

DEBRECENI EGYETEM
AGRÁRTUDOMÁNYI CENTRUM
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTENYÉSZTÉS TUDOMÁNYI INTÉZET

ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető: Dr. Kovács András MTA doktora

Témavezetők:

Dr. Magyar Károly
egyetemi docens

Dr. Varga Vince
az MTA doktora

„DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI”

Méregtelenítési folyamatok laborállat idegrendszerben

**Trankvillánsok Glutation-S-Transzferáz indukciója laborállat és
kishaszonállatok egyes szerveiben valamint új neuroinformatikai módszerek a
hatékonyságvizsgálatban**

Készítette:

Godó Zoltán Attila
doktorjelölt

Debrecen
2007

I Bevezetés

A humán gyógyászati, az állatkísérleti, az állatorvosi valamint az állattenyésztési gyakorlatban egyaránt nagy jelentőséggel bírnak a gerincesek (vertebrata) központi idegrendszerére erős gátló hatást kifejtő, stresszoldó, agresszivitást csökkentő trunkvillánsok, szorongást oldó anxiolitikumok, szedatívumok. Humán gyógyászatban a schizophreniák terápiájának legfontosabb gyógyszerei. A pszichotikus betegek izgatottsága, zavartsága csökken, a hallucináció és a téveszmék mérséklődnek vagy megszűnnek a neuroleptikus (antipszichotikus) gyógyszerekkel történő kezelés hatására.

A vad, agresszív állatokat már kis adagok beadása megnyugtatja, könnyen kezelhetővé teszi, a természetes és a mesterségesen kiváltott dühösségi reakciókat, verekedő - támadó aktivitást kikapcsolják. Így kísérleti beavatkozások elvégezhetősége érdekében használják laborállatoknál (rágcsálók, nyúl, majom stb.).

Széles körben alkalmazzák az állatgyógyászat és az állattenyésztés területén is. Kisebb, fájdalom nélküli de kellemetlen állatorvosi beavatkozások során az állatokat kezelhetővé teszik, vagy analgetikumokkal kombinálva fájdalmasabb beavatkozások is elvégezhetőek (neuroleptanalgesia). Használatukkal elkerülhetőek a kockázatosabb hypnoticumok és narkotikumok alkalmazása.

Az állattenyésztésben főként a stressz (szállítás, mérlegelés, jelölés, karikázás, szarvtalanítás, körmözés stb.) negatív következményeinek csökkentésére, illetve az értékes példányok megóvása érdekében, valamint a gyógyszeres megfékezés eszközeként alkalmazzák. A stressz ugyanis súlyos negatív hatást gyakorolhat a homeosztázisra, így a szaporodásra, növekedésre, ellenálló képességre és egyéb termelési és tenyésztési paraméterekre. A trunkvillánsoknak tehát komoly gazdasági jelentősége és létjogosultsága van az állattenyésztés területén is.

Azonban a trunkvillánsok –különösen a neuroleptikumok– jelentős számú kellemetlen és olykor veszélyes mellékhatással rendelkeznek (dyskinesziák, parkinsonismus, akatizia, agresszivitás, endokrin-, cardiovascularis-, antikolinerg-, haematológiai mellékhatások, szexuális funkciózavarok stb.). Ez hosszabb távon kihathat a test zsír és izom arány megváltozására, viselkedési zavarokat okozhat, csökkentheti a szaporodási mutatókat, stb. Használatuk lehetőségeit tovább szűkíti, hogy a haszonállatokban maradó szermaradványok mennyiségét fogyasztóvédelmi megfontolásból szigorúan korlátozzák. Az egészségügyi miniszter 2/1999. (II.5) EüM. rendelete valamint az Európai Parlament és a Tanács 2377/90/EGK rendelete szabályozza az állati eredetű élelmiszerekben az állatgyógyyszer-maradványok maximális mennyiségét, beleértve a trunkvilláns gyógyszereket is.

A kívánt biológia hatás eléréséhez bejuttatott gyógyszerek, –így az általam vizsgált vegyületek is–, testidegen anyagok (xenobiotikumok), amelyeknek a szervezetből való eltávolítására specifikus metabolizáló enzimek és transzportáló mechanizmusok alakultak ki a filogenezis során. A fokozott metabolizáció különböző mértékben megterheli az egyes szervek detoxifikációs mechanizmusait. Ezáltal kevesebb kapacitás jut az egyéb ártalmas tényezők elleni védekezésre. Csökkenti az állatok immunvédekezési teljesítményét ami kihathat a hasznos produkció minőségére és mennyiségére egyaránt.

Az antipszichotikus és trunkvilláns gyógyszereknek jelentős számú metabolitját azonosították. Nem ismert azonban minden intermediert illetve az sem, hogy ezek az intermedierek milyen biológiai hatással rendelkeznek vagy szerepet játszhatnak-e a majdnem mindig megfigyelhető mellékhatások kialakulásában, az egyéni tűrőképesség és toxikus hatások kifejlődésében. (DAHL and STRANDJORD, 1977; DOLLERY, 1991; YEUNG et al., 1993; JAVAID, 1994).

Feltételeztem, hogy a fenti gyógyszerek némelyike (elsősorban a halogén szubsztituált vegyületek) glutation-S-transzferáz enzim (GST) segítségével, a glutation-S konjugáció útján is metabolizálódhatnak, illetve ürülhetnek ki a szervezetből. Amennyiben ez bekövetkezik, akkor azt is feltételezhetjük, hogy a vegyületek maguk is indukciós hatással bírhatnak a metabolizmusukban szerepet játszó enzimek szintézisére. Tehát a GST enzim szintézise is fokozódhat, ezáltal fokozott mértékben képződhetnek az egyes szervekben a trankvilláns vegyületek glutation konjugátumai, így pl. az agyszövetben is. Feltételezhető az is, hogy a glutation konjugátumok is kölcsönhathatnak a központi idegrendszerben a trankvillánsok hatásmechanizmusában szerepet játszó fehérjékkel, receptorokkal. Másrészt a glutation-konjugátumok, más γ -glutamil peptidekhez és glutation analógokhoz hasonlóan, befolyásolhatják a központi idegrendszer glutamaterg neurotranszmissziós folyamatait is (VARGA és mtsai, 1988; MCMOHAN et al., 2000; JANÁKY és mtsai, 2000; HERMANN és mtsai, 2004). Ezek a vegyületek így egy másik útvonalon, a serkentő mechanizmus gátlása révén is kifejthetik hatásukat a központi idegrendszerben (KIR). Így hozzájárulhatnak a mellékhatások kialakulásához is.

A trankvillánsok egyik fő támadáspontja az agytörzsi formatio reticularis és elsősorban a retikuláris aktiváló rendszer (RAS) összetett pályarendszereinek idegsejtjei. Elsősorban EEG (elektroencefalográfia) vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a trankvillánsok jellegzetes szinkrontüzelési jelenséget váltanak ki a kéregben, ami feltételezhetően kapcsolatban áll a központi idegrendszerre gyakorolt nyugtató hatással. A szinkronizáció kialakulásának mechanizmusa nem ismeretes, de tudjuk, hogy szabályozásában esszenciális szerepe van a RAS-nak. Az EEG meglehetősen indirekt információt nyújt az idegrendszer működéséről, ezért a KIR egyes régióinak és az abban szerepet játszó idegsejteknek, idegpályáknak a behatóbb vizsgálata számos értékes információt rejt magában. Ezért elektrofiziológiai mérőtechnikák felhasználásával neuroinformatikai analízáló módszerekre van szükség. Ennek segítségével vizsgálható az egyes idegsejtek tüzelése, azaz depolarizációs frekvenciája, az idegsejtek aktivitásának következtében kialakuló területi, regionális potenciál (field potential) változása vagy az egyes idegpályák által vezetett ingerületi folyamatok (akciós potenciálok) regisztrációja, elemzése. Kevésbé ismert a szinkron tüzelési mintázatok természete és kapcsolata a trankvillánsok és glutation konjugátumainak hatékonyságával, az egyes vegyületek hatásmechanizmusával. Nem ismert, hogy milyen tüzelési mintaváltozásokat okoznak ezek a vegyületek a formatio reticularis területén.

A tüzelési mintázat értékelése akkor lehet hatékony, ha egy időben minél több elektródával valamint magas időfelbontással vagyunk képesek regisztrálni (jelen méréseim során 128 elemű elektróda tömbbel és multiprocesszoros párhuzamos feldolgozással).

További vizsgálati lehetőségek sokaságát nyújtja ha egyben stimulációra is képes egy ilyen rendszer, tehát kétirányú kommunikációt képes megvalósítani a központi idegrendszer egy célzott területével. Ilyen nagy mennyiségű adatfolyam feldolgozására mesterséges neuronhálózat lehet alkalmas, amely felületes analógiát mutat a hozzá kapcsolt élő idegrendszer struktúrájához. A digitális technika robbanásszerű fejlődése lehetővé tette a nagy teljesítményű mikrokontrollerek neurobiológiai, gyakorlati hasznosítását, de a mai napig csak igen kevés ilyen irányú felhasználás, alkalmazás született. Nem lehet olyan publikáció, amelyben mikrokontroller alapú mesterséges neuronhálózattal, multielektroda tömbön keresztül kétirányú kommunikációt valósítottak volna meg a hozzákapcsolt központi idegrendszeri területtel. Ezért célul tűztem ki egy olyan, új elven felépülő neuroinformatikai rendszer kiépítését és algoritmusainak kidolgozását, amelynek segítségével vizsgálni lehet az agytörzsi tüzelési mintázatokat vagyis az idegrendszer működését, az egyes területek kommunikációját más távolabbi területekkel, továbbá vizsgálható a trankvillánsok valamint metabolitjaik hatása az agytörzsi formáció reticularis elektromos aktivitására.

A jelentős számú mellékhatás csökkentése és újabb, hatékonyabb vegyületek szintetizálása érdekében intenzív kutatás folyik, aminek következtében időről-időre cserélődnek a szerek a gyógyszer-törzskönyvi nyilvántartásban. Fontos feladat tehát, hogy megismerjük ezeknek a kémiaiilag változatos gyógyszereknek a metabolizmusát és eliminációját az állati szervezetben/ből. A központi idegrendszeri bioelektromos tevékenység pontosabb megismerése és az arra kifejtett trankvilláns hatások elemzése hozzásegíthet a gyógyszerek hatásmechanizmusának pontosabb feltárásához. Vizsgálataim segíthetnek az újabb, hatékonyabb vegyületek teszteléséhez, biológiai hatásának felderítéséhez. A különböző állatfajokon végzett összehasonlító vizsgálatok pedig adatokat szolgáltathatnak arra vonatkozóan, hogy mely gyógyszerek milyen állatfajoknál alkalmazhatók megbízhatóan, illetve nagymértékben segíthetik az eltérő biometabolikus utak feltárását.

A disszertációmban néhány a humán- és állatgyógyászatban (csak részben) alkalmazott trankvilláns gyógyszer hatását vizsgáltam a GST indukcióra, három állatfaj különböző szerveiben. A GSH-gyógyszer konjugátumok képződésének lehetőségét és azok biológiai hatását teszteltem. Bioinformatikai módszereket dolgoztam ki és alkalmaztam a GST enzimkinetikai analíziséhez. Újszerű, analóg és digitális jellemzőket integráló, mikrokontroller alapú, multiprocesszoros mesterséges neuronhálózatot és algoritmusait fejlesztettem, mellyel a gyógyszerek és konjugátumainak hatását vizsgáltam az agytörzs tüzelési mintázatára. Vizsgálataim eredményei interdiszciplináris jellegűek, a neurobiológia és a neuroinformatika területeiről.

