

DEBRECENI EGYETEM
AGRÁRTUDOMÁNYI CENTRUM
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTENYÉSZTÉS TUDOMÁNYI INTÉZET

ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető: Dr. Kovács András az MTA doktora

Témavezetők:

Dr. Magyar Károly
egyetemi docens

Dr. Varga Vince
az MTA doktora

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

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

*Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Állattenyésztési Tudományok tudományágban*

Írta: Godó Zoltán Attila doktorjelölt

A doktori szigorlati bizottság:

	Név	Tud. fokozat
Elnök:	Prof. Dr. Jávor András	CSc.
Tagok:	Prof. Dr. Huszenicza Gyula	DSc.
	Dr. Herdon Miklós	PhD.

A doktori szigorlat időpontja: 2007. Július hó 2. nap

Az értekezés bírálói:

Név	Tud. fokozat	Aláírás
.....
.....

A bíráló bizottság:

	Név	Tud. fokozat	Aláírás
Elnök:
Titkár:
Tagok:

Az értékezés védésének időpontja: 2007.....

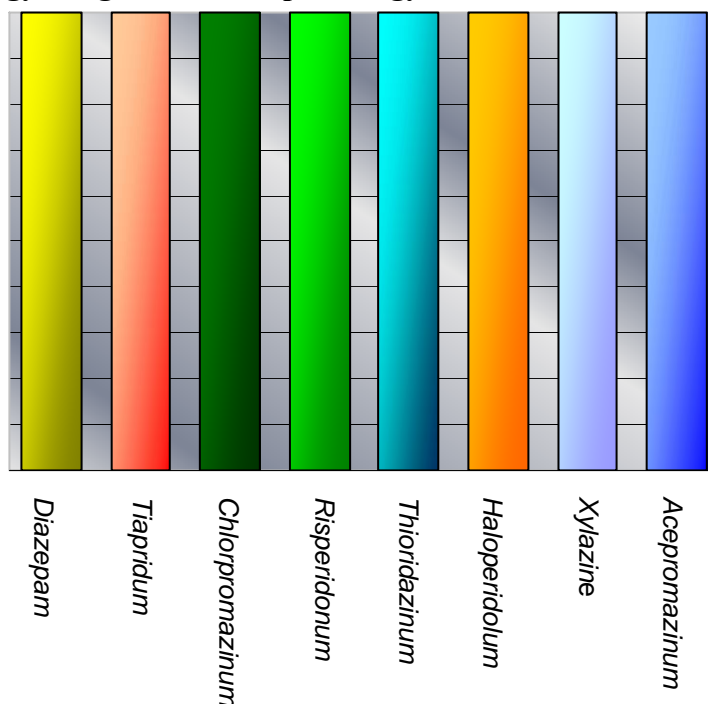
"Biology is so digital, and incredibly complicated, but incredibly useful...
It is hard for me to say confidently that after fifty more years of explosive growth
of computer science, there would still be a lot of fascinating unsolved problems
[...] I can't be as confident about computer science as I can about biology.
Biology easily has 500 years of exciting problems to work on..."

Donald E. Knuth

Gyakran alkalmazott rövidítések:

A/D	: Analóg / Digital
ADNC	: Analog Digital Neural Computer
ADNC-AS	: Analog Digital Neural Computer – Analog Surface
ADNC-DS	: Analog Digital Neural Computer –Digital Surface
ARAS	: aszcendáló retikuláris aktiváló rendszer (Ascending Reticular Activating System)
CDNB	: 1-kloro-2,4-dinitrobenzén
DA	: dopamin antagonizmus
EEG	: elektro-encefalográf
EPSP	: excitátoros posztszinaptikus potenciál
GSH	: glutation (γ -L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine)
GST	: glutation-S-transzferáz enzim
KIR	: központi idegrendszer
MEA	: mikroelektród tömb (Micro Electrode Array)
RAS	: retikuláris aktiváló rendszer (Reticular Activating System)
TTKG	: testtömeg kilogramm
Unit (IU)	: az enzimaktivitás nemzetközi mértékegysége (I.U. : International Unit)

A grafikonok jobb áttekinthetősége és összehasonlíthatósága érdekében minden vizsgált vegyület grafikonoszlopához ugyan azon színekódot alkalmaztam:



TARTALOMJEGYZÉK

1	Bevezetés.....	7
1.1	Célkitűzések.....	10
2	Irodalmi áttekintés	13
2.1	A vizsgált trankvilláns vegyületek.....	13
2.1.1	Neurolepticumok.....	13
2.1.1.1	Kémiai szerkezet és hatékonyság összefüggése	15
2.1.1.2	Hatásmechanizmus	23
2.1.1.3	Mellékhatások és metabolizmus	24
2.1.2	Anxiolyticum	29
2.1.2.1	Kémiai szerkezet és hatékonyság összefüggése	29
2.1.2.2	Hatásmechanizmus	30
2.1.2.3	Mellékhatások és metabolizmus	31
2.1.3	Sedatohipnoticum.....	32
2.1.3.1	Kémiai szerkezet és hatékonyság összefüggése	32
2.1.3.2	Mellékhatások és metabolizmus	33
2.2	Xenobiotikumok GSH konjugációja	33
2.2.1	Specifikus védekező mechanizmusok.....	34
2.2.2	GST katalizált glutation konjugáció.....	35
2.3	Formatio reticularis, RAS.....	37
2.3.1	EEG deszinkronizáció	38
2.3.2	Szinkronizáló mechanizmusok.....	39
2.3.3	RAS - ingerlés	40
2.3.4	Trankvillánsok hatása a RAS-ra.....	41
2.4	Multielektródás elvezetés, tüzelési mintaelemzés.....	42
2.5	Mesterséges neuronhálózatok.....	45
2.5.1	Párhuzamos rendszerek.....	45
2.5.2	CNN-UM	46
3	Anyagok és módszerek	49
3.1	Trankvilláns kezelések	49
3.1.1	Laboratóriumi patkány	50
3.1.2	Házinyúl.....	51
3.1.3	Ezüstkárász	52
3.2	Minták előkészítése GST indukció vizsgálatához	53
3.3	Fehérjetartalom meghatározása.....	54
3.4	GST aktivitás mérése.....	55
3.5	In vitro GST szubsztrát vizsgálat.....	57
3.6	GSH konjugátum szintézis.....	57
3.7	Motilitás mérés.....	58
3.8	Hot-plate teszt	60
3.9	Testhőmérséklet és testtömeg mérés	60
3.10	Mikrokontroller választás.....	60
3.11	Mikrokontrolleres enzimkinetika mérés.....	62
3.12	Agytörzsi szöveti struktúra	63
3.12.1	Hematoxilin-eozin festés.....	63
3.12.2	Velőhüvely festés	64
3.12.3	Immunhisztokémia és hematoxilin-eozin festés.....	64
3.13	Multielektród fejlesztés	65

4	<i>Eredmények és értékelésük</i>	67
4.1	Mikrokontroller alapú enzimkinetikai analízáló rendszer	67
4.1.1	Fotometriás analóg jelek digitális konverziója.....	67
4.1.2	Mikrokontrolleres előfeldolgozás	70
4.1.3	Adatfeldolgozás	74
4.1.4	„Black box” teszt	75
4.2	In vitro szubsztrát vizsgálat	75
4.3	Neuroleptikumok GST indukciója laboratóriumi patkányban	77
4.4	Trankvilláns vegyületek hatékonyságának vizsgálata házinyúlban	82
4.4.2	Trankvillánsok hatása az állatok viselkedésére	82
4.4.1	A motilitás mérőrendszer tesztelése	83
4.4.2	A trankvillánsok hatása az állatok motilitására	84
4.4.2.1	Motilitás változás a kezelés végére a legaktívabb naphoz képest.....	94
4.4.3	A trankvillánsok hatása a fájdalomérzetre (Hot-plate teszt)	95
4.4.4	Trankvillánsok hatása a testhőmérsékletre	97
4.4.5	Trankvillánsok hatása a testtömeg változásra	98
4.5	Trankvillánsok GST indukciója házinyúlban	99
4.6	Glutation konjugált Trankvillánsok hatékonysága házinyúlban	105
4.7	Trankvillánsok és GSH konjugátumainak hatékonysága ezüstkárászban	109
4.8	Trankvillánsok GST indukciója ezüstkárászban	112
4.9	Fajspecifikus összehasonlítások	113
4.10	Analog Digital Neural Computer (ADNC)	120
4.10.1	Általános felépítés	121
4.10.2	Analóg jelfeldolgozás.....	124
4.10.3	Digitális felület	127
4.11	Tüzelési mintaelemzés ADNC segítségével	129
4.11.1	A DS néhány fontosabb algoritmus.....	131
4.11.1.1	Inaktív egység kiszűrés.....	131
4.11.1.2	Kapcsolat keresés	132
4.11.1.3	Tüzelési gyakoriság	132
4.11.1.4	Teszt algoritmusok	132
4.11.1.5	Összetett algoritmusok	133
4.12	Agytörzsi mintavételezés és feldolgozás ADNC-vel	133
4.12.1	Házinyúl	139
4.12.2	Ezüstkárász.....	141
5	<i>Az értekezés új és újszerű eredményei</i>	144
6	<i>A gyakorlatnak átadható eredmények</i>	146
7	<i>Összefoglalás</i>	147
8	<i>Új célkitűzések</i>	154
9	<i>Summary</i>	155
9.1	Introduction	155
9.2	Objectives	158
9.3	Results	160
9.4	The new and original findings of the dissertation	164
10	<i>Irodalomjegyzék</i>	166

1 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 trankvillánsok, 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 trankvillánsoknak tehát komoly gazdasági jelentősége és létjogosultsága van az állattenyésztés területén is.

Azonban a trankvillánsok –különösen a neuroleptikumok– jelentős számú kellemetlen és olykor veszélyes mellékhatással rendelkeznek (dyskinesiák, 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 állatgyógyszer-maradványok maximális mennyiségét, beleértve a trankvilláns 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 filogenézis 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 trankvilláns gyógyszereknek jelentős számú metabolitját azonosították. Nem ismert azonban minden intermedier 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 kölcsönhatnak 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 glutamáterg 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 analízis 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 házinyulat 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 multielektrodás elvezetési rendszer, multielektroda 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 multielektrodás tüzelési

mintamátrixok 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.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A vizsgált trankvilláns vegyületek

A trankvilláns hatású vegyületeket több csoportba soroljuk. (*Trankvilláns /lat./ = csendesít, szinonimája: ataraktikum /gör./ [a-tarasso] = nem-zavar*). Ez a kategorizálás azonban nem teljesen egyértelmű, illetve néhány vegyület a dózistól függően több kategóriába is besorolható. Ide tartoznak a szedatívumok, anxiolyticumok, neurolepticumok és a hypnoticumok. Figyelemre méltó, hogy kémiaiailag rendkívül változatos vegyületekről van szó, amelyeknek azonban közös tulajdonsága a neurodepresszív hatás.

Besorolás	Alkalmazott hatóanyagcsoportok
Szorongásoldók (anxiolítikumok)	Diazepam chlordiazepoxide medazepam clobazam alprazolam diphenylmethane -származékok carbamatok azaspirodecanedione -származékok
Nyugtatók - altatók (szedatívumok-hipnotikumok)	barbiturátok benzodiazepin –származékok zopiclone zolpiden zaleplon clomethiazole valerian Xylazine
Antipszichotikumok (neuroleptikumok) régbben major trankvillánsok	phenotiazinok butyrophenone –származékok Indole –származékok thioxanthene –származékok diazepinek benzamidok lithium Risperidonum

1. Táblázat. Elterjedten alkalmazott nyugtató - szorongásoldó - altató és antipszichotikus vegyületsportok

A táblázatban vastagon kiemelt a jelen munkámban vizsgált gyógyszerek hatóanyagcsoportjai. A további fejezetekben részletesen tárgyalom a vizsgálataimba vont vegyületeket.

2.1.1 Neurolepticumok

A neuroleptikumok (antipszichotikumok) a központi idegrendszerben erősen gátló hatást kifejítő vegyületsport. Különböző eredetű pszichotikus állapotok, elsősorban

schizophreniák kezelésében alkalmazzák a humán gyógyászatban. Erre utal az antipszichotikum vagy trankvilláns elnevezés is. A szedatohipnotikus szerektől eltérő központi idegrendszeri hatást mutatnak. Már kis adagokban jellegzetes nyugalmi állapotot, indifferens magatartást, az érdeklődés csökkenését eredményezik, ugyanakkor még nagyobb adagban sem hipnotikusak és nem hoznak létre narkózist. A neuroleptikus kezelés hatására a pszichotikus beteg izgatott, zavart állapota csökken, közlékenyebbé válik, a jellegzetes pszichotikus tünetek, mint a hallucináció és téveszmék mérséklődnek vagy megszűnnek.

Már kis adagok beadása a vad, kezelhetetlen állatokat megnyugtatja, könnyen kezelhetővé teszi. A természetes dühösségi reakciókat, verekedő - támadó aktivitást kikapcsolja. Ezért 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).

