

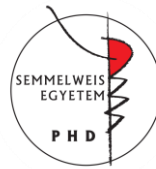
**Ciklodextrinek alkalmazása gangliozidok kapilláris
elektroforézissel történő elválasztására és a membrán
gangliozid tartalmának módosítására**

Doktori tézisek

Geda Orsolya

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Semmelweis Egyetem



Témavezető: Dr. Szökő Éva, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Szócs Levente, PhD

Dr. Fejős Ida, PhD, egyetemi adjunktus

Komplex vizsga bizottság elnöke:

Dr. Antal István, PhD, egyetemi tanár

Komplex vizsga bizottság tagjai:

Dr. Németh Krisztina, PhD, tudományos főmunkatárs

Dr. Kőhidai László, CSc, egyetemi docens

Budapest

2022

1. Bevezetés

A gangliozidok a sejtmembránban található, szíálsav tartalmú glikoszfinbolipidek, melyek jelentős szereppel bírnak számos jelátviteli folyamatban. A megfigyelések alapján a gangliozidok a koleszterinben gazdag membrán mikrodoménekben vagy más néven lipid raftokban akkumulálódnak, ahol részt vesznek a környező membránfehérjék szabályozásában, illetve sejt-sejt kapcsolatok kialakításában.

A gangliozidok, bár a legtöbb szövetípusban megtalálhatók, a legnagyobb mennyiségben az idegszövetben vannak jelen, ahol mind funkcionális, mind strukturális szempontból jelentős szereppel bírnak számos kutatás szerint. Részt vesznek többek között a neuronok differenciációjában, az axon-mielin kapcsolat kialakításában és a kalcium jelátviteli folyamatokban. Emellett egyre több bizonyíték van a lipid raftok, illetve a gangliozidok neurotranszmisszióban betöltött szabályozó szerepére is. Továbbá, az elmúlt évek vizsgálatai alapján több neurodegeneratív betegség, így például az Alzheimer-kór és a Parkinson-kór patomechanizmusában is szerepet játszhat a megváltozott gangliozid metabolizmus.

Szerkezetüket tekintve a gangliozidok egy ceramid és egy oligoszacharid egységből épülnek fel. A ceramidot egy hosszú szénláncú amino-alkohol, a szfingozin és egy ehhez amid kötéssel kapcsolódó telített zsírsav alkotja. Az oligoszacharid egység neutrális monoszacharid egységekből (glükóz, galaktóz, N-acetil-galaktózamin) épül fel, melyek kapcsolódási sorrendje meghatározott, azonban számuk változó lehet az egyes gangliozid típusokon belül. A gangliozidok jellegzetessége, hogy egy vagy több szíálsavat (N-acetil-neuraminsav) is tartalmaznak a cukorláncon, amely révén a molekula fiziológiás pH-n negatív töltésű. A gangliozidok szerkezetében nagyfokú heterogenitás figyelhető meg és számos módosulat ismert mind a ceramid, mind az oligoszacharid résznek. A megfigyelések szerint a fehérjékkel történő interakciókban leginkább a cukorlánc vesz részt, ezért jelenleg a legtöbb kutatás a különböző gangliozid glikoformák vizsgálatára irányul. A szerkezeti sokféleség ellenére az agyban csak néhány gangliozid fordul elő nagyobb mennyiségben, ezek a GM1, GD1a, GD1b, GT1b és GQ1b gangliozidok, melyek különböző szíálsav tartalommal rendelkeznek (1, 2, 3 vagy 4 szíálsav). Az idegszöveten kívül a kevesebb monoszacharid alegységből álló, monoszializált GM3

gangliozid dominál, azonban előfordulhat például az inzulin-érzékeny szövetekben a GM3 mellett a GM1 is.