1.1 Célkitűzések

A trankvilláns hatású vegyületek közül néhány kiemelt gyógyszer vizsgálatát tűztem ki célul. A választási szempont a heterogén kémiai szerkezet hasonló hatásprofil mellett, a hagyományos és új generációs besorolás, valamint a humán, állat és mindkettőnél történő gyakorlati alkalmazás elterjedtsége.

Disszertációmban az alábbi felvetett kérdésekre keresem a válaszokat, illetve dolgoztam ki megoldásokat:

1. Olyan új, a jelenleginél precízebb és hatékonyabb mikrokontroller alapú mérési rendszer, hardver és szoftver kidolgozása, amely lehetővé teszi nagyszámú biológia minta enzimaktivitásának gyors, megbízható mérését, az enzimkinetikai mérések során nyert adatok monitorozását, elemzését és értékelését.
2. A vizsgált vegyületek in vitro szubsztrátjai-e a GST enzimnek? Az 1-kloro-2,4-dinitrobenzén (CDNB) mint toxikus xenobiotikum a GST enzim szubsztrátja és fotometriásan mérhető általa az enzim aktivitása. A vizsgált gyógyszerek tehát kompetitíven gátolják-e a GSH – CDNB konjugátumok létrejöttét?
3. Az egyes trankvilláns hatású vegyületek mely szervekben és milyen mértékben váltanak ki GST enzimindukciót, azaz új enzimfehérje szintézisét, a gén expresszióját?
4. Van-e különbség a laboratóriumi gyakorlatban széles körben alkalmazott laboratóriumi patkány (*Rattus norvegicus*); az emlős gazdasági állataink modelljeként használatos, szintén emlős házinyúl (*Orictolagus cuniculus*) és a halak közül az állattenyésztési jelentőséggel bíró ezüstkárász (*Carassius auratus*) GST indukciójában az egyes szervek esetében?
5. Gazdasági haszonállatoknál (modellként házinyulát és az ezüstkárászt vizsgálva) milyen az egyes gyógyszerek alkalmazhatósága és hatékonysága, összevetve a humán és az állatgyógyászat gyakorlatában elterjedt vegyületeket. Különös tekintettel az első illetve második generációs neuroleptikumok helyére.

6. A GSH konjugátumoknak van-e hatékonysága a fenti fajok esetében, illetve szerepet játszhatnak-e egyes mellékhatások megjelenésében?
7. Olyan újszerű multielektródás elvezetési rendszer, multielektróda tömb és csúcstechnológiát alkalmazó analóg erősítő rendszer kidolgozása és kiépítése amellyel vizsgálni lehet az egyes vegyületek hatását az agytörzs célzott területeinek tüzelési mintázatára.
8. Olyan új multiprocesszoros mesterséges neuronhálózat és a hozzá tartozó algoritmusok kidolgozása, amely alkalmas a multielektródás tüzelési mintamatrixok valósidejű digitális feldolgozására és az idegrendszerrel való kétirányú, analóg kommunikáció megvalósítására.
9. A fenti rendszerrel vizsgálva, okoznak-e –és ha igen, milyen– tüzelési mintaváltozásokat a vizsgált trankvilláns vegyületek az agytörzs formatio reticularis pályarendszereiben és van-e különbség ugyanezen vegyületek GSH konjugátumai által kiváltott tüzelési mintaváltozásaiban.

A munkámat 1998 – 2007 közötti időszakban az alábbi intézetekben végeztem (kronológiai sorrendben):

- Debreceni Orvostudományi Egyetem, Élettani Intézet
- Kossuth Lajos Tudományegyetem, Természet Tudományi Kar, Állatanatómiai és Élettani Tanszék
- Debreceni Egyetem, Műszaki Főiskolai Kar, Villamosmérnöki Tanszék
- Debreceni Egyetem, Agrár –és Műszaki Tudományok Centruma, Műszaki Tudományi Kar, Környezet –és Vegyészmérnöki Tanszék. Elektrofiziológia – Bioinformatika Laboratórium.

II Anyagok és módszerek

Trankvilláns kezelések

A GST induktivitásának vizsgálatához a kísérleti állatoknak gyógyszereket adagoltam. A trankvillánsok kiválasztásánál több szempontot vettem figyelembe. Elsősorban neuroleptikumokat kívántam vizsgálni, mivel széles körben elterjedt vegyületek, nagy hatékonyságúak és heterogén kémiai szerkezetük ellenére hasonló hatással és mellékhatás profillal rendelkeznek. Figyelemreméltó továbbá, hogy egyes szereket csak az állatgyógyászat másokat csak a humángyógyászat alkalmaz, míg néhány vegyület mindkét területen elterjedt. Az összehasonlítás érdekében vizsgáltam továbbá egy anxyoliticum és egy sedatohypnoticum csoportú gyógyszert, amelyek szintén nagymértékben elterjedtek a gyakorlatban.

A fajonkénti dózis meghatározásánál az állatorvosi szakirodalomra (TÓTH, 2004) valamint a gyógyszer tájékoztatókra támaszkodtam (PERÉNYI, 2002). Azoknál a szereknél amelyeket nem alkalmaznak az adott fajnál, a humán adatok testtömeg kilogrammra átszámított értékét használtam fel (BORVENDÉG, 2002). Ezt korrigáltam saját teszt vizsgálatok eredményeivel és kalibráltam a dózist.

Típus	Vegyület	Humán dózis (hatóanyag/nap)	Állat dózis (hatóanyag/ttkg/nap)
típusos neurolepticum	chlorpromazinum	<i>Hibernal</i> 3 x 25 mg = 75 mg Maximum: 600 mg	<i>Hibernal</i> eb : 1-5 mg im. ló : 0,15-0,25 mg im.
	acepromazin	–	<i>Ventranquil A.U.V.</i> ló, szarvasmarha, sertés : 0,05-0,1 mg iv. ló, szarvasmarha, sertés : 0,1-0,2 mg im. kutya juh, kecske : 0,005 mg iv. kutya juh, kecske : 0,01 mg im. Élelmezés –eü. -i várakozási idő: Hús: 24 óra, tej: 12 óra
	thioridazinum	<i>Melleril</i> 100-600 mg Maximum: 800 mg	–
	haloperidolum	<i>Haloperidol</i> 5 mg Maximum: 60 mg	–
atípusos neurolepticum	tiapridum	<i>Tiapridal</i> 200-1200 mg Maximum: 1800 mg	–
	risperidon	<i>Risperdal</i> 4-6 mg Maximum: 10 mg	–
anxiolitikum	diazepam	<i>Seduxen, Stesolid</i> 5-15 mg Maximum: 40 mg	<i>Seduxen, Valium</i> ló : 0,02-0,1 mg iv. csikó : 0,1-0,25 mg iv. eb, macska : 0,1-0,5 mg im.
Sedato-hipnoticum	xylazine	–	<i>Xylazin A.U.V., Primazin A.U.V., Rometar A.U.V.</i> eb : 1-3 mg im. macska : 2-4 mg im. ló : 0,6-1 mg iv. vagy 1,5-3 mg im. szarvasmarha : 0,05-0,3 mg im. 0,025-0,15 mg iv. juh, kecske : 0,3-0,5 mg im. CP-Xylazin: élelmiszertermelő állatoknak nem adható. Más Xylazin tartalmú készítményeknél az élelmezés –eü. -i várakozási idő: Hús: 3-7 nap, tej: 3-7 nap

1. Táblázat. A vizsgált vegyületek gyógyszerkönyvi elnevezése, dózisa és gyakorlati alkalmazása

Laboratóriumi patkány

Az első vizsgálati körben csak neuroleptikumokat vizsgáltam. A humán gyógyszerek metabolizmusára vonatkozó adatok jórészt patkánykísérletekből állnak rendelkezésre. Ezért ennél a fajnál azt kívántam vizsgálni, hogy egyáltalán okoznak-e GST indukciót és milyen mértékűt az egyes szervekben a fenti gyógyszerek közül a humán felhasználású neuroleptikumok.

Az in vivo kezelések során hím, SPF (*specifid pathogen free*) Wistar patkányoknak 8 napon keresztül adagoltam, a humán terápiában alkalmazott maximális dózisban (a testtömeg kg-ra átszámítva) intraperitoneálisan a következő gyógyszereket: Risperidonum, Tiapridum, Thioridazinum hydrochloricum, Chlorpromazinum hydrochloricum és Haloperidolum.

Minden csoportban 10 egyedet oltottam így 60 állatot használtam fel. Az állatok általános egér-patkány laboratóriumi tápot (normal - CRLT/N, Charles River) kaptak, csapvizet és természetes megvilágítást. A gyógyszereket azonos napszakban, napi egy alkalommal kapták meg. A kontroll azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot kapott.

Házinyúl

Második vizsgálati körben nem laboratóriumi állatot, hanem állattenyésztési jelentőséggel bíró házinyulat használtam. A házinyúl az emlős gazdasági állataink modelljeként használatos és az eddigi, ilyen irányú kutatásokban ritkábban szerepel.

A patkány kísérletek eredményeit követően kiterjesztett vizsgálatokat végeztem, az 1. táblázatban szereplő összes vegyület bevonásával. Minden csoportban 5 egyedet oltottam 8 napon keresztül, így a 9 csoportban 45 állatot használtam fel. Az állatok standard nyúltápot (CRLT/NY, Charles River) kaptak önadagolással, csapvizet és természetes megvilágítást. A gyógyszereket azonos napszakban, napi egy alkalommal i.p. kapták meg. A kontroll azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot kapott.

Ezüstkárász

A hal esetében nem i.p. oltásokkal juttattam be a gyógyszereket, hanem a kísérleti akvárium vizében oldottam fel. A légzés során ugyanis a kopolyún keresztül az állat felveszi az oldott vegyületeket. Továbbá gyakorlati szempontból –ha alkalmazásra kerül a szer például a csapkodási veszteség vagy az oxigénigény csökkentése érdekében pl. szállítás során– célszerűbb a hatást eleve a vízben oldott szer esetében vizsgálni, ahogyan az felhasználásra is kerülhetne. A vizsgált szerek közül jelenleg csak a diazepamot alkalmazzák (0,2-0,4 mg/ttkg im.) halaknál. A standard eljárás vízben oldott anestheticum esetén *triacin methanesulfonate* (MS-222 Sandoz) –al történik, 25-100 ppm. koncentrációban (0,1 - 0,3%). (TÓTH, 2004).

A vízben oldott gyógyszer esetében több szempontot kell figyelembe venni. A víz mennyiségén kívül az állat tömegét, a víz hőmérsékletét, oxigén ellátottságát is. A hatóanyag lassabban jut be a szervezetbe, egyenletesen nő a plazmakoncentráció de hosszabb idejű, elnyújtott a hatás. Később a vízben fokozatosan csökken a koncentráció ahogy az állat felveszi azt.