A gyógyszercsoport rendkívül nagy hatékonyságú:

- A Rhesus majmok (*Macaca mulata*) igen vad természetűek. Fenotiazin vagy reserpin kezelés után teljesen szelíddé válnak.
- A Sziámi harcoshal (*Betta splendens*) jellemző támadó mozgását az akváriumba oldott kis mennyiségű neurolepticum felfüggeszti.
- Gátolják a kísérletesen decorticálással vagy specifikus hely, pl. hypothalamus, n. amygdalae ingerlésével kiváltott, ún. "sham rage" (áldühösség) állapotot, illetve a gyenge áramütéssel kiváltható „verekedő” periódusokat patkányon (*Mus rattus*).
- Macskákon (*Felis catus*) morfinnal kiváltható extrém izgatottságot és dühreakciót megszüntetik.
- Normális vagy gyógyszeresen felfokozott (pl. aktedron) ingerlékenységet és a spontán motilitást csökkentik állatokon.

A trankvilláns hatása alatt álló szervezet erősebb feltétlen ingerekre, egészen subtoxikus dózis határokig bezárólag, csaknem normális reakciókra képes, a feltételes reakciókat azonban már kis adagok gátolják.

2.1.1.1 Kémiai szerkezet és hatékonyság összefüggése

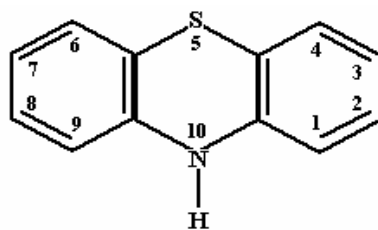
A schizofrenia kezelése egészen a közelmúltig empirikus terápiákra épült. Gyakorlatilag nem volt olyan gyógymód, amellyel csökkenteni lehetett volna a schizofren betegek tüneteit és szenvedéseit. Így az állatgyógyászat és az állattenyésztés területén sem volt hatékony módszer a gyógyszeres megfékezésre, a stressz csökkentésére.

1933-tól Meduna László vezette be a pszichiátriai gyakorlatba a kámfor injekcióval kiváltott epilepsziás rohamterápiát. A kezelés kidolgozásának alapjául az a hipotézis szolgált, hogy az epilepsziás rohamok javítják vagy megszüntethetik a schizofreniás tüneteket. 1934-től Cerletti és Bini (Olaszország) vezette be az elektromos áramot az epilepsziás nagyroham kiváltására. Ez volt az első electroconvulsiv terápia (ECT), amelyet mai napig is alkalmaznak. 1940 -től a XVI. századi német orvostanikusról, Leonhard Rauwolfról elnevezett kígyógyökér *Rauwolfia serpentina* (L.) első aktív komponenseit izolálják, melyet több tucat egyéb alkaloid kinyerése és szerkezetük azonosítása követett. A növényt az indiaiak mintegy 3000 év óta alkalmazzák sikerrel többféle betegség, például az elmebaj és a holdkórosság kezelésében. A *Rauwolfia* alkaloidok felhasználása volt az első farmakoterápiás próbálkozás. A reszerpint 1952-ben állították elő a növényből kristályos formában (MÜLLER, 1952), amelynek hamarosan totálszintézisét is megoldották (WOODWARD, 1956). A reszerpin hatékony neuroleptikum és vérnyomáscsökkentő hatású fenotiazin származék. A fenotiazin molekula kémiai szerkezete a legtöbb hatékony neuroleptikum alapvázát képezi.

2.1.1.1.1 Első generációs vegyületek

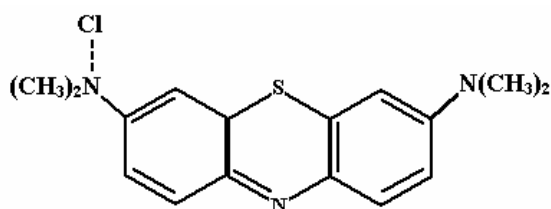
A Párizsi Laborit kutatóintézet munkatársai az 1950-es évek elején figyeltek fel arra, hogy egyes fenotiazin származékok olyan sajátos központi idegrendszeri trankvilláns hatással rendelkeznek, amelynek a mechanizmusa eltér az addig ismert nyugtató-altató szerekétől.

A fenotiazin-molekula emlős szervezetre kevésbé hatásos, és csak egyes baktériumokra valamint férgekre fejt ki már kis adagokban toxikus hatást.



Fenotiazin alapváz

A metilénkék (fenotiazin származék) kemoterápiás alkalmazása *Erlich* nevéhez fűződik. 1876 - ban állították elő, 1938-42 között húgyúti fertőzések kezelésére, majd 1942 után féreghajtóként alkalmazták. Használatát vörösvérsejt-károsító hatása korlátozta és mint gyógyszer kiszorult a terápiából.



Metilénkék

A fenotiazin-molekula központi idegrendszeri hatásához alkalmas szubsztitúció szükséges a 2. és a 10. helyen. A 10. helyen kapcsolódó bázikus oldallánc szerkezete alapján a legalkalmasabbnak tartott fenotiazinokat a következő származékokra osztjuk : dimetilamino-, piperazin-, piperidin-, pirrolidin- A leghasználatosabb vegyületek esetén a 10. helyen leginkább előforduló gyökök a következők :dimetilamino-propil (N^o. 2,4,5,6,8,9), metilpiperazinilpropil (N^o. 10 - 12), hidroxietilpiperazinilpropil (N^o. 13 - 14). *A N^o utalások az 1. Táblázat vegyületeire vonatkoznak.*

Megfelelő szubsztitúció a 2. helyen a hatást erősíti. Pl.: A promazin (N^o. 2) jóval gyengébb hatású, mint a 2. helyen is szubsztituált *Chlorpromazinum* (N^o. 4), metoxipromazin (N^o. 5), triflupromazin (N^o. 6), acetilpromazin (N^o. 8), propiopromazin (N^o. 9). A perazin (N^o. 10) jóval gyengébb hatású, mint a 2. helyen is szubsztrált proklorperazin (N^o. 11), vagy trifluoperazin (N^o. 12).

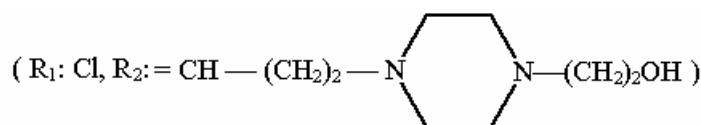
A legjobban bevált szubsztituensek a 2. helyen : Klór (N^o. 4, 11, 13, 15, 16), Trifluorometil (N^o. 6, 12, 14)

Más, hatékony gyökök még : Metil (N^o. 7), Metoxi (N^o. 5), Acetil (N^o. 8), Propionil (N^o. 9), Metilmerkaptó (N^o. 19), Dimetilszulfonamid (N^o. 17)

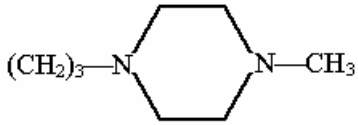
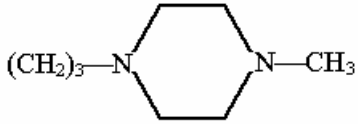
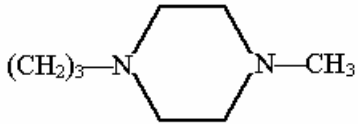
Az 1-es helyen a C helyett N-t tartalmazó vegyületek is hatékonyak (1-aza-fenotiazinok) egyes származékai. Ilyen a protipendil, mely a 10. -helyen dimetilaminopropil gyököt tartalmaz.

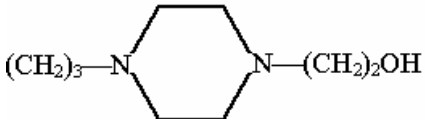
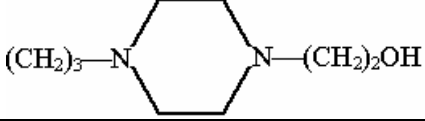
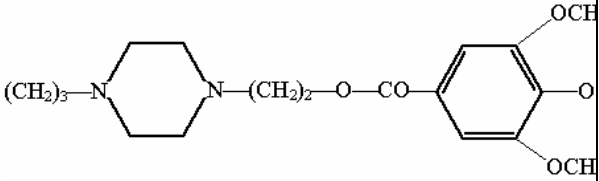
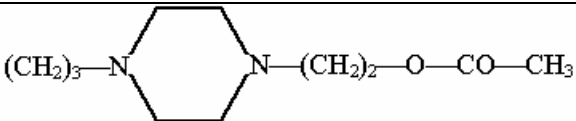
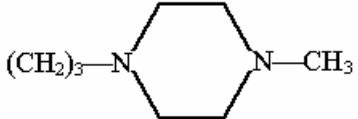
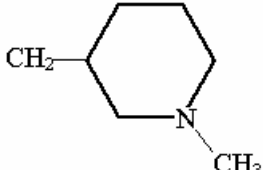
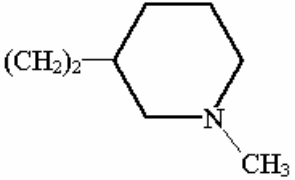
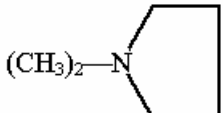
Jellegében megmarad, bár valamelyest gyengül a fenotiazinok trankvilláns hatása akkor is, ha a gyűrűbe a kén szulfoxiddá oxidálódik. Ilyen szulfoxiddá alakulás a vegyület szervezeten belüli metabolizmusa során a molekulák egy részén végbemegy: secotil, a *Chlorpromazinum* megfelelő szulfoxid-analógja.

A heteroatomok (N,S) a jellegzetes trankvilláns hatás megmaradása mellett elhagyhatók. Így hatékonyak pl. a thioxanten -származékok. A fenotiazinok N -je helyett itt C atomot találhatunk. Legismertebb képviselői a chlorprothixen, a *Chlorpromazinum* thioxanten -analógja (R1: Cl, R2: = CH — (CH₂)₂ — N(CH₃)₂) és a Clopenthizol, a perfenazin -analógja.



Hasonlóképpen megmarad a hatás (legalábbis alapvető jellegében) olyan struktúráknál is, amelyek egyáltalán nem tartalmaznak heteroatomot (dialkil-antron - származékok).

N°.	R (10 -es hely)	X (2 -es hely)	Vegyület neve	Hatékony napi dózisok nagyságrendje emberen, mg - ban
1.	H	H	Fenotiazin	1000 - 2000
Dimetilamin - származékok				
2.	(CH ₂) ₃ —N(CH ₃) ₂	H	Promazin	25 - 1000
3.	CH ₂ —CH(CH ₃)—N(CH ₃) ₂	H	Prometazin	25 - 300
4.	(CH ₂) ₃ —N(CH ₃) ₂	Cl	<i>Chlorpromazinum</i>	25 - 400
5.	(CH ₂) ₃ —N(CH ₃) ₂	OCH ₃	Metoxipromazin	30 - 500
6.	(CH ₂) ₃ —N(CH ₃) ₂	CF ₃	Triflupromazin	20 - 150
7.	CH ₂ —CH(CH ₃)—CH ₂ —N(CH ₃) ₂	CH ₃	Trimeprazin	10 - 80
8.	(CH) ₃ —(CH ₃) ₂	CO-CH ₃	Acetilpromazin	150 - 200
9.	(CH ₂) ₃ —N(CH ₃) ₂	CO-CH ₂ -CH ₃	Propiopromazin	10 - 50
Piperazin - származékok				
10.		H	Perazin	50 - 100
11.		Cl	Proklórperazin	15 - 40
12.		CF ₃	Trifluperazin	4 - 12

13.		Cl	Perfenazin	5 - 20
14.		CF ₃	Flufenazin	0,5 - 2,5
15.		Cl	Frenolon	15 – 30
16.		Cl	Tiopropazat	15 - 30
17.		SO ₂ -N(CH ₃) ₂	Tioperazin	30 – 50
Piperidin – származékok				
18.		H	Mepazin	150 – 200
19.		SCH ₃	Tioridazin	30 – 800
Pirrolidin – származékok				
20.		H	Piratiazin	50 – 100

2. Táblázat. Az R és X szubsztituensek a fenotiazin vázon az egyes hatékony vegyületeknél

Forrás: (KNOLL, 1965)

A *Chlorpromazinum* előállításával elkezdődött egy kb. 15 évet átfogó korszak, nagyszámú neuroleptikus vegyület szintézisével. Az ekkor előállított vegyületeket „hagyományos” vagy „típusos” neuroleptikumoknak nevezi a szakirodalom. Fő jellemzőjük a dopamin (DA) antagonizmuson alapuló, jelentős mellékhatásokkal kísért (extrapiramidális zavarok, hiperlaktinémia stb.) hatás. Ide sorolható az általam is vizsgált dimetilamin származék a *Chlorpromazinum hydrochloricum* (CHARPENTIER, 1953). Számos farmakológiai tulajdonsága – tranquilláns, adrenolytikus, anticholinerg, antiszerotonin, dopaminantagonista, antiemetikus, analgetikus, narcosispotenciáló, –

lehetővé teszi sokrétű felhasználhatóságát. Egyike a legrégebben alkalmazott antipsychotikus vegyületeknek. Alkalmazzák motoros és psychés nyugtalanság, paranoid-hallucinációs syndromák különböző formái (schizophreniák, psychosis maniaco depressiva mániás fázisa, epilepsiás eredetű psychosisok az antiepilepticumok változatlan vagy emelt adagja mellett). Műtéti előkészítés, potenciált anaesthesia, hibernatio, postoperativ nausea és vomitus csökkentése, traumás és postoperativ shock megelőzése és kezelése, tetanus, acut intermittens porphyria. Neuralgiás, neuritises, malignomás, égési fájdalom esetén adjuvánsként alkalmazzák. A vegyület mind a humán mind az állatgyógyászat területén elterjedt.

