

Szakdolgozat

HASENFRATZ ANDRÁS CSABA

2016

Nyugat-magyarországi Egyetem  
Természettudományi és Műszaki Kar  
Biológia Intézet

**NMDA-receptor mediálta toxicitás vizsgálata csirke  
neuronális tenyészeteken**

Dr. Molnár Péter  
egyetemi docens

Hasenfratz András Csaba  
Biológia B.Sc.

Szombathely  
2016

## Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke .....	4
2	Bevezetés.....	5
3	Célkitűzések .....	6
4	Irodalmi áttekintés.....	7
4.1	NMDA Receptor .....	7
4.1.1	Glutamát transzmitterrendszer .....	8
4.1.2	Glutaminsav receptorok .....	11
4.1.3	NMDA receptor szerkezete.....	12
4.1.4	NMDA receptor elektrofiziológiája .....	13
4.1.5	NMDA receptor farmakológiája .....	14
4.1.6	NMDA receptor szerepe a fiziológiában, és a patológiában.....	15
4.2	Excitotoxicitás .....	17
4.3	Neuroprotekción.....	22
5	Anyagok és módszerek .....	24
5.1	Sejtek eredete .....	24
5.2	Csirke kortikális neuron tenyészet.....	24
5.3	Tenyészfelület optimalizálása .....	24
5.4	Anyagadás .....	25
5.5	Értékelés .....	25
6	Eredmények.....	26
6.1	Kísérlet 1. ....	26
6.2	Kísérlet 2. ....	27
6.3	Kísérlet 3. ....	29

6.4	Kísérlet 4. ....	31
6.5	Kísérlet 5. ....	32
6.6	Kísérlet 6. ....	34
7	Megvitatás .....	36
8	Összefoglalás.....	39
9	Summary .....	40
10	Köszönetnyilvánítás .....	41
11	Referenciák .....	42

## 1 Rövidítések jegyzéke

AMPA:	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-izoxazol-propionát
ATP:	adenozin-trifoszfát
D-APV:	D-2-Amino-5-foszfonovalerát
ER:	endoplazmás retikulum
GABA:	$\gamma$ -aminovajsav
GluR:	glutamát receptor alegység
KA:	kainsav receptor alegység
KAIN:	kainsav
MK-801:	(5R,10S)-(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]cikloheptén-5,10-imin
NMDA:	N-metil-D-aszpartát
NO:	nitrogén-monoxid
NR:	NMDA receptor alegység
PLL:	poly-l-lizin

## 2 Bevezetés

Az agyműködés elve mindig is erősen mozgatta a fantáziámat, amelynek köszönhetően a szakdolgozati témám is a neurobiológia tárgykörébe tartozik. Napjainkban a cerebrovaszkuláris betegségek prevalenciája, továbbá az egyéb etiológiájú neuropszichiátriai betegségek kellőképpen megalapozzák a neurobiológiai kutatások létjogosultságát. Az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptoron keresztül történő excitotoxikus agykárosodás valamennyi kórkép közös vonásaként sújthatja az agyszövetet. A következő betegségekben tulajdonítanak szerepet az NMDA receptornak: agyi sérülés, alkoholemegvonás, cerebrovaszkuláris betegségek, demencia, epilepszia, Parkinson-kór, szkizofrénia, és limbicus encephalitis. Emellett szerepel a krónikus fájdalom okozta centrális szenzitizációban, továbbá bizonyos fájdalmak esetén az analgetikus farmakonok támadáspontjaként. Az ide tartozó kórképek a következő tudományterületek tárgykörébe tartoznak: neurológia, pszichiátria, addiktológia, traumatológia, és onkológia. Látható, hogy e betegségek az orvostudományon belül multidiszciplináris spektrumot ölelnek fel, amely véleményem szerint megadja az ez irányú kutatások relevanciáját. A hatékony NMDA receptor blokkolók azonosítása bizonyos kórállapotok esetén nagyban hozzájárulhat az agykárosodás mérsékléséhez, vagy a szupportív kezeléshez. A kísérleti feltételek optimalizálása, valamint a költségek redukálása a jövőbeli kutatások egyszerűsítése révén segítheti az előrelépést. Az NMDA receptor nem csak patológiai aspektusból, hanem a fiziológiát illetően is releváns eleme az agyműködésnek, tekintve, hogy a következő folyamatokban szintén érintett: szinaptikus plaszticitás, memória, és tanulás. Reményeim szerint agyunk rejtélyekkel telített funkcionalitása a közeli jövőben megvilágosul számunkra, ami az ismeretlen megfejtésével járó csodálat átélése mellett sok probléma, illetve szenvedés felszámolására kínál majd lehetőséget.

### **3 Célkitűzések**

A szakirodalmat átböngészve azt találtuk, hogy ez idáig cerebrokortikális eredetű NMDA receptorral kapcsolatos farmakológiai kísérleteket csak emlős fajon végeztek, ezért a bennünk felmerült hipotézis, miszerint releváns lenne a csirke neuronális tenyészetben való NMDA toxicitás vizsgálat megalapozottnak látszott. Továbbá a szakirodalmat tanulmányozva nem találtunk olyan kutatást, amely a Na<sup>+</sup> csatorna blokkoló lidocain esetleges neuroprotektív hatását vizsgálta volna.

Ezért a következő célokat tűztük ki:

- 1) Az NMDA receptor neurotoxicitásban játszott szerepének, valamint az NMDA toxicitás kísérletes vizsgálati lehetőségeinek áttekintése az irodalom alapján.
- 2) NMDA által kiváltott toxicitás vizsgálatára alkalmas módszer beállítása, és optimalizálása csirke kortikális tenyészeteken.
- 3) A lidocain esetleges neuroprotektív hatásának vizsgálata.

## 4 Irodalmi áttekintés

### 4.1 NMDA Receptor

Az agyban a serkentő neurotranszmitterek közül a glutamát fordul elő a legnagyobb mennyiségben. Hatását különböző receptorokon keresztül fejti ki. Ezek közé tartozik az ionotrop NMDA receptor, amely a nevét szelektív agonistájáról, az N-methyl-D-aszpartátról kapta. Az NMDA receptor egy négy alegységből álló tetramer fehérje, amely az aktiváció során egy nem-szelektív transzmembrán ioncsatornát formál. A receptornak több izoformája expresszállódik a különböző agyterületeken, amely az alternatív splicing által valósul meg. A receptor aktivációjához glutamát, és glicin kötődése szükséges. Azonban a receptor feszültségfüggő működéséből adódóan nem elegendő csupán a ligandumok kötődése, hanem egyéb ioncsatornák révén történő depolarizáció is szükséges a transzmembrán rész megnyílásához, amely a  $Mg^{++}$  ionok kilökődése által valósul meg. Ha a posztszinaptikus sejt ismételten depolarizálódik, és az NMDA receptor ioncsatornája megnyílik, akkor bekövetkezhet a neuron hosszú távó potenciációja (LTP). Ehhez azonban a nyitási feltételek (glutamát és glicin, valamint depolarizáció egyéb ioncsatornán keresztül) egyidejű fennállása szükséges. Ezen kettős feltételű aktivációnak köszönhető, hogy az NMDA receptor szerepet játszik bizonyos idegi folyamatokban, például a memóriában (Réthelyi, 2011).

Azonban az alacsony frekvenciájú ingerlés nem generál olyan mértékű depolarizációt, hogy megnyíljanak az NMDA receptorok ioncsatornáit. Magas frekvenciájú ingerlés hatására viszont az  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-izoxazol-propionát (AMPA) receptorok által kiváltott nagy ingerlő posztszinaptikus potenciál (EPSP) a felszabadult glutamáttal együtt hatva már megnyitja az NMDA receptorok csatornáit. Az NMDA receptor formálta ioncsatornán keresztül különböző kationok ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ) vándorolnak. A  $Ca^{++}$  koncentráció sejten belüli megnövekedése egy bizonyos szint felett aktiválja a  $Ca^{++}$ /kalmodulin kinázt. A kináz autofoszforylációt végez, és az intracelluláris  $Ca^{++}$  koncentráció nyugalmi szintre való visszatérése után is működik, amely lehetővé teszi a hosszan tartó hatások kialakulását, illetve a később érkező impulzusokkal szemben érzékenyíti a sejtet (Fonyó és Ligeti, 2008).



#### 4.1.1 Glutamát transzmitterrendszer

A glutaminsav a serkentő, és a gátló aminosavakkal, továbbá az acetilkolinnal, és a szerotoninnal együtt a klasszikus transzmitterek I. típusába tartozik. Az acetilkolin, valamint a szerotonin csak meghatározott receptorokhoz való kötődés esetén szerepeltethető ebben a kategóriában. Az I. típusba tartozó serkentő, valamint a gátló aminosavakra a gyors ingerületátvitel jellemző. Az I. típus tagjai képezik a fő neurotranszmittereket. Alfabetikus sorrendben a neurotranszmitterek II. típusába tartozik az acetilkolin, a dopamin, a noradrenalin, és a szerotonin. Az ebbe a típusba tartozó neurotranszmitterek lassabb, és döntően regulátor hatásúak. A neurotranszmitterek III. típusába főképp neuropeptidek tartoznak, amelyek az előző két típus tagjaival együtt fordulnak elő, és neuromodulátor hatást fejtenek ki az érintett szinapszisokban. Megközelítően az agyi szinapszisok 80%-ban a glutaminsav, illetve az aszparaginsav által valósul meg a neurotranszmisszió. Glutamáterg transzmisszióval rendelkeznek a következő struktúrák: a neokortex fő sejtjei, a hippocampusz fő sejtjei, a pályákat képező principális piramissejtek, és a talamusz relé sejtjei. Glutamáterg transzmisszió az előbbi struktúrákon kívül egyéb magcsoportokban is igazolható. Figyelemre méltó az a tény, hogy a központi idegrendszerben szinte minden idegsejt hordoz glutaminsav szenzitív receptorokat. Azok az aminosavak, amelyek serkentő neurotranszmitterként szerepelnek két anion csoporttal, valamint egy kation csoporttal rendelkeznek. A receptor-ligand kötés létrejöttének releváns eleme, hogy a karboxilcsoporthoz viszonyítva egy aminocsoport alfa pozícióban helyezkedjen el, továbbá minimum 2-3 szénatom forduljon elő az előbbieket és a második savas karakterű molekularész között. A második karboxilcsoport szulfátcsoporttal történő szubsztituálását követően a transzmitter hatékonysága fokozódik. Ezek alapján arra lehet következtetni, hogy a glutaminsav agonista transzmitterek receptorhoz kötődése három ponton valósul meg. A glutaminsav intracelluláris kompartmentizációja térbeli, és funkcionális alapokon nyugszik. Az un. metabolikus készlet a neuronok szómájának citoplazmájában helyezkedik el alfa-ketoglutársav, valamint glutamin jelenlétében. A transzmitterként funkcionáló glutaminsav az aszimmetrikus szinapszisok axonterminálisainak szinaptikus vezikuláiba lokalizálódik. A citoplazmában

elhelyezkedő glutaminsav többek között peptidláncképző, GABA prekursor molekula, valamint lényeges eleme az ammónia detoxikációnak. A glutaminsav vér-agy gáton történő penetrációja elhanyagolható. A szintézis a neuronokban zajlik elsősorban mitokondriumhoz kötötten. A szintetizáció főleg a dikarbonsav ciklushoz kapcsoltn történik glükózból, de a glutaminból való szintézis is számottevő. A termelt glutaminsav mennyiség pozitívan korrelál a glükóz, és az axonterminálisok glutamin koncentrációjával. A glutaminból történő szintézist a foszfát-aktivált glutamináz katalizálja, amely enzim  $\text{Ca}^{++}$  szignállal aktiválódik, glutaminsav hatására pedig gátlódik. Az aszpartát-aminotranszferáz oxálecetsavból képez glutaminsavat aszparaginsav jelenlétében. Az ornitinból történő glutaminsav szintézist az ornitin transzferáz katalizálja egy közti termék közbeiktatásán keresztül. A metabolizmusban releváns még a glutaminszintáz, amely az asztrocitákban, és az oligodendrocitákban található. Funkciója a glutaminsavból történő glutaminszintézis. A szinaptikus résbe kerülő glutaminsav kisebb része reuptake által az axonterminálisba transzlokálódik, vagy a posztzinaptikus sejtbe helyeződik. A glutaminsav nagyobbik része a gliajestekbe transzportálódik, és a glutaminszintáz által glutaminná alakul. Ezen átalakulást követően a glutamin visszakerül a glutamáterg neuron axonterminálisába, ahol foszfát-aktivált glutamináz hatására ismét glutaminsavvá alakul. A glutaminsav-dehidrogenáz egy a mitokondriumokban található enzim, amelynek funkciója a glutaminsav alfa-ketoglutársavvá, és ammóniává alakítása. Az átalakulás irányát a metabolitok koncentrációja határozza meg. Glutamáterg neuronokban a disszociáció irányába terelődik, ellenben GABA-erg idegsejtekben a glutaminsav szintézis felé tart a folyamat. A vezikulák glutaminsavval történő feltöltését vezikuláris transzporter végzi, amely folyamat  $\text{Mg}^{++}$ , adenzin-trifoszfát (ATP), és proton igényes. A vezikuláris transzporter 12 transzmembrán doménnel rendelkezik. A sejtmembránba lokalizálódó szintén glutaminsavat transzlokáló transzportertől azonban eltérő szerkezetű. A transzporter glutaminsavra specifikus, tehát aszparaginsavat nem transzlokál a vezikulába. A gliális, és a neuronális membránba lokalizált transzportereknek öt családja ismert (neuron: EAAT3, EAAT4, EAAT5; glia: GLAST, GLT1), amelyek L-glutaminsavat, valamint L-aszparaginsavat transzportálnak az