A kapilláris elektroforézis (CE) nagy hatékonysága, kis minta szükséglete és rövid analízis ideje révén igen alkalmas lehet a szerkezetileg nagy hasonlóságot mutató biomolekulák elválasztására. Az irodalomban relatíve kevés, a gangliozidok elválasztását célzó CE módszer található. Ezek közös jellemzője, hogy többnyire standard gangliozidok elválasztására fókuszálnak és csak kevés biológiai mintákon történő analízist mutatnak be, illetve ez utóbbi elválasztások hatékonysága sem kielégítő. Továbbá két, a kutatások szerint jelentős szabályozó szerepet betöltő gangliozid, a GQ1b és a GM3 biológiai mintákból történő elválasztását nem vizsgálták. A gangliozidok CE elválasztásában alapvető kihívást jelent az egyes gangliozid glikoformák töltés/tömeg hányadosában lévő kis különbség, amely különösen az azonos szialsav számú – tehát azonos töltésű – gangliozidok esetében jelent nehézséget. A korábbi módszerekben borát puffer alkalmazásával javuló elválasztást figyeltek meg, feltételezhetően az oligoszcharid egység és a borát anion közötti komplexképzés és az ennek következtében fellépő töltés/tömeg hányados növekedése eredményeképpen. A gangliozidok elválasztásában jelentkező egy további kihívás, hogy vizes közegben micellákat, illetve kevert micellákat képeznek, melyek együtt vándorolnak, ezért a különböző gangliozidok monomer formában történő elválasztása nehézséget jelent. Ennek kiküszöbölésére a korai publikációkban ciklodextrineket (CD) vizsgáltak puffer additívként, melyek az elválasztást vélhetően oly módon segítik, hogy a gangliozidok alkil-láncai és a CD között zárványkomplex jön létre, melynek következtében a micella felbomlik.

A CD-ket a gyógyszeriparban számos készítményben alkalmazzák vízben rosszul oldódó hatóanyagok oldhatóságának és biohasznosulásának növelésére. Ismert, hogy a CD-k a sejtmembránban található lipideket is képesek komplexálni, amely hatásuk korrelációt mutat toxicitásukkal. A CD-k üregmérete alapján szelektivitás figyelhető meg a különböző típusú lipidekkel való kölcsönhatásban. Míg az alfa-ciklodextrin (ACD) elsősorban a telített zsírsavakkal, a nagyobb üreg méretű béta-ciklodextrin (BCD) és származékai zsírsavakkal és koleszterinnel is képesek stabil komplex létrehozására. Ez utóbbi tulajdonságot kiaknázva a metil-béta-ciklodextrineket elterjedten használják *in vitro* vizsgálatokban a sejtmembrán koleszterin tartalmának módosítására, és ezáltal a lipid raftok vizsgálatára. Továbbá, szintén koleszterin komplexáló képessége révén, a 2-

hidroxipropil-béta-ciklodextrint (HPBCD) jelenleg a koleszterin felhalmozódással járó ritka kórkép, a Niemann-Pick C típusú betegség kezelésében gyógyszerjelöltként vizsgálják. Annak ellenére, hogy ismert a BCD-k zsírsavakkal történő komplexképzése, a gangliozidokra kifejtett hatásokról kevés adat áll rendelkezésre.

2. Célkitűzés

A gangliozidok fiziológias és patológias folyamatokban betöltött szerepének megismerésére jelenleg is számos kutatás irányul, melyhez jelentősen hozzájárulhat hatékony elválasztástechnikai módszerek fejlesztése. A CD-k alkalmasak lehetnek a lipidek vizsgálatára mind bioanalitikai, mind biokémiai módszerekben történő alkalmazásban, azonban a gangliozidokkal való kölcsönhatásuk nem kellően ismert.