Az R –helyen dimetilamino-propil gyököt tartalmaz az *Acepromazinum*, amelyet széles körben alkalmaznak az állatgyógyászat területén de kizorult a humán felhasználási körből. Nyugtató és izomrelaxáns hatást fejt ki. A védekező reakciók valamint az ingerlékenység és az izgalmi állapot csökkentésével. Csökkenti a testhőmérsékletet, a vérnyomást, adrenolitikus, antihisztamin illetve antiemetikus hatású.

A *Thioridazinum hydrochloricum* kéntartalmú C₂-szubsztituenst tartalmazó piperidin származék (BOURQUIN et al., 1961) A fenotiazin vázat azonban itt, N-[metilmerkaptó-fenil]-N-[2-(N,-metilpiperidil)-anilin és kénklorid reakciójával hozták létre. Antipsychotikus, antihisztamin, gyenge antiemetikus, erős sedativ és anxiolytikus hatása van. Erős alfa-adrenerg antagonist és anticholinerg hatású. Mérsékelt vérnyomáscsökkentő hatású, extrapiramidális tüneteket kevésbé okoz. A hatóanyag terápiás tartománya széles. Jelenleg csak humán felhasználású.

A *Haloperidolum* (JANSSEN et al., 1962) a fenotiazinoktól eltérő szerkezetű, butirofenon származékok prototípusának tekintjük Psychoticus syndromák kezelésére, érzéksalódások és hallucinációk esetén a következő állapotokban: - akut és krónikus schizophrenia, - paranoid-hallucinatorikus tünetegyüttes, - mania és mániás állapotok, - psychomotoros nyugtalanság, időskori agitáltság, aggresszivitás, - cerebrovascularis eredetű nyugtalanság, - izgatottsággal járó oligophrenia, - alkoholelvonási izgalmi állapotok. Hyperkinesziák: - Huntington-chorea, - Gilles de la Tourette syndroma, - tic nerveux, maior analgeticumok dózisának csökkentése céljából adjuvánsként súlyos, krónikus fájdalom csillapítására. Antiemetikumként különféle eredetű, más módon csillapíthatatlan hányinger és hányás kezelése. Mind humán mind állatgyógyászati felhasználása ismert.

A fenotiazinokra és tioxanténekre vonatkozó leglényegesebb szerkezet- hatás összefüggések az alábbiak (TAKÁCSNÉ és SZÁSZ, 2005). A dopamin- antagonistá hatást jól alátámasztják a röntgenkristallográfias vizsgálatok, miszerint a *Chlorpromazinum* és a dopamin szerkezete fedésbe hozható. A fenotiazin és a tioxantén vázak bioizosztereknek tekinthetők, mivel az N10 atom helyettesítése C=C kötéssel hasonló erősségű neuroleptikumokat eredményezett. A C₂ szubsztituens elektronegativitása a neuroleptikus hatást fokozza a következő sorrendnek megfelelően: (H) << Cl < OCH₃ < CF₃ < -CO-CH₃ ~ -SO₂N(CH₃)₂ ~ SCH₃. Az oldallánc bázikus N atomja és a gyűrű távolsága 3 C atomnyi kell legyen, 2 C távolság esetén az antihisztamin hatás válik dominánssá. A neuroleptikus hatás nő az alkilamino, piperidinil, piperazinil származékok irányában. A fenotiazin- szerkezetűeknél a (transz vagy α) rotamer lehet a receptoraktív forma, ahol az oldallánc a klór atom felé mutat, míg a tioxantének esetében a cisz izomer a hatásos (WILLIAMS et al., 2002).

2.1.1.1.2 Második generációs vegyületek

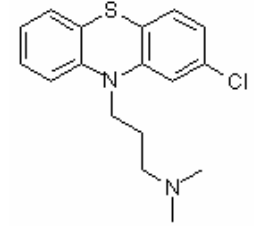
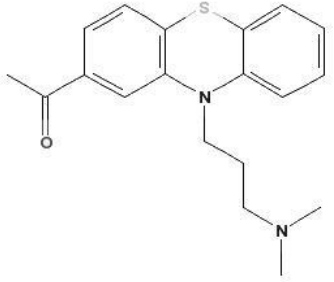
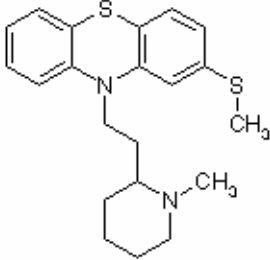
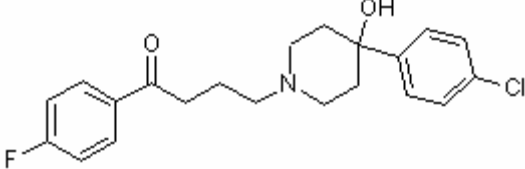
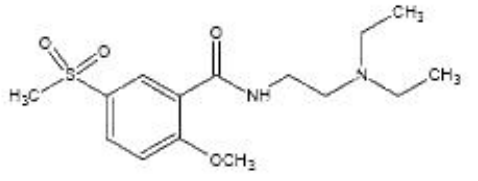
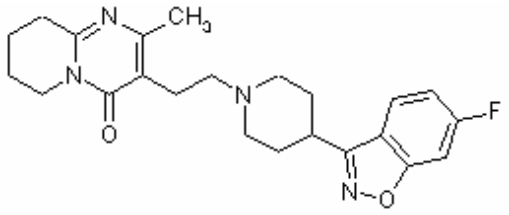
A jelentős számú kellemetlen és olykor veszélyes mellékhatás miatt az újabb vegyületek utáni intenzív kutatás folytatódott. Az 1960-as évek közepétől hatásmódjában új, jelentősen kevesebb mellékhatással rendelkező „atípusos” neurolepticumok kerültek forgalomba. A kategoriális felosztás azonban sok esetben félrevezető (BARTKÓ, 2004). Az új szerek közül ugyanis több, nem minden tekintetben elégti ki az „atípusosság” korábban felállított kritériumait. Az amiszulprid például hatékonyan csökkenti a negatív tüneteket, de átmeneti prolaktinszint emelkedést okozhat. Így egyes szerzők első illetve második generációs gyógyszerekként említik ezeket, ez vált elfogadottá (SARTORIUS, 2002; MAGYAR NEUROPSZICHOFARMAKOLÓGIAI EGYESÜLET 4. Antipszichotikumok Konszenzus Konferenciáján - 2003 november 26 - módosított és elfogadott dokumentum).

Második generációs gyógyszerek közé tartozik (TAKÁCSNÉ és SZÁSZ, 2005) az általam is vizsgált, szulfonil csoportot tartalmazó benzamid származék, a *Tiapridum* (ACHER and BULTEAU, 1973). Itt sem teljes az egyetértés, hiszen más szerzők a *Tiapridot* első generációsok közé sorolják (MAGYAR NEUROPSZICHOFARMAKOLÓGIAI EGYESÜLET 4. Antipszichotikumok Konszenzus Konferenciáján - 2003 november 26 - módosított és elfogadott dokumentum). Agitált és agresszív állapotoknál javallt, főleg alkoholistá betegekben,

choreiform mozgások, súlyos, egyéb gyógyszerekkel kezelhetetlen fájdalom esetén. A vegyületet az állatgyógyászatban nem alkalmazzák.

„Egyéb” szerkezetű, de egyértelműen második generációs vegyületek közé sorolják a benzizoxazol + piperidin + piridopirimidin -vázis, heterociklusokban bővelkedő **Risperidonumot** (KENNIS E.J. and VANDENBERK J. 1989). A vegyület egy piperidinnel szubsztituált benzizoxazol-származék. Alkalmazzák schizophreniában, beleértve az első psychotikus epizódot, az akut schizophren exacerbációt, a krónikus schizophreniát. Egyéb psychotikus állapotokban, amelyekben a pozitív tünetek (mint hallucinatio, téveszmék, gondolati zavarok, ellenséges érzélem, bizalmatlanság) hangsúlyosak. A vegyületet az állatgyógyászatban még nem vezették be.

Az értekezés alapjául szolgáló kísérletsorozatban az alábbi neurolepticumokat vizsgáltam:

	Név	Származék	Szerkezet
Hagyományos	<i>Chlorpromazinum hydrochloricum</i>	dimetilamin 3-(2-chloro-10H-phenothiazin-10-yl)-N,N-dimethyl-propan-1-amine	
	<i>Acepromazinum</i>	1-[10-(3-dimethylaminopropyl)phenothiazin-2-yl]ethanone	
	<i>Thioridazinum hydrochloricum</i>	piperidin 10-[2-(1-methyl-2-piperidyl)ethyl]-2-methylsulfanyl-phenothiazine	
	<i>Haloperidolum</i>	butirofenon 4-[4-(4-chlorophenyl)-4-hydroxy-1-piperidyl]-1-(4-fluorophenyl)-butan-1-one	
Atípusos	<i>Tiapridum</i>	benzamid N-[(1-ethylpyrrolidin-2-yl)methyl]-2-methoxy-5-sulfamoyl-benzamide	
	<i>Risperidonum</i>	benzizoxazol+piperidin+piridopirimidin 4-[2-[4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-yl)-1-piperidyl]ethyl]-3-methyl-2,6-diazabicyclo[4.4.0]deca-1,3-dien-5-one	

3. Táblázat. A kísérletek során vizsgált neuroleptikumok besorolása és kémiai szerkezete

2.1.1.2 Hatásmechanizmus

A neuroleptikumok szerkezetileg jelentős különbségeket mutatnak, mégis közös jellemzőjük a dopamin (DA) antagonistá hatása. Klinikai hatékonyságuk támasztja alá a schizofrenia úgynevezett DA-hipotézisét, amely szerint a betegség hátterében fokozott DA aktivitás áll. Valamennyi neuroleptikum gátolja az agyi dopaminerg receptorok működését. A receptor affinitás és az antipszichotikus hatékonyság szoros korrelációt mutat. A skizofrenia ún. pozitív tüneteire (hallucináció, téveszmék, agresszivitás stb.) klinikailag bizonyítottan a mesocorticalis és a mesolimbikus rendszer dopaminerg neurotranszmissziójának zavara, DA túlsúly felelős. Elsősorban a D₂ receptorok gátlása eredményezi a tünetek javulását (NIKOLICH and URFER, 2004). A betegség neurobiológiai háttere ennél feltehetőleg jóval összetettebb, hiszen a mesolimbicus területen fokozott DA transzmisszió figyelhető meg, míg a nigrostriális és a mesocorticalis területen hipoaktivitás (FÜRST, 2006). A klasszikus szerek nigrostriális D₂ receptor gátlásának súlyos következménye az ún. extrapiramidális mellékhatások (tardív dyskinesia, akatisia, dystonia stb.) kialakulása. Újabb vizsgálatok szerint azonban az ún. negatív tünetek (apátia, depresszió, beszédkézség romlás stb.) a kortikális DA hipofunkció következménye (SVENSSON, 2003). A betegségben pozitív és negatív tünetek egyidejű megléte is fennállhat. Így a klasszikus dopamin antagonistá vegyületek e tüneteket inkább rontják, mint javítják. A dopaminerg neurotranszmisszió mellett számos más receptoron is gátló hatást fejtenek ki (RICHELSON and SOUDER, 2000). A neuroleptikumok a központi idegrendszerben, valamint perifériálisan, a dopamin D₂- és D₁-, a szerotonin 5HT₂-, az α_1 - és α_2 -adreno-, az acetilkolin, muscarin M₁-M₅, valamint a hisztamin- H₁ receptorokat gátolják. A jelentkező mellékhatások tüneteire szoros összefüggést mutatnak az egyes receptorokhoz történő affinitással (VIZI, 2002; FÜRST, 2006). A második generációs gyógyszerek „atípusossága” épp azon alapszik, hogy nagyobb mértékű az egyéb, így a szerotonerg neuronokra kifejtett gátló hatás. A klozapin és egyéb triciklusos vegyületek nagyobb affinitással gátolják az 5-HT_{2A} receptorokat, mint a D₂-t, de más 5-HT és D₁ valamint D₄ receptorokra, sőt az α -adrenoceptorokra és H-receptorokra is gátló hatással vannak. A 5-HT_{2A} > D₂ gátlás eredménye a sokkal kedvezőbb mellékhatás- profil (MELTZER, 2004). Ugyanakkor a benzamid-származékok (szulpirid, amiszulprid, *Tiapridum*) szelektív D₂/D₃ receptor antagonisták és csak csekély affinitással kötődnek egyéb receptorokhoz. Itt az atípusos jelleg, vagyis a kevesebb mozgásszervi mellékhatás annak lehet a következménye, hogy a különböző agyi

régiókban nem egyforma mértékben gátolják a dopaminerg neuronokat. Az utóbbi időben újabb elméletek is születtek a skizofrénia patomechanizmusára vonatkozóan, melyek szerepet tulajdonítanak a noradrenalin neurotranszmisszió zavarának („NA hipotézis”) (YAMAMOTO and HORNYKIEWICZ, 2004), valamint a glutaminerg hipofunkciónak (JAVITT and ZUHIN, 1991) a betegség kialakulásában. Ez új gyógyszer támadáspontokat (target) jelent és új lehetőségeket nyit meg a gyógyszerkutatás számára (NIKOLICH and URFER, 2004).