elektrokémiai gradienssel szemben. Utóbbi transzportereknek nyolc transzmembrán doménjük van. Az M3-M4 domének között extracellularis hurok, továbbá intracellularisan lokalizációdó N, illetve C terminális jellemző rájuk. A vezikuláris tárolás ATP igényes, és egyben elektrogén folyamat. Protontranszport hiányában a glutaminsav eliminálódik a vezikulákból. A glutaminsav mellett egyéb transzmitterek is jelen lehetnek a vezikulákban, amelyek általában peptidek. A gerincvelői hátsó szarv esetében P anyag kolokalizációjára van ismert precedens. A glutaminsav felszabadulása  $Ca^{++}$  szignál hatására következik be, amely szignál multifaktoriális befolyás alatt áll. Többek között egyéb transzmitterek modifikációja érvényesül preszinaptikus receptorokon keresztül hatva. Például az adenosin  $A_1$  receptorokhoz kötődve a glutaminsav felszabadulásra nézve gátló hatást fejt ki a  $Ca^{++}$  citoplazmába irányuló fluxusának csökkentésével. A noradrenalin preszinaptikus  $\alpha_2$  receptorokon keresztül, a gamma-aminovajsav (GABA) a metabotrop  $GABA_B$ -receptorokon át, az acetilkolin pedig  $M_2$ -receptorok által mediálva fejt ki gátló hatást a glutaminsav felszabadulásra. További gátló hatású anyagok: neuropeptid Y, galanin, valamint a hisztamin. A nikotinos acetilkolin receptorok, valamint a  $P2_X$ , és az  $A_{2A}$  receptorok a megfelelő transzmitter bekötődésekor excitációs hatást közvetítenek. A glutaminsav ürülése  $Ca^{++}$  independens módon is bekövetkezhet, amely főképp patológiás állapotokban észlelhető, például agyi iszkémiában, illetve drog hatása alatt. Ezekben az esetekben megfordulhat a transzporterek működése. A gliális, és vezikuláris transzporterek  $Na^+$ , és egyidejűleg  $H^+$  bekötődését igénylik a transzport elvégzéséhez. A  $K^+$  intracellularis szintjének emelkedése serkentőleg hat a transzportra, ellenben ha a  $Na^+$  sejten belüli koncentrációja növekszik, akkor transzport irányt változtat, és glutaminsav ürülés következik be. A sejten belüli  $Na^+$  koncentráció növekedése például agyi hipoxiában fordulhat elő. A transzporter egy ciklus alkalmával két  $Na^+$ -ot a citoplazmába, egy  $K^+$ -ot pedig az extracellularis térbe transzlokál (Világi, 2003).

### 4.1.2 Glutaminsav receptorok

A glutaminsav ionotrop, és metabotrop receptorokon keresztül fejt ki hatását. A receptorok preszinaptikus, és posztszinaptikus lokalizációban is előfordulnak. A glutaminsav, illetve az aszparaginsav mellett egyéb aminosavak is képesek kötődni a receptorokhoz, amelyek közül egyesek erősebb receptor aktiváló hatással rendelkeznek, mint a két említett transzmitter. Az ionotrop receptorok két csoportra oszlanak. Megkülönböztetünk NMDA típusú receptorokat, és nem-NMDA típusúakat. Az utóbbi csoport két alcsoportra osztható: AMPA receptorok, és kainsav (KAIN) receptorok (1. táblázat). Eddig 15 génről van tudomásunk, amelyek az ionotrop receptorok fehérjéit kódolják. A kódolt fehérjék funkciója alapján a géneket 3 csoportba klasszifikálják: AMPA, KAINÁT, és NMDA receptorszerkezetet kialakító gének. Ez idáig 8 génről van tudomásunk, amelyek metabotrop receptort kódolnak (mGluR1-mGluR8). Ezek termékei a 7 transzmembrán domént tartalmazó (7TM) receptorok, amelyek farmakológiájuk, és jelátviteli mechanizmusaik szerint 3 csoportra oszlanak. Az ionotrop receptorok esetében 4 alegység valószínűsíthető. Egy alegység 4 szegmentumból épül fel (M1-M4), amelyek az M2 szegmentum kivételével transzmembrán domének. Az M2 domén az intracellularis oldal irányában visszahajlik. Az M3-M4 domének között extracellularis hurok található. Az N-terminális extracellularis, a C-terminális pedig intracellularis lokalizációjú. Az N-terminális, és az extracellularis hurok képezi az agonista kötőhelyet, továbbá a két egység glikozilációs helyekben is bővelkedik. A C-terminálison foszforilációs részek találhatóak. Az egymás irányába forduló négy darab M2 szegmentum feladata az ionáteresztő pórus kialakítása. A pórus transzmitter általi aktiváció hatására konformációváltozáson keresztül nyílik meg. Nyugalmi helyzetben zárt állapotban található. A csatornákon allosztérikus helyek is találhatóak, amelyek a csatorna működésére nézve modulációs hatásúak. A nem-NMDA receptorok alegység kompozíciója többféleképpen adódhat. Ennek oka a különböző alegységek változatos kombinációs lehetőségeiben rejlik. E receptortípus esetében GluR1-GluR7, és KA1-KA4 alegységek különíthetők el. Az NMDA receptorok két típusra oszlanak: NR1, és NR2. A két típushoz különböző funkciók rendelhetők, és további altípusokat

tartalmaznak (NR1, NR2A-NR2D). Egy glutaminsav receptor a formáját tekintve lehet homo-oligomer, és hetero-oligomer. Előbbi esetben azonos alegységekből, utóbbi esetben pedig különböző alegységekből áll össze a receptor. A hetero-oligomer receptorok farmakológiai, valamint elektrokémiai tulajdonságaikat tekintve rendkívül változatosak (Világi, 2003).

Ionotrop			Metabotrop		
NMDA	nem-NMDA		I.	II.	III.
NR1	AMPA	KAIN	mGluR1	mGluR2	mGluR4
NR2A	GluR1	GluR5	mGluR5	mGluR3	mGluR6
NR2B	GluR2	GluR6	---	---	mGluR7
NR2C	GluR3	GluR7	---	---	mGluR8
NR2D	GluR4	KA1	---	---	---
---	---	KA2	---	---	---

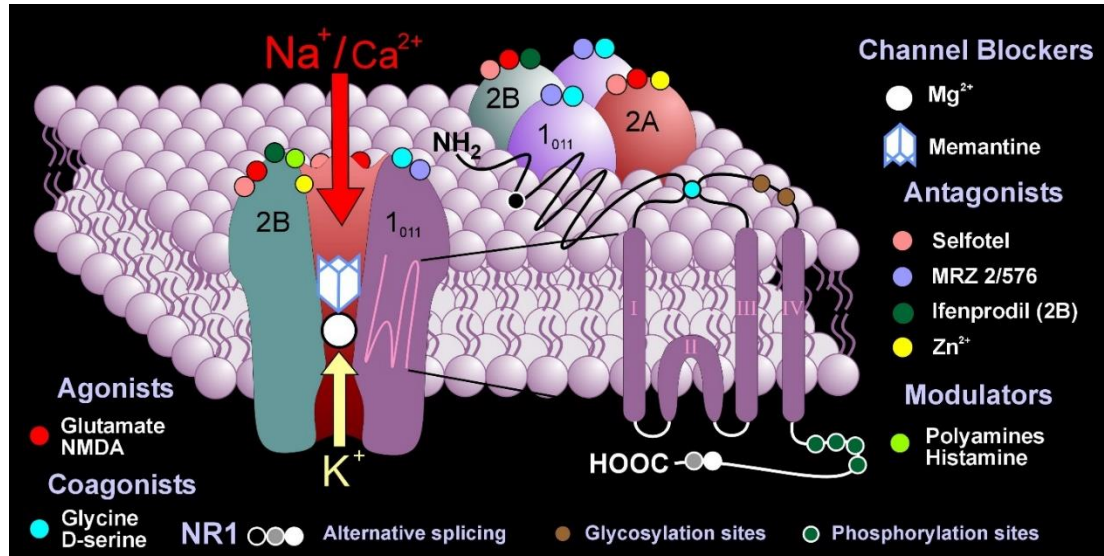
1. táblázat. Glutaminsav receptorok, és alegységeik. Színezett cellák: receptor típusok. Fehér cellák: alegységek (Világi, 2003 nyomán).

#### 4.1.3 NMDA receptor szerkezete

Az NMDA receptor alegységeket öt gén által kódoltak, a változatosságukat pedig több vágási variáns növelheti. Az alegységek két fő típusa: NR1, és az NR2. Az NR2 típus tovább oszlik 4 altípusra: NR2A, NR2B, NR2C, NR2D. A csak NR1 alegységekből összeálló homo-oligomer ioncsatorna működik ugyan, de az áramátviteli tulajdonságaiban különbözik a natív receptoroktól. Csak NR2 alegységekből működőképes csatorna nem alakul ki, azonban ha NR1 alegységből legalább egy beépül, akkor az áramátvitel már megvalósul. Ezekből következik, hogy az NR1 alegység relevanciája alapvető a csatorna működése szempontjából, az NR2 alegység pedig modulációs hatású elsősorban. Az NR1 alegység aminosavszáma 931, az NR2 alegység pedig 1250-1450. Az NR1 alegység a GluR alegységekkel 25-28%-ban homológ, az NR2 alegység altípusokkal pedig kevesebb, mint 20%-os homológiát mutat. Az NR2, és a GluR alegységek homológiája körülbelül 50%. Az NR1 alegység

illesztési variánsainak száma 8, ebből 3 esetben C-terminális deléció, 4 esetben pedig N-terminális beépülés áll a háttérben (Világi, 2003).

Az NMDA receptor szerkezete, és a kötőhelyek az 1. ábrán tanulmányozhatók.



1. ábra. Az NMDA receptor és kötőhelyei (Webreferencia 1.)

#### 4.1.4 NMDA receptor elektrofiziológiája

Az NMDA receptor nyitott csatornáján keresztül Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, és Ca<sup>++</sup> ionok vándorolnak. A sejten belüli Ca<sup>++</sup> koncentráció alakulását illetően az NMDA receptor alapvető szereppel bír. A nem-NMDA típusú receptorokhoz hasonlóan egyéb kétértékű ionok is átmehetnek a csatornán: Ba<sup>++</sup>, Sr<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, és Mg<sup>++</sup>. Azonban ezen ionok permeabilitási tényezője eltér az AMPA receptorok esetében tapasztalhatótól. Nyugalmi membránpotenciál fennállásakor az NMDA receptor ioncsatornájának belsejébe kötődik egy Mg<sup>++</sup> ion. Amennyiben a membránpotenciál csökkenés eléri megközelítően a -35 mV-os értéket, a Mg<sup>++</sup> ion kiszabadul a csatorna belsejéből, amely ezáltal más ionok számára átjárhatóvá válik. Gyors nyitási-zárási folyamat esetén a Mg<sup>++</sup> ion rendszeres ismételt bekötődése zajlik, de a membránpotenciál pozitív irányú eltolódása miatt végül újból leválik. A Mg<sup>++</sup> ion hidratburkának leválási, illetve az újbóli hidratációjának sebessége meghatározza a csatornába kötődés, és a leválás

folyamatát. Mint azt már korábban említettem a receptor aktivációjához glutaminsav kötődése mellett koagonista glicin kötődése is szükséges. A glicin a sztrichnin inszenzitív helyhez kötődik. A glicin amellett, hogy biztosítja az aktiválhatóságot, az inaktivációt lassítja (nyitva tartás ideje nő), továbbá erősíti a glutamát hatását. Ha a glicin koncentráció alacsony, és ezért a kötőhelyek nem teljesen telítettek, a csatorna gyors deszenzitizációja következik be. Amennyiben a glicin kötőhelyek telítve vannak, akkor a csatorna nyitott állapota minimum 90-250 millisecundumig tart (Világi, 2003).