A halivadékok átlagos testtömege 18 g volt. A tesztmérések tapasztalatai szerint az 5 literes kezelő akváriumba megközelítőleg a nyulaknál alkalmazott dózis egy tizede bizonyult hatékonynak, de még hosszú távon sem letálisnak.

Minden csoportban 5 egyedet kezeltem 8 napon keresztül, így a 9 csoportban 45 állatot használtam fel. Az állatok liofilizált vörös szúnyoglárvát (bio-lío) kaptak táplálékul, kiszellőztetett csapvíz közegben, folyamatos levegő buborékolatással, természetes megvilágítással, egyenletes szobahőmérsékleten. A gyógyszereket azonos napszakban, napi egy alkalommal kapták meg. A kontroll gyógyszert nem kapott.

Minták előkészítése GST indukció vizsgálatához

Az állatok feláldozása szakszerű, fizikai euthanasiával történt (KÁLLAI, 2000; CLOSE et al., 2000; MOLNÁR, 2001; TÓTH, 2004). Utána a kísérleti állatok azonnal boncolásra kerültek. A belső szerveket (agy – agytörzssel, gerincvelő, máj, lép, vese, szív, tüdő) -70 °C-ra hűtött rozsdamentes acéllapra bontottam ki. A felület hőkapacitása gondoskodott a minták azonnali hűtéséről. Alapkonceptió hogy a minták minden művelet alatt folyamatosan hűtve legyenek. A hűtés megakadályozza a proteázok működését és más folyamatok negatív hatását a GST enzimaktivitásra. Egyes műveleteket (pl.: potterezés, centrifugálás) csak olvadáspont fölötti, 0 – 4

°C közötti hőmérsékleten lehet elvégezni. Azonban minden minta azonos időtartamot töltött a munkafolyamatok által megkövetelt hőmérsékleten. A minták -20 °C-os fagyasztásra kerültek zárható, mintatartó üvegekben a további feldolgozásig.

Fagyaszott állapotban a szervekből átlagosan 3 x 0,2 g tömegű mintákat választottam le, majd külön-külön 10ml 0,32M -os 0°C-os szacharóz oldatban teflon potterrel homogenizáltam 1 percig, jeges vízfürdőben (CARBERG and MANNERVICK, 1985). A homogenizátumot 4°C-on 9000g-vel 10 percig centrifugáltam. Ezután a felülúszót az üledéktől elválasztottam és 5 x 50 µl mintát, fehérje quantitativ meghatározásra kimértem. A minta többi része (≈5ml) ismételt fagyasztásra került az enzinkintetikai meghatározásig.

Fehérjetartalom meghatározása

A GST enzimaktivitásának korrekt összehasonlításához figyelembe kell venni az egyes minták fehérjetartalmát. Ehhez megfelelően érzékeny módszert nyújtott a Lowry -féle fehérje meghatározás (LOWRI, 1951).

Reagensek:

1. 2 %-os Na-karbonát 0,1 N-os NaOH-ban
2. 0,5 %-os $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ oldat 1 %-os Na-tartarát oldatban
3. (C reagens) : 1 ml CuSO_4 oldatot (2) 50 ml Na-karbonát oldattal (1) elegyítettem.
4. Folin-Ciocalteu (D reagens) 100 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 25 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 700 ml desztillált víz + 500 ml 80 %-os ortofoszforsav oldat + 100 ml koncentrált HCl 10 órás főzés után, 150 g Li_2SO_4 -t, 50 ml desztillált vizet és 3 csepp brómot adtam az oldathoz. Ezt további 15 perc főzés követi, hogy a bróm felesleget eltávolítsuk. Lehűlés után 1000 ml-re egészítettem ki desztillált vízzel. A reagens fényérzékeny ezért barna üvegben tároltam. Tekintve, hogy a sav tartalom kb. 2 N, a meghatározásnál a reagenst 1:1 arányban hígítottam desztillált vízzel
5. Standard fehérje oldatként, a kalibrációhoz szarvasmarha szérum albumint (BSA : Bovine Serum Albumin, SIGMA) használtam. 20 mg-ot 100 ml desztillált vízben oldottam, hűtve tároltam.

A mintákat és a standardot 1 ml-ekre egészítettem ki desztillált vízzel. Ezután a „C” reagensből 2 ml-t tettem hozzá. 10 perc várakozás után a „D” reagensből 200µl mértem hozzájuk és újabb 30 percig várakoztam a szín stabilitásáig. A mintákat 660 nm-en fotometráltam vak mintával szemben, ami nem tartalmazott fehérjét.

A kalibrációt 0,01–0,1 mg/ml BSA koncentrációban 10 standarddal végeztem. A kapott extinkciós értékekre a legkisebb négyzetek módszerével illesztettem egyenest.

A munka során minden egyes mintának külön-külön meg kellett határozni a fehérjetartalmát és a mért Δ abszorbancia alapján kiszámítani a GST aktivitást Unit-ban.

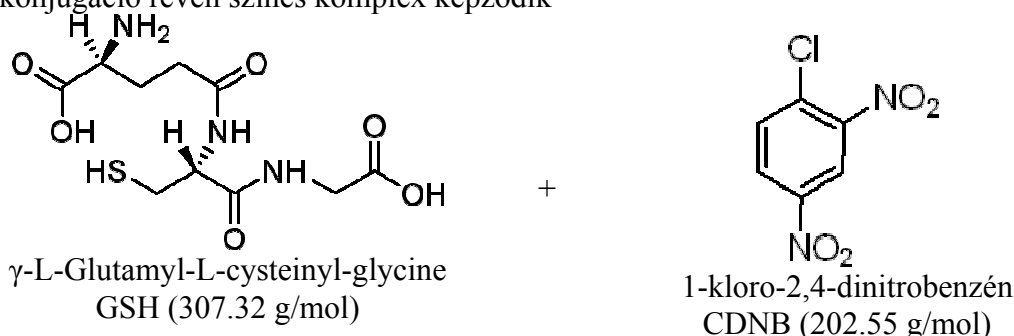
állat faj	állat db	szerv	minta/szerv	mérés/minta	Összesen
patkány	60	4	3	3	2 160
nyúl	45	6	3	3	2 430
kárász	45	3	3	3	1 215
Összes fehérje quantitativ meghatározások száma:					5 805

2. Táblázat. Fehérje quantitativ meghatározások száma

GST aktivitás mérése

A GST enzim egyik szubsztrátja az 1-kloro-2,4-dinitrobenzén (CDNB). Bár ezzel a toxikus xenobiotikummal természetes körülmények között nehezen elképzelhető a találkozása a

szervezetnek, azonban az enzim mégis nagy affinitást mutat hozzá. A GSH -SH csoportjával történő konjugáció révén színes komplex képződik



A standardizált körülmények között képződött termék mennyisége egyenes arányban áll a GST enzim aktivitásával, ami fotometriás úton mérhető (HABIG et al., 1974; MAUCH and DUDLER, 1993).

Reagensek:

- 0,1 M-os nátrium-foszfát puffert (6,5 pH) 1 mM EDTA-Na₂.vel
- 20 mM GSH tridesztillált vízben oldva
- 20 mM CDNB 95%-os etanolban oldva

Mérési metódus:

Mérésenként 850 µl pufferoldatot Eppendorf csövekbe mértem, majd termosztáttal stabilizált 37,5 °C-os vízfürdőben inkubáltam amíg a hőmérsékletet fel nem vette. Ezután 50 µl 20mM-os GSH és 50 µl 20mM-os CDNB oldatot mértem hozzá. A reakciót 50 µl minta hozzáadásával indítottam, majd összerázás után azonnal a fotométerbe kerültek. Az 1-klór-2,4-dinitro-benzolból képződött konjugátum ($\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) koncentrációjának változását 340 nm hullámhosszon 3 percig mértem. A kontroll elegy nem tartalmazott mintát. A GST aktivitás mértékét Unit-ban fejezzük ki.

$$\frac{(\Delta A_{340}) / \text{min} \times V (\text{ml}) \times \text{dil}}{\epsilon_{\text{mM}} \times V_{\text{enz}} (\text{ml})} = \mu\text{mol} / \text{ml} / \text{min}$$

Ahol a „dil” a hígítási faktor, „V” a reakció mennyiség, „ε” az extinkciós koefficiens, „V_{enz}” pedig a minta mennyisége. A kapott értéket a minta fehérjetartalma alapján korigáltam és számoltam át µmol / kg fehérje / sec értékre.

Szórással mértem és ábrázoltam a grafikonokon, hogy az értékek a várható értéktől (középértéktől) milyen mértékben térnek el. Ahol x az értékek átlagának középértéke, n pedig a minta mérete.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

A foszfát puffer 6,5 pH-ja az irodalmi adatok szerint megakadályozza a CDNB – GSH spontán, enzim nélkül lejátszódó reakcióját. Ezt tesz mérés ellenőriztem. GST hozzáadása nélkül az abszorbancia 3 perc alatt sem változott értékelhető mértékben.

állat faj	állat db	szerv	minta/szerv	mérés/minta	Össz.
patkány	60	4	3	3	2 160
nyúl	45	6	3	3	2 430
kárász	45	3	3	3	1 215
Összes enzim kinetikai fotometriás mérések száma:					5 805
3 perc mérés alatt 19 adat keletkezik, tehát az összes adat száma:					110 295

3. Táblázat. Enzimkinetikai mérések száma.

In vitro GST szubsztrát vizsgálat

A kompetitív gátlás vizsgálatához molárisan ekvivalens mennyiségű gyógyszerrel próbáltam gátolni a GSH – CDNB komplex képződését. A reakciót standard liofilizált GST enzim (ló májból nyert, SIGMA) katalizálta. Az enzim teljesítménye katalógus szerint: 1 μ mol CDNB – redukált GSH konjugáció per perc pH 6,5 és 25 °C –on. Az 1 mg liofilizált enzimet 5 ml tridesztillált vízben oldottam és a mintákhoz 50 μ l mennyiséget mértem. Az oldódási tényezők figyelembevételével a szubsztrátokból 5 mM –os oldat 50 μ l-es mennyiségét használtam. Standard hőmérsékleten, foszfát pufferben (6,5 pH). A CDNB azonban igen nagy affinitással kötődik a GST –hez. Ezért a gyógyszerekből koncentráció sorozatot is képeztem, amellyel a gátlás teljesítménye is megállapítható volt.

Továbbá vizsgáltam, hogy a kísérleti állatoknak beadott dózisban milyen mértékű a gátlás, a gyógyszereket egymáshoz viszonyítva. Így a szervezetben kialakuló koncentrációhoz hasonló arányában volt vizsgálható.

GSH konjugátum szintézis

A konjugátumok hatékonyságát házinyúl és ezüstkárász esetében vizsgáltam. A gyógyszer konjugátum szintéziséhez a GSH egyenérték számítását a moláris tömegek alapján az alábbi képlettel végeztem:

$$\text{GSH egyenérték} = \left(\frac{\text{gyógyszer napi dózis mg} / 1000}{\text{gyógyszer moláris tömeg}} \right) \times \text{GSH moláris tömeg} \times 1000$$

Ahol a GSH moláris tömege: 307,32 g/mol

A gyógyszer és a molárisan ekvivalens mennyiségű GSH összemérését fiziológiás sóoldatban, ló májból nyert GST (SIGMA) hozzáadása követte. Az enzim teljesítménye katalógus szerint: 1 μ mol CDNB – redukált GSH konjugáció per perc pH 6,5 és 25 °C –on. Az 1 mg liofilizált enzimet 5 ml tridesztillált vízben oldottam és a mintákhoz 150 μ l mennyiséget mértem. A reakciót szobahőmérsékleten 5 órát inkubáltam. Közben a termékképződést ellenőriztem.