2.1.1.3 Mellékhatások és metabolizmus

(Forrás: VIZI, 2002; BORVENDÉG, 2002; FÜRST, 2006)

Általános tünetek:

Akut dyskinesziák

A syndroma elsősorban a nyelv, arc, száj és állkapocs akaratlan ritmikus mozgásával jellemezhető. A gyógyszer felszívódását követő néhány percen, legfeljebb néhány órán belül torticollis, oculogyriás laryngopharyngealis dystonia, a mély hátizmok dystoniája (Pisa-szindróma) léphet fel. Az akut dystoniák és dyskinesisek jelentős fájdalommal járnak. A laryngopharyngealis dystonia pedig az előidézett nyelészavarok miatt életveszélyessé is válhat.

Parkinsonismus

Tremor, hypokinesia, izomtónus-fokozódás. Általában a kezelés ötödik napja után jelentkeznek a tünetek.

Akatizia

Nyugtalanság, mozgáskényszer. Esetenként a kísérleti állatok fokozott aktivitása, izgatottsága figyelhető meg, ami ellentétes a gyógyszertől várt hatásnak.

Agresszivitás

Nagy dózisban alkalmazott hagyományos neuroleptikum esetén (pl. *Haloperidolum*) figyeltek meg szignifikánsan gyakoribb erőszakos viselkedést, és szuicid magatartást. A második generációs antipszichotikumok esetén (clozapin, *Risperidonum*) tapasztalható antidepresszív antiagresszív hatás feltehetőleg a szerotonerg (5HT_{2A-C}) rendszerre gyakorolt hatással magyarázható

Endokrin melléhatások

A neuroleptikumok a tuberoinfundibularis rendszer dopamin D₂-receptorainak gátlásával a prolactin elválasztást elősegítik. Ez galactorrheát, gynaecomastiát okoz.

További következménye a gonadotrop hormonok, a testosteron és oestrogen szintézisének csökkenése. Ezáltal potenciazavart, amenorheát, frigiditást valamint hosszútávon osteoporozist okoz. A szexuális funkciózavarok hangsúlyosan figyelembeveendő tényezőállatok esetén.

A prolactin szinttől független hatás az elhízás, ami feltehetőleg hisztamin receptorok blokkolásának következménye. Például rendszeresen szállított és nyugtatott sportlovaknál teljesítmény csökkentő lehet az izom és zsírszövet arányának megváltozása.

Cardiovascularis mellékhatások

Hypotóniát, súlyos orthostaticus vérnyomáscsökkenést és tachycardiát okozhat. A vérnyomás zavara az α_2 receptorgátló hatással hozható összefüggésbe.

Antikolinerg mellékhatások

Több neuroleptikum (*Chlorpromazinum*, tioridazin, stb.) muszkarin M_1 -gátló hatása érvényesül. Ezért központi és perifériás idegrendszeri antikolinerg zavarokat idéznek elő. Euphoria, zavartság, delirium, székrekedés, szájszárazság, tachycardia, accomodatiós zavar, elektro kardiogram (EKG) QRS-eltérések léphetnek fel.

Haematológiai mellékhatások

Súlyos agranulocytosist okozhatnak.

Neuroleptikus malignus tünetcsoport (NMS)

Potenciálisan fatális kimenetelű, rosszindulatú tünetegyüttes. Viszonylag ritka 0,02-0,88 % a kialakulási valószínűsége emberen, krónikus kezelés következtében. Ezt a ritka idiosyncrasiás reakciót hyperthermia, generalizált izomrigiditas, vegetatív instabilitás és változó tudati állapot kíséri.

A vizsgált neuroleptikumok jellemzői:

Chlorpromazinum hydrochloricum

Mellékhatásként álmoság, szájszárazság, sápadtság, gyengeség, a hőmérséklet csökkenése, depressio, bőrtünetek jelentkezhetnek. Sárgaság (nem dózisfüggő, reverzibilis), májártalom, haematologiai rendellenességek (agranulocytosis, leukopenia, leukocytosis, haemolytikus anaemia). Tachycardia és mérsékelt vérnyomáscsökkenés. Tartós szedéskor obstipatio, megacolon. Nagy adagok alkalmazásakor parkinsonos tünetek, amelyek antiparkinsonicumok hatására megszűnnek. Photosensibilisatio. Nagy adagok

hosszan tartó alkalmazásakor a bőr "bíbor-pigmentáció"-ja (pigment lerakódás a szemben is). A cornea és a szemlencse átlátszatlansága. Amenorrhoea, galactorrhoea, gynecomastia, hízás, diabetes mellitus.

Acepromazinum

Hypothermiát, hypotensiót, leukopeniát, leukocytózist, eosinophiliát, valamint a bőr sötét pigmentációját idézhetik elő, hasonlóan a *Chlorpromazinum*hoz.

Thioridazinum

A gyomor-béltraktusból gyorsan és szinte teljesen felszívódik. A plazmában a csúcskoncentrációt 2-4 órával a bevétel után éri el. Biohasznosulása kb. 60 %. Fehérjékhez kb. 95 %-ban kötődik. A hatóanyag relatív megoszlási térfogata 10 L/kg. A májban metabolizálódik a citokróm-P450 2D6 izoenzim segítségével. Két aktív metabolitja ismert, a mesoridazin és a sulforidazin. A metabolitok hasonló farmakodinámiás tulajdonságokkal rendelkeznek, mint az anyavegyület. Részben a széklettel (kb. 50 %), részben a vesén át választódik ki (kb. 4 % változatlan formában, kb. 30 % metabolitként). Felezési ideje kb. 10 óra. A *Thioridazinum* átjut a placentán, kiválasztódik az anyatejbe. A *Thioridazinum* és aktív metabolitjai átjutnak a vér-agy gáton és kimutathatók a cerebrospinális folyadékban (CSF). A két metabolit CSF/plazma koncentráció aránya nagyobb, mint az anyavegyületé, ami azt mutatja, hogy mindkettő lényegesen hozzájárul a gyógyszer antipsychotikus aktivitásához. Máj- és vesefunkció zavarban eliminációja lassulhat.

A mellékhatások dóziszfüggőek, és általában a farmakológiai hatás fokozott megnyilvánulásai.

- Nagyon gyakori (>10%): sedatio, álmoság.
- Gyakori (1-10 %): szédülés, szájszárazság, homályos látás, accomodatio zavarok, orrdugulás, orthostaticus hypotensio, galactorrhoea.
- Nem gyakori (0,1-1 %): zavartság, agitáció, hallucinációk, irritabilitás, fejfájás, hányinger, hányás, hasmenés, székrekedés, étvágyvesztés, húgyúti retentio vagy incontinentia, EKG eltérések mint pl. QT-szakasz nyúlás vagy tachycardia, arrhythmia, amenorrhoea, menstruációs zavarok, testsúlyváltozás, erekciós zavarok, az ejakuláció gátoltsága, májenzim rendellenességek.
- Ritka (0,01-01 %): pseudoparkinsonismus, convulsiók, extrapyramidalis tünetek (tremor, izomrigiditás, akathisia, dyskinesia, dystonia), hyperkinesia, tardiv dyskinesia, pallor, tremor, priapismus, leucopenia, agranulocytosis,

thrombocytopenia, dermatitis, erupciók, urticaria, allergiás bőrkiütések, fotosensitivitas.

- Nagyon ritka (<0,01%): depressio, insomnia, rémálmok, psychotikus reakciók, neurolepticus malignus syndroma, paralytikus ileus, "torsade de pointes" arrhythmia, hirtelen halál, mellduzzanat, perifériás oedema, fültőmirigy duzzanat, hyperthermia, respiratorikus depressio, retinopathia pigmentosa.

Haloperidolum

Centrális dopaminreceptor-antagonista hatású, nagypotenciálú neurolepticum. Valószínűleg a mesocorticalis és limbikus szövetekre kifejtett dopaminblokkoló hatása révén hatásos az érzéksalódások és hallucinációk kezelésében. Jelentős psychomotoros nyugtató hatással rendelkezik. Erős antidopamin hatása révén (chemoreceptor trigger zóna, adenohypophysis) kifejezett hányáscsillapító hatással rendelkezik. A basalis ganglionokra kifejtett hatása magyarázhatja az extrapyramidalis mellékhatásokat (dystonia, akathisia, parkinsonismus). Oralis adagolás után a *Haloperidolum* plazma-csúcskoncentráció 2-6 óra között jelenik meg, intramuscularis adagolás után ugyanez az érték kb. 20 perc. A vér-agy gáton átjut. A plazmafehérjékhez 92 %-ban kötődik, a kiürülés döntően metabolitok formájában, 60 %-ban a faecessel, 40 %-ban a vizelettel történik.

Mellékhatásai jellegzetes extrapyramidalis tüneteket okoznak. Jelentkezhet tremor, rigiditas, bradykinesia, akinesia, akut dystonia, oculogyriás crisis, laryngealis dystonia, neuroleptikus malignus syndroma (NMS). Okozhat továbbá depressiót, sedatiót, agitációt, álmoságot, álmatlanságot, fejfájást, confusiót, szédülést, nyugtalanságot, félelemérzést, euphoriát, lethargiát, grand mal rohamot, a psychoticus tünetek rosszabbodását. Esetenként hányingert és hányást, étvágycsökkenést, dyspepsiát. Súlygyarapodás- és csökkenés egyaránt lehetséges. Endokrin mellékhatások: Dopaminantagonista hatása révén hyperprolactinaemiát, galactorrhoeát, gynecomastiát, oligo-amenorrhoeát okozhat.

Tiapridum

Az adenyl-cikláz-dependens D₂ dopamin receptor szelektív antagonistája, ami nem rendelkezik affinitással a D₁ dopaminreceptor irányában. Szedatív illetve kataléptogén hatása csekély, hatását a dopamin iránt érzékeny vált receptorokon fejté ki. Anxiolitikus hatása független dopamin antagonistá hatásától. A *Tiapridum* sem fizikai

sem pszichés dependenciát nem okoz. 200 mg *Tiapridum* im. beadása után 30 perccel 2,5 (g/ml plazmakoncentráció érhető el, orálisan 200 mg tabletta bevétele után 1 órával pedig 1,3 g/ml. Nem kötődik a plazmafehérjékhez és a vörösvérsejtekhez való kötődése is nagyon gyenge. A *Tiapridum* humán metabolizmusa igen lassú, az adag 75 %-a változatlanul ürül a vizeletben. A plazma eliminációs félideje férfiakban 3,6 óra, nőkben pedig 2,9 óra. Főleg a vizelettel választódik ki, renalis clearance 330 ml/min.

Mellékhatásai: asthenia/fáradtság (9,4 %) - somnolentia/álmoság (5,6 %), insomnia (4,4 %) - agitáltság (3,7 %) - közömbösség (2,8 %) - szédülés (2,6 %) - fejfájás (2 %) - parkinsonismus és azzal kapcsolatos tünetek: tremor (2,3 %), izommerevség, hypokinesia (1,2%), fokozott nyálképződés (1,2 %) - akut dyskinesia és dystonia (torticollis spastica, oculogyriás krízis, trismus) - akathisia (0,9 %) - prolactin-szint emelkedéssel kapcsolatba hozható tünetek (<0,2%): galactorrhea, amenorrhea, gynaecomastia, impotencia, testsúlynövekedés - tardív dyskinesia

Risperidonum

A *Risperidonum* egyedi tulajdonságokkal rendelkező szelektív monoaminerg antagonist. Nagy affinitást mutat a szerotoninerg 5-HT₂ és a dopaminerg D₂ - receptorokhoz. A *Risperidonum* az alfa₁-adrenerg receptorokon és kisebb affinitással a H₁-hisztamin és alfa₂-adrenerg receptorokon is kötődik. Nem rendelkezik affinitással a kolinerg receptorokkal szemben. Bár a *Risperidonum* erős D₂-antagonista és így a schizophrenia pozitív tüneteit mérsékli, motoros aktivitáscsökkenést és katalipsziát kevésbé idéz elő, mint a klasszikus neuroleptikumok. Kiegyensúlyozott központi idegrendszeri szerotonin- és dopamin-antagonizmus révén csökken az extrapyramidalis mellékhatások megjelenésének lehetősége, ugyanakkor terápiás hatása a schizophrenia negatív és affektív tüneteire is kiterjed. Orális bevétel után teljesen felszívódik, és a plazmaszint csúcértékét 1-2 óra alatt éri el. A *Risperidonum* a citokróm P-450 IID6 révén 9-hidroxi-*Risperidonum*ná metabolizálódik, ami a *Risperidonum*hoz hasonló farmakológiai aktivitással rendelkezik. A *Risperidonum* és a 9-hidroxi-*Risperidonum* képezi az aktív antipsychotikus frakciót. A *Risperidonum* N-dealkilálása a másik metabolikus út. Psychotikus betegeknél történt orális alkalmazás után a *Risperidonum* 3 óras felezési idővel eliminálódik. A 9-hidroxi-*Risperidonum* és az antipsychotikus frakció eliminációs felezési ideje 24 óra. A plazmában az albuminhoz és az alfa 1-glikoproteinsavhoz kötődik. A *Risperidonum* plazmafehérje kötődése 88 %, míg a 9-hidroxi-*Risperidonum*é 77 %. Egy hetes adagolást követően a vizelettel 70 %-a, míg a

széklettel 14 %-a választódik ki. A vizeletben a dózis 35-45 %-a *Risperidonum* és 9-hidroxi-*Risperidonum* formájában van jelen. A maradék inaktív metabolit.