#### **4.1.5 NMDA receptor farmakológiája**

Az NMDA receptor extracelluláris részén, és csatornájának belsejében is találhatóak kötőhelyek a különböző farmakonok részére, amelyek befolyással vannak az ioncsatorna érzékenységre, aktiválhatóságára, és permeabilitására (2. ábra). Az NR2 alegység N-terminálisának, és az M3-M4 domének közti extracelluláris hurok szerkezetének modifikációja befolyással van a glutaminsav kötődésre, azonban a glicin kötésre nézve hatástalan. Az NR1 alegység esetében ugyanezen helyek modifikációja az alegység glicinkötő képességét erősen csökkenti. Ezek alapján mondható, hogy az NR2 alegység a glutaminsav, az NR1 alegység pedig a glicin kötéséért felelős. Az említett két koagonista kötőhelyén kívül egyéb ún. modulációs helyek is jelen vannak az receptoron. Ezen modulációs helyek a következők: poliamin kötőhely, protonérzékeny hely, cink-ion kötőhely, és redox modulációs hely. A glutaminsav kötőhelyen kompetitív antagonisták a 3-((+)-2karboxipiperazin-4-il)-propil-1-foszfonsav, az amino-foszfono-heptánsav, és az amino-foszfono-valeriánsav. A glicin kötőhelynek pedig 7,8-kloro-kinurénsav a kompetitív antagonistája. Ez utóbbi hatására teljesen kiiktatódik az NMDA receptor glutamatra adott válasza. A glicin kötőhely agonistái a D-alanin, és a D-szerin. Utóbbi kettő, mint endogén ligandum is szerepelhet. A csatornába azonos helyre bekötődő antagonisták a következők: ketamine, (5R,10S)-(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]cikloheptén-5,10-imin (MK-801), fenciklidin, és az 1-(2-fenil)ciklohexil-piperidin. Ezek az antagonisták akkor tudnak kötődni, amikor a receptor aktiválódik, és az ioncsatornája megnyílik. A

kötődésük által gátolják a csatornán keresztül folyó ionáramokat. Zárt, illetve inaktív csatornába nem képesek bekötődni. Az NMDA receptor specifikus agonistái: NMDA, glicin, iboténsav, alanin (Világi, 2003).

A pH alakulása az NMDA receptorokra is hatással van. A hidrogén-ionok az NMDA receptor allosztérikus modulátorainak tekinthetők. Fiziológias pH esetén 50%-os tónikus gátló hatást fejtenek ki az NMDA receptorokra. Amennyiben a pH kismértékben savas irányba tolódik, neuroprotektív hatás áll elő, mert ez teljesen gátolni képes a receptor aktivitását. Bázikus irányú eltolódás esetén pedig fokozódik az ioncsatorna működése. Egyes allosztérikus modulátorok úgy hatnak, hogy megváltoztatják a receptor proton szenzitív régiójának logK értékét. Ilyenek például: poliaminok,  $Zn^{++}$  (Boros, 2006).

#### **4.1.6 NMDA receptor szerepe a fiziológiában, és a patológiában**

Az NMDA receptor által bonyolított transzmisszió fontos szerepet játszik a különböző fiziológias, és patológias folyamatokban. Ilyen fiziológias folyamat a szinaptikus plaszticitás, a memória, és a tanulás. Az NMDA rendszer túlműködésének következménye az ún. excitotoxicitás, amelynek lényege a glutamát excesszív felszabadulása következtében fellépő irreverzibilis  $Ca^{++}$  beáramlás, majd apoptózis indukció. Az excitotoxicitásnak a következő kórállapotokban tulajdonítanak szerepet: agyi sérülés, alkoholmegvonás, cerebrovaszkuláris betegségek, demencia, epilepszia, és Parkinson-kór (Réthelyi, 2011).

Az alkohollal kapcsolatos neurológiai zavarok NMDA receptorral való összefüggését jól prezentálja Ahern és mtsai-nak (1994) kísérlete. 100 mM ethanolba helyeztek patkány cerebrokortikális kultúrákat, amelynek hatására növekedett az NMDA neurotoxikus potenciálja, és az NMDA által indukált maximális intracellularis  $Ca^{++}$  szint emelkedés mértéke. A kontroll, és az ethanolal kezelt kultúrák esetében az NMDA toxicitás szoros korrelációt mutatott az intracellularis  $Ca^{++}$  szinttel. A kutatók szerint az NMDA válaszok esetleg tükrözik a krónikus alkohol kitétséghez társuló



neuronális adaptációt, és közreműködhetnek az alkohollal összefüggő neurológiai zavarok patogenezisében (Ahern és mtsai, 1994).

A szkizofréniát az NMDA rendszer alulműködésével hozzák összefüggésbe (Réthelyi, 2011). A ketamine NMDA receptor antagonistá hatású szer (Világi, 2003), amely képes a szkizofrén betegek állapotrosszabbodását előidézni, illetve a tüneteiket súlyosbítani, továbbá képes az egészséges személyek esetében pszichotikus tüneteket kiváltani. Ilyen, illetve hasonló eredmények fényében a szkizofréniára vonatkozóan megfogalmazták az NMDA receptor hipofunkciós modellt (Juhász és Bartkó, 2007).

Az NMDA rendszerrel kapcsolatos kórállapotok között megemlíteném még az agyvelőgyulladás azon fajtáját, amelyet NMDA receptor ellenes autoantitestek termelődése vált ki (Réthelyi, 2011).

A limbikus encephalitis valószínűsíthetően leggyakoribb oka az NMDA receptor ellen termelődő antitestek jelenléte. E betegség, elsősorban fiatal nők esetében, ovariumtumorhoz társulva manifesztálódik. Az NMDA receptor ellenes antitestek kb. 50-60%-ban paraneopláziásak. A nem paraneopláziás ellenanyagokkal társuló limbikus encephalitisok esetében pedig autoimmun eredet feltételezhető (Illés, 2011). A beteg személyek szérumában, valamint a liquorában NMDA receptor ellenes antitestek mutathatók ki (Hollódy és mtsai, 2011).

Az NMDA receptor migrénnel való összefüggését is leírták. Migrén esetében az un. centrális szenzitizáció, azaz a másodlagos nociceptív idegsejtek hiperexcitabilitásának kialakításában az NMDA receptor aktivitásfokozódása (glutamát érzékenység növekedése) is szerepet játszik (Tajti és Vécsei, 2009).

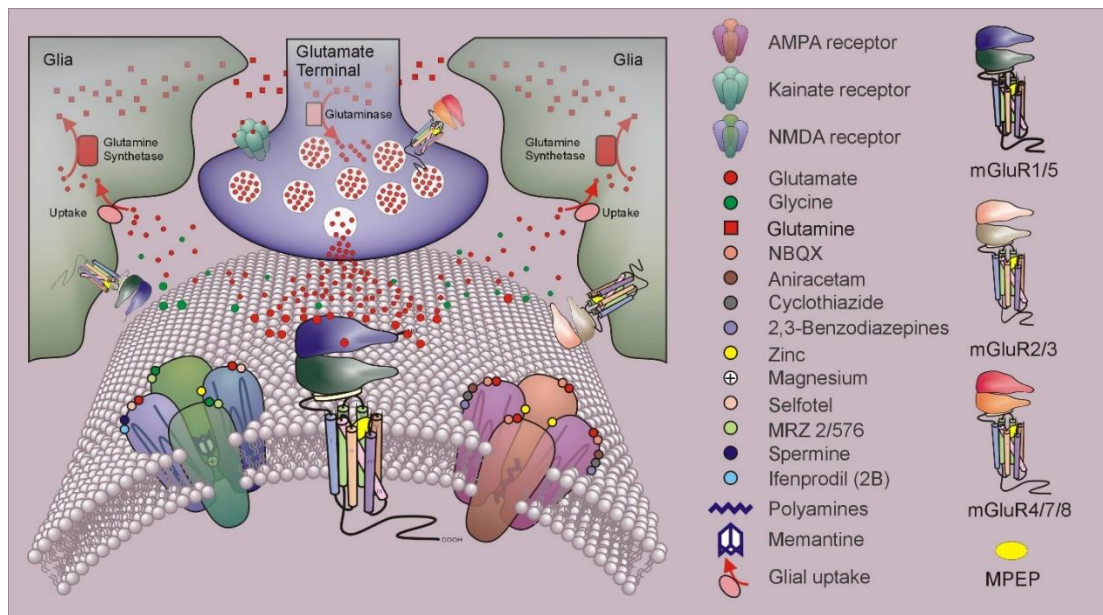
Az NMDA receptor bizonyos analgetikus hatású szerek támadáspontjaként is releváns. A krónikus tenziós típusú fejfájásban javasolt amitriptilin nevű analgetikus farmakon hatásáról feltételezik, hogy a fájdalomcsillapító képessége (egyéb általam nem részletezett hatások mellett) részben az NMDA antagonistá hatásának köszönhető (Tajti és Vécsei, 2006). A mitrazapin nevű antidepresszívum kedvező hatású olyan fájdalomszindrómákban, és tenziós típusú fejfájásokban, amelyek depresszióhoz társulnak. Ezen tulajdonsága kevésbé a fő hatásainak köszönhető, helyettük inkább az NMDA, és az ópiát rendszerekre gyakorolt aktivitásának tulajdonítható (Almási és

Rihmer, 2004). Az NMDA receptorok szerepet játszanak a neuropátiás, illetve krónikus fájdalmak esetén kialakuló centrális szenzitizációban. A ketamin analgetikus hatásának feltételezett magyarázata az NMDA receptor gátlása (Fürst, 2008).

Az NMDA receptorra antagonistá hatású memantin az Alzheimer-kór közepesen súlyos, illetve súlyos stádiumában javasolt készítmény (Kovács, 2009).

A demencia szindrómákhoz társuló viselkedési és pszichés zavarok (BPSD) okozta tünetek kezelésében NMDA antagonisták is alkalmazhatók (Kálmán és mtsai, 2008).

Említésre méltó még a kínai vendéglő szindróma, amely időleges mellkasi fájdalommal, és nyaki merevséggel jár, oka pedig a glutamát fokozott fogyasztása lehet (Gyires és Fürst, 2011).



2. ábra. Az NMDA receptor farmakológiája a hatásmechanizmusok kiemelésével (Webreferencia 2.)

## 4.2 Excitotoxicitás

Az idegrendszer két általános mechanizmus szerint károsodhat: excitotoxicitás, vagy oxidatív stressz által. Az excitotoxicitást excitátoros (izgató) aminosavak okozzák. A glutaminsav már kis koncentrációban is neuronpusztulást indukál a sejt kultúrákban. A

sejtek pusztulása főleg NMDA receptor mediálta szignál hatására következik be, amely pusztulás antagonisták adásával kivédhető. A károsodás együtt jár a sejten belüli  $\text{Ca}^{++}$  koncentráció emelkedésével. Elsősorban AMPA receptorokon keresztül depolarizáció történik, amely feszültségfüggő  $\text{Ca}^{++}$  csatornákat nyit meg. A metabotrop receptorok révén az endoplazmás retikulumból (ER) szabadul fel  $\text{Ca}^{++}$ . A glutamát gyakori, illetve tartós felszabadulása már NMDA receptorokat is aktivál, amely szintén  $\text{Ca}^{++}$  beáramlást eredményez. A glutamát visszavételére a depolarizáció gátló hatással van, ami az extraneurális koncentrációjának növekedését eredményezi. A  $\text{Ca}^{++}$  tartósan magas intracelluláris koncentrációja minimum 4 folyamat elindítója (Gyres és Fürst, 2011).

Ezek a következők:

- Károsodik a mitokondriális energiatermelés, amely a  $\text{Ca}^{++}$  ER-be történő visszavételét, továbbá a kifelé rektifikáló  $\text{Ca}^{++}$  pumpa működését az ATP hiányon keresztül gátolja.
- Fokozódik az aktivitása a  $\text{Ca}^{++}$  dependens proteázoknak, és a  $\text{Ca}^{++}$  dependens lipázoknak.
- A nitrogén-monoxid (NO) szintézis aktivációja következik be. A NO nagy koncentrációban neurodegeneratív, kis koncentrációban pedig neuroprotektív hatású.
- A foszfolipáz  $\text{A}_2$  aktivitásfokozódása által nő a prosztaglandinszintézis, és az arachidonsav felszabadulása.

Iszkémia esetén a mitokondriumba  $\text{Ca}^{++}$  ion felvétel történik, amely potenciál-függő uniporter által valósul meg. A bekerülő  $\text{Ca}^{++}$  ionok hatására a mitokondrium depolarizálódik, amely az ATP-áz működésének gátlásán keresztül csökkenti a sejt ATP készletét. A csökkenő ATP készlet tovább rontja a sejt ionháztartását, valamint a mitokondriális diszfunkció reaktív oxigén gyökök képződéséhez is vezet (Gellért, 2013).

A reaktív oxigéngyökök felhalmozódása az excitátoros aminosavakkal szemben érzékenyíti a neuronokat (Gyires és Fürst, 2011).

A NO reagál az oxigén gyökökkel, és peroxinitritet képez. A peroxinitrit, és a NO káros hatása a sejtalkotókra, a mitokondriális légzés gátlását okozza, elősegíti a további mitokondriális depolarizációt, valamint egyszálú DNS töréseket okoz (Gellért, 2013). A NO szabadon diffundálva eljut a preszinaptikus végződésbe, ahol a guanilat-cikláz aktiválásán keresztül fokozza a cGMP termelést, ami növeli a glutamát felszabadulást (Szilágyi, 2005).