Mindezeket figyelembe véve, doktori munkám során célul tűztem ki:

1. A szövetekben legnagyobb mennyiségben jelen lévő neuronális (GM1, GD1a, GD1b, GT1b és GQ1b) és perifériás (GM3) gangliozidok elválasztására alkalmas CE módszer kidolgozását.
 - Az elválasztás optimalizálását és különböző CD-k elválasztásra gyakorolt hatásának vizsgálatát.
 - Az optimalizált módszer validálását a neuronális gangliozidok mennyiségi meghatározására.
 - A validált módszer alkalmazhatóságának demonstrálását biológiai mintákon.
2. Annak vizsgálatát, hogy különböző CD-k hogyan befolyásolják a patkány nagyagyból izolált szinaptoszómák gangliozid és koleszterin tartalmát.
 - Koleszterin kivonásra alkalmas heptakis(2,6-di-O-metil)-béta-cyclodextrin (DIMEB) és HPBCD gangliozid tartalomra gyakorolt hatásának vizsgálatát.
 - ACD származékok vizsgálatát annak céljából, hogy alkalmasak-e szelektív gangliozid extrakcióra.
 - Annak vizsgálatát, hogy a CD-k hatására létrejött lipid depléció hogyan befolyásolja a szinaptoszómákból történő glutamát felszabadulást.

3. Módszerek

A CE módszer kidolgozását, illetve a lipid depléciós kísérleteket nagyagy és kisagy szinaptoszóma mintákon végeztük el, melyeket felnőtt, hím Wistar patkányokból preparáltunk.

A gangliozidok izolálása a szinaptoszómákból folyadék-folyadék extrakció alkalmazásával történt: kloroform-metanol-víz (4:8:3) oldószerkelet felhasználásával teljes lipid kivonat készült, majd víz (0,173 vol) hozzáadásával fázisválas indukálása révén a gangliozidok a felső, vizes fázisba kerültek, melyet nitrogén árammal szárazra pároltunk. A gangliozid mintákat vízben oldottuk fel, közvetlenül a CE mérést megelőzően.

A CE módszer validálását patkány nagyagy szinaptoszóma mintákon végeztük el. Kalibrációs görbét vettünk fel az idegszövetre jellemző öt fő gangliozid (GM1, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b) meghatározásához. A kalibrációt háttérkivonás módszerrel végeztük, azaz a biológiai mintákhoz a kivonat készítést megelőzően növekvő mennyiségű analitot adtunk (*spike*-olás), és az ezen mintákból kapott csúcsterületből kivontuk a nem *spike*-olt mintában mért válaszjelet, majd az így kapott értékekre illesztettünk görbét. A számításokhoz az analit és a belső standard csúcsterület arányát használtuk fel. A LOQ és LOD értékeket a következőképpen számítottuk:

$$\text{LOQ} = 10\sigma/S \quad (1)$$

$$\text{LOD} = 3.3\sigma/S \quad (2)$$

ahol σ = Y-tengelymetszet relatív szórása és S = a görbe meredeksége.

A napon belüli és napok közötti torzítatlanság és pontosság értékek meghatározásához alacsony, közepes és magas koncentrációjú QC mintákat használtunk. A torzítatlanság esetén a nominális érték $\pm 15\%$ -át fogadtuk el megfelelőnek, az alacsony QC szint esetében ez $\pm 20\%$ volt. A pontosság esetén $\pm 15\%$ relatív szórás (RSD) értéket fogadtuk el megfelelőnek, az alacsony QC szint esetében ez $\pm 20\%$ RSD volt. Meghatároztuk a minták extrakciós hatásfokát alacsony, közepes és magas koncentrációjú QC mintákon, melyet a következőképpen számoltunk: extrakció előtt *spike*-olt minta/extrakció után *spike*-olt minta*100. Az extrakció reprodukálhatóságát három mérési nap átlagának RSD értékével határoztuk meg. Az előkészített minta stabilitásának vizsgálatához a vízben oldott gangliozid kivonatokat 24 óra 5 °C-on tárolást követően vizsgáltuk, míg a

hosszútávú mintastabilitáshoz a gangliozid kivonatokat 1 hétig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő tárolást követően vizsgáltuk.