A termék képződését a redukált glutation fogyása jelzi, a teljes konjugációt pedig annak elfogyása. Így a reakcióból vett mintához mért CDNB egyre kisebb fotometriásan mérhető (340nm) színreakciót mutatott, mivel a termékképződés során egyre kevesebb szabad, redukált GSH található benne.

Motilitás mérés

A központi idegrendszerre serkentő vagy gátló hatást kifejtő vegyületek hatékonyságának objektív vizsgálatára a motilitás mérése ad lehetőséget. Jelenleg gyakran alkalmaznak fotokapus és webkamerás mérőrendszereket (pl. EXPERIMETRIA), de megfelelően korszerű és precíz eredményt szolgáltatnak a piezo- elektromos rezgésérzékelős vagy infravörös mozgásdetektoros

rendszerek. A mérésekhez az utóbbi két technológiát alkalmazó, mikrokontroller felügyeletű, saját tervezésű motilitásmérő rendszert fejlesztettem.

A motilitást mindig a gyógyszer beadása előtt, tehát megközelítőleg 24 órával az előző dózis beadása után és a kezelés után is mértem. Így nyomon követhető volt az akut és a krónikus kezelés okozta hosszabbtávú motilitás változás egyaránt.

Az egyszeri dózis vizsgálatoknál az eredményeket a gyógyszer illetve konjugátumaik beadását követően 1 órával és az akklimatizációs idő leteltével rögzítetem.

Az állatok a mérőrendszerbe helyezés után 10 perc akklimatizációs időt kaptak, majd a mérést elindítottam és alkalmanként 5 percig monitoroztam. Mikrokontrolleres (BS2SX) felügyeleti rendszer gyűjtötte és továbbította a PC-felé az adatokat, ahol azt saját fejlesztésű szoftver fogadta és dolgozta fel.

Hot-plate teszt

A hot-plate az analgészia és a szedáció mértékének standardizált mérésére szolgáló teszt. Az állatoknak 10 perc akklimatizációs időt hagytam a mérés előtt a saját tervezésű berendezésben. Ezután egy 25 x 25 cm-es konstans, 55°C hőmérsékleten tartott felületre helyeztem az állatokat a minden oldalról zárt tárolóban, amelyben biztosított a lap elhagyásának lehetősége. A hőmérsékletet 0.1°C pontosságú mikrokontroller vezérelt digitális termosztáttal kontrolláltam. (MALMBERG and BANNON, 1999; MOGIL et al., 1999; WILSON and MOGIL, 2001). Ezután a lapról való leugrás illetve lemászásig eltelt időt mértem. Amennyiben 90 másodpercig nem reagált az állat a hőstresszre akkor a mérést megszakítottam.

Testhőmérséklet és testtömeg mérés

A testtömeget SOEHNLE típusú 0,5 g pontosságú digitális mérleggel, a testhőmérsékletet SUNLIFE típusú 0,1 °C pontosságú digitális lázmérővel, rektálisan mértem nyulaknál. A méréseket mindig közvetlenül a kezelés előtt végeztem, így nem a gyógyszer közvetlen hanem krónikus hatását vizsgáltam a testhőmérsékletre.

Mikrokontroller választás

A mesterséges neuronhálózatba és az enzimkinetikai mérőrendszerbe a beépítés időpontjában a világ leggyorsabb SX alapú processzorát tartalmazó BS2/SX mikrokontrollert alkalmaztam. 50 MHz-es órajel frekvenciája 10 000 gépikódú művelet végrehajtását teszi lehetővé másodpercenként (<http://parallax.com>). Alkalmazza a többszintű „pipe-line” technológiát így a látszólagos gépi ciklusa mindössze egy órajel. 16 I/O vonallal rendelkezik.

Multielektród fejlesztés

Az általam létrehozott célorientált neuronhálózat (ADNC, Analog Digital Neural Computer) a kereskedelmi forgalomban nem beszerezhető, speciális elektródatömböt igényel. Ezért a multielektród tömbök előállítására saját technológiát fejlesztettem ki. Több egység készült el réz, réz - cink és wolfram ötvözetekből, melyek különböző elektronikai tulajdonságokkal rendelkeznek.

A huzalokra ($d = 50 - 100 \mu\text{m}$) először rákerül a szigetelő réteg. Ezután történik a hajtogatás, így 2 , 4 , 8 , 16 ... stb egységre sokszorozódnak. A 7. hajtás után felsokszorozódott 128 egység kohézióját szilikon mátrixszal biztosítom. Gél fázisban kerül a laza elektródköteg szálai közé, majd az elektródatömböt hosszanti irányba feszítéssel és egyidejű csavarással egységesítem, amíg a szilikon polimerizálódik. A szilikon tulajdonságai miatt rövid távon nem okoz olyan szöveti irritációt ami torzítaná a mérési eredményeket. Továbbá felxibilisen tartja az elektródatömböt és további szigetelést biztosít az egyes egységek között.

Az elkészült huzalköteg ezután fagyasztásra kerül. Egy optimális hőmérséklet elérésekor a tömb egyik végét 90° , 45° , 20° vagy más szögben elmetsem. Ezáltal tompa vagy különböző hegyben végződő elektródátömböt kapunk. Minél kisebb a szög annál nagyobb lesz az egyes egységek felülete és nagyobb felületen fog érintkezni a megcélzott szövet sejtjeivel. A túlzott hűtés vágáskor az anyag és a szigetelés töréséhez, berepedezéséhez vezethet. Míg a nem elégséges lehűtéskor az anyag „kenődhet”, amely különösen a lágy rézvezetékeknél fordul elő. A wolfram vagy a réz – cink ötvözetű elektródák esetén finomabb vágási felületet sikerült elérnem.

Az elektródátömb másik vége szétbontásra és a szigetelőréteg leoldásra került. Ezután a szálatkat egyesével két 64 pólusú csatlakozó tömbhöz forrasztottam. A csatlakozót egy saját fejlesztésű analóg switch IC rendszer fogadja.

III Eredmények

Mikrokontroller alapú enzimkinetikai analizáló rendszer

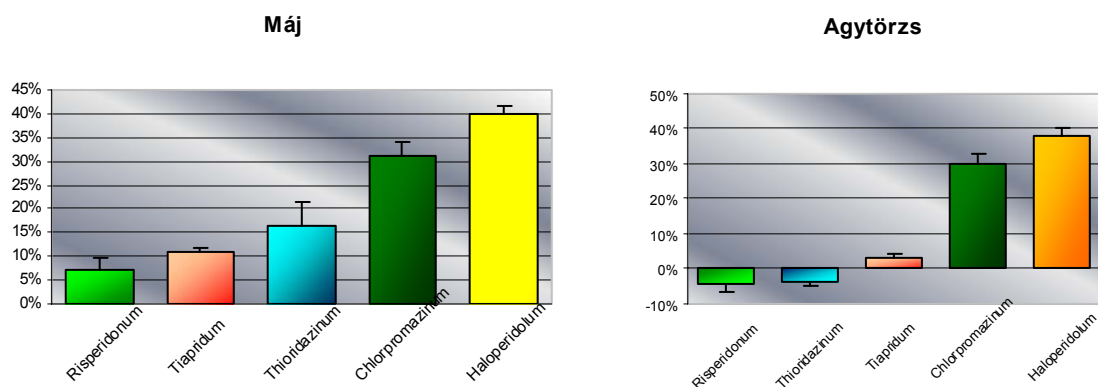
A nagyszámú minta (több mint 5 ezer enzimkinetikai mérés, ugyan ennyi fehérje tartalom meghatározás, azaz több mint 110 ezer adatsor) komplex enzimkinetikai analíziséhez mikrokontroller alapú feldolgozó rendszert fejlesztettem és algoritmusait dolgoztam ki. A 14 valamint a második verzió 24 bites soros A/D konvertere jelentősen megnövelt pontossággal kvantálta a spektrofotométer detektor analóg jeleit. Az enzimkinetikai méréseknél gyakori pontatlanságot okozó hibák kiküszöbölésére hibajavító algoritmust dolgoztam ki, teszteltem és alkalmaztam. A kinetikai görbék analízisére a lineáris szakaszkeresését és a legnagyobb nettó termékképződési szakaszkereső algoritmust dolgoztam ki BS2/SX mikrokontrollerre. A rendszer a nagyszámú adatfeldolgozás valamint összehasonlító vizsgálatok során sikeresen bizonyított.

In Vitro gátlás vizsgálat

A vizsgált gyógyszerek in vitro körülmények között mind kompetitíven gátolták GST jelenlétében a CDNB – GSH konjugátumok létrejöttét. Mindegyik vegyület, különböző affinitással az enzim szubsztrátjának bizonyult. Így valószínűsíthető a GSH-gyógyszer komplex képződésének lehetősége. Kezelési dózisban a Thioridazinum mutatta a legjelentősebb gátlást, majd a Tiapridum, a Xylazin etc. A szervezetben hasonló arányú kezdeti koncentráció alakulhat ki a kezelések során is.

Laboratóriumi patkány

A laboratóriumi patkány valamennyi kezelt csoportjában megnövekedett a máj GST aktivitása. Hasonló tendenciát tapasztaltam az agytörzsi homogenizátumban is, bár ott a GST aktivitása 20-30-ada volt mint a májban. A több mellékhatással rendelkező hagyományos neuroleptikumok általában kisebb GST indukciót okoztak, mint a kevesebb mellékhatást okozó új típusú gyógyszerek. Az agyban a haloperidol és a chlorpromazin okozta a legnagyobb GST indukciót. Így ezek konjugátumainak megjelenése a legvalószínűbb.

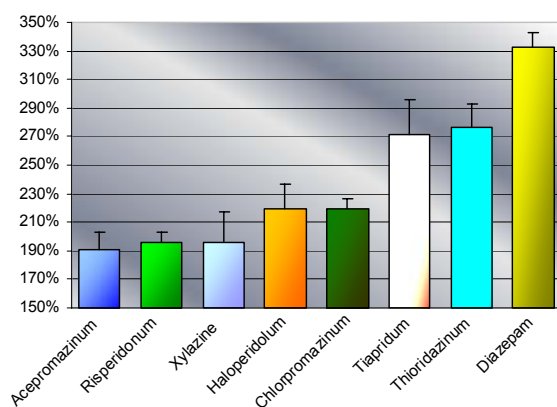


1. ábra. Laboratóriumi patkány GST indukciója agytörzsben. Kontroll : 491 Unit, valamint májban. Kontroll : 7 563 Unit

A vesében szintén jelentős növekedést okoztak a vegyületek az új generációs risperidonum kivételével. A lépben pedig jellemzően csökkent a GST aktivitás a kontrollhoz képest. Az enzimaktivitás növekedése a GSH detoxifikációs rendszer aktiválódását jelzi. Minél nagyobb mértékű, annál inkább megterheli a szer az adott szerv sejtjeinek védekező kapacitását. A negatív érték azt jelezheti, hogy a vegyület maga kapcsolódhat az enzimhez, vagy a vegyület metabolizmusa során keletkező intermedierek allosztérikusan gátolhatják az enzimet, vagy az intermedierek befolyásolják az enzim expresszióját. Az sem kizárt, hogy más detoxifikációs mechanizmusok kerültek előtérbe az adott szervben, tehát a GST gén expressziója csökkenhetett, amelyre feltételezhetően ezekben az esetekben nem volt olyan mértékben szükség.