A  $\text{Ca}^{++}$ -függő calpain gátolja a sejtmembrán  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  cserélő pumpáját, ami fokozza a  $\text{Ca}^{++}$  koncentráció növekedését (Gellért, 2013).

A kóros NMDA receptor aktiváció a  $\text{Ca}^{++}$  homeosztázis kisiklását előidézve számos olyan intracelluláris szignálra van közvetlen hatással, amelyek sejthalálhoz vezetnek. Például a CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein) transzkripciós faktor defoszforilációja által elnyomja a túlélési szignálokat (Gellért, 2013).

Azonban számos olyan mechanizmus is működik, amelyek az excitotoxicitásra nézve közömbösítő hatásúak. A legfőbb ilyen mechanizmus a mitokondriális energiatermelés megőrzése, amely a membránpotenciál fenntartása, a kifelé rektifikáló  $\text{Ca}^{++}$  pumpa működtetése, és az ER-be történő  $\text{Ca}^{++}$  visszavétel fokozása által fejt ki közömbösítő hatást. Emellett olyan folyamatok is aktiválódnak, amelyek a szabadgyököket semlegesítik: glutationrendszer, szuperoxid-dizmutáz (SOD), és kataláz (Gyires és Fürst, 2011).

A  $\text{Ca}^{++}$  intracelluláris szintjének emelkedése nem kizárólagos oka a neurotoxitásnak, hanem egyéb tényezők is befolyással bírnak a degenerációra illetően. Jó példát szolgáltat erre Li és mtsai-nak (1996) kísérlete, amelyben a hiperglikémia utáni iszkémiában csökkent mértékű  $\text{Ca}^{++}$  választ tapasztaltak a normoglikémia utáni esetekhez viszonyítva, azonban a hiperglikémiát követő iszkémia a normoglikémiával azonos, vagy nagyobb mértékű idegsejt károsodást eredményezett (Fekete, 2009).

Az excitotoxicitás hipotézis szerint a serkentő aminosavak azokban a régiókban okoznak szelektív módon idegsejt degenerációt, amelyekben a serkentő aminosav koncentrációja fiziológiai körülmények közt is magas értéket mutat (Fekete, 2009).

A kísérletek során az érintett területen áthaladó axonok, és a gliasejtek nem pusztultak el (Fekete, 2009).

Choi és mtsai (1987) két mechanizmust írtak le, amelyek által a glutamát kifejti sejtkárosító hatását. Leírtak egy  $\text{Na}^+$ -dependens, illetve  $\text{Cl}^-$ -dependens kezdeti hatást, valamint egy  $\text{Ca}^{++}$  jelenlétéhez kötődő késői károsodást. A visszafordíthatatlan sejtkárosodás kiváltásában önmagában mindkét mechanizmus potensnek bizonyult. Ellenben redukált glutamát koncentrációt alkalmazva a  $\text{Ca}^{++}$  dependens késői károsodás vált uralkodóvá (Fekete, 2009).

A neuronokból, és a gliasejtekből a glutamát extracellularis felszabadulása többféleképpen valósulhat meg (Fekete, 2009).

A következő útvonalak ismereteseek:

- Depolarizáció hatására  $\text{Ca}^{++}$  függő vezikuláris exocitózis.
- A megnövekedett intracellularis  $\text{Na}^+$  koncentráció megfordíthatja a  $\text{Na}^+$ -dependens glutamáttranszporter működését, amelynek következtében  $\text{Na}^+$ , és glutamát kerül az extracelluláris térbe.
- A  $\text{Na}^+$ , és  $\text{Cl}^-$  intracelluláris térbe áramlása sejtduzzadást okozva  $\text{Ca}^{++}$  dependens módon az asztrociták térfogatra szenzitív szerves anion csatornáit nyithatja meg, amelyeken át glutamát, illetve egyéb anionok kerülhetnek az extracelluláris kompartmentbe.
- ATP jelenlétében a nagy pórusátmérővel rendelkező  $\text{P2X}_7$  receptorok glutamát felszabadulását eredményezhetik.
- Az aminosavak közül mind a semlegesek, mind a töltéssel bírók passzív diffúzióval penetrálni képesek a lipid kettős rétegen keresztül.

Az iszkémia megjelenését követő percekben megindul a glutamát felszabadulás. Ennek fő forrása feltehetően a  $\text{Na}^+$ -dependens glutamát transzporter működési irányának megfordulása, és a hőmérséklet. A transzporter működési irányának megfordulása nem csak a glutamát extra mennyiségű felszabadulását okozza, hanem a felszabaduló mennyiség eltávolítását is gátolja (Fekete, 2009).

Az iszkémia következtében az extracellularis térben savas irányba tolódik a pH. Az NMDA receptorok érzékenységét a savanyú közeg csökkenti, ez pedig valamennyire mérsékli a pH savas irányba tolódásának negatív hatásait (Gellért, 2013).

A glutamát 3 különböző ionotrop, valamint 8 különböző metabotrop receptoron keresztül fejt ki hatását, azonban az iszkémiás károsodást illetően az NMDA típusú receptorok szelektív gátlása fokozott neuroprtektív hatással bír a nem-NMDA típusú receptorokhoz viszonyítva. Az excitotoxicitással az I. csoportba tartozó metabotrop receptorokat is összefüggésbe hozták, azonban úgy vélik, hogy az ionotrop receptorok jelentősége nagyobb. A glutamát a felszabadulását követően az extraszinaptikus lokalizációjú receptorokon keresztül is hat, amelyek a szinaptikusan elhelyezkedő receptorokhoz viszonyítva nagy affinitásúak, és neurotoxikusak. Az extraszinaptikusan ható glutamát koncentrációra vonatkozó elmélet azonban hiányosságokat is hordoz (Fekete, 2009).

Ezen hiányosságok a következők:

- A neuronális érzékenység a glutamát receptor denzitással gyenge korrelációt mutat.
- Az axonon, valamint a terminálison jelen lévő glutamát receptorokon nem alakul ki direkt degeneratív válasz.
- A glutamáterg innervációval rendelkező agyi területek deafferenciációja gyengíti az NMDA, és a kainát receptor agonisták neurotoxicitását.
- A glutamát receptorok aktivációja után a degeneráció gyakran csak órákkal később alakul ki.

Ezen észrevételek az un. „forrás specificitás” hipotézis egyéb részleteire derítettek fényt. Az említett hipotézis kiegészíti a  $Ca^{++}$  hipotézist, illetve válaszokat keres a  $Ca^{++}$  hipotézis ellentmondásaira. A forrás specificitás hipotézis szerint a sejtkárosodást nem a teljes sejten belüli  $Ca^{++}$  szint emelkedés határozza meg, hanem hogy a  $Ca^{++}$  milyen mechanizmus révén áramlik a sejtbe. Ezek szerint az excitotoxicitásért azok a mechanizmusok lennének a felelősek, amelyek a glutamát receptorokhoz kolokalizálva azok aktivációja, és a degeneráció között zajlanak. (Sattler és Tymianski, 2000; cit.: Fekete, 2009).

### 4.3 Neuroprotekción

Neuroprotekción lehetőségei: feszültségfüggő  $Ca^{++}$  csatorna antagonistákkal,  $Na^+$  csatorna blokkolókkal, gyors  $Ca^{++}$  csatorna blokkolókkal, az NMDA nem kompetitív antagonistáival, szabadgyök antagonistákkal, NO-szintetáz gátlókkal, növekedési faktorokkal, antiapoptotikus beavatkozásokkal, GABA-agonistákkal (Marosi, 2009).

Hartley és Choi (1989) az excitotoxikus inzultus bekövetkezése után késleltetetten elvégzett beavatkozások neuroprotektív hatékonyságát tárták fel. Állításuk szerint az 500 microM NMDA, vagy glutamát hatásának való kitettség után sok rágcslóból származó kortikális neuron kultúra elpusztult volna, de az NMDA antagonisták tenyészmediumhoz való késői hozzáadása megmentette őket. A D-2-Amino-5-foszfonovalerát (D-APV), az MK-801, és a dextrorphan koncentrációfüggő neuroprotekción eredményeztek. A halálra ítélt neuronális populáción megmenthető hányada az NMDA kimosása, és az antagonista hozzáadása közötti időintervallumtól függött. A neuronpopuláción megmenthető hányada azonnali hozzáadás esetén 40-80%-nak adódott, 30 perc után pedig nullára csökkent. A D-APV-nek csak 30 percig kellett jelen lennie a közel maximális protekción érdekében. Az NMDA antagonisták protektív hatását nem tudták más anyagokkal imitálni. A széles spektrumú glutamát antagonista kinurenátnak hasonló protektív hatása volt, mint a D-APV-nek, de amikor a D-APV-hez adták a kinurenátot, az nem javította a neuroprotekción. A neuronokat szintén meg lehetett menteni az extracelluláris  $Ca^{++}$  késői eltávolításával az NMDA kezelést követő 30 percen át (Hartley és Choi, 1989).

Von Engelhardt és mtsai (2007) az NR2A-t, és NR2B-t tartalmazó NMDA receptorok *in vitro* excitotoxicitását vizsgálták kortikális neuronokon. Azt találták, hogy a vad típusú neuronokban az NMDA receptor szubtipusok excitotoxicitása a sejt kultúrák korával változott. Fialal sejt kultúrákban 14 nap után az NR2B-t tartalmazó NMDA receptorok blokádja megakadályozta az NMDA mediálta toxicitást *in vitro*, de mindkét altípus kiváltott excitotoxicitást az idősebb (21 napos) sejt kultúrákban. A két szubtipus bármelyikének blokkolása nem tudta megakadályozni az NMDA által kiváltott sejt halált, ezzel azt jelezve, hogy a fennmaradó szubtipus kiváltja a sejt pusztulását. Az NR2A szubtipus neuroprotektív hatása csak a 21 napos sejt kultúráknál szubmaximális

NMDA koncentráció esetén vált nyilvánvalóvá. Az NR2A szubtypus mediálta NMDA toxicitás, valamint a parciális protekció csak akkor kivitelezhető, ha az NR2A egy funkcionális C-terminális doménnel rendelkezik. Ha az NR2A szubtypusban kitörlik ezt a domént, akkor az excitotoxicitás teljes mértékben az NR2B szubtypus által mediált mind a 14 napos, mind a 21 napos sejt kultúráknál. A kutatók szerint a megállapításaik azt jósolják, hogy a sikeres terápiás beavatkozás stroke-os betegek esetében a pillanatnyilag elérhető NMDA receptor szubtypus szelektív blokkolók által valószínűtlen (von Engelhardt és mtsai, 2007).

Weller és mtsai (1993) az amantadin és a memantin hatásmechanizmusát vizsgálták az NMDA receptor mediálta glutamát toxicitásban kisagyi, agykérgi, és középagyi neuronokon. A következőket találták: Mindkét anyag megvédte a kisagyi és agykérgi neuronokat a glutamát toxicitás ellen. A memantin következetesen hatékonyabb volt az amantadinnál, de kevésbé volt hatékony az MK-801-nél. A középagyi dopaminerg idegsejt kultúrák glutamát toxicitását a memantin csak enyhén mérsékelte, illetőleg az MK-801 szintén csak részlegesen blokkolta. A dopaminerg középagyi neuronokban a nem-NMDA receptorok tűnnek a glutamát toxicitás alapvető mediátorainak, viszont ezek nem képesek megvédeni a nigrostriális neuronokat, amelyek főként a parkinson betegségben degenerálódnak (Weller és mtsai, 1993).



## **5 Anyagok és módszerek**

### **5.1 Sejtek eredete**

A tojásokat egy helyi tenyésztőtől szereztük be, amelyeket a felhasználásig 38 Celsius-fokon 100% páratartalom mellett inkubáltunk.

### **5.2 Csirke kortikális neuron tenyészet**

A csirke embriókat steril körülmények között eltávolítottuk a tojásokból. A neurontenyészet elkészítéséhez igyekeztünk csak kortextet izolálni. Az izolált szöveteket 5 ml jéghideg Trypsinbe (Sigma) tettük, zsilippengével feldaraboltuk, majd 5 ml-es pipettával 2x fel-le pipettáztuk. A szövetet üleptítettük, eltávolítottuk a felülúszót, majd további 5 ml Trypsint adtunk hozzá. A sejteket fel-le pipetázással disszociáltuk. 2 perc ülepedést követően a felülúszó részt egy új 15 ml-es centrifuga csőbe tettük, adtunk hozzá 5 ml tenyészmédiumot, és 1700 fordulat/perc fordulatszámra 5 percig centrifugáltuk. Ezt követően a felülúszó részt eltávolítottuk, és a leülepedett sejteket annyi ml tenyészmédiumban (DMEM, 10% Fetal Bovine Serum, 0.1% Gentamicin) disszociáltuk, ahány embriót felhasználtunk a tenyészet elkészítéséhez. Ezt 100 µl-es adagokban a poly-L-lizin (PLL) felületkezelésben részesített, és előzetesen 500 µl médiummal töltött 24-lyukú plate lyukaiba osztottuk szét, majd inkubátorba helyeztük.

