EKD-vel csatolt HPLC módszert fejlesztettünk ki bizonyos biogén aminok és azokkal kapcsolatos egyes vegyületek szimultán meghatározására 3 BS adaptálásával. A módszert optimalizáltuk, hogy a lehető legjobb érzékenység és szelektivitás mellett tudjunk dolgozni. A sikeres fejlesztés és validálási folyamat elvégzése után az eredményeink azt mutatták, hogy az MPTP-vel kezelt nőtény és hím egerek striatális DA szintjei szignifikánsan, 39%-ra, illetve 15,4%-ra csökkentek a megfelelő kontrollokhoz képest. Az MPTP-intoxikációra való érzékenységben tapasztalt különbség összhangban van az irodalmi adatok többségével. Bár a DA turnover jelentősen nőtt az MPTP-vel kezelt egerekben a kontrollokhoz képest, de a nemek között nem volt kimutatható különbség. A striatális αT szinteket illetően a jelenlegi vizsgálat eredményei megerősítették korábbi eredményeinket. Meglepő módon, de a korábbi megállapításokkal egyhangúlag, a striatális αT szinteket egyik kezelt csoportban sem befolyásolta az MPTP kezelés, azonban a plazma αT koncentrációk mindkét nemnél szignifikánsan csökkentek. Figyelembe véve, hogy a bioanalitikai vizsgálatokhoz a mintákat 7

nappal az akut MPTP intoxikációt követően nyertük, úgynevezett redisztribúció történhetett a periférián a központi idegrendszer felé, mely az agyi oxidatív sérülésének részleges megakadályozását segíthette elő. Tanulmányunk következő részében statisztikai modellépítéssel felmértük, hogy a fent részletezett 2 paraméter között lehetséges-e bármilyen kapcsolatot kimutatni, vagyis azt, hogy az emelkedett striatális α T koncentráció képes-e védelmet nyújtani az MPTP-indukált neurotoxicitás ellen. Az alkalmazott statisztikai elemzések azonban nem mutattak ki szignifikáns kapcsolatot közöttük, ezért a hipotézisünk nem nyert bizonyítást.

Az eredmények tükrében megerősíthetjük, hogy az endogén α T nem játszik jelentős szerepet az MPTP által kiváltott neurotoxicitás gátlásában. Mindenesetre a nőstény egerek nigrostriatális MPTP-toxicitással szembeni csökkent érzékenysége mögött álló tényezők feltárása további vizsgálatoknak adhat alapot, melyek nagyban elősegíthetnék új, célzott terápiák kifejlesztését. Ezenkívül az antioxidáns védelem ezen aspektusának mélyebb áttekintése klinikai jelentőséggel is bírhat, azaz segíthet az életkorral összefüggő patogenetikai folyamatok elleni terápiás stratégiák kidolgozásában, elsősorban a megváltozott agyi antioxidáns homeosztázis helyreállítására összpontosítva.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretném hálámat kifejezni Dr. Vécsei László és Dr. Klivényi Péter Professzor Uraknak, amiért lehetővé tették számomra a szegedi Neurológiai Klinikán a tudományos munkámat. Hálás köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Zádori Dénesnek, amiért munkám során bátorított és kiemelkedő tudományos hozzáállásával formálta a gondolkodásmódom. Hálás vagyok továbbá Dr. Veres Gábornak is, aki megismertette velem az elválasztástudomány e szép, de nehéz világát. Ezúton is szeretnék köszönetet mondani Cseh Edinának a rengeteg szakmai tanácsért. Szívből jövő köszönetemet kiérdemelték kedves kollégáim, akik szakértelmüket, idejüket adták az állatkísérletek kivitelezésében, továbbá a labormunkák során jópárszor a kezem alá dolgoztak: Martos Diána, Dr. Maszlag-Török Rita, Polyák Helga, Fülöpné Dr. Bohár Zsuzsanna, Dr. Boros Fanni, Spekker Eleonóra, Vágvölgyi-Sümege Evelin, Szabó Csilla, Keszégné Vörös Gabriella és Lukács Erzsébet. Egykori szakdolgozómnak, Dr. Hadady Leventének sem lehetek elég hálás, aki orvostan hallgatóként tudományos kutatási tevékenységét mindvégig lelkiismeretesen és kitartóan végezte. Végül, de nem utolsósorban, szüleimnek, testvéremnek, nagyszüleimnek és páromnak örök hálával tartozom szeretetükért, megértésükért, bátorításukért és kitartó támogatásukért.