Házinyúl

A házinyúl motilitásának csökkentésére a diazepam a thioridazin és a tiapridum hatott leginkább, a legaktívabb nap és az utolsó kezelési nap differenciájának elemzésében. A tiapridum mint csekély mellékhatású új típusú neuroleptikum a patkány agyban sem okozott jelentős GST indukciót ellentétben a thioridazinnal.



2. ábra. Motilitás csökkenésének aránya házinyúlnál a kontroll változásához képest

A napi aktivitás elemzések alapján két csoportba sorolhatók a vizsgált vegyületek. Az első kísérleti csoportban olyan vegyületek találhatók, amelyeket a szakirodalom neuroleptikumoknak nevez. A Chlorpromazinum és Thioridazinum, fenotiazin gyűrűt tartalmaz, a Haloperidolum pedig butirofenon származék. A Chlorpromazinum és Haloperidolum az aromás gyűrűn halogén szubsztituenst hordoz.

Érdekes az a megfigyelés, hogy a humán terápiás hatásokhoz hasonlóan a nyulaknál is csak pár napos kezelés után jelenik meg egy kb. 50%-os motilitás csökkenés kifejlődése. Tehát az itt megfigyelt változások is arra utalnak, hogy a neuroleptikus gyógyszerek hatása fokozatosan kumulálódik a kezelési napok során. Az első csoport állatainál talált lassú, graduálisan megjelenő mozgás frekvencia csökkenés, nagyon hasonlít, sőt jó egyezést mutat a Haloperidolummal, Chlorpromazinummal és Thioridazinummal kezelt pszichotikus betegeknek a farmakológiai, antipszichotikus hatás megjelenésével. Ezeknél a betegeknek is csak pár napos kezelése után manifesztálódik az antipszichotikus hatása a trunkvillánsoknak. Továbbá a gyógyszeres kezelés elhagyása után bizonyos ideig még fennmarad a hatás és csak lassan térnek vissza a betegség tünetei. A pontos magyarázatot erre a jelenségre nem ismerjük, de elképzelhető, hogy ezek a szervezetbe juttatott halogénnel szubsztituált vegyületek a kezelése után felszívódnak és a keringéssel gyorsan eljutnak a különböző szervekbe, szövetekbe így az agyszövetbe is. Kapcsolódhatnak a plazmamembrán D_2 receptorokhoz, ott kifejtik gyors hatásukat, megváltoztatják a neuronális aktivitást. Ezzel magyarázható az egy óra elteltével kialakuló mozgás szegény állapot. Azután a vegyületek a receptorról leválva, vagy a receptorral együtt (internalizációval) a sejtekbe kerülnek. A sejten belül viszont a GST enzim által katalizált reakcióban a glutationnal konjugálódhatnak direkt módon, vagy pedig közvetett úton, az első fázisú átalakításokon keresztül, $-CYP450$ enzimek által katalizált reakciókban keletkezett intermedierek – kapcsolódhatnak a GSH-hoz a GTS által katalizált reakcióban (szekunder metabolikus fázis). Máj esetében viszont nem feltétlenül várható, hogy ezek a vegyületek a hepatociták plazma membránján is kifejtsenek hatást. A vegyületek a parenchima sejtekbe bejutva a citoplazmában konjugálódhatnak direkt, vagy az előbb említett indirekt utat bejárva GSH- vagy glukuronoid-konjugátum keletkezik a sejtekben. A Glukuronoid vagy Glutation-trankvilláns konjugátumokat a különböző transzport mechanizmusok pl. az ABC-transporterek, Glutation-konjugátum ATP-dependens transzport mechanizmusok távolítják el a sejtekből, szövetekből, pl. a máj sejtekből az epébe. Ezért koncentrációjuk viszonylag gyorsan csökkenhet a vérben. Ez magyarázhatja azt, hogy a hatás megközelítőleg egy nap alatt lecseng. Éppen ezért nem láthattunk erős mozgáscsökkentő hatást az első napokban a kezeléseket utáni 24-ik órában.

A második csoportba besorolt vegyületek kémiai szerkezete, farmakokinetikája, gyógyszer mellékhatásai, metabolikus útjai, egymástól igen különböznek. A benzamid származék Tiapridum a G-proteinhez kapcsolt D_2 receptor szelektív antagonistája, azonban igen jó anxiolitikus hatással is rendelkezik. Ugyanakkor mellékhatásai között megemlíti, hogy gyakran okoz agitációt is. Talán ezzel magyarázható az, hogy a második naptól kezdődően növekszik és az ötödik kezelési nap után pedig lényeges kiugrást tapasztaltunk a nyulak motilitásában. A benzioxazol-piperidin Risperidonum mellékhatásai között szintén megemlíti, hogy gyakran okoz szorongást, nyugtalanságot, álmatlanságot. Hasonlót tapasztaltunk a nyulaknál is. A kezdeti jelentős motilitás csökkenés után egyre fokozódott és a következő napokban a kontroll értéket is meghaladó mozgás aktivitást mértünk.

Az egyik leggyakrabban alkalmazott anxiolitikummal a Diazepammal is hasonló adatokat regisztráltunk. A kezdeti igen jelentős csökkenés után a kontroll értékeket is jóval meghaladó aktivitásváltozást figyeltünk meg. Érdekesek azok az irodalmi adatok is, hogy egyes betegeknek a benzodiazepinek agitációt váltanak ki, vagy idősebb arteriosclerotikus betegeknek éppen zavartságot is okozhatnak. Ezeknek az adatoknak a tükrében, szintén némi hasonlóságot véltem felfedezni a nyulaknál és néha az embereknél tapasztalt mellékhatásokkal. A nem várt aktivitás növekedés arra utalhat, hogy a nyúl idegrendszerében is hiányoznak olyan idegi kapcsolatok mint amelyek a leépülő humán idegrendszerben tűnnek el a patológiás változások során.

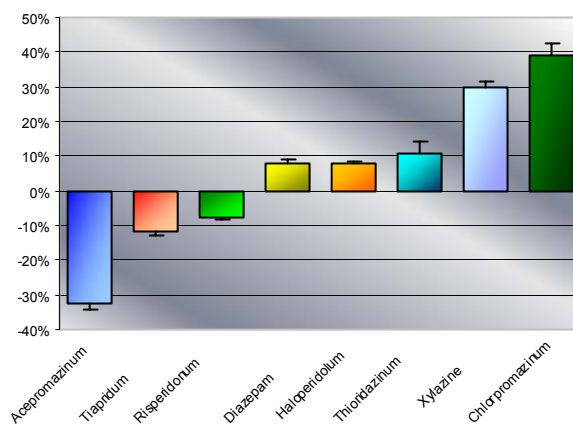
Az Acepromazinum jól bevált, nagy hatékonyságú neuroleptikum. Hatását rövid időn belül fejti ki, de a hatás viszonylag rövid időn belül el is múlik. Kémiai szerkezete nagyon hasonlít a Chlorpromazinuméhoz. Azonban lényeges különbség az, hogy a fenothiazin gyűrűn

nincs halogén szubsztitúció, viszont a hármás kondenzált gyűrű első tagján egy karboxil csoport található. Ez a különbség feltehetően hozzájárul ahhoz, hogy a vegyület vízdékonyabb és a vesén keresztül ürülhet viszonylag rövid időn belül. Tehát feltehető, hogy a 24 óra alatt a vegyület nagy része kiürül a szervezetből, azaz nem várható olyan mértékű felhalmozódás mint pl. a Chlorpromazinum esetében. Figyelemreméltó tehát az, hogy a Tiapridum, a Risperidonum, a Diazepam, a Xylazin és az Acepromazinum a kezdeti aktivitás csökkenés után az azt követő napokban inkább agitációt okozott a kezeléseik közötti időszakokban.

A Hot-Plate teszten csak a risperidon a haloperidol és a diazepam szerepelt gyengébben. A kezeléseik általában a 3.-4. napon okoztak hibernációt, amelyet a szervezet a további napokon minden esetben kompenzált. A testtömeg gyarapodás elmaradása mindegyik kezelés során megfigyelhető volt. A risperidonum a thioridazin és a chlorpromazin esetében pedig fogyás volt tapasztalható. A thioridazin és a chlorpromazin nagy hatásfokú hagyományos neuroleptikumok, amelyeknél az eredmény nem meglepő. A risperidonum azonban második generációs, amelynél elvárható lenne a pozitívabb mellékhatás profil (humán vonatkozásban ez tapasztalható). A tiapridum és a haloperidol okozta a legkisebb tömeggyarapodás elmaradást.

Az egyes szervekben általában a haloperidol és a thioridazin mutatta a legnagyobb GST indukciót és a tiapridum az alacsonyabbakat. A máj mint a detoxifikációs mechanizmusok legfontosabb helyszíne, a risperidon kivételével minden kezelésre jelentős GST indukcióval reagált. A vese, hasonlóan a májhoz és a szívhez jelentős GST indukciót mutatott, a tiapridum illetve a szívnél a diazepam kivételével. Ez a szer csak a májban váltott ki jelentősebb emelkedést.

Az egyes szervek detoxifikációs terhelésén kívül külön figyelmet érdemel az agy, ahol a glutation konjugátumok a leginkább befolyásolhatják a neurotranszmissziót.



3. ábra. Házinyúl GST indukciója agytörzsben. Kontroll : 15 260 Unit

Az agytörzsi mintákban az acepromazin, a tiapridum és a risperidonum kivételével minden vizsgált vegyület GST indukciót idézett elő, ami GSH konjugátumainak megjelenését okozhatta az agyszövetben. Ez befolyásolhatja a glutamáterg neurotranszmisszió folyamatát, ahogyan azt számos γ -glutamil peptidnél és glutation analógnál tapasztalták (VARGA és mtsai, 1988; MCMOHAN et al., 2000). A két új típusú neuroleptikum —amelyeket egyelőre nem alkalmaznak állatgyógyászatban—, nem emelte a GST indukcióját. Elképzelhető, hogy a GSH konjugátumok felhalmozódásának hiánya lehet az egyik oka ezen szerek jelentősen kevesebb mellékhatásának. A házinyúl agytörzsben a chlorpromazin és a xylazin okozta a legnagyobb GST indukciót.