### **5.3 Tenészfelület optimalizálása**

A felületoptimalizáció során két kezelést próbáltunk ki:

1. kezelés: 300 µl/lyuk 0.2 mg/ml koncentrációjú PLL steril desztillált vízben oldva.

2. kezelés: 100 µl/lyuk 0.2 mg/ml koncentrációjú PLL ethanolban oldva.

Ezt szobahőmérsékleten 2 óra inkubálás követte, majd a folyadék eltávolítása után 10 percig UV mellett sterilizáltuk a felületet. A kísérlet során a 24-lyukú plate minden második oszlopát alternálva kezeltük.

## 5.4 Anyagadás

A toxicitásvizsgálatokhoz 100-szoros koncentrációjú desztillált vizes NMDA-oldatot készítettünk.

A tenyészeteken végzett toxicitásvizsgálatok ütemezését illetően két protokollt használtunk.

1. protokoll: 7 napos embrió. NMDA kezelés a 4. napon. Értékelés az 5. napon.

2. protokoll: 7 napos embrió. Az 5. napon 50% Médium csere. NMDA kezelés a 10. napon. Értékelés a 11. napon.

A második protokollt utólag állítottuk fel a toxikus hatás elősegítése érdekében az idősebb tenyészet fokozott NMDA szenzitivitását feltételezve.

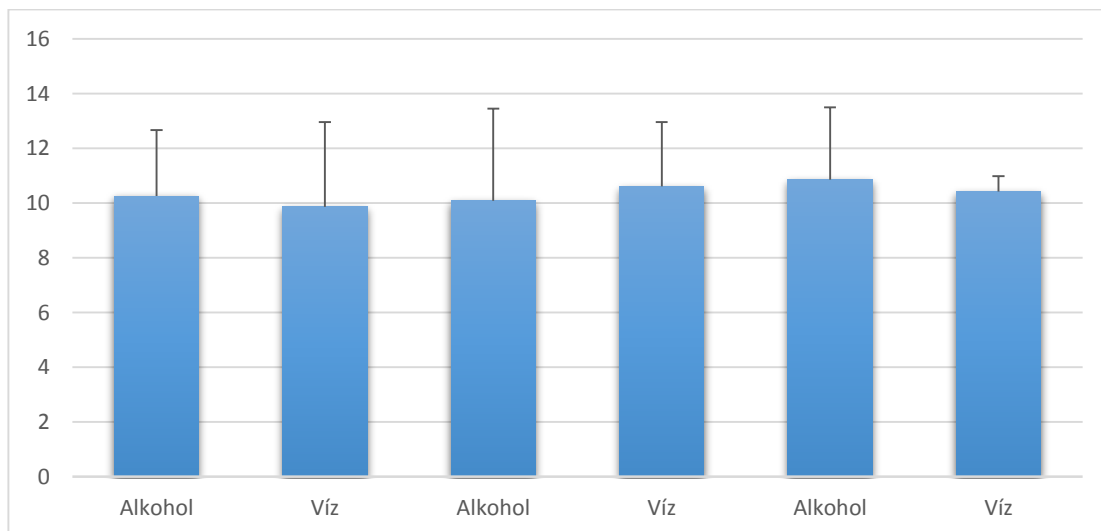
## 5.5 Értékelés

A sejtpusztulást kétféle módszerrel mértük. A szubjektív értékelést inverz fáziskontraszt mikroszkóp segítségével, 20x objektívvel készített fényképek alapján végeztük. A kvantitatív kiértékelést Alamar Blue biokémiai assay alapján F-, majd ennek megfelelő t-próbával végeztük. A különbséget  $p < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

## 6 Eredmények

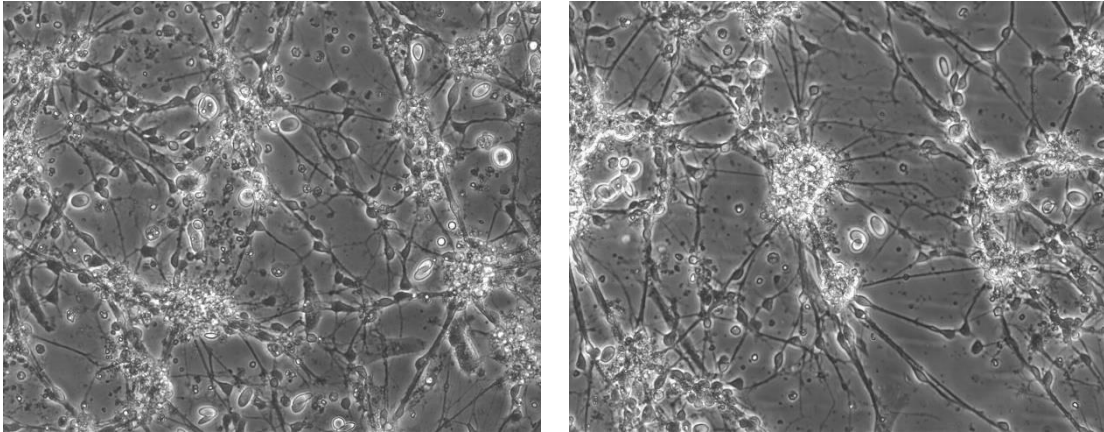
### 6.1 Kísérlet 1.

Első kísérletünk célja a számunkra legoptimálisabb tenyészfelület meghatározása volt. A vizsgálatot 1 db 24 lyukú plate-n végeztük. A kísérlethez 7 napos embriókat használtunk fel, az értékelést pedig a 3. napra időzítettük. Kétféle felületkezelési protokollt használtunk. Az egyikben a PLL-t alkoholban, míg a másikban desztillált vízben oldottunk fel. A PLL-t széles körben használják neuronális tenyészeteknél, csak a felületek kezelés utáni sterilizálása a probléma, ezért próbáltuk ki az alkoholos feloldást. A szokatlan kezelésnél azonban új problémák jelentkezhetnek, mint például a PLL réteg különböző térszerkezete, és a felületi réteg vastagsága. A kezelés sikerének megítélésében a neuronok túlélését, illetve az aggregátság fokát vettük alapul. Ezeket a paramétereket fáziskontraszt fényképek, és egy biokémiai teszt (Alamar Blue assay) segítségével mértük. Az értékelésnél örömmel tapasztaltuk, hogy egyik lyuk se fertőződött be. A neuronok eloszlásáról elmondható, hogy kevésbé alkottak clumpokat a vizes kezelés során. Azonban Alamar Blue assay (3. ábra), illetve t-próba ( $p: 0,9045$ ) alapján a sejtszámban nem volt szignifikáns különbség a vizes, és az alkoholos kezelés között.



3. ábra. Felületkezelés hatása neuron tenyészetekre – Alamar Blue teszt. Relatív sejtszám a függőleges tengelyen. Mean  $\pm$  SD látható, N=12.

A 4. ábrán látható, hogy vizes kezelés mellett jobban szétterültek a sejtek.



4. ábra. Felületkezelés hatása neuron tenyészetekre. Bal panel: PLL vízben.  
Jobb panel: PLL alkoholban.

A kiértékelés után a vizes kezelést választottuk a további kísérletekhez, mivel ez a sejtek egyenletesebb eloszlását eredményezte a felületen, és nem jelentett sterilitási problémát. A további kísérletekben megpróbáltuk optimalizálni az NMDA toxicitás vizsgálat körülményeit, elsősorban a tenyészet korát és a tenyésztés körülményeit. Az egyszerűség kedvéért egy napos folyamatos NMDA kezelést választottunk, mivel az irodalom alapján egynapos korban nem csak az azonnali, de a késleltetett sejtpusztulás jelei is megjelennek. A folyamatos NMDA kezelést (a rövid idejű, általában félórás kezeléssel szemben) azért választottuk, mivel így nem kellett a médiumot többször cserélni, és kimosni az NMDA-t.

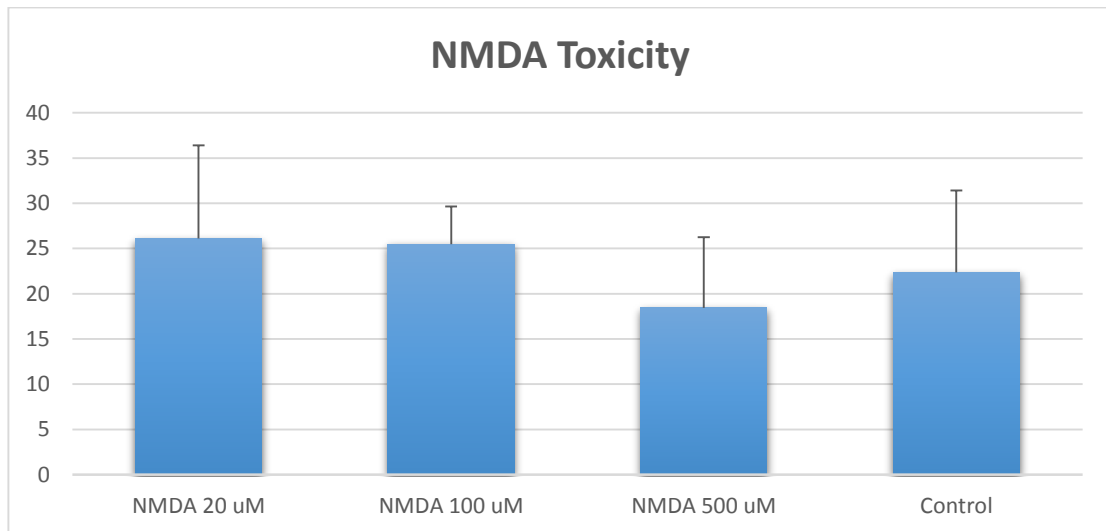
## 6.2 Kísérlet 2.

Második kísérletünk célja az NMDA toxicitás vizsgálata volt a lehető legegyszerűbb tenyésztési protokoll mellett, fiatal (4 napos) tenyészetben. A vizsgálatot 1 db 24 lyukú plate-n végeztük.

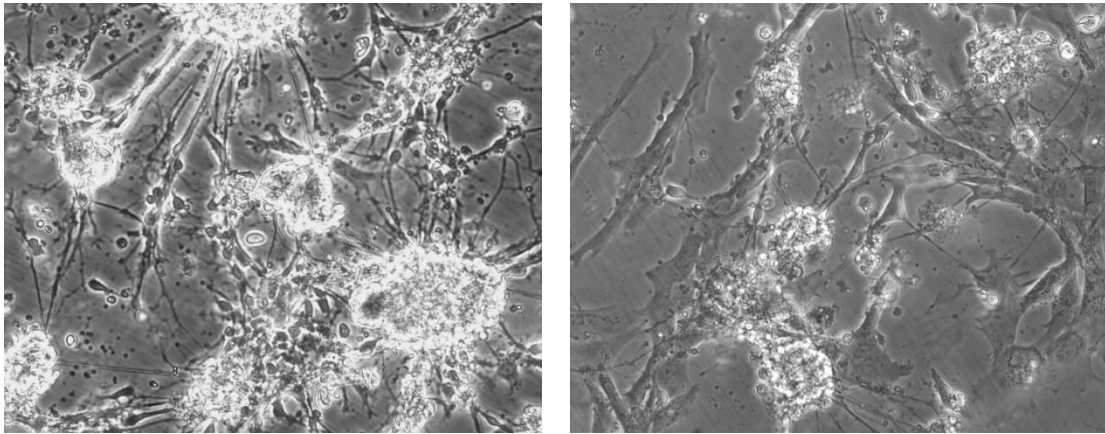
24-lyukú plate NMDA kezelése:

1. sor: 20 uM NMDA
2. sor: 100 uM NMDA
3. sor: 500 uM NMDA
4. sor: kontroll

Meglepetésünkre a nagy koncentrációjú NMDA kezelés (500 uM) se okozott jelentősebb sejtpusztulást. Alamar Blue assay, és t-próba alapján nem volt szignifikáns különbség az NMDA kezelt, és a kontroll tenyészetek sejtszáma között. Azonban kitűnik az adatokból, hogy a legintenzívebb toxicitás 500 uM NMDA dózisonál következett be. Az is látható, hogy a mérésnek jelentős a szórása (5., és 6. ábra).



5. ábra. NMDA hatása neuron tenyészetekre - Alamar Blue teszt. Relatív sejtszám a függőleges tengelyen. Mean  $\pm$  SD látható, N=6.



6. ábra. NMDA toxicitás fiatal tenyészetben. Bal panel: kontroll. Jobb panel: 500 uM NMDA hatása.