A gangliozidok analízisét P/ACE MDQ (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) kapilláris elektroforézis készüléken végeztük. A detektálás UV detektorral, 200 nm-en történt. Az elválasztásokhoz $75\text{ }\mu\text{m}$ belső átmérőjű ömlesztett kvarc kapillárisokat (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) alkalmaztunk. A futások között a kapillárist 0,5% nátrium-dodecil-szulfát oldattal, majd az elválasztó pufferrel mostuk. A minta injektálása nyomás alkalmazásával történt. Az elválasztásokat állandó feszültség alkalmazása mellett végeztük. Vizsgálataink során a következő CD-eket teszteltük az elválasztó pufferben additívként alkalmazva: ACD, BCD, gamma-ciklodextrin (GCD), random metil-alfa-ciklodextrin (RAMEA), DIMEB, 2-hidroxi-propil-alfa-ciklodextrin (HPACD), HPBCD. A nátrium-borát puffer koncentrációját 50-150 mM tartományban, míg pH értékét pH 8,5-10,0 között vizsgáltuk.

A CD-k lipid tartalomra kifejtett hatását patkány nagyagy szinaptoszóma mintákon vizsgáltuk. A szinaptoszómákat 40 percig $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk különböző koncentrációjú CD-t (0,3-100 mM) tartalmazó HEPES-glükóz pufferben (pH 7,4). A kísérletek során a DIMEB, a HPBCD, a RAMEA és a HPACD hatását vizsgáltuk. Kontroll mintaként a szinaptoszómákat 40 percig $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on HEPES-glükóz pufferben inkubáltuk.

A CD kezelést követően a szinaptoszómák koleszterin tartalmát kereskedelemben elérhető koleszterin-oxidáz enzimmal működő kit segítségével a gyártó utasítása szerint mértük meg, néhány módosítás alkalmazásával a mintaelőkészítésben. Röviden, a CD kezelést követően lipid kivonatot készítettünk kloroform-metanol 2:1 oldószerkelettel, majd a lipid kivonatot nitrogén áramban szárazra pároltuk. A kivonatot a kit pufferében oldottuk fel, és a koleszterin tartalom megállapításához a keletkezett fluoreszcens terméket 530/590 nm-en detektáltuk fluoreszcencia microplate olvasóval (Varioskan LUX multimode microplate reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

A CD kezeléseket a szinaptoszómák életképességére gyakorolt hatásának vizsgálatához reszazurin redukciós tesztet alkalmaztunk a gyártó utasításai szerint, a mintaelőkészítés kisebb módosítását követően. A mérés alapja, hogy a nem fluoreszcens reszazurin a plazmamembránon átjutva, az intracelluláris dehidrogenázok által fluoreszcens rezorufinná redukálódik. A kezelést követően a CD-t tartalmazó puffert reszazurin oldatot

tartalmazó pufferre cseréltük és a szinaptoszómákat 25 percig inkubáltuk, majd a keletkezett fluoreszcens rezorufin szintjét fluoreszcencia microplate olvasóval mértük 530/590 nm-en.

A CD kezelések membránintegritásra kifejtett hatásának vizsgálatához laktát-dehidrogenáz (LDH) kibocsátást mértünk a gyártó utasítása alapján, a mintaelőkészítés kisebb módosítását követően. A mérés alapja, hogy a károsodott membránon keresztül a citoplazmatikus LDH az extracelluláris térbe jut, és az enzim mennyisége arányos a membránintegritás csökkenésével. A CD kezelést követően a szinaptoszómákat pelletáltuk és a felülúszót összegyűjtöttük a kibocsátott enzim tartalmának meghatározásához. A szinaptoszóma pelletet 1% Triton X-100 alkalmazásával lizáltuk a teljes LDH tartalom méréséhez. A fluoreszcens terméket 530/590 nm-en detektáltuk fluoreszcencia microplate olvasóval.