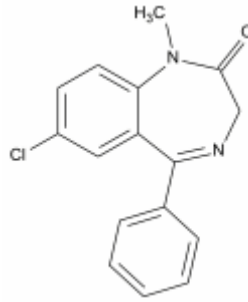
Gyakori mellékhatások: álmatlanság, nyugtalanság, szorongás, fejfájás, szedáció, aluszékonyság, fáradtság, szédülés, csökkent koncentrációkészség, székrekedés, dyspepsia, hányinger/hányás, hasi fájdalom, homályos látás, priapizmus, az erectio, az ejaculatio és az orgazmus zavara, vizelet incontinentia, rhinitis, bőrkiütés és egyéb allergiás reakciók. A *Risperidonum* kisebb mértékben hajlamos az extrapyramidalis tünetek indukálására, mint a klasszikus neuroleptikumok. Ennek ellenére esetenként a következő extrapiramidális tünetek előfordulhatnak: tremor, rigiditás, fokozott nyáleválasztás, bradykinesia, akathisia, akut dystonia. A *Risperidonum* a plazmaprolaktin-koncentráció dóziszfüggő emelkedését idézheti elő. Ennek lehetséges megnyilvánulásai: galactorrhoea, gynecomastia, a menstruációs ciklus zavara, amenorrhoea. Risperdal kezelés során testsúlygyarapodást, oedemát és a májenzim-értékek emelkedését figyelték meg. A klasszikus neuroleptikumokhoz hasonlóan alkalmanként psychotikus betegeknél víz-intoxicatióról (polydipsia következtében vagy az antidiuretikus hormon szekréciózavarának tüneteiként), tardív dyskinesiaról, malignus neuroleptikus szindrómáról, a testhőmérséklet szabályozásának zavaráról és rohamokról is beszámoltak.

2.1.2 Anxiolyticum

Az anxiolitikumok olyan psychotróp vegyületek amelyek csökkentik a feszültséget konfliktushelyzetben, szorongásoldó és alvást potencírozó hatással rendelkeznek. Sikertörténetük 1956-ban, Leo Sternbach által szintetizált chlórdiazepoxiddal kezdődött, ami 1960-ban Librium néven került forgalomba. Jelenlegi, humán és állatgyógyászati területen is széles körben alkalmazott egyik képviselője az általam is vizsgált **benzodiazepin**.

2.1.2.1 Kémiai szerkezet és hatékonyság összefüggése

Kémiai szerkezetük egy közös alapvázból épül fel. A gyűrűben lévő N atomok helyzete szerint (1,4; 1,5; 2,3; helyzetben lehetnek) több alcsoportot különíthetünk el. Az alap vegyületből szubsztituálással új vegyületek állíthatók elő: ilyen pl. a Medazepam, mely Cl és CH₃ csoportot tartalmaz.



7-Chlor-2,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-1H-1,4-benzodiazepin-2-on.

A benzodiazepinek jó altatók, alvászavar esetén csökkentik az elalváshoz szükséges latenciaidőt, növelik az alvási időt, csökkentik az alvás alatti nyugtalanságot, meggátolják az alvászavarokkal küzdők REM-fázis utáni felébredését. Ugyanakkor a benzodiazepinek megváltoztatják a fysiologias alvás struktúráját. Rövidítik az első, a harmadik, a negyedik, valamint a REM-fázis időtartamát és erősen megnyújtják a második fázisban töltött időt. (BITTER, 1996)

A benzodiazepinek hatékony görcs gátlók. Erősen gátolják a görcsaktivitás subcorticalis terjedését. Hatékonyan antagonizálják a picrotoxin és pentametiltetrazol okozta görcsöket, sokkal kevésbé hatékonyak azonban a sztrichnin okozta görcsökkel és az elektrosokkal szemben. Nagyon hatékonyan gátolják állatkísérletes modelleken a cortexben létrehozott epileptogén fókuszról kiinduló görcsök szétterjedését a cortexre, a thalamusra és a limbikus rendszerre, de a fókusz abnormális kisüléseit egyik benzodiazepin sem képes gátolni. A benzodiazepinek antikonvulzív hatásával szemben gyorsan alakul ki tolerancia.

A benzodiazepinek izomrelaxáns hatással is rendelkeznek. Gátolják a poliszinaptikus reflex aktivitást és csökkentik a mesencephalon reticularis rendszerében a neuronok működését.

A benzodiazepineknek amnéziát okozó hatása is van. Intravénás adagoláskor gyakran megfigyelhető, hogy a betegek nem emlékeznek az elaltatás előtti vagy az ébredés utáni eseményekre, míg régebbi eseményeket jól fel tudnak idézni.

2.1.2.2 Hatásmechanizmus

A benzodiazepin receptorokhoz kötődve fokozza az inhibitoros neurotranszmitter GABA-hatást. Anxiolytikus, hypnotikus, anticonvulsiv és izomrelaxáns hatása van.

A benzodiazepinek az agy fő gátló neurotranszmitterének, a γ -aminovajsavnak (GABA) hatásait erősítik. (KÓSA L. ,1998) A GABA-erg neuronok mindig gátló hatásokat közvetítenek, fő feladatuk valószínűleg az ingerek túlzott generalizációjának a

megakadályozása. A központi idegrendszer csaknem 40 %-ában GABA_A és GABA_B receptorokat tartalmazó területek vannak, az agy neurotranszmitterei közül a legnagyobb számban fordul elő. Farmakológiai és neuroanatómiai vizsgálatok szerint a benzodiazepinek a szepto-hippokampalis rendszer noradrenerg és szerotonerg inputjainak redukcióján keresztül, elsősorban a locus ceruleus (noradrenerg) és a raphe magcsoport (szerotonerg) kisülési rátájának csökkentésével bekövetkező agyi GABA tónus növelésével módosítják a szorongásos magatartást (MATSUMOTO, 1998).

A GABA_A receptor az ionotrop receptorok közé tartozik és három funkcionális alegységből áll: a benzodiazepin receptorból (omega receptor), a GABA kötőhelyből és a klorid ioncsatornából (AWAD and GAVIS, 1991). A GABA_A receptor fiziológiai ingerlése a klorid csatorna megnyitását, a klorid ionok idegsejtbe való beáramlását, és a posztszinaptikus neuron hyperpolarizációját eredményezi. Az omega receptorok a GABA_A receptor benzodiazepin kötő receptorai, hat alcsoportját ismerjük, melyek hatásukban különbözőek: vannak szorongásoldásért, izomrelaxációért, amnesztikus hatásért felelős receptorok. (DOBLE and MARIN, 1992; LAURIJSSENS and GREENBLATT, 1996; MATSUMOTO, 1998; WAAGEPETERSEN et. al., 1999). Az omega receptor antagonistá flumazenil (Anexate) segítségével felfüggeszthető a benzodiazepin-hatás.

A benzodiazepinek jól felszívódnak a gastrointestinalis traktusból, és e tulajdonságuk jelentősen megkönnyítik az alkalmazásukat. A benzodiazepinek anxiolitikus, ill. altató hatásának megjelenése egyszeri adagolás esetén annak a függvénye, hogy milyen gyors az abszorpció. A maximális plazmakoncentrációt és klinikai hatást kb. ½ -2 órán belül érik el. Gyakran észlelhetünk ismételt magas plazmakoncentrációt 6-10 óra múlva, az enterohepatikus recirkuláció miatt. Zsírdékony vegyületek, ez magyarázza gyorsan kifejlődő hatásukat, valamint azt, hogy a vér-agy gáton és a placentán könnyen átjutnak.

2.1.2.3 Mellékhatások és metabolizmus

Biotranszformáció (oxidáció és redukció) segítségével metabolizálódik. A szervezetben 85-98%-ban fehérjékhez kötődnek. Nagy részben a májban metabolizálódnak, igen sok aktív metabolitjuk ismert, és általában az oxazepam a végső termék. Alkalmazásukkor figyelembe kell venni, hogy felezési idejük nagyon különböző és ez a sok aktív metabolit miatt igen elhúzódó (akár 200 óra) is lehet. Kiürülésük 70-90%-ban a vizelettel és kismértékben az epe útján történik (KLEIN, 1980; KAPLAN and SADOCK, 1998).

A benzodiazepinek gyakori mellékhatásai közé tartoznak: bágyadtság, álmoság, ataxia, memória- és figyelemzavarok, a tanulási képesség csökkenése, ritkán agresszivitás és euphoria, időskorban zavartság. Gátolják a normális reakciókat kellemetlen és veszélyes helyzetekben. Ritka mellékhatás az ún. paradox benzodiazepin reakció, amelyet fokozott aktivitás, izgatottság, nyugtalanság, esetenként dühreakciók jellemeznek.

A benzodiazepinek toxicitása csekély, önmagukban igen nagy adagban sem, vagy csak igen ritkán okoznak halált. Más pszichotróp szerrel (igen gyakran alkohollal) együtt azonban már nem biztonságosak.

2.1.3 Sedatohipnoticum

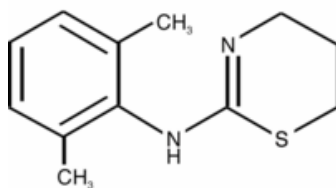
Sedatohipnoticumoknak nevezzük azokat a vegyületeket, amelyek kis adagban nyugtató (sedativ), nagy adagban altató (hipnoticus), igen nagy dózisban pedig narcoticus hatást fejtenek ki.

Sedativ hatáson a központi idegrendszer ingerlékenységét, az idegfeszültséget, a psychomotoros nyugtalanságot csökkentő hatást értjük, a fizikai és a szellemi teljesítőképesség épen hagyása mellett.

Hipnoticus hatású az a vegyület, amely a fiziológiás alvás folyamatának bekövetkezését segíti elő, az alvást mélyíti, esetleg elnyújtja, ugyanakkor altató dózisban a felébredés után nem okoz tartós központi idegrendszeri depressziót.

Az általam is vizsgált *Xylazin* kizárólag az állatgyógyászat területén elterjedt sedatohipnoticum.

2.1.3.1 Kémiai szerkezet és hatékonyság összefüggése



N-(2,6-dimethylphenyl)-5,6-dihydro-4H-1,3-thiazin-2-amine (FAO , 1997)

Clonidin analóg vegyület. A pre- és posztzinaptikus receptorokon α_2 -adrenerg agonista hatást fejt ki a központi és a perifériás idegrendszerben (GROSS, 2001; ALTHAUS, 2006).

Alkalmazzák szedációra, más készítményekkel (CP-Ketamin inj. A.U.V.) anaesthesiára, analgesiára és izomrelaxációra. Különböző fajok közötti összehasonlító

farmakokinetikájának vizsgálata Garcia nevéhez fűződik (GARCIA-VILLAR et al., 1981).

2.1.3.2 Mellékhatások és metabolizmus

Vérnyomás csökkenése a kezdeti vérnyomás emelkedés után, bradycardia, szívritmuszavar, hányás, hőmérséklet regulációs zavar, paradox izgalmi jelenségek, hiperglycaemia, polyuria, reverzibilis helyi szövetirritáció (RECTOR, 1996). Az LD₅₀ értéke patkányon 130 mg/kg (O'Neil, 2001). A CP-*Xylazin* élelmiszertermelő állaton nem alkalmazható. Más *Xylazin* tartalmú készítmények élelmezés egészségügyi várakozási ideje ehető szövetek és tej esetében 3 – 7 nap között változik.

A *Xylazin* tiazin gyűrűjének radioaktív jelölésével (³⁵S és ¹⁴C) vizsgálták a patkány vizelet és epe összetételét. A papír elektroforézis és kromatográfia segítségével kb. 20 anyagcsere terméket különítettek el, de nem azonosították azokat (DUHM et al., 1969). A jelzett összetevők mindössze 8% -a nyerhető ki a vizeletből. A leggyakrabban előforduló anyag az összes radioaktivitás 35%-át mutatta.