### 6.3 Kísérlet 3.

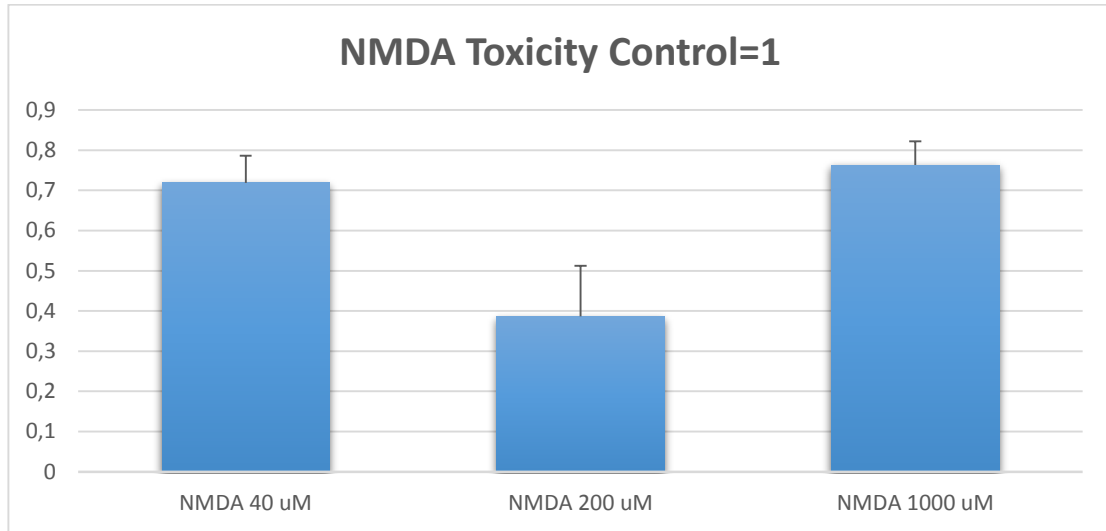
Miután az előző kísérlet kimenetele nem az elvárásainknak megfelelően alakult, felállítottuk a második tenyészetkezelési protokollt. Ennek során szintén 7 napos embriókat használtunk fel, de egyszeri, az ötödik napra ütemezett 50% tenyészmédiumcsere beiktatásával a tizedik napon kezeltük NMDA-val a sejteket. Az értékelést a 11. napon végeztük 24 óra folyamatos NMDA kezelést követően. A feltételezésünk az volt, hogy az idősebb sejtek nagyobb valószínűséggel expresszálnak NMDA receptort, így nagyobb az esélye a szignifikáns NMDA toxicitás kialakulásának. Ebben a kísérletben az előzőleg alkalmazott NMDA dózisok dupláját alkalmaztuk. A vizsgálatot 3 db párhuzamos 24 lyukú plate-n végeztük.

24-lyukú plate NMDA kezelése:

1. sor: 40 uM NMDA
2. sor: 200 uM NMDA
3. sor: 1000 uM NMDA
4. kontroll

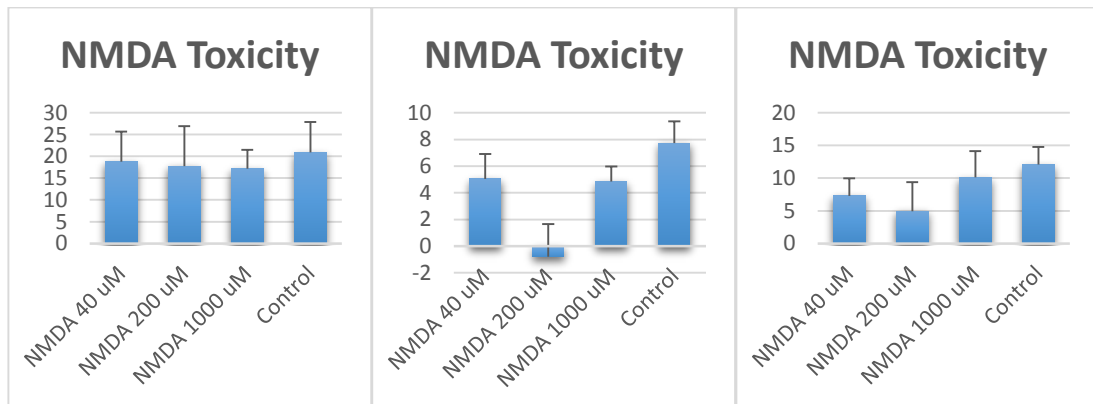
Alamar Blue assay, és t-próba alapján a plate 2-3. esetében a számok tükrében, és a fényképeken is látszik NMDA indukálta szignifikáns toxicitás kiemelten a 40 uM (p:

0,0269; 0,0173) és a 200  $\mu\text{M}$  ( $p$ : 0,0089; 0,0141) koncentrációknál. Azonban az összesített vizsgálatban nem mutatkozott szignifikáns különbség az NMDA kezelt, és a kontroll tenyészetek sejtszáma között, illetve a toxicitás messze nem 100%-os (7., 8., és 9. ábra).



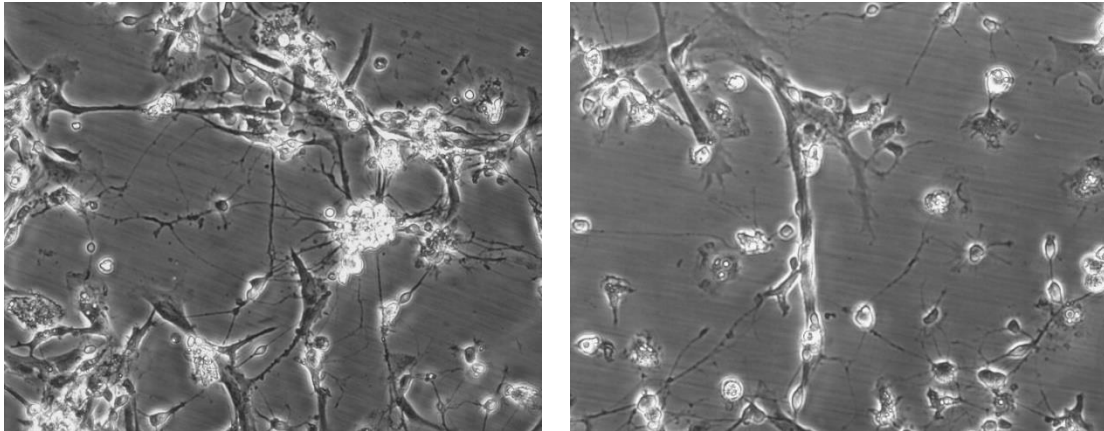
7. ábra. NMDA hatása neuron tenyészetekre - Alamar Blue teszt. Relatív sejtszám a függőleges tengelyen. Mean $\pm$  SEM látható, N=18.

A három párhuzamos 24 lyukú plate-n végzett mérés mutatja ezt a hatást, kisebb-nagyobb mértékben.



8. ábra. NMDA hatása neuron tenyészetekre - Alamar Blue teszt. Relatív sejtszám a függőleges tengelyen. Mean  $\pm$  SD látható, N=6.

Továbbá feltűnt számunkra egy az előző kísérletnél nem tapasztalt jelenség, a toxikus hatás haranggörbe szerű alakulása. Felmerült bennünk a nagy dózis (1000 uM) miatti deszenzitizáció lehetősége, amelynek kiküszöbölésére koagonista glicin adását terveztük, de a tenyészmédium glicin tartalmára való tekintettel elvetettük az ötletet.



9. ábra. NMDA hatása idősebb tenyészetben. Bal panel: kontroll. Jobb panel: 200 uM NMDA után.

A szignifikáns toxicitás elmaradásának háttérében továbbra is fennállt a tenyészet fiatal voltának lehetősége, ennek megfelelő elégtelen NMDA receptor expresszióval. Ezt kiküszöbölendő a következő kísérletben teszteltünk egy harmadik tenyészetkezelési protokollt, hogy a továbbiakban még idősebb sejteken vizsgálhassuk az NMDA toxicitást.

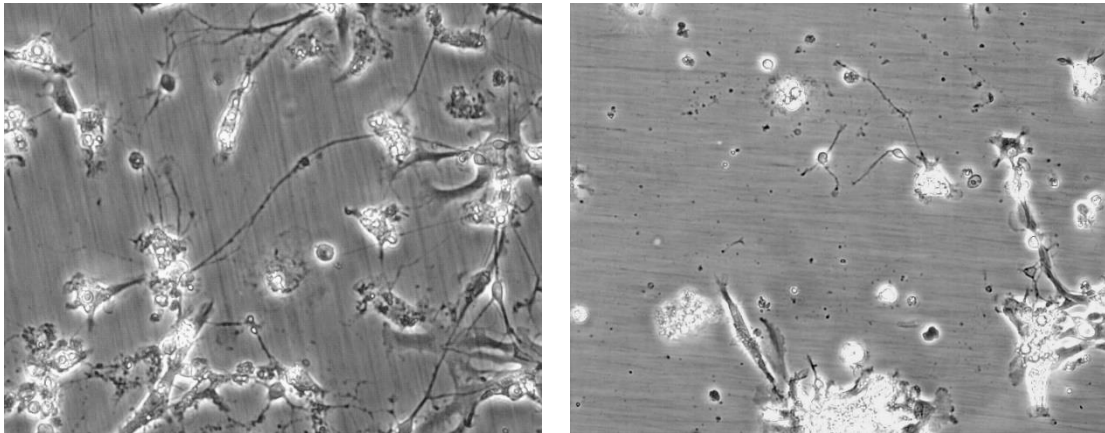
#### **6.4 Kísérlet 4.**

Negyedik kísérletünk célja egy harmadik tenyészetkezelési protokoll vizsgálata, amely során a fiatal, és idős minősítésű tenyészetek túlélésének az időfüggését hasonlítottuk össze. Azt reméltük, hogy az idősebb 14 napos embriókból nyert tenyészet hasonló túlélési valószínűséggel rendelkezik, mint a 7 napos embriókból származó, amely lehetővé tette volna, hogy még idősebb sejteken vizsgálhassuk az NMDA toxicitást. A kísérlet során 7 napos, és 14 napos embriókból származó tenyészeteket hasonlítottuk össze 5 naponta végzett 50% tenyészmédiumcsere mellett. Közvetlenül a



tenyészmédiumcsere előtt fotókat készítettünk, amelyek alapján jól megítélhető volt a tenyészetek aktuális állapota.

A fotók (10. ábra) alapján történő vizuális kiértékelés jól mutatta, hogy a 2 hetes embriókból származó öreg tenyészet túlélése lényegesen rosszabb, mint az 1 hetes embriókból származóké.



10. ábra. Csirke neuronális tenyészetek túlélése. Bal panel: 7 napos embrió, 14 napos tenyészet. Jobb panel: 14 napos embrió, 14 napos tenyészet.

Ez alapján a 7 napos embriókból származó tenyészet használata célszerűbbnek tűnik, mert a 14 napos tenyészethez mért korából adódó hátránya a magasabb túlélési valószínűséggel kompenzálódik.

## 6.5 Kísérlet 5.

Ötödik kísérletünkben a második tenyészetkezelési protokoll alapján megismételtük az NMDA toxicitás vizsgálatot, tehát 7 napos embriókat használtunk, NMDA-t a 10. napon adtuk hozzá a tenyészetekhez, a kiértékelést pedig a 11. napon végeztük 24 óra folyamatos NMDA kezelést követően. A vizsgálatot 2 db párhuzamos 24 lyukú plate-n végeztük.