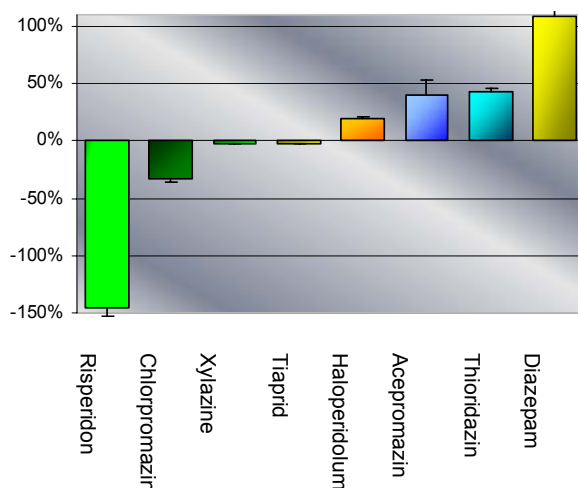
A gyógyszerek megszintetizált glutation konjugátumaival is elvégeztem ugyanazon hatékonysági vizsgálatokat mint az alapvegyületekkel. A konjugátumok közül a risperidonum és a klórpromazin bizonyult a leggyengébb míg a thioridazin és a xylazin a legerősebb hatásúnak. A sorrend szinte teljesen megegyezik a májban mért GST indukció mértékének sorrendjével. A hot-plate teszten azonban a xylazin a klórpromazin és a tiapridum mutatott kisebb értéket. Ez azonban az analgészia kisebb mértékével is összefüggésbe hozható, mert a teszt fájdalom ingeren alapul. A testhőmérsékletet a kezelés után egy órával a klórpromazin és az acepromazin csökkentette a legjelentősebben. Míg az alapvegyületeknél a haloperidol és a diazepam. Az új típusú szerek közül a risperidon konjugátuma csekélyebb a tiapridumé jelentősebb hibernációt idézett elő az alapvegyületnél.

Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a neuroleptikumok okozhatnak mind hőmérséklet csökkenést mind pedig ún. „neuroleptic malignant” szindrómát, hyperthermiát is. (KARAGIANIS et al., 1999). A hypothermia és hyperthermia kialakulásáért többnyire a gyógyszerek túladagolását vagy az egyes egyéneknél a gyógyszerek metabolizmusában fontos szerepet játszó CYP450 izoenzim hiányát teszik felelőssé. A megemelkedett trunkvilláns koncentráció mitokondriális szétkapcsoló mechanizmusok révén fokozhatja a hőtermelést ugyanakkor nem növekszik ennek megfelelő mértékben a hőleadás, tehát hyperthermia alakulhat ki. A hypothermia alakulhat ki akkor, ha a centrális hypothalamikus hőközpontok szenzoros illetve az onnan kiinduló motoros pályáinak szabályozó szerepét gátolják meg a pszichofarmakonok. Normál szabályozott körülmények között a testhőmérséklet csökkenést, a szervezet a harántcsíktól szeptális izmok reszkető mozgásával termelt hő produkciójával bizonyos határok között többnyire jól kompenzálja. A neuroleptikumok az α -motoneuronokhoz, a hypothalamikus régióból leszálló aktiváló pályákat gátolhatják meg hypothalamikus szinten. Ezért ilyen irányú mellékhatásai csak igen kismértékben érvényesültek a nyolc napos kezelések során, de mindenesetre tendenciózus változásokat megfigyeltünk. Elképzelhető, hogy a hosszabb mint nyolc napos kezelések során szignifikáns hatásokat regisztráltunk volna a nyulak esetében is.

Érdekes, hogy a házinyúl GST aktivitása jelentősen (olykor 10x mértékben) nagyobbak mutatkozott mint a korábban vizsgált laboratóriumi patkányé. Ez feltételezhetően annak tudható be, hogy az SPF Wistar patkány vonalat nemzedékek sora óta laboratóriumi körülmények között tenyésztik, jóval kisebb környezeti terhelés éri, mint a házinyulát. Így a detoxifikációs rendszere sem olyan aktív.

Ezüstkárász

Az ezüstkárász esetében a légzésszámot az acepromazin és a thioridazin csökkentette a legjelentősebben és a GSH konjugátumai is hasonlóan hatásosak voltak. A risperidonum és a haloperidol nem csökkentette a légzésszámot de a glutation konjugátumai jelentősen. A diazepam konjugátum azonban emelte a légzésszámot az alapvegyülethez képest. A GST indukciót általában az acepromazin váltotta ki jelentősen. Az agyban emellett a diazepam és a thioridazin. Az új típusú neuroleptikumok alacsony indukciót mutattak, a risperidon pedig jellemzően negatív értéket. Feltehetően az ezüstkárászban nem a GSH a fő metabolikus útvonal első lépcsője.

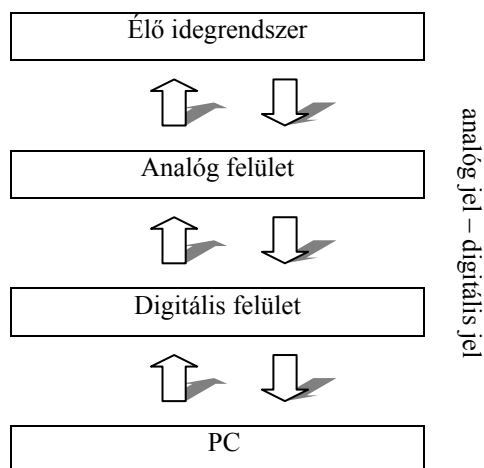


4. ábra. Ezüstkárász GST indukciója agyban. Kontroll : 3 183 Unit

A GST indukciós adatokat vegyületenkénti valamint fajonként és szervenkénti csoportosításban egyaránt összehasonlítottam.

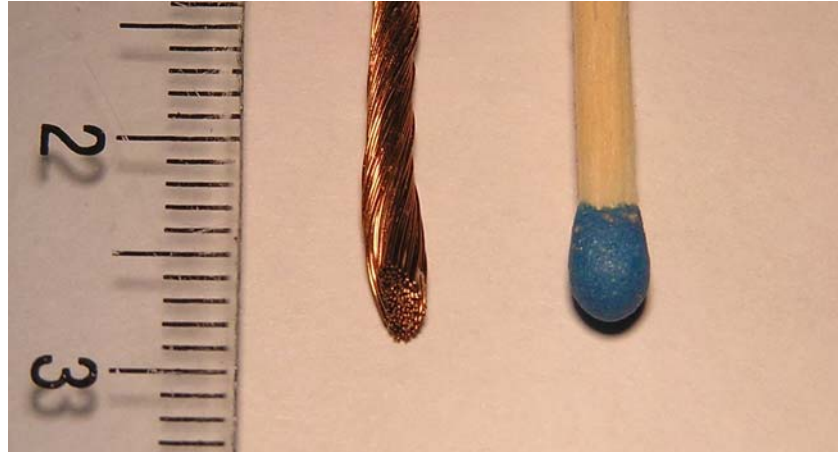
Analog Digital Neural Computer

Vizsgáltam továbbá a gyógyszerek és glutation konjugátumainak hatását az agytörzs bioelektromos tevékenységre. Ehhez egy olyan új elvű, analóg és digitális tulajdonságokat egyesítő multiprocesszoros mesterséges neuronhálózatot (ADNC : Analog Digital Neural Computer) fejlesztettem és algoritmusait dolgoztam ki, amellyel 128 egységes saját fejlesztésű mikroelektródatömbön (MEA) keresztül kétirányú kommunikációt valósíthat meg az élő idegrendszer egy célzott területével. A rendszer újszerűen közelíti meg a neuronhálózat és az idegrendszer interakcióját, azt ismeretlen kapcsolású analóg részeként kezeli.



5. ábra. Az analóg és digitális jel útja. A felületek kapcsolódása a PC től a mikroelektródákkal megcélzott élő idegrendszeri területig

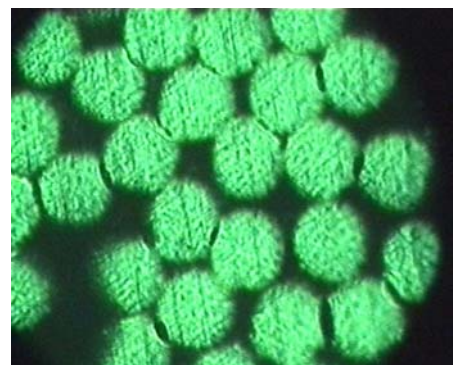
Az ADNC analóg és digitális felülete csúcstechnológiájú mikroelektronikai hardvereket integrál. A digitális felület 9 nagyteljesítményű BS2/SX mikrokontrollerből épül fel. A tüzelési mátrixok detektálásán kívül algoritmusok alapján műveleteket képes végezni azokon és eredményeit visszastimulálva kommunikálni képes az idegrendszerrel.



6. ábra. 128 db, 100 μm átmérőjű egységből felépülő 45°-os hegyes MEA, foto optikával nagyítva
 Fotó: Saját felvétel



100 μm



50 μm

7. ábra. 128 db, 50 μm átmérőjű egységből felépülő, tompa hegyű elektródatömb anyagvizsgáló mikroszkópos képe
 Fotó: Saját felvétel