(PUTTER and SAGNER, 1973) kimutatta hogy a szarvasmarha vizeletében a radioaktívan jelölt összetevők közül kevesebb mint 1%-a azonosítható mint *Xylazine*-hidroklorid. Így a *Xylazine* a szarvasmarhákban csak keresztülhalad a clearance során. A fő anyagcsere összetevő a marhavizeletben szabad és konjugált formában is kiválasztódik, melyet 1-amino-2,6-dimetilbenzén –ként vagyis 2,6 xylidine –ként azonosítottak.

A *Xylazine* metabolizmusának tanulmányozására az LC/MS/MS és GC/MS technikákat lovakon in vivo és patkány májon in vitro alkalmazták (MUTLIB et al, 1992) A fő metabolitokat azonosították mint:

2-(4'-hydroxy-2',6'-di-methylphenylamino)-5,6-dihydro-4H-1,3-thiazine

2-(3'-hydroxy-2',6'-dimethylphenylamino)-5,6-dihydro-4H-1,3-thiazine

N-(2,6-dimethylphenyl)thiourea

2-(2',6'-dimethylphenylamino)-4-oxo-5,6-dihydro-1,3-thiazine.

Nincs adat más fajok *Xylazine* kiválasztásáról a lovakat és a patkányokat kivéve.

2.2 Xenobiotikumok GSH konjugációja

Környezetünk kemizálásával a mezőgazdaságban használt peszticidek, herbicidek, inszekticidek, az ipari hulladék anyagok mennyiségének növekedésével egyre több toxikus anyag jut a levegőbe, a talajba onnan pedig a növényi és állati szervezetekbe. E toxikus anyagok a tápláléklánc csúcsán elhelyezkedő emberben is megjelenhetnek

felhalmozódhatnak. Másrészt a gyógyszeres terápia fejlődésével, a gyógyszerek hozzáférhetőségének és használatának növekedésével rendkívül változatos kémiai szerkezetű és típusú vegyületek, azaz testidegen anyagok juthatnak be az állati és humán szervezetbe. A testidegen anyagokat más néven xenobiotikumoknak nevezik. Mivel ezek az anyagok nem alkotóelemei a sejteket felépítő molekuláknak, ezért a sejtek, szervek, az egész szervezet igyekszik megszabadulni azoktól, függetlenül attól, hogy azok toxikusak vagy nem. Ezért az élőlényekben specifikus elimináló, detoxifikáló és transzportáló mechanizmusok jelentek meg, alakultak ki a filogenezis során.

2.2.1 Specifikus védekező mechanizmusok

A sejt normális működése során energiát használ fel. A kémiai energiát a szubsztrátok elégetésével nyeri, oxigén jelenlétében és enzimek segítségével, az oxidatív foszforiláció energia átalakító folyamatában. Az ATP szintézis mellett még normális körülmények között is előfordul az, hogy az enzimek által katalizált oxidatív folyamatokban melléktermékként szabadgyökök képződnek. A szabadgyökök, a sejtek számára veszélyes kémiai reakciókat generálhatnak, megváltoztatva ezzel a fehérjék, lipidek funkcióját, vagyis a sejtek életfunkcióját. Normál körülmények között az átmeneti fémionok csak nyomokban találhatók szabad állapotban a sejtekben. Azonban ha azok sejten belüli koncentrációja megnő akkor igen nagy eséllyel szabadgyök képződést váltanak ki. A xenobiotikumok közvetlenül, de gyakran közvetett úton éppen pl. a Fe sejten belüli koncentrációjának növekedését előidézve okoznak szabadgyök képződést. Az arzén, kadmium, ólom, stb. nehézfémek, gyakran más mechanizmusok elsősorban az un. antioxidáns vegyületek koncentrációjának csökkentése révén váltják ki a toxikus hatásokat. A károsító tényezők eltávolítására defenzív mechanizmusok alakultak ki. Alapvetően két védekező mechanizmus segítségével történik a hatástalanítás. A szabadgyökök befogását a sejt citoplazmájában, sejtorganellumaiban, a membránokban jelen lévő redukáló ágensek: az E-vitamin, C -vitamin, karotinoidok, és a redukált glutation végzik. Ezek a kémiai reakciók spontán nem-enzimatis úton játszódnak le. A másik útvonalon az enzimatis reakciókban valósul meg a szabad gyökök átalakítása: superoxide dismutase (SOD; szuperoxid \rightarrow hidrogén peroxid), kataláz (hidrogén peroxid \rightarrow víz), glutation peroxidáz (hidrogén peroxid \rightarrow víz), glutation reduktáz.

A gázhalmazállapotú vegyületek többnyire a tüdőn keresztül választódnak ki. A vegyületeknek egy része közvetlenül kiválasztódhat a vesén keresztül a vizeletbe vagy a májból az epével a gasztrointesztinális traktusba, onnan pedig a székletben ürülhetnek ki. A kiválasztás másik módja az, hogy a vegyületeket kémiai úton alakítja át a sejt

„biotranszformálja”. Azok az anyagok amelyek nem vízoldékonyak először átalakulnak, elsősorban a májsejtekben (de más szervekben is) található citokróm P-450 enzimek segítségével. Ezt követően (vagy számos esetben a citokrómP-450 enzimek részvétele nélkül) a vegyületek konjugációja játszódik le egy olyan kosubsztráttal (glükuronsavval, vagy glutathionnal, taurinnal, glicinnel) amely fokozza a vegyületek vízoldékonyosságát. Összefoglalóan a citokrómP-450, és a transzferáz enzimek által katalizált konjugációs reakciókat nevezzük biotranszformációnak. Ilyenkor az eredeti vegyület teljesen átalakul, gyakran elveszti kémiai tulajdonságait, biológiai hatását, de előfordul olyan is, hogy éppen az átalakítás következtében válik toxikussá. A konjugációs kémiai reakciónak előfeltétele, hogy a vegyület tartalmazzon olyan reaktív kémiai pl. nukleofil csoportot amelyen keresztül reagálhat a kosubsztráttal, ilyenek pl. $-NH_2$, $-OH$, $-COOH$, stb. Gyakran ilyen csoportokat a citokróm P-450 enzimek alakítanak ki a molekulákon, az anyavegyületeken. Előfordul pl. az $-OH$ csoportok szulfonálása, vagy más csoportok glükuronidációja vagy az elektrofil vegyületek (pl. halogén szubsztituált aromás vegyületek, kinonok, epoxinok, stb.) esetében a glutationnal való konjugáció. A fenti reakciókat az UDP-glükoronoziltranszferázok, szulfotranszferázok és a glutation-S-transzferázok katalizálják.

2.2.2 GST katalizált glutation konjugáció

A glutation-S-transzferáz (GST) enzim a redukált glutation nukleofil tiolcsoportjának és más elektrofil vegyületnek a konjugációját katalizálja. A GST-t először patkány májban találták meg, olyan enzimként amely az 1,2-diklor-4-nitrobenzén és a bromoszulfoftalein konjugációját katalizálja (BOOTH et al., 1961; COMBES and STAKELUM, 1961).

GST enzimnek számos izoenzimét fedezték fel és tisztították. Kezdetben az enzim nomenklatúráját annak megfelelően választották, hogy milyen szubsztrátot konjugál a glutationnal. Később a fehérje kémiai tulajdonsága alapján nevezték őket, majd 1992-ben megalkották a konszenzus nomenklatúrát. A nevet annak megfelelően adják, hogy az enzim hol található a sejten belül. Öt citoplazmatikus és egy mitokondriális GST-t identifikáltak, amelyek aminosav szekvenciája kevesebb mint 50 %-ban tér el egymástól.

A mikroszóma frakció szintén tartalmaz különböző GST izoenzimeket mikroszómális GST-I. (MGST-I), GST-II (MGST-II), stb. A leukotriének bioszintéziséért is ilyen enzim felelős a leukotrien 4-C szintáz (LTC4). Ezeknek az enzimeknek a fehérje szerkezete nem hasonlít a citoplazmatikus enzimekéhez. Fontos különbség továbbá az, hogy ezek hidrofób transzmembrán régióval is rendelkeznek. Főleg az endoplazmás

retikulumban, plazmamebránban és a mitokondrium külső membránjában helyezkednek el. A citoplazmatikus GST_A főleg a májban, a vese proximális tubulusaiban, a gyomor-béltraktus epithel sejtjeiben, míg a GST_M az izomban és májban, a GST_P izoenzim pedig a vesében és a vékonybél epithel sejtjeiben található.

A glutation része a nem specifikus detoxifikáló rendszernek (számos abiogén vegyület kapcsolódhat hozzá) és nagy jelentősége van az antioxidánsok elleni védekezésben is. Több közleményben beszámoltak arról is, hogy az antioxidáns rendszer enzimeinek aktivitása bizonyos fokú korrelációt mutat a termelési tulajdonságokkal a különböző gazdasági állatfajokban (JORGENSEN and WEGGER, 1979, BUNK et al., 1981).

A glutation (GSH) három aminosavból felépülő tripeptid (γ -L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine). A szerkezete „rendellenes” ugyanis a glutaminsav nem az α - hanem a γ - karboxilcsoportjával kapcsolódik a ciszteinhez (BOROSS, 1993). Redoxi tulajdonságai miatt nagy az élettani jelentősége, így viszonylag nagy mennyiségben (kb. 5 mmol/dm³) van jelen intracellulárisan.

A glutation-S-transzferáz (GST) enzim a xenobiotikumok GSH -val való összekapcsolódását un. konjugátum képzését katalizálja. A GSH konjugátum képződés többnyire detoxifikálja a potenciálisan cyto- és genotoxikus ágenseket. Összefoglaló munkák [overviews]: (KETTERER et al., 1988; MANNERVIK and DANIELSON, 1988).

A GST a filogenézis korai szakaszán megjelenik. Az állati szervezeten kívül megtalálható baktériumokban, gombákban és növényekben egyaránt (FREAR and SWANSON, 1970; LAMOUREUX and FREAR, 1979; JAKOBY and HABIG, 1980; KETTERER et al., 1988; PICCOLOMINI et al., 1989). Kétszeres GST aktivitású transzgénikus növények (dohány) a herbicidek és az oxidatív stressz iránt nagyobb ellenállóságot mutattak (ALLEN et al., 1997). De kimutatták a GST indukció fokozódását xenobiotikumok és patogén ágensek hatására is búzában (MAUCH and DUDLER, 1993).

Hasonlóan az aszkorbáthoz a glutation is képes enzimek közreműködése nélküli, közvetlen reakciókra is, így hatékony gyökbefogó lehet (GUTTERIDGE and HALLIWELL, 1994). A glutation szint megemelkedése patkány agyban megvédi a proteineket az oxidációtól, amit a hidroxil szabadgyökök okoznak (POCERNICH et al., 2000).

A glutation szulfhidril kelátot képez a nehézfémekkel, így többek között a higannyal és az ólommal is. Miután kialakult a komplex, a szervezet főként az epén át

távolítja azt el, csökkentve ezáltal a rendelkezésre álló glutation mennyiségét. De szerepet játszik az arzén eliminálásában is arzén-triglutationt képezve (CSANAKY és mtsai, 2003). A GST izoenzimek számos xenobiotikum és elektrofil centrumot tartalmazó metabolit GSH-val történő reakcióját katalizálják (HABIG et al., 1974; MOZERT et al., 1983; MANNERVIK and DANIELSON, 1988; TOUNG et al., 1990; WILCE and PARKER, 1994; TAMAKI et al., 1999).

A glutation-S-transzferáz izoenzim családot, szuperfamíliát képez (SALINAS and WONG, 1999 – a review). Vizsgálták a GST subunitok különböző indukcióját spironolakton hatására, például patkány májban, az éhbélben és a vastagbélben (LUQUITA et al., 1998). Eltérő, emelkedett GST aktivitást és izoenzim összetételt írtak le a különböző humán emlőrák sejtvonalakon is (SHEA et al., 1990).

Kimutatták, hogy a GST aktivitása eltérést mutat a nem, a fajta és az életkor szerint egér májában (EGAAS et al., 1995 „a”; 1995 „b”). De in vitro összehasonlító vizsgálat is készült egy növény, három halfaj, két rovar és két emlős GST aktivitásáról négy szubsztráttal (EGAAS et al., 1995 „c”). Itt nem csak a CDNB hanem az ethacryn sav, az atrazin és az 1,2-dichloro-4-nitrobenzén másodlagos szubsztátókkal is prezentálták az aktivitást.

Kevés közlemény számol be azonban a pszichofarmakonok által kiváltott GST indukcióról. Vizsgálták a phenobarbitál hatását a GST aktivitás és gén expresszió fokozódására (PINKUS et al., 1993). Kimutatták, hogy a *Haloperidolum* csökkentette az intracelluláris GSH koncentrációt a patkány agy egyes területein (cerebellum, striatum, cortex) valamint a májban (VAIRETTI et al. 1999). A peszticidek hatására is leírtak GST aktivitás fokozódását foltos fésűsbagoly lepkén (EGAAS, 2000). Trankvillánsok hatását a GST indukcióra patkány, nyúl és hal szerveiben nem sikerült fellelnem a szakirodalomban.