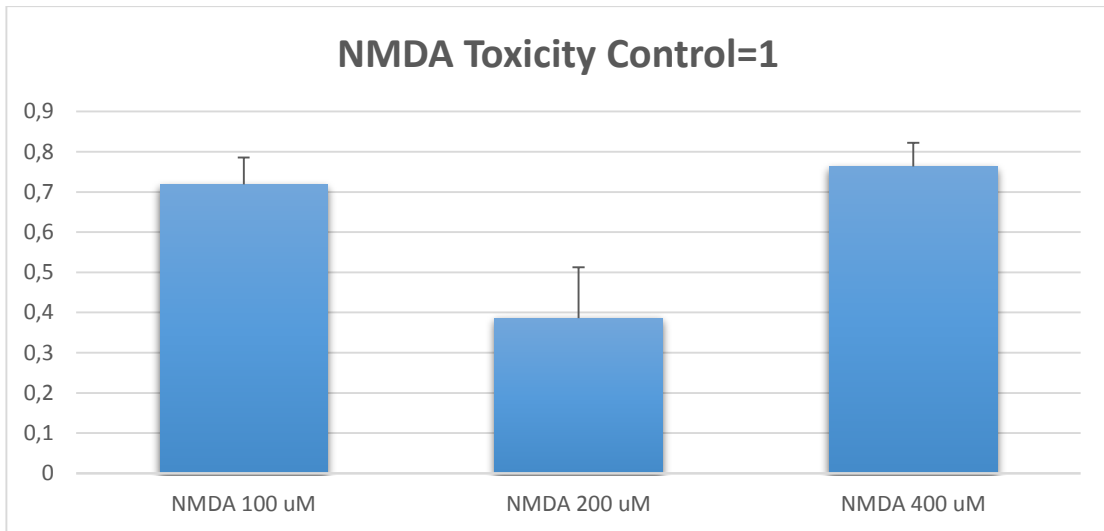
24-lyukú plate NMDA kezelése:

1. sor: 100 uM NMDA
2. sor: 200 uM NMDA

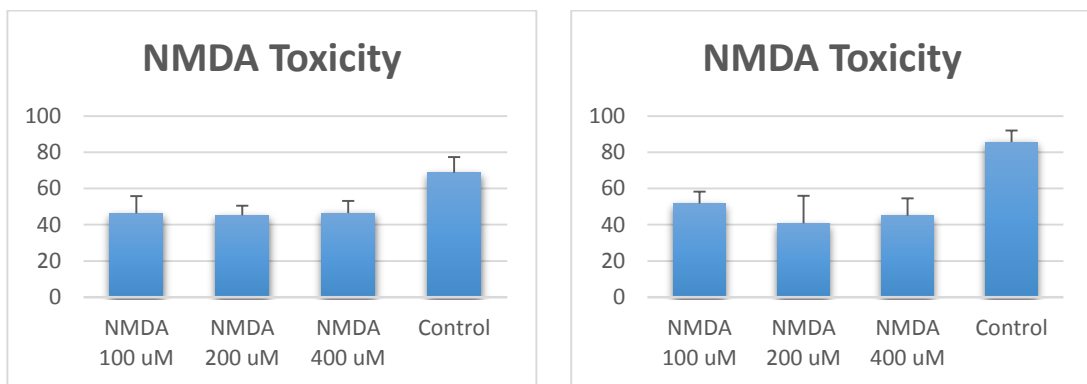
3. sor: 400  $\mu$ M NMDA

4. sor: kontroll

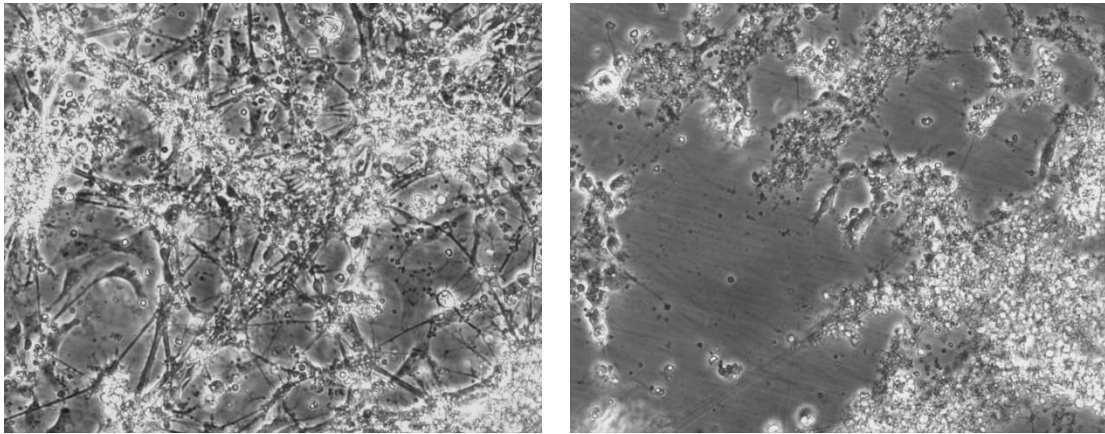
Nagy meglepetésünkre Alamar Blue assay, és t-próba alapján szignifikáns sejtpusztulás következett be a kontroll tenyészetek, és az NMDA-val kezelt tenyészetek között. A sejtpusztulást a készített fotók is jól prezentálják (11., 12, és 13. ábra).



11. ábra. NMDA hatása neuron tenyészetekre - Alamar Blue teszt. Relatív sejtszám a függőleges tengelyen. Mean $\pm$  SEM látható, N=18.



12. ábra. NMDA hatása neuron tenyészetekre - Alamar Blue teszt. Relatív sejtszám a függőleges tengelyen. Mean  $\pm$  SD látható, N=6.



13. ábra. NMDA toxicitás. Bal panel: kontroll. Jobb panel: 200 uM NMDA után.

Ami már a vizsgálat elvégzése előtt feltűnt számunkra, az a jelenlegi sejtek eddigiektől eltérő morfológiája, illetve a magasabb sejtszám. Ez összefügghet a szignifikáns NMDA toxicitás kialakulásával.

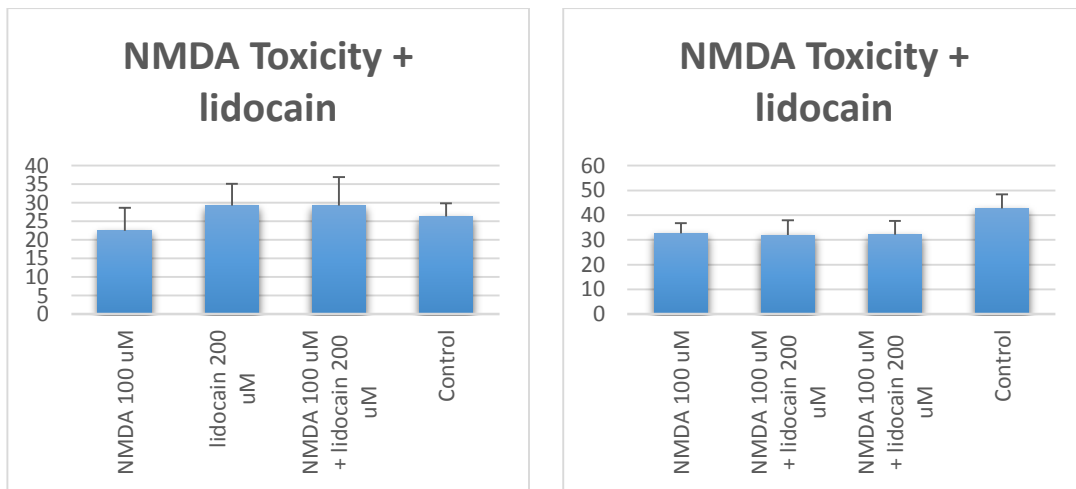
## 6.6 Kísérlet 6.

Hatodik kísérletünkben a lidocain esetleges neuroprotektív effektusát vizsgáltuk az NMDA toxicitásban. A lidocain  $\text{Na}^+$  csatorna blokkoló hatású szer, amely a Vaughan-Williams - féle klasszifikáció 1/B osztályába tartozik (Gyires és Fürst, 2011). A kísérletben a második protokoll szerint jártunk el, tehát 7 napos embriókat használtunk, NMDA-t a 10. napon adtuk hozzá a tenyészetekhez, a kiértékelést pedig a 11. napon végeztük 24 óra folyamatos NMDA kezelést követően. A vizsgálatot 2 db párhuzamos 24 lyukú plate-n végeztük.

24-lyukú plate NMDA, és lidocain kezelése:

1. sor: 100 uM NMDA
2. sor: 200 uM lidocain (plate 1.); 100 uM NMDA + 200 uM lidocain (plate 2.)
3. sor: 100 uM NMDA + 200 uM lidocain
4. sor: kontroll

Az értékelés során ellentmondásos eredményeket kaptunk (14. ábra). A plate 1. esetében a lidocain valamelyest protektív hatásúnak tűnt az NMDA toxicitást illetően, azonban az NMDA önmagában se okozott szignifikáns sejtpusztulást a kontroll tenyészetekhez viszonyítottn. A plate 2. esetében az NMDA önmagában, és lidocainnal együtt adva is szignifikánsan elpusztította a sejteket (NMDA 100 uM: 0,0045; NMDA 100 uM + lidocain 200 uM: 0,0066; NMDA 100 uM + lidocain 200 uM: 0,0093).



14. ábra. NMDA és lidocain hatása neuron tenyészetekre - Alamar Blue teszt. Relatív sejtszám a függőleges tengelyen. Mean +- SD látható, N=6.

## 7 Megvitatás

Elsőként a tenyészfelületet optimalizáltuk. Az általunk megismert NMDA toxicitással kapcsolatos nemzetközi kutatások egy részénél poly-d-lizin felületet használtak a neuronok tenyésztéséhez. Példájukat részben követve, illetve a tenyészfelületekkel kapcsolatos kutatásokat (Kim és mtsai, 2011; Young és mtsai, 2008; Young és mtsai, 2009) tanulmányozva poly-l-lizin felületkezelést választottunk a kísérletekhez. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a sejtek túlélése, valamint az eloszlásuk tekintetében van-e lényegi különbség a poly-l-lizin alkoholban, ill. vízben történő oldása között. Az értékelés során azt tapasztaltuk, hogy a két típusú felület tenyésztésre gyakorolt hatásában nincs szignifikáns különbség. A vizes kezelés mellett a fotók alapján esetleg jobban szétterültek a sejtek. Az alkohol elpárolgása után visszamaradt vastagabb PLL réteg nem jobb a neuronok letapadása szempontjából, hiszen a sejtek inkább egymáshoz tapadtak, mint a felülethez. A vizes kezelésnek nem tapasztaltuk hátrányát, hiszen egyik tenyészet se fertőződött be.

Sajnos az NMDA toxicitás vizsgálata szempontjából a csirke neuronális tenyészet nem egy egyszerűen használható rendszer. Egyrészt a legnagyobb sejtpusztulás, amit sikerült elérnünk, kb. 50%-os volt. Ennek az lehet a magyarázata, hogy tenyészetünkben viszonylag magas a nem-neuronális sejtek aránya. Ez természetes az ilyen típusú tenyészeteknél, hiszen a differenciálódott neuronok már nem osztódnak, ellenben a többi sejtípus (fibroblaszt, glia sejt) még igen, és így lassan benövik a tenyészetet. Ez ellen lehetne védekezni sejtosztódást gátló szerekkel, például citozin-arabinoziddal (Choi és mtsai, 1988), de számunkra nem állt rendelkezésre. A nem-neuronális sejtek csökkentik az NMDA hatását, és növelik a mérés relatív hibáját. Ezen kívül megakadályozzák a hosszú idejű neuronális tenyészetek fenntartását.

Ebből fakad az NMDA toxicitás mérésének második problémája, a sejtek érzékenysége függ az tenyészetek korától. Fiatal tenyészetekben nem tapasztaltunk szignifikáns sejtpusztulást, amelynek oka feltételezhetően a sejtek fiatal korából adódó elégtelen NMDA receptor expresszió lehetett. Ezt megpróbáltuk kiküszöbölni egy protokollváltással, amelyben 6 nappal később adtunk NMDA-t a sejtekhez, és idő közben a neuronok túlélése érdekében 50% tenyészmediumcserét is végeztünk. Az

idősebb tenyészetekben már tapasztaltunk jelentős sejtpusztulást, viszont az nem volt minden esetben szignifikáns mértékű. De a tenyészeteket nem tudtuk túl hosszan fenntartani.

A harmadik probléma, amire tényleg nem számíthattunk az NMDA toxicitás haranggörbe szerű hatása, vagyis kb. 200  $\mu\text{M}$  körül volt maximális a sejtpusztulás, kisebb koncentrációkban, de magasabb koncentrációkban is csökkent a toxicitás. Erre nem tudjuk a pontos magyarázatot, feltesszük, hogy összefügghet az NMDA receptorok gyors deszenzitizációjával. Magas NMDA koncentrációnál előbb deszenzitizálódott a receptor, mint hogy sejtpusztulást okozott volna. Ennek kizárása érdekében koagonista glicin adását terveztük, de az általunk használt tenyészmédium glicin tartalmára való tekintettel elvetettük az ötletet. Továbbá megkérdőjeleztük a tenyészetek homogenitását, de mivel az inhomogenitás a fotókon is jól látszana, ezt a lehetőséget kizártuk.

A sejtek fiatal voltából adódó elégtelen NMDA receptor expresszió lehetőségét még idősebb sejtek alkalmazásával terveztük kiküszöbölni, de a túlélés időfüggésének vizsgálatára irányuló kísérletünkben kimutattuk, hogy az idősebb 14 napos embriókból származó neuronok túlélési valószínűsége rosszabb, mint a fiatalabb 7 napos embriókból származóké. Tekintve, hogy a fiatalabb sejtek magasabb túlélési valószínűsége ellensúlyozza az idősebb sejtek feltehetően magasabb NMDA receptor expresszióját, célszerűbbnek láttuk a következőkben a fiatalabb sejtek alkalmazását.