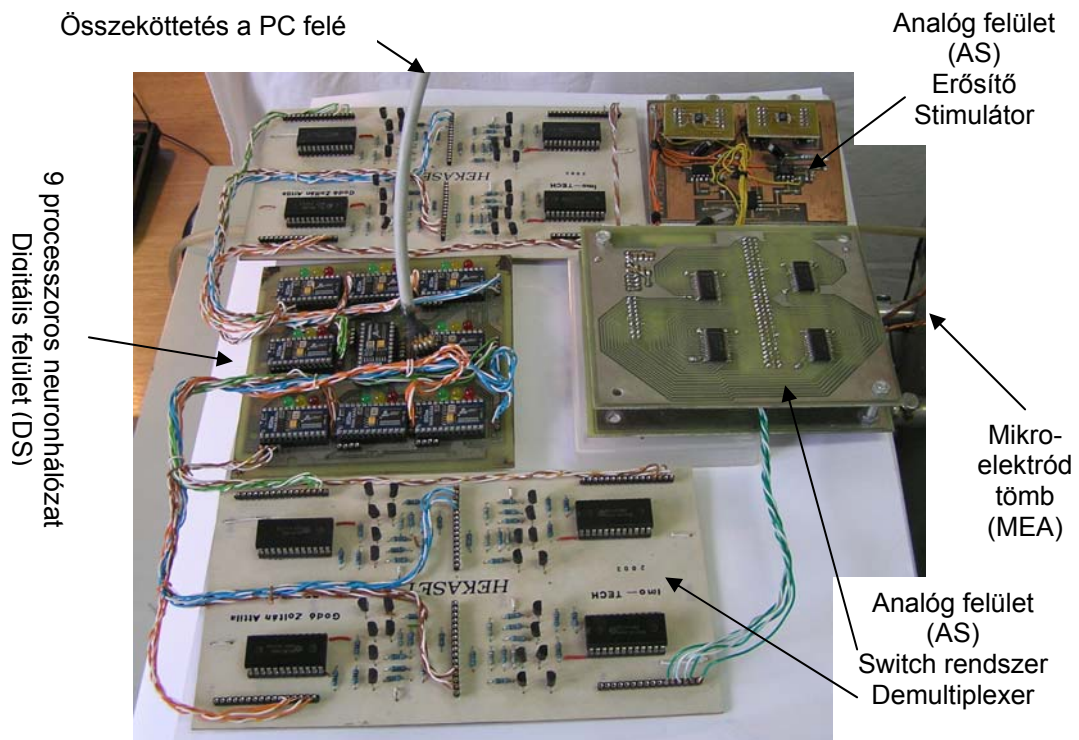
Koponyacsont részleges eltávolításával



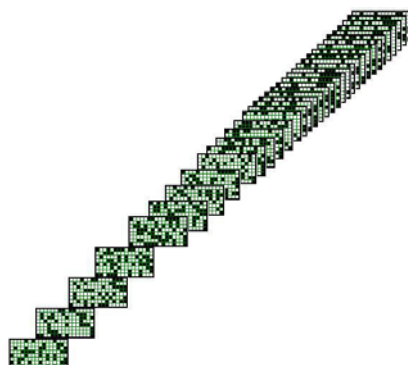
Fürt nyíláson keresztül

8. ábra. Elektród beültetés stereotaxiás célzóberendezés segítségével

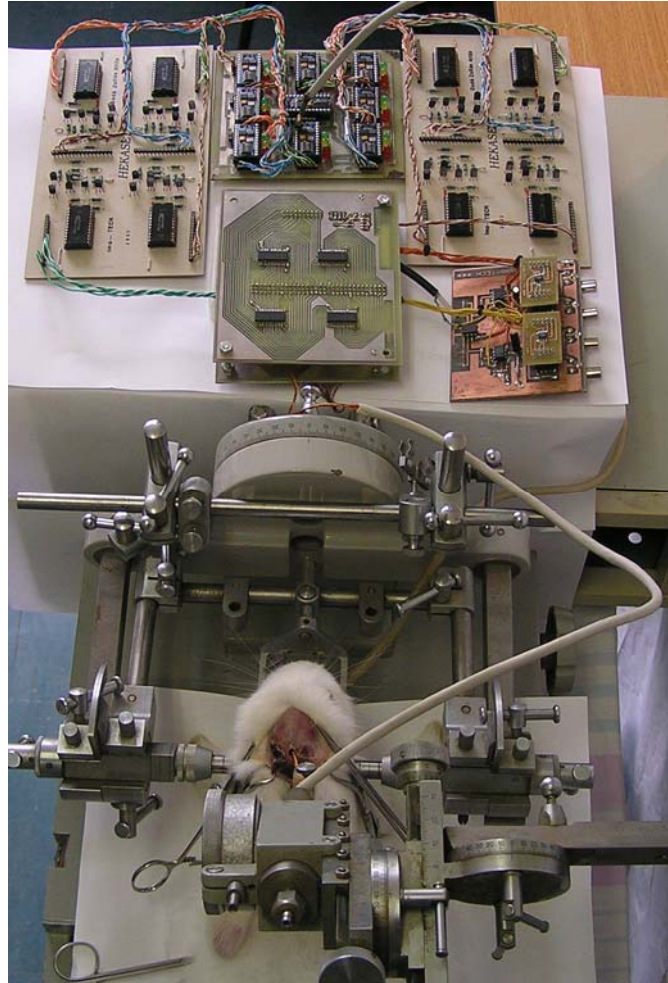
Fotó: Saját felvételek



9. ábra. Az ADNC analóg és digitális felülete.

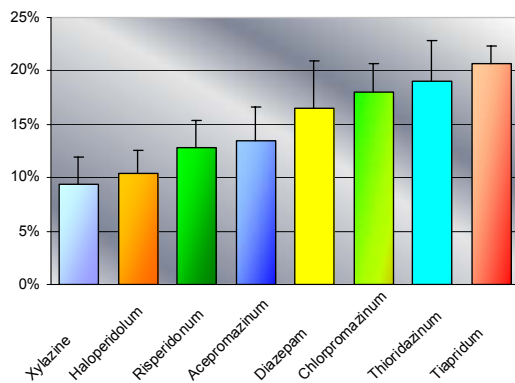


10. ábra. 0,16 másodperc tüzelési mátrix nyúl agytörzsből (32% inaktív elem, 46% gyakoriság)

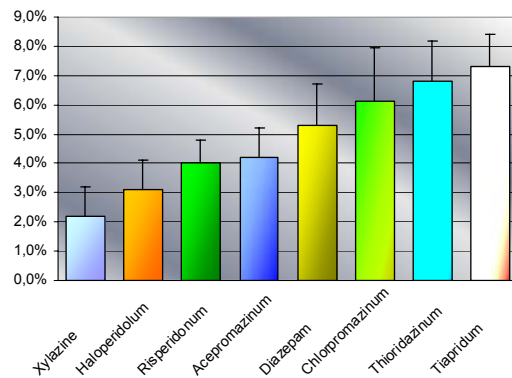


11. ábra. A teljes rendszer működés közben
Fotó: Saját felvétel

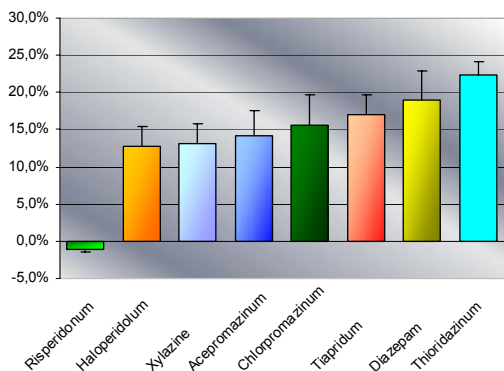
A kezelések hatására a tüzelési gyakoriság csökkenésével növekedett a szinkrontüzelés aránya, tehát mérséklődött de egyben rendezettebbé vált az agytörzs bioelektromos tónusa. Az egyes gyógyszerek tüzelési ráta csökkentése, azaz az alapvegyület és GSH konjugátuma közötti arány szoros összefüggést mutatott a hatékonyságtesztekkel, nyúl esetében a motilitási eredményekkel, hal esetében pedig a légzésdepresszió mértékével.



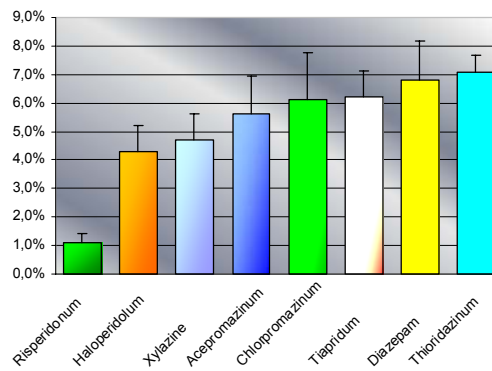
12. ábra. Alapvegyület kezelés után bekövetkező tüzelési gyakoriság csökkenése házinyúlnál



13. ábra. Szinkron tüzelő egységek arányának változása kezelés hatására házinyúlnál



14. ábra. GSH konjugátum kezelés után bekövetkező tüzelési gyakoriság csökkenése



15. ábra. Szinkron tüzelő egységek arányának változása kezelés hatására

Megalapozottnak tűnik az a feltételezés, hogy a trankvilláns vegyületek, hasonlóan a narkotikumokhoz a RAS-ban a vezetés depressziója révén okozhatják a hatékonyságukat. A RAS-aktivitás tiszta hatása a „jel/zaj viszony” arányának megváltozása lehet, az abszolút ingerlékenység valamelyes csökkenése árán. A tüzelési ráta csökkenése mellett ugyanis bizonyos mértékig növekedett a rendezett tüzelési aktivitás. Vizsgálataim rávilágítanak arra is, hogy a pszichofarmakonok hatásának központi idegrendszeri tüzelési mátrix elemzésében még rendkívül széleskörű, új lehetőségek rejlenek. Tovább kellene vizsgálni a szinkron tüzelés természetét és viszonyát a tüzelési aktivitással. Meg lehetne vizsgálni az ingerlésre adott válaszmintázatok jellegét, összehasonlítva az egyes kezelések hatását. Valamint számos szempontból és új algoritmussal lehetne elemezni a mintázatokot, amely közelebb vihet minket a trankvillánsok központi idegrendszerre gyakorolt hatásának jobb megértéséhez. Sajnos jelen értekezés terjedelmi korlátai ezt nem teszi lehetővé, így ez további célkitűzéseimként szerepel.

Eredményeim arra utalnak, hogy a vizsgált pszichoaktív vegyületek GST-enziminduktív hatással is rendelkeznek. Mindamelllett az agyszöveti GST aktivitás révén a vegyületek glutation konjugátumai képződhetnek az agyszövetben és más szervekben egyaránt. A glutation konjugátumok, más γ -glutamil peptidhez és glutation analógokhoz hasonlóan, befolyásolhatják a központi idegrendszeri glutamáterg neurotranszmissziót, így hozzájárulhatnak egyes mellékhatások mint például a pszeudoparkinsonizmus tüneteinek kialakulásához is.

Egyes pszichofarmakonok a GST gátlását idézték elő. Ebben feltehetőleg más metabolikus mechanizmusok játszanak szerepet. A gyógyszerek által előidézett specifikus szöveti hatásokért feltehetően az egyes szervekben található izoenzimek tehetők felelőssé.

Az eredményekben sorra megmutatkozik a különbség az új típusú és a hagyományos vegyületek között. Az ismert mellékhatások feltételezhetően szoros összefüggésben állnak a képződött glutathion komplexek megjelenésével is.

Az eredményeim tükrében célszerű lenne egyes, a humán gyógyászatban már hosszabb ideje bevált gyógyszerek alkalmazhatóságát tovább vizsgálni egyes állatfajoknál. Az új generációs neuroleptikumok jóval kedvezőbb mellékhatás profil mellett kevésbé terhelik meg a szervezetet. Mérsékeltébbek lehetnek a krónikus kezelések negatív hatásai az értékmérő tulajdonságokra az állattenyésztés területén is. Miközben hatékonyságuk nem marad el jelentősen a hagyományosan bevált szerekétől.

Indokolt lehet a jelentős GST indukciót kiváltó gyógyszerek GSH konjugátumainak további vizsgálata. A konjugátumok hatékonysága, szerepe a mellékhatások kialakulásában egyes szervek szintjén és esetleges interakciójának vizsgálata a glutamáterg neurotranszmisszió folyamatával.

IV Az értekezés új és újszerű eredményei

Vizsgálataim során eredményeimmel több tudományterületet érintettem. Az alábbiakban a diszciplínák jellege szerint foglalom össze az eredményeimet.