A CD kezelések glutamát felszabadulásra gyakorolt hatását a következő kísérleti elrendezésben vizsgáltuk: a szinaptoszóma mintákat 10 mM DIMEB, 34 mM HPBCD, 26 mM RAMEA vagy 85 mM HPACD tartalmú pufferben inkubáltuk 40 percig 37 °C-on. Kontroll mintaként a szinaptoszómákat azonos körülmények között HEPES-glükóz pufferben inkubáltuk. Az inkubálást követően 1 mM 4-aminopiridin hozzáadásával váltottunk ki depolarizációt, a nem stimulált csoportok esetében HEPES-glükóz puffert adtunk a szinaptoszómákhoz. A felszabadult glutamát szintjét fluoreszcens származékképzést követően CE-LIF módszerrel határoztuk meg P/ACE MDQ Plus (SCIEX, Framingham, MA, USA) kapilláris elektroforézis készüléken.

A gangliozidok kalibrációs görbéit egyszerű lineáris regresszió alkalmazásával készítettük el. A kisagy és nagyagy szinaptoszómák gangliozid szintjének összehasonlításához kétmintás t-próbát alkalmaztunk. A CD kezeléseket követő mérések esetén az IC_{50} értékeket nemlineáris regresszióval illesztett koncentráció-hatás görbék alapján becsültük meg. A glutamát felszabadulás elemzése esetén az eredmények statisztikai elemzésére egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA), majd ezt követően az adatok összehasonlítására Bonferroni *post hoc* tesztet alkalmaztunk. Az értékelésnél a különbségeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. Az értekezésben szereplő eredmények minimum három párhuzamos mérés értékeinek átlagát mutatják. Eredményeinket átlag \pm standard hiba formájában adtuk meg.

4. Eredmények

A CE módszer optimalizálása során vizsgáltuk, hogy a különböző üreg méretű és különböző szubsztituensekkel rendelkező CD-k az elválasztó pufferben additívként alkalmazva milyen hatást gyakorolnak a gangliozidok elválasztására. Vizsgálataink során az ACD esetében elválasztást figyeltünk meg a különböző szilsav számú analitok között, azonban az egy szíalsavval rendelkező GM3 és GM1 gangliozidok esetén azt tapasztaltuk, hogy azok átfedő dupla csúcsokkal migrálnak. A BCD és GCD esetén nem tapasztaltunk érdemi változást az elválasztásban. A továbbiakban hidroxipropilezett és metilezett ACD és BCD származékok elválasztásra gyakorolt hatásait vizsgáltuk. A DIMEB, a HPACD és HPBCD alkalmazásával elválasztást tapasztaltunk a különböző szilsav számú gangliozidok között, azonban az azonos szíalsav számú GM3 és GM1, valamint a GD1a és GD1b szerkezeti izomerek között csak részleges elválasztást eredményeztek. Ezen CD-k alkalmazásával dupla csúcsokat figyeltünk meg több gangliozid esetében. Továbbá, a hidroxipropilezett származékok esetében elválasztást csak relatíve magas, 100 mM koncentrációban tapasztaltunk, amely hosszú analízis idővel párosult. Elválasztást tapasztaltunk mind a hat vizsgált gangliozid között a RAMEA alkalmazásával, melynek optimális koncentrációját 20 mM-ban határoztuk meg.

Vizsgáltuk a nátrium-borát puffer koncentrációjának (50-150 mM) és pH értékének (pH 8,5-10,0) hatását a gangliozidok elválasztására. Mind a puffer koncentrációjának, mind a pH értékének növelése esetén javuló elválasztást és megnövekedett migrációs időket tapasztaltunk. Az optimális elválasztást 100 mM nátrium-borát alkalmazásánál, pH 10,0 értéken határoztuk meg, ahol az azonos szíalsav számú gangliozidok között (GM3 és GM1, valamint GD1a és GD1b) is megfelelő elválasztást értünk el.

A CE módszer optimalizálása során 70 cm effektív kapilláris hosszúság és +25 kV feszültség alkalmazása bizonyult megfelelőnek az analitok elválasztásához.