Munkám során feltételeztem, hogy a trankvilláns gyógyszerek a glutation-S konjugáció útján a GST segítségével is inaktíválódhatnak.

2.3 *Formatio reticularis, RAS*

A trankvilláns hatású vegyületek támadáspontja elsősorban az agytörzs felszálló reticuláris rendszereiben van.

A *formatio reticularis*, az agy filogenetikailag ősi hálózatos belső tengelye a nyúltvelő és a középagy középső- ventrális részét foglalja el. Kis neuronok miriádjai alkotják, amelyek bonyolult, összefonódó hálózatokba rendeződnek. Vérnyomást, légzést,

szívfrekvenciát és más vegetatív funkciókat szabályozó központok található benne. Továbbá olyan felszálló és leszálló összetevőket is tartalmaz, amelyek fontos szerepét játszanak a belső elválasztás beállításában, a szenzoros bemenet és a tudatosulás szabályozásában. (GANONG, 1994)

A retikuláris aktiváló rendszer (RAS = Reticular Activating System) bonyolult poliszinaptikus pálya amely a formatio reticularis felső szakaszán helyezkedik el. Nemcsak a hosszú, felszálló érző pályákból futnak bele kollaterálisok, hanem a trigeminális, a halló-, a látó- és a szaglőrendszerből is. A neuronhálózat bonyolultsága, és a benne érvényesülő nagyfokú konvergencia megszünteti a modalitáspecifitást, vagyis a különféle szenzoros ingerekkel a legtöbb retikuláris neuron egyformán könnyen aktiválható. A rendszer ezért nem-specifikus, ellentétben a klasszikus érző pályákkal, amelyek specifikusak abban, hogy bennük a rostok csak egyféle típusú szenzoros ingerrel aktiválhatók. A RAS egy része elkerüli a thalamust, és diffúzan vetül az agykéregbe. A RAS egy másik része az intralamináris, ill. a velük összefüggő thalamus magvakban végződik, és ezekből vetül diffúzan és nem-specifikusan az egész neocortexbe (STARZL, 1951). A RAS működésének szoros köze van az agykéreg elektromos aktivitásához.

A tudatos gondolkodáshoz megfelelő, aktív éberségi szintre van szükség. Ébrenlét, aktív agykérgi tevékenység során az egyes sejtek, sejtcsoportok különálló, egyedi **deszinkronizált** működést végeznek. Erre a nagy frekvenciájú, kis amplitúdójú hullámok (β ritmus) a jellemzők. Az éberségi szint csökkenése (elalvás, alvás) során egyre nagyobb kérgi területek működése hangolódik össze (**szinkronizálódik**), vagyis egyre lassúbb, alacsonyabb frekvenciájú, és nagyobb amplitúdójú hullámok keletkeznek.

Az ébredés, az éberség fokozódása (araisal) az EEG deszinkronizációjával és jól körülírható magatartásváltozásokkal, az ún. tájékozódási reakcióval (izomtónus fokozódás, inger felé fordulás, tájékozódó mozgások) jár. Az araisal döntő mértékben az agytörzsi formatio reticularis felszálló aktiváló rendszerétől (ARAS = aszcendáló retikuláris aktiváló szisztéma) függ.

2.3.1 EEG deszinkronizáció

Amennyiben a középagy szintje alatt ingereljük a specifikus érző rendszereket, akkor deszinkronizációt válthatunk ki az agykéregben, vagyis a ritmusos EEG-mintázat helyett egy szabálytalan, kifestültségű aktivitás tapasztalható. A középagy feletti ingerlés, a thalamus specifikus érző relay-magvainak ingerlése vagy maguknak az agykérgi reprezentációs területeknek az ingerlése azonban nem hoz létre deszinkronizációt. Ugyanakkor a középagygi tegmentalis formatio reticularis vagy a

thalamusban a nem-specifikus projekciós magok viszonylag nagy frekvenciájú ingerlése deszinkronizálja az EEG-t és felébreszti az alvó állatot. A középagy oldalsó-felső részeinek nagy kiterjedésű sérítése, amely megszakítja a lemniscus medialis és a többi felszálló specifikus érző rendszert, nem akadályozza meg a szenzoros ingerekkel kiváltható deszinkronizációt. A középagy tegmentum azon sérülései azonban, amelyek —anélkül, hogy a specifikus érző rendszereket sértenék— megszakítják a RAS-t, szenzoros ingerléssel nem befolyásolható szinkronizált EEG-mintázattal járnak együtt (LINDSLEY et al., 1950). Az előbbi típusú sérülés esetén az állatok éber állapotban vannak; az utóbbi típusú esetén tartósan comatosusak. Ezért úgy tűnik, hogy a szenzoros ingerlést követő deszinkronizációért felelős felszálló aktivitás a specifikus érző rendszeren át a középagyba jut, kollaterálisok útján belép a RAS-ba, és a thalamuson, ill. a nem-specifikus thalamicus projekciós rendszeren át az agykéregig terjed. Ugyanakkor az érző bemenet nem feltétlenül szükséges a deszinkronizációhoz. Azokban az állatokban, amelyekben az agytörzset a trigeminus bemenet felett, de a híd dorzális határától kaudálisan átmetszették, a szagló- és a látóidegek átvágása nem akadályozza meg a deszinkronizációt. Lehetséges tehát, hogy a formatio reticularisnak a deszinkronizáció kiváltására és esetleg az éber állapot fenntartására szolgáló intrinsic képessége is van.

Az ébredés és az EEG deszinkronizáció, noha általában együtt fordulnak elő, nem mindig járnak együtt. Fájdalomkeltő erős perifériás ingerlés középagy tegmentum sérüléssel állatokban deszinkronizáció nélkül okozhat ébredést, hátsó hypothalamus sérüléssel állatokban pedig deszinkronizációt ébredés nélkül.

2.3.2 Szinkronizáló mechanizmusok

Az alfa-ritmus hullámmintázata arra utal, hogy sok axon ingerületi aktivitása szinkronizált. Ehhez a szinkronizációhoz két tényező járul hozzá: a szomszédos párhuzamos rostok aktivitásának minden egyes egységére gyakorolt szinkronizáló hatása és a thalamusból eredő ritmikus kisülések. Két egymás mellett elhelyezkedő idegrost ugyanis befolyásolja egymás ingerlékenységét. Az egyik depolarizációja a töltéshordozó ionok megváltozó koncentrációja miatt hiperpolarizálja a másik idegrostot. Azoknak a helyeknek a tőszomszédságában, ahol gátló végződések működnek, az ellentétes irányban folyó áram a rostokban pozitív töltésű területeket hoz létre. Hasonlóan orientált idegi nyúlványok nagy sokasága esetén az ilyen áramforrások keletkezése a szomszédos rostokban elősegíti az áramfluktuáció szinkronizálását (GANONG, 1994).

Az elalvás és az alvás aktív folyamat: nem egyszerűen a deszinkronizáló ingerek hiányának, hanem aktív szinkronizáló ingerek jelenlétének következménye.

A szinkronizálást nagyrészt a thalamusból származó nem specifikus afferensek biztosítják. A szinkronizáció a thalamuson belüli neuronkörökre vezethető vissza, ezt rekurrens kollaterális gátlásnak nevezzük. A thalamus nem specifikus magvaihoz befutó impulzusok hatására aktiválódott neuronok serkentő ingereket küldenek az agykéreg felé. A cortex felé haladó impulzus azonban visszakanyarodó kollaterálisokon keresztül gátló interneuronokat aktivál, amelyek hiperpolarizálják (gátolják) a kiindulásul szolgáló thalamikus neuront. A szinkronizáció folyamatában a thalamuson kívül a nyúltvelői szinkronizációs zóna sejtjei is hozzájárulnak az ARAS aktiváló rendszerének gátlásán keresztül.

2.3.3 RAS - ingerlés

EEG-szinkronizáció és lassú hullámú alvás több subcorticalis terület ingerlésével is előidézhető. Így a nyúltvelői szinkronizáló zóna ingerlésével, a nyúltvelői formatio reticularisban a nucleus tractus solitari szintjén. Ennek a zónának az ingerlése, a köztiagyi alvási zóna ingerléséhez hasonlóan, szinkronizációt és alvást hoz létre, ha az ingerlési frekvencia alacsony, és ébresztést, ha a frekvencia magasabb ($\approx 8/s$). A szinkronizáció kialakulásának mechanizmusa nem ismeretes, de feltehetően olyan pályákat foglal magába, amelyek a thalamusba szállnak fel.

Nem ismeretes, hogy a RAS-ban felszálló impulzusok miképpen szakítják meg az agykérgi szinkronizált aktivitást, illetve miképpen hoznak létre ébredést. A RAS ingerlése gátolja a sorozat kisüléssel (burst) aktivitást, az ún. felerősödő (recruiting) választ és az agy bizonyos területein alkalmazott sztrichnin okozta agykérgi hullámokat. Mivel a RAS ébreszti és éber állapotban tartja az állatot, feltételezhető, hogy a RAS-aktivitás inkább növeli, mintsem csökkenti az agykérgi neuronok ingerlékenységét. Valójában azonban alvás idején az agykérgi érző projekciós területek bizonyos neuronjai véletlenszerűen tüzelnek, ébrenlét idején viszont csak specifikus ingerekre válaszolva sülnek ki. Lehetséges, hogy a RAS aktivitása bizonyos fokú agykérgi gátlást okozva megszünteti ezt a véletlenszerű tüzelést, vagyis szabaddá teszi ezeket a neuronokat arra, hogy csak a specifikus szenzoros ingerekre válaszoljanak. A RAS-aktivitás tiszta hatása ezért a „jel/zaj viszony” (SNR = signal-to-noise ratio), növelése lehet, az abszolút ingerlékenység valamelyes csökkenése árán.

Az agykéreg bizonyos részeinek elektromos ingerlése fokozott retikuláris aktivitást és EEG-ébredést (EEG-arousal) okoz. Majomban a leghatásosabb kérgi területek a gyrus temporalis superior és a homloklebeny orbitalis felszíne. Ezeknek a területeknek az ingerlése az alvó állatot felébreszti, azonban nem vált ki mozgást, éber

állatban viszont csak kevés a látható hatása. Más agykérgi területek ingerlése még erős árammal sem hoz létre elektromos vagy magatartási ébresztést. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy corticofugalis rostok rendszere köti össze az agykérget a formatio reticularisszal, olyan pályát alkotva, amelyen keresztül az agykéregben lejátszódó események ébresztést indíthatnak el. Ez a rendszer lehet felelős az emocionális és más pszichés jelenségekre bármiféle látható külső inger híján bekövetkező készenléti válaszokért (alerting responses).

2.3.4 Trankvillánsok hatása a RAS-ra

A narkózis vagy a hipnózis nélküli szedáció mechanizmusa ma is kevésbé ismert terület. Kérdés, hogy miképpen hozhatja létre ezt az állapotot olyan sokféle, egy mástól teljesen eltérő szerkezetű farmakon.

Narkózis során az agyban nagyon sok neuron hiperpolarizálódik. A szinapszisokban a vezetés gátolt. Ez felveti azt a lehetőséget, hogy a narkotikumok a RAS-ban a vezetés depressziója révén okozhatják az öntudatlan állapotot (FENCH and KING, 1955)

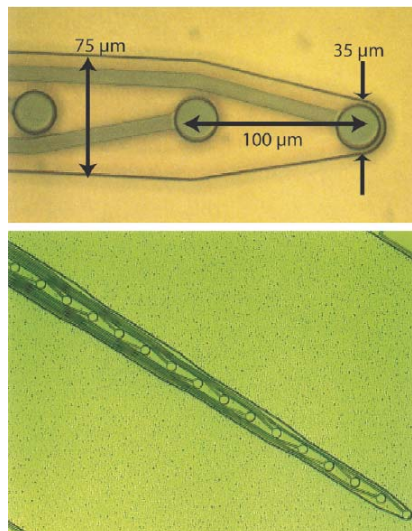
Egy specifikus pályán (mint pl.: egy reflex kör) 2-4 szinapszis található. Ezzel szemben a retikuláris pályákban szinapszisok százai találhatók, un. polyszinaptikus pályarendszert alkotnak. Az ingerület átvitelre ható farmakonok számára így nagyságrendekkel nagyobb támadási felületet nyújtanak. Minden egyes szinapszisban az EPSP-k nek addig kell összegződniük, amíg eléri a posztszinaptikus neuronok tüzelési szintjét. Bármely hatóanyag, amely mérsékelten deprimálni tudja ezt a folyamatot, előbb fogja blokkolni a vezetést a multiszinaptikus, mint a csak néhány szinapszist tartalmazó pályákban.

A trankvillánsok egyik legjellegzetesebb hatása, hogy már kis adagokban meggátolja a külvilági ingerek okozta arousal reakciót (fény, hang stb. inger). Ugyanakkor a formatio reticularis direkt ingerlésével még kiváltható a kéreg aktiválódása. Úgy tűnik, hogy a trankvillánsok megszakítják a kapcsolatot az agytörzsben a külvilággal, az állat indifferensé válik az olyan ingerekre amelyekre normálisan egyébként jól reagálna. A RAS területén, trankvillánsok hatására az idegrostok tüzelésében olyan mintázati változások következnek be, amelyek kihatnak a kéreg aktivitására és hozzájárulhatnak a gyógyszer ismert hatásához.

2.4 Multielektrodás elvezetés, tüzelési mintaelemzés

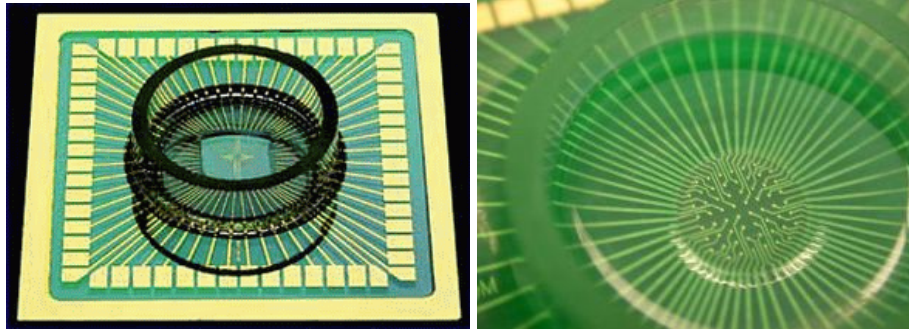
A központi idegrendszer elektromos aktivitásának vizsgálatához nemrég, csak 1997 -óta használnak és publikálnak egyre több egységből felépülő mikroelektroda tömböket (MEA). (BLAU, 1997; GONZÁLEZ and RODRÍGUEZ, 1997; WITTKAMPF et al. 1997; stb.) A multielektrodákból ugyanis nagy mennyiségű információ érkezik, amelynek feldolgozásához először megfelelően nagyteljesítményű informatikai háttérnek kellett kifejlődni. Számos, szinte minden publikációban egyedi kialakítású megoldásokat találhatunk. A célnak megfelelően különböző térbeli elrendezésű, csatornaszámú és anyagú MEA megoldások léteznek. Anyagában tömör króm, alumínium, szilikon, titánium, wolfrám, szilícium, platina (KAREN et al., 2007) vagy tubuláris nanoszerkezetű karbon (KE et al., 2006), illetve számos más anyag fordulhat elő. Újabban CMOS felületű bioszenzorral (FRANKS et al., 2007) is végeznek sikeres kísérleteket.

Jelenleg a leggyakrabban alkalmazott multielektrodák a tű mélységi elektrodák, amelyekkel *in vivo* méréseket lehet végezni különböző mélységű területeken és a sík, felszíni elektrodák amelyekkel *in vitro*, izolált szöveteken végezhető mérések. Többnyire 8 – 64 csatornás megoldásokat alkalmaznak.



1. ábra. 16 elemű mikroelektrodá tömb *in vivo* vizsgálatokhoz.

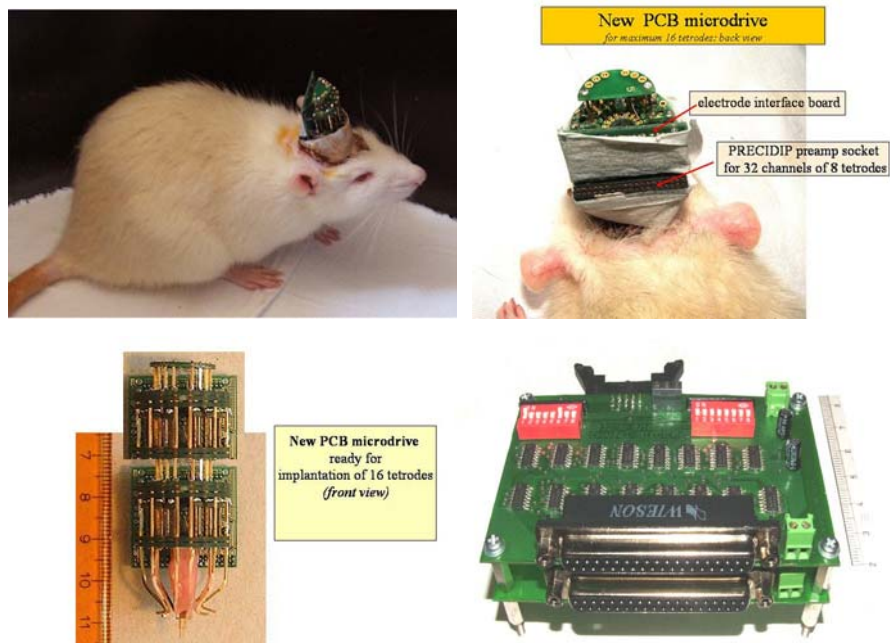
Forrás: (KAREN et al., 2007)



2. ábra. 60 elemű sík MEA izolált szövetmintákhoz
Forrás: (Multi Channel Systems, 2007)

Az adatgyűjtés a korábbi sok csatornás, analóg rögzítő eszközök helyett már digitális úton történik. A nagy sebességű CMOS integrált áramkörökkel megvalósítható, hogy lényegesen kevesebb (akár egyetlen), precízen kiépített erősítő elektronika lásson el sok elektródát. Ilyenkor kapcsoló rendszer (switch) vagy útvonal választó (selector) áramkört építenek be (NOTED, 2006; TÓTH és mtsai, 2007). A jelfeldolgozás legtöbbször hagyományosan, az analóg jelek minél sűrűbb mintavételezésével és nagyfelbontású analóg/digitál (A/D) átalakításával történik. Tehát az analóg jelforma minél pontosabb visszaállítására törekszenek. Újabban azonban megjelentek azok a publikációk amelyekben az akciós potenciál spike-ok digitális (bináris) feldolgozását valósítják meg (PIZZI et al. ,2007).

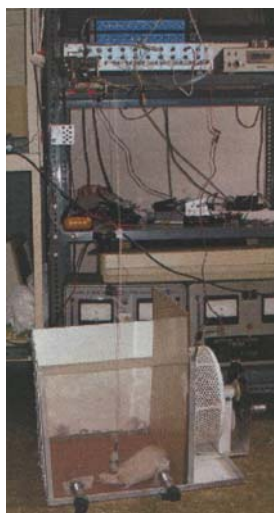
Egyes szerzők a multielektroda tömbbe integrált, alacsony zajú előerősítő megoldásról számolnak be (BLUM et al., 2003). Hazai fejlesztés eredménye a tetródokból felépülő mélyelektroda elvezetés, szelektor és jelfeldolgozó rendszer (NOTED, 2006; TÓTH és mtsai, 2007). Az állat fejére épített „korona” különböző számú tetródból épül fel. Maximálisan 32 tetród így 128 elvezetést is lehetővé tesz. A rendszer előnye, hogy az állat bizonyos mértékű szabad mozgását engedi és így a viselkedését is megfigyelhetővé teszi.



3. ábra. Az állat fejére helyezett „korona” a microdrive és a tetród szelektor.

Forrás: NOTED, 2006; <http://braintelemeter.atw.hu>

A tetród és az erősítő között körülbelül 1-1,5 m (!) távolság van. A szerzők szerint Faraday-háló árnyékolása sem szükséges (!) a tiszta jelfogáshoz. A vezérlést itt is célorientált mikrokontrolleres rendszer (de nem neuronhálózat) végzi és továbbítja az adatokat a PC felé.



4. ábra. Hosszú multielektrodás elvezetés.

A szelektor és az erősítő (fent a polcon) és a tetród (a földön lévő állat fején) között 1 – 1,5 m a távolság.

Forrás: TÓTH és mtsai, 2007

A rendszer hátránya, hogy az elektródok csak erősen korlátozott szögből ültethetők az agyba. A tetródok pedig jelentős szöveti roncsolást és traumát okoznak minél több elemből épülnek fel.

2.5 Mesterséges neuronhálózatok

A mesterséges neuronhálózatok matematikai alapjaival még jelenleg is kiemelten foglalkozik a szakirodalom. A hagyományos számítógépeken futó szoftveres neuronhálózat emulációknak szintén számos alkalmazása és széleskörű irodalma van. A konkrétan megvalósuló neuronhálózat hardverekről azonban csak elvétve találni hivatkozást. Mikrokontrolleres megoldásról pedig ennél is kevesebbet. „Kontroll szenzor” linearizációra fejlesztenek mikrokontroller alapú analóg neuronhálózatot egyes szerzők (DEMPSEY et al., 1997) ez azonban nem neurofiziológiai alkalmazás. Ez minden bizonnyal annak tulajdonítható, hogy a digitális technika robbanásszerű fejlődése mellett, kevés idő telt el az új, nagyteljesítményű eszközök lehetőségeinek teljes körű kihasználásához. Mikrokontroller alapú mesterséges neuronhálózatról, amely multielektroda tömbön keresztül kapcsolódik egy élő idegrendszeri területhez, nem leltem fel publikációt.

2.5.1 Párhuzamos rendszerek

A Neumann elvű (hagyományosnak nevezhető) számítógépek gyakorlatilag elérték a működésük korlátait. Az órajel frekvencia és a sebesség növelése, a címrendszer szélesítése egy ésszerű határ fölött nem járható fejlesztési irányvonal bizonyos biológiai problémák megoldására. Ugyanis nem képesek olyan egyszerűnek tűnő feladatok megoldására, amire primitív élőlények igen. Az élőlények páratlan kép, hang, tapintás, illat felismerési képességeinek reprodukálása a jelenlegi eszközökkel nagy számításigényű, nehéz feladatok, amelyekben az óriásgépek is gyengék, vagy legalábbis aránytalanul nagyméretűek és túl sok elektromos energiát fogyasztanak - az élő szervezetek számára egyszerű feladatok megoldására. Ugyanakkor néhány ezer –a digitális elemekhez képest– lassú idegsejt nagyságrendekkel nagyobb teljesítményre képes, mint számítógép. Ennek oka, hogy a Neumann elvű számítógépek és az élő neuronhálózatok között alapvető architektúrális és funkcionális különbségek vannak. (BALDI and BRUNAK, 2001; ALURU, 2006).

A technikai fejlődés során a többprocesszoros rendszerekkel kezdetben csak a sebesség fokozását tűzték ki célul (általános rendszerek). Később az egyes processzorok önálló task-okat futtattak tehát valódi párhuzamos rendszerek jöttek létre. Ez több szinten valósulhat meg. A hardver egységen belüli párhuzamosítástól a folyamatok közötti párhuzamosításig (SOLV, 1988; PALG, 1988).

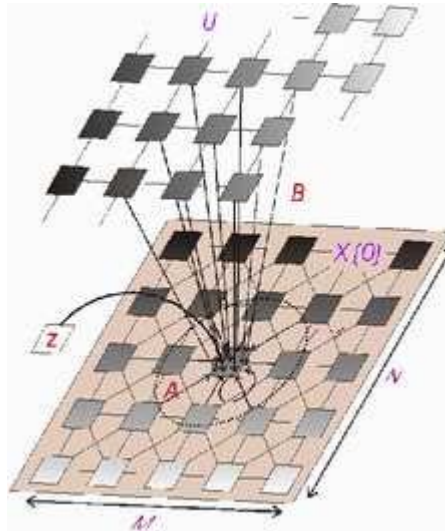
Az általános célú rendszerek kialakításakor a fő szempont az egyprocesszoros számítógépek működési sebességének a fokozása az architektúra módosításával. A redundáns (hibatűrő) rendszerek tervezésekor a fő cél, hogy a több processzor alkalmazásával a számítógépek megbízhatóságát nagymértékben növeljék (KACSUK, 1982). Míg a multiprocesszoros neuronhálózatok a hagyományostól eltérő feladatok megoldására optimalizált rendszerek. A hardver egységen belüli párhuzamosítás szintjén vagy az alatt valósulnak meg, mivel egymástól függetlenül működő processzorokból épülnek fel, processzoronként egyedi adatfolyammal. Forrás: (TÓTH , 2006).

2.5.2 CNN-UM

Teljesen új irányvonal, az elemi processzorok hálózatszerű összekapcsolása az idegrendszerhez hasonlóan. A mesterséges neuronhálózatok a központi idegrendszer idegsejt hálózatának felületes analógiája alapján szervezett struktúrák.

Egy új számítógép-elvet képvisel a világviszonylatban is egyedülálló hazai eredmény, a Roska Tamás akadémikus nevéhez fűződő Analogikai Celluláris Számítógép (CNN-UM: Cellular Neural/Non-linear Network – Universal Machine) (ROSKA és mtsai, 1992, 1993, 1999). A processzor működtetése a hagyományos, rugalmas tárolt-program vezérléssel történik, azonban a műveletek jó része folytonos, analóg jelek térképszerű képein folyik. Ezeket gyakran a fizika végzi el, például az összeadást Kirchoff első (csomóponti) törvénye.

Az Analogikai Vizuális Mikroprocesszor alapja a cellulár-neurális hálózat (CHUA and YANG, 1988) vagy röviden CNN (Cellular Neural/nonlinear Network). Ez egy csatolt, analóg, dinamikus, nem lineáris processzor tömb, amely alapértelmezésben egy NxM-es négyzetrácson elhelyezkedő, lokálisan összekötött cella-rendszert