1. Nagyszámú minta hatékonyabb GST enzimkinetikai analíziséhez újszerű, mikrokontroller alapú hardver és algoritmusainak kidolgozását végeztem el. A hibatűrő rendszer segítségével nagyobb pontossággal detektálható és analizálható a trankvillánsok hatása a GST indukcióra.
2. Vizsgálataim kimutatták, hogy az Acepromazinum, Chlorpromazinum, Diazepam, Haloperidolum, Risperidonum, Thioridazinum, Tiapridum és Xylazine trankvilláns hatású gyógyszerek mindegyike különböző mértékben, gátolja a CDNB-GSH konjugátumok GST indukált in vitro kialakulását. A Haloperidolum és a Chlorpromazinum halogén szubsztituált neuroleptikumok szubsztrátjai lehetnek in vivo körülmények között is a GST enzimnek, azaz lejátszódhat a glutation-S-konjugációja, illetve ezen intermedierek képződhetnek in vivo az állati szervezetben is.
3. A fenti vegyületek tekintetében a házinyúl és ezüstkárász fajoknál hatékonysági sorrendeket állapítottam meg, motilitás, hot-plate, testhőmérséklet és testtömeg illetve légzésszám paraméterek függvényében.
4. Kimutattam és összehasonlítottam, hogy az acepromazin, chlorpromazin, diazepam, haloperidol, risperidon, thioridazin, tiaprid és xylazine vegyületek a laboratóriumi patkány, a házinyúl és az ezüstkárász egyes szerveiben (máj, agy, vese, lép, tüdő, szív, harántcsíkolt izom) különböző mértékű GST enzimindukációs hatást váltottak ki. Különböző mértékben aktiválták illetve gátolták a GST detoxifikációs rendszert.
5. Megállapítottam és összehasonlítottam a fenti vegyületek GSH konjugátumainak (mint lehetséges metabolikus intermedier) hatékonyságát a házinyúl és ezüstkárász fajoknál a motilitás, hot-plate, testhőmérséklet és testtömeg illetve légzésszám paraméterek függvényében.
6. Olyan új elvű, analóg és digitális tulajdonságokat egyesítő multiprocesszoros mesterséges neuronhálózatot fejlesztettem és algoritmusait dolgoztam ki, amellyel 128 elemű mikroelektródátömbön keresztül kétirányú kommunikációt valósíthat meg az élő idegrendszer egy célzott területével. A rendszer újszerűen közelíti meg a neuronhálózat és az idegrendszer interakcióját, azt ismeretlen kapcsolású analóg részeként kezeli. Segítségével –jelen vizsgálataimban– pszichofarmakonok központi idegrendszeri hatékonysága és hatásmechanizmusa tanulmányozható.
7. Megállapítottam és fizikális hatékonysági teszt eredményeivel összehasonlítottam a vizsgált gyógyszerek hatását az agytörzs tüzelési mintázatára a házinyúl és az ezüstkárász esetében.
8. Megállapítottam és fizikális hatékonysági teszt eredményeivel összehasonlítottam a vizsgált gyógyszerek megszintetizált GSH konjugátumainak hatását az agytörzs tüzelési mintázatára a házinyúl és az ezüstkárász esetében.
9. Megállapítottam, hogy megalapozott az a feltételezés, miszerint a trankvilláns vegyületek a tüzelési mintázat jel/zaj arányának megváltozását okozzák az agytörzs felső régiójában. A tüzelési ráta csökkenése mellett arányosan növekszik a szinkronizált aktivitás.

V A gyakorlatnak átadható eredmények

Az Acepromazinum, Chlorpromazinum, Diazepam, Haloperidolum, Risperidonum, Thioridazinum, Tiapridum és Xylazine vegyületek mindegyike fajonként -és az egyes szervekben eltérő mértékben módosította a GST enzim aktivitását. Figyelembe véve hogy más γ -glutamil peptidek és glutation analógok csakúgy mint a glutation konjugált trunkvillánsok befolyásolhatják a glutamáterg neurotranszmissziót, indokolt lenne ezen vegyületek konjugátumainak további hatásait részletesen vizsgálni a mellékhatások csökkenthetőségének reményében.

Eredményeim tükrében indokolt lenne megvizsgálni egyes, állatoknál nem alkalmazott vegyületek bevezethetőségét az állatgyógyászati és állattenyésztési gyakorlatba. A jó hatékonyság és kevesebb mellékhatás tekintetében elsősorban a második generációs Tiapridum és Risperidonum gyógyszerek jöhetnek szóba. Figyelembe vehető, a munkám során feltárt, glutation konjugált méregtelenítési rendszer megterhelése az egyes gyógyszerek és szervek estében. A modellállatként alkalmazott házinyúl eredményeiből kiindulva más állatfajok esetében is indokolt lenne az összehasonlító vizsgálat. Az új típusú neuroleptikumokon túl a házinyúl esetében elsősorban a Thioridazinum és a Haloperidolum, ezüstkárász esetében az Acepromazinum, Thioridazinum és a Chlorpromazinum további lehetőségeinek vizsgálatát javaslom.

A mikrokontrolleres enzimkinetikai analizáló rendszer architektúrája és algoritmusai felhasználásával továbbfejleszthetők a jelenlegi laboratóriumi mérőrendszerek.

A neuronhálózat hardver architektúrája és alap algoritmusai alapján hasonló elvű neuronhálózatok építhetők, más idegrendszeri tevékenységek vizsgálatára is. Az architektúra alapján javaslom a neuronhálózat továbbfejlesztését, a processzorok számának jelentős emelésével. Eredményeim alapján célszerűnek tűnik a hardveres neuronhálózatokat nagyteljesítményű mikrokontrollerek felhasználásával fejleszteni.

VI Az értekezés témakörében megjelent publikációk

Lektorált tudományos közlemények:

- Godó Zoltán Attila**, Kocsis István (2004): Mikrokontroller alapú neuronhálózat a központi idegrendszer tüzelési mintázatának elemzéséhez. Debreceni Műszaki Közlemények. 3, 2, pp. 75 - 84.
- Godó Zoltán Attila** (2004): Microcontroller-based neural network for evaluating the activity change of glutathione conjugates on RAS. IEEE 4th International Conference on Intelligent Systems Design and Application (ISDA), Budapest, Hungary, Proceedings. pp. 547-550.
- Godó Zoltán Attila** (2004): Use of ADNC in Analyzing the Firing Patterns in Central Nervous System. IEEE 8th International Conference on Intelligent Engineering Systems (INES). Kolozsvár, Romania, Proceedings. pp. 89-92.
- Godó Zoltán Attila** (2005): Artificial neural network with a multiprocessor for analyzing the changes of the firing pattern of the central nervous system caused by the psychopharmacons. *Abstract*. Clinical Neuroscience. 58, 1, pp. 34-35.
- Godó Zoltán Attila** (2006): Bioinformatical application of microcontroller in enzyme induced investigation of glutathione-s-transferase. Debreceni Műszaki Közlemények. V., 2, pp. 41-56.
- Godó Zoltán Attila** (2006): Processing the bioelectric activity of the central nervous system with ADNC-AS. Acta Technica Napocensis. 49, V, pp. 27-34.
- Godó Zoltán Attila** (2006): Signal amplification of neurons in the Artificial Neural Network for the Effect Analysis of Neuroleptics. Academic Journal of Manufacturing Engineering. 4, 2, pp. 42-48.
- Godó Zoltán Attila** (2006): Glutathione-S-Transferase induction of certain Neuroleptics. Debreceni Műszaki Közlemények. V., 4, pp. 101-117.
- Godó Zoltán Attila**, Pirger Zsolt (2007): The Application of Artificial Neural Network in Neurophysiology. International Scientific Conference (microCAD), Miskolc, Hungary, Proceedings. pp. 63-69.
- Godó Zoltán Attila** (2007): The effectiveness and metabolism of some of the Neuroleptics on the GST pathway. *Abstract*. Clinical Neuroscience. 60, 1, pp. 22-23.
- Godó Zoltán Attila** (2007): Artificial Neural Network- for the Effect Analysis of Neuroleptics in the Central Nervous System. International Conference on Neural Networks (ICNN), Barcelona, Spain, Proceedings. (Accepted)
- Godó Zoltán Attila** (2007): Trankvillánsok hatékonysága és toxicitása házinyúlban. Acta Agraria Debreceniensis. (Közlésre elfogadva)

Tudományos konferencia posztterek és előadások:

- Godó Zoltán Attila**, Pirger Zsolt, Nagy Gábor, Révész Csaba, Varga Vince (2001): Glutation-S-transzferáz enzim indukciója pszichoaktív farmakonokkal. XXXI. Membrane Transport Conference, Sümeg, Hungary p. 84.
- Godó Zoltán Attila** (2003): Applying microcontrollers to bioinformatics. XXXIII. Membrane Transport Conference, Sümeg, Hungary p.88.
- Godó Zoltán Attila** (2004): Artificial neural network for analyzing the firing pattern of RAS. XXXIV. Membrane Transport Conference, Sümeg, Hungary, p. 49.
- Godó Zoltán Attila** (2004): Microcontroller-based neural network for evaluating the activity change of glutathione conjugates on RAS. IEEE 4th International Conference on Intelligent Systems Design and Application (ISDA), Oral presentation. Budapest, Hungary.
- Godó Zoltán Attila** (2004): Use of ADNC in Analyzing the Firing Patterns in Central Nervous System. IEEE 8th International Conference on Intelligent Engineering Systems (INES). Oral presentation. Kolozsvár, Romania.
- Godó Zoltán Attila** (2005): Artificial neural network with a multiprocessor for analyzing the changes of the firing pattern of the central nervous system caused by the psychopharmacons. Hungarian Neuroscience Society XI. Conference (HNS, MITT) Pécs, Hungary, p. 50.
- Godó Zoltán Attila** (2007): The effectiveness and metabolism of some of the Neurolepticums on the GST pathway. Hungarian Neuroscience Society XI. Conference (HNS, MITT) Szeged, Hungary, p. 14.
- Godó Zoltán Attila**, Pirger Zsolt (2007): The Application of Artificial Neural Network in Neurophysiology. International Scientific Conference (microCAD). Oral presentation. Miskolc, Hungary.
- Godó Zoltán Attila**, Révész Csaba (2007): Trankvillánsok hatékonyság és toxicitás összehasonlító vizsgálata. XXXVII. Membrane Transport Conference, Sümeg, Hungary (*Közlésre elfogadva*)

VII Az értekezés témakörén kívül megjelent publikációk:

Tudományos konferencia poszterek:

Godó Zoltán Attila, Nagy Gábor, Pikó Eszter, Varga Vince (2000): A hypertónia etiopatogenezisének rizikófaktora: testtömeg index (BMI) és testzsír százalék összehasonlító vizsgálata átlag populáció és egyetemi hallgatók körében. XXX. Membrane Transport Conference, Sümeg, Hungary, p. 72.

Nagy Gábor György, Antal Andor, Serfőző Zoltán, **Godó Zoltán Attila**, Komáromi Sándor, Varga Vince (2000): Akut peritonitis kezelése módosított dializáló folyadékkal. XXX. Membrane Transport Conference, Sümeg, Hungary, p. 79.

Révész Csaba, Forgács Zsolt, **Godó Zoltán Attila**, Rajczy Klára, Krizsa Ferenc, Mátyás Szabolcs, Bernard Artur, Lázár Péter, Marcsek Zoltán (2001) : A Ni^{2+} hatása humán primer ovariális granulosa-sejt tenyészet szteroidgenézisére. XXXI. Membrane Transport Conference, Sümeg, Hungary, 72.

Lektorált egyetemi jegyzetek:

Godó Zoltán Attila (2003): Programozás, vezérlések programozása pascal nyelven és a C nyelv alapjai. (p. 66. A/4 ív).

Godó Zoltán Attila (2003): Élettan gyakorlatok biológusoknak I. – A keringés és légzés élettana. (p. 58. A/4 ív).

Godó Zoltán Attila (2004): Élettan gyakorlatok biológusoknak II. – A táplálkozás, hormonális rendszer és az idegrendszer élettana. (p. 64. A/4 ív).

Godó Zoltán Attila (2005): Programozás I. Villamosmérnökök számára. (p. 17. A/4 ív).

Godó Zoltán Attila (2005): Digitális technika számítógéppel. (p. 36. A/4 ív).

Godó Zoltán Attila (2006): Digitális technika mikrokontrollerrel. (p. 42. A/4 ív).