Az optimális pufferösszetételt (20 mM RAMEA, 100 mM nátrium-borát, pH 10,0) és egyéb elválasztási paramétereket alkalmazva a CE módszert validáltuk patkány nagyagy szinaptoszóma minták felhasználásával. A validálás során vizsgált paramétereket az elfogadási tartományon belül találtuk. A validált módszerrel meghatároztuk a patkány nagyagy és kisagy gangliozid koncentrációját és összevetettük az egyes gangliozidok

százalékos arányát, és a mért értékeket az irodalomban fellelhető adatokkal összevethetőnek találtuk.

A CD-k gangliozid és koleszterin deplécióra kifejtett hatását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a DIMEB hasonló koncentráció tartományban indukálja mind a koleszterin ($IC_{50} = 7,4 \text{ mM}$), mind a gangliozidok ($IC_{50} = 10,5 \text{ mM}$) deplécióját patkány nagyagy szinaptoszómákon. Szelektív koncentráció tartományt a koleszterin kivonására tehát nem találtunk a DIMEB esetén. A HPBCD alkalmazása során is tapasztaltunk koleszterin és gangliozid depletáló hatást, azonban ezek IC_{50} értékei (koleszterin: $IC_{50} = 33,5 \text{ mM}$, gangliozidok: $IC_{50} = 83,3 \text{ mM}$) szignifikáns különbséget mutattak és szelektív koncentráció tartomány volt megfigyelhető a két lipid depléciója esetén. A vizsgált ACD származékok (RAMEA és HPACD) alkalmazása során megfigyeltük a gangliozidok deplécióját, a RAMEA esetében megállapított IC_{50} érték $26,5 \text{ mM}$, míg a HPACD esetében $85,1 \text{ mM}$ voltak. Az ACD származékokkal történő kezelést követően a koleszterin tartalomban nem volt mérhető változás.

Vizsgáltuk a CD-k membránintegritására (LDH kibocsátás teszt) és életképességére (reszazurin redukciós teszt) gyakorolt hatását patkány nagyagy szinaptoszómákon. Mindkét mérés típus esetén a DIMEB esetében volt megfigyelhető a legnagyobb mértékű károsító hatás. Szignifikáns életképesség csökkenés 10 mM feletti DIMEB koncentrációnál volt megfigyelhető, továbbá teljes életképesség veszteség mutatkozott 60 mM koncentrációnál. A HPBCD esetén csak kismértékű életképesség veszteséget tapasztaltunk, a legnagyobb, 100 mM -os koncentrációban. A DIMEB és a HPBCD membránintegritásra gyakorolt hatásának vizsgálata során tetőzést figyeltünk meg, körülbelül 60% LDH enzim kibocsátásnál. Életképesség csökkenést a RAMEA vizsgálata során csak a legnagyobb alkalmazott koncentrációban (100 mM) figyeltünk meg, a HPACD kezelést követően azonban egyáltalán nem tapasztaltunk. Az ACD származékok esetén, továbbá csak a magas koncentrációkban történő alkalmazáskor detektáltunk membránkárosító hatást.

Vizsgáltuk, hogy a különböző CD-vel kiváltható szelektív lipid depléció milyen hatást gyakorol a patkány nagyagy szinaptoszómákból történő glutamát felszabadulásra. Az előzetesen a lipid deplécióra meghatározott IC_{50} értékek felhasználásával olyan kísérleti elrendezést hoztunk létre, amelyben szelektív, 50% -os koleszterin depléciót indukáltunk

a HPBCD 33 mM koncentrációban történő alkalmazásával, amely értéknél csak minimális gangliozid deplécióval kellett számolni. Mivel a DIMEB esetében nem találtunk szelektív koncentráció tartományt a gangliozidok és a koleszterin depléciójában, ezért mindkét lipid körülbelül 50%-os depléciójával kellett számolni. Szelektív, 50%-os gangliozid depléciót indukáltunk RAMEA és HPACD alkalmazásával. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy mind a négy CD alkalmazása megemelte a bazális (nem stimulált) glutamát felszabadulást. Azon CD-k esetében, amelyekkel gangliozid depléciót váltottunk ki (DIMEB, RAMEA, HPACD), nem volt megfigyelhető szignifikáns glutamát felszabadulás a 4-aminopiridinnel történő depolarizáció hatására. Ellenben megfigyeltük a HPBCD esetében, ahol szelektív koleszterin depléciót indukáltunk (gangliozid kivonás nélkül), hogy stimulálás hatására szignifikáns glutamát felszabadulás mérhető csakúgy, mint a CD kezelést nem kapó csoportban.

5. Következtetések

A CE elválasztások során kapott eredményeink alapján elmondható, hogy a natív ACD, illetve a vizsgált hidroxipropilezett és metilezett ACD és BCD származékok is képesek a gangliozid micellák felbontására, vélhetően a ceramid résszel történő komplexképzés révén. A szubsztituenseket tekintve a hidroxipropilezett származékok a metilezett származékoktól magasabb koncentrációban eredményeztek elválasztást, ami kisebb stabilitású CD/gangliozid komplexek létrejöttére utalhat, melyhez hozzájárulhat, hogy a hidroxipropil-csoportok a metil-csoportokhoz viszonyítva kevésbé hidrofóbok, továbbá a komplexképzést sztérikus gátlás is befolyásolhatja.

Az elválasztásokban, több CD esetében is tapasztalt dupla csúcsok feltehetőleg a különböző, C18:1 és C20:1 szfingozint tartalmazó gangliozid lipoformákat jelölhetik, amelyek a mérések során használt gangliozid standardekben megtalálhatók. Mivel ismert, hogy a komplexben a CD-k száma a zsírsavak hosszúságától függően változhat, feltételezhető, hogy a különböző hosszúságú szénláncokat tartalmazó gangliozidok esetén eltérő komplexstabilitási állandó vagy sztöchiometria alakul ki. Ezen komplexek részlegesen elváló, dupla csúcsokként jelenhetnek meg, amennyiben a töltés/tömeg hányadosban vagy stabilitásban lévő különbség elég nagy.

Eredményeink alapján elmondható, hogy míg a CD-k üreg mérete alapján az ACD-k tekinthetők elsősorban optimálisnak a telített zsírsavakkal történő komplexképzésre, CE

kísérleteink alapján arra következtethetünk, hogy a hidroxipropilezett és metilezett BCD származékok is képezhetnek komplexet a gangliozidokkal. CE eredményeink és irodalmi adatok alapján arra következtethetünk, hogy a CD-k két különböző mechanizmus által segítik a gangliozidok elválasztását. A gangliozidok a vizes elválasztó pufferben micellákat vagy kevert micellákat képeznek, ezért a különböző szerkezetű gangliozidok elektroforetikus mobilitása nem megkülönböztethető. A CD-k a komplexképzés és a micellák felbontása révén feltehetőleg elősegítik, hogy az egyes gangliozidok a saját elektroforetikus tulajdonságuknak megfelelően migráljanak. Vélhetően ez az alapja a gangliozid glikoformák elválasztásának. A ceramid változatok elválasztása pedig valószínűleg a komplexek különböző sztöchiometriáján vagy stabilitásán alapul.

Mivel célunk elsősorban a gangliozidok szénhidrátlánc szerinti elválasztása volt, a RAMEA bizonyult a legalkalmasabbnak a puffer additívként történő alkalmazásra, mivel csak a glikoformák szerinti elválasztást eredményezett, amely az elektroferogramok egyszerűbb kiértékelhetősége szempontjából is előnyös.

Megállapítottuk, hogy a borát puffer szükséges volt az azonos szíálsav számú gangliozidok elválasztásához, melynek feltételezhetően az az alapja, hogy a borát anion további negatív töltéssel látja el a GM1 és GD1b oligoszacharid egységét.

A validált CE módszer alkalmasnak bizonyult a patkány nagyagy és kisagy szinaptoszómák gangliozid koncentrációjának meghatározására. Továbbá, a CE módszer lehetőséget ad a gangliozidok analízisére patológias állapotok vizsgálatában vagy farmakológiai kísérletekben.