Ezen tények ismeretében megismételtük az NMDA toxicitás vizsgálatot annyi módosítással, hogy az NMDA dózisokat az eddigi leghatásosabb köré igyekeztünk szűkíteni. De ezzel jelentős újítást nem iktattunk be a kísérletbe, mert azonos, illetve hasonló dózisokat már alkalmaztuk a korábbi két toxicitásvizsgálat során. Nagy meglepetésünkre minden plate esetében minden dózisonál szignifikáns sejtpusztulás volt tapasztalható. Tekintve, hogy a kísérlet során alkalmazott NMDA dózisok az előző kísérletekben nem váltottak ki ilyen mértékű sejtpusztulást, valamint figyelembe véve a tényt, hogy a már egyszer kipróbált tenyészetkezelési protokoll szerint jártunk el, egyéb befolyással bíró tényezőt kell feltételeznünk a jelenlegi sikeres kimenetel háttérében. Ezen tenyészetünk sejteire az eddigiekben tapasztaltaktól kissé eltérő

morfológia volt jellemző, amelynek köze lehetett a sejtek fokozott NMDA szenzitivitásához. Ez esetleg köszönhető a tenyészetek magasabb sejt-sűrűségének. Ennek tisztázása további vizsgálatokat indikál. Összességében elmondható, hogy az NMDA toxicitás csirke neuronális tenyészeteken vizsgálható, azonban optimalizálást igényelhet.

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a  $\text{Na}^+$  csatorna blokkoló lidocainnak van-e neuroprotektív hatása az NMDA toxicitásban. A kísérlet során az NMDA-t lehetőleg alacsony, de még szignifikáns sejtpusztulást előidéző dózisában (100  $\mu\text{M}$ ) adtuk. Ettől azt reméltük, hogy a lidocain feltételezett befolyása így kifejezettebbé válik. A lidocaint 200  $\mu\text{M}$  dózisban adtuk. Az eredmények kissé ellentmondásosak, mert egyik esetben az NMDA szignifikáns toxikus hatása önmagában, és lidocainnal együtt adva is elmaradt. A másik mérés során azonban mind a natív, mind a lidocainnal együtt adott NMDA szignifikáns sejtpusztulást eredményezett. Tehát a  $\text{Na}^+$  csatornák lidocainnal történő blokkolása nem tűnik hatékony neuroprotektív beavatkozásnak, illetve a lidocain ebben a dózisban hatástalannak bizonyult.

## 8 Összefoglalás

Az NMDA receptor mediálta excitotoxicitás jelentős szereppel bír a különböző etiológiájú idegszövetet károsító betegségek patomechanizmusában. Az excitotoxicitás ellen ható neuroprotektív farmakonok azonosítása, illetve kifejlesztése a különböző diszciplínák (például: neurológia, pszichiátria) részére kívánatos lenne a terápia szempontjából. A hatásos farmakonok megtalálását az excitotoxicitás vizsgálatára alkalmas módszerek beállítása, és optimalizálása nagyfokban segítheti. Kísérleteink során egy ilyen módszert igyekeztünk optimalizálni csirke kortikális tenyészeteken. Emellett egy  $\text{Na}^+$  csatorna blokkoló szer, a lidocain neuroprotektív hatását is megvizsgáltuk az excitotoxicitásban. A kísérletekhez 7 napos embriókból izoláltuk a cerebrokortikális sejteket, amelyeket a 4., illetve a 10. napon kezeltünk NMDA-val. 24 óra folyamatos NMDA kezelést követően elvégeztük az értékelést, amelynek szubjektív részét fáziskontraszt mikroszkóp segítségével, a kvantitatív részét pedig Alamar Blue biokémiai assay alapján hajtottuk végre. A poly-L-lizint vízben oldva alkalmas tenyészfelületet hoztunk létre a neuron kultúrák részére. Feltételezhetően a sejtek fiatal korából adódóan eleinte nem tapasztaltunk jelentős toxicitást, azonban idősebb neuronokat alkalmazva már sikerült szignifikáns sejtpusztulást előidézni. Utóbbi hatást az idősebb sejtek nagyobb valószínűségű NMDA receptor expressziójával magyaráztuk. Nagy NMDA dózisokat (1000  $\mu\text{M}$ ) is alkalmazva haraggörbe szerű toxikus hatást tapasztaltunk, amelyet az NMDA receptorok deszenzitizációjával hoztunk összefüggésbe. Elmondható, hogy csirke kortikális tenyészeteken az NMDA receptor mediálta toxicitás vizsgálható, de optimalizációt igényelhet. A lidocain feltételezett neuroprotektív hatását nem sikerült igazolnunk, illetve az általunk alkalmazott dózis (200  $\mu\text{M}$ ) hatástalannak bizonyult.



## 9 Summary

NMDA receptor mediated excitotoxicity plays an important role in the pathogenesis of several neurodegenerative diseases. Identification and development of drugs with neuroprotective properties against excitotoxicity would be beneficial for various disciplines (e.g., Neurology, Psychiatry) for therapeutic purposes. Development and optimization of suitable methods for the assessment of excitotoxicity would be helpful for finding new and effective pharmaceuticals. In our experiments we tried to optimize such a method based on chicken cortical cultures. In addition, we investigated the neuroprotective effect of a sodium channel blocking agent, lidocaine, on the developed excitotoxicity model.

Experiments were performed on cerebrocortical cells isolated from 7 day old chicken embryos. Cells were treated with NMDA at days 4 and 10. Cell death was evaluated after 24h continuous NMDA treatment using phase-contrast microscopy and Alamar Blue biochemical assay. We found that our surface treatment using poly-L-lysine (dissolved in water) is suitable for the effective growth of chicken neuronal cultures.

In the first experiments the cells did not show significant toxicity, presumably because of their young age, but using older cultures we managed to evoke significant cell death using NMDA treatment. The latter observation could be explained by the possible higher expression of NMDA receptors in older cells. Interestingly, the concentration-effect curve of NMDA was bell-shaped. The lower toxicity of higher concentrations of NMDA could be associated with the fast desensitization of the receptor. Based on our results it could be concluded that NMDA mediated excitotoxicity could be investigated using chicken cortical cultures but it may require further optimization. The assumed neuroprotective effect of lidocaine could not be confirmed, it would require more experiments.

## **10 Köszönetnyilvánítás**

Elsősorban szeretném kifejezni hálás köszönetemet a témavezetőmnek, Dr. Molnár Péternek, aki kitartó munkával, és segítőkészséggel állt mellettem mind a laboratóriumi ténykedéseim során, mind pedig a szakdolgozatom megírása közben. Emellett megtanította a laboratóriumi munka alapfogásait, és mint korábbi biofizika tanárom szerepet játszott abban is, hogy az érdeklődésem a neurobiológia felé fordult.

Köszönettel tartozom egyetemi tanárainknak, akik bevezettek eme csodálatos tudomány rejtelseibe, és akik egyben személyükkel is hatást gyakoroltak rám, illetve formálták tudatomat.

Végül szeretném kifejezni hálámat, és köszönetemet hallgatótársaimnak, akik jelenlétükkel átsegítettek a nehezebb időszakokon, és akiktől szintén sokat tanultam a biológiáról.

## 11 Referenciák

**Ahern, von B. K., Lustig, H. S., & Greenberg, D. A. (1994):** Enhancement of NMDA toxicity and calcium responses by chronic exposure of cultured cortical neurons to ethanol. *Neuroscience Letters*, 165(1-2), 211–214.

**Almási J., Rihmer Z. (2004):** Az antidepresszívumok áttekintése a TCA-któl a harmadik generációs szerekig. *Neuropsychopharmacologia Hungarica* 2004, VI/4; 185-194.

**Boros M. (2006):** Az N-metil-D-aszparaginsavnak és amid származékainak előállítása, a csoport- és rotamer-specifikus bázicitások meghatározása. Doktori (Ph.D.) értekezés. Semmelweis Egyetem. Gyógyszertudományok Doktori Iskola. Budapest.

**Choi, D. W., Maulucci-Gedde, M., & Kriegstein, a R. (1987):** Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 7(2), 357–368.

**Choi, D. W., Koh, J. Y., & Peters, S. (1988):** Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 8(1), 185–196.

**Fekete Á. (2009):** Az agyi ischaemia korai, intracellularis történéseinek vizsgálata fluoreszcens képalkotó eljárások és in vitro ischaemia modellek segítségével. Doktori értekezés. Semmelweis Egyetem. Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola. Budapest.

**Fonyó A., Ligeti E. (2008):** Az orvosi élettan tankönyve. Medicina Könyvkiadó Zrt. Budapest.

**Fürst Zs. (2008):** Centrális és perifériás mechanizmusok szerepe a fájdalomcsillapításban. Jelen és perspektívák. *Neuropsychopharmacologia Hungarica* 2008, X/3; 127-130.

**Gellért L. (2013):** Neuroprotekciónak lehetőségei kinureninakkal. PhD értekezés. Szegedi Tudományegyetem. Természettudományi és Informatikai Kar. Biológia Doktori Iskola. Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék. Szeged.

**Gyires K., Fürst Zs. (2011):** A farmakológia alapjai. Medicina Könyvkiadó Zrt. Budapest.

**Hartley, D. M., & Choi, D. W. (1989):** Delayed Rescue of N-Methyl-D-Aspartate-mediated neuronal injury in Cortical culture. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 250, 752–758.

**Hollódy K., Csábi Gy., Láng A., Rózsai B., Komáromy H., Bors L., Illés Zs. (2011):** Anti-N-metil-D-aszpartát-receptor-encephalitis: a szindróma ismertetése az első magyar beteg leírása kapcsán. *Ideggyógyászati Szemle*, 64 (3–4):119–125.

**Illés Zs. (2011):** A limbicus encephalitis paradigmataváltásáról az első felismert magyar NMDA-receptorencephalitis-eset kapcsán. *Ideggyógyászati Szemle*, 64(7–8): 222–228.

**Juhász L. Zs., Bartkó Gy. (2007):** A forrásmonitorozás zavarai szkizofréniában: áttekintés és farmakoterápiás következtetések. *Neuropsychopharmacologia Hungarica* 2007, IX/1; 19-29.

- Kálmán J., Kálmán S., Pákási M. (2008):** Demenciához társuló viselkedési és pszichés zavarok felismerése és kezelése antipszichotikumokkal: a CATIE-AD vizsgálat tanulságai. *Neuropsychopharmacologia Hungarica* 2008, X/4.; 233-249.
- Kim, Y. H., Baek, N. S., Han, Y. H., Chung, M. A., & Jung, S. D. (2011):** Enhancement of neuronal cell adhesion by covalent binding of poly-d-lysine. *Journal of Neuroscience Methods*, 202(1), 38–44.
- Kovács T. (2009):** Az Alzheimer-kór terápiája. *Neuropsychopharmacologia Hungarica* 2009,XI/1, 27-33.
- Li, P. A., Kristian, T., Shamloo, M., & Siesjo, K. (1996):** Effects of preischemic hyperglycemia on brain damage incurred by rats subjected to 2.5 or 5 minutes of forebrain ischemia. *Stroke*, 27(0039-2499 (Print)), 1592–1601.
- Marosi M. G. (2009):** Ischaemia okozta funkcionális és morfológiai károsodások valamint néhány lehetséges neuroprotektív beavatkozás vizsgálata patkány modellen. Ph.D. értekezés. Szegedi Tudományegyetem. Természettudományi és Informatikai Kar. Biológia Doktori Iskola. Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék. Szeged.
- Réthelyi J. (2011):** Még egyszer az NMDA-rendszerről. Szerkesztőségi levél. *Neuropsychopharmacologia Hungarica* 2011. XIII. évf. 1. szám; 2-3.
- Sattler, R., & Tymianski, M. (2000):** Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 78(1), 3–13.

**Szilágyi T. (2005):** Élettan – Az idegrendszer. Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem. Élettani Tanszék.

**Tajti J., Almási J. (2006):** A mirtazapin hatása a krónikus tenziós típusú fejfájásban szenvedő betegekre. Irodalmi áttekintés. *Neuropsychopharmacologia Hungarica* 2006, VIII/2; 67-72.

**Tajti J., Vécsei L. (2009):** A perifériás és a centrális szenzitizáció jelentősége migrénben. Irodalmi áttekintés. *Neuropsychopharmacologia Hungarica* 2009, XI/1, 15-21.

**Világi I. (2003):** Neurokémia. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs.

**von Engelhardt, J., Coserea, I., Pawlak, V., Fuchs, E. C., Köhr, G., Seeburg, P. H., & Monyer, H. (2007).** Excitotoxicity in vitro by NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors. *Neuropharmacology*, 53(1), 10-17.

**Webreferencia 1.:** <http://chrisparsons.de/Chris/nmda.htm>

**Webreferencia 2.:** <http://chrisparsons.de/Chris/glutamate.htm>

**Weller, M., Finiels-Marlier, F., & Paul, S. M. (1993):** NMDA receptor-mediated glutamate toxicity of cultured cerebellar, cortical and mesencephalic neurons: neuroprotective properties of amantadine and memantine. *Brain Research*, 613(1), 143–148.

**Young, T. H., Lu, J. N., Lin, D. J., Chang, C. L., Chang, H. H., & Cheng, L. P. (2008):** Immobilization of l-lysine on dense and porous poly(vinylidene fluoride) surfaces for neuron culture. *Desalination*, 234(1-3), 134–143.

**Young, T.-H., Lin, U.-H., Lin, D.-J., Chang, H.-H., & Cheng, L.-P. (2009):**  
Immobilization of L-lysine on microporous PVDF membranes for neuron culture.  
*Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 20(5-6), 703–720.