A patkány nagyagy szinaptoszómán történő CD kezelések esetében megállapítottuk, hogy a vizsgált hidroxipropilezett és metilezett ACD és BCD származékok képesek depletálni a plazmamembrán gangliozid tartalmát.

Eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy a koleszterin extrakcióra széles körben alkalmazott metil-BCD-k alkalmazása során megfigyelt biológiai hatások vélhetően nem kizárólag a koleszterin eltávolításának tulajdoníthatók, tekintve, hogy a DIMEB esetében, hasonló koncentráció tartományban tapasztaltunk gangliozid és koleszterin depleciót.

Vizsgálataink alapján a HPBCD ideálisabb lehet a koleszterin szelektív eltávolítására, mivel a koleszterin kivonására szelektív koncentráció tartományt tudunk azonosítani, mielőtt gangliozid depléció is létrejött volna.

Továbbá, méréseink alapján a vizsgált ACD származékok (RAMEA és HPACD) alkalmasak lehetnek szelektív gangliozid depléció indukálására *in vitro* kísérletek során.

A CD-k membránintegritására és életképességére gyakorolt hatását tekintve elmondható, hogy a BCD származékok nagyobb mértékű károsodást okoznak, mint az ACD származékok, melynek oka elsősorban feltehetőleg a BCD származékok esetében megfigyelt koleszterin depléció. A CD származékok típusát tekintve a metilezett származékok nagyobb mértékű károsodást okoztak, mint a hidroxipropilezett származékok. Ezen eredményeink az irodalomban fellelhető adatokkal összhangban vannak.

A tesztelt CD-k szelektív lipid depléciós tulajdonságát felhasználva a továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy alkalmazásuk milyen hatással van a központi idegrendszer fő excitátoros neurotransmitterének, a glutamátjának a felszabadulására. A CD kezeléseket követően, a bazális glutamát felszabadulásban mért emelkedés lehetséges magyarázata lehet a szinaptoszóma membránjának kismértékű károsodása, melynek következtében a neurotransmitter kijuthat a szinaptoszómából az extracelluláris térbe. A CD kezeléseket követően, azon csoportokban, amelyekben gangliozid depléciót váltottunk ki, nem volt mérhető szignifikáns glutamát felszabadulás 4-aminopiridinnel történő stimulálás hatására, a nem stimulált csoporthoz viszonyítva. Ezen megfigyelésünk arra utalhat, hogy a membrán gangliozid tartalmának nagyobb szerepe lehet a glutamát felszabadulás folyamatában, mint a koleszterinnek. A gangliozidok neurotransmisszióban betöltött szerepének pontos felderítéséhez azonban további vizsgálatok szükségesek.

Eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy a CD-k alkalmazása lehetőséget nyújthat a membrán gangliozid tartalmának változtatására és ezáltal funkcióinak vizsgálatára. Továbbá kiemelendő a CD-k karakterizálásának fontossága a membrán lipidekkel való kölcsönhatásuk szempontjából.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Geda O, Tábi T, Lakatos PP, Szökő É. (2022) Differential Ganglioside and Cholesterol Depletion by Various Cyclodextrin Derivatives and Their Effect on Synaptosomal Glutamate Release. *International Journal of Molecular Sciences*, 23.

IF: 6,208

2. Geda O, Tabi T, Szoko E. (2021) Development and validation of capillary electrophoresis method for quantification of gangliosides in brain synaptosomes. *J Pharm Biomed Anal*, 205: 114329.

IF: 3,571

Az értekezés témájától független közlemények

1. Lakatos PP, Karádi DÁ, Galambos AR, Essmat N, Király K, Laufer R, Geda O, Zádori ZS, Tábi T, Al-Khrasani M, Szökő É. (2022) The Acute Antiallodynic Effect of Tolperisone in Rat Neuropathic Pain and Evaluation of Its Mechanism of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 23.

IF: 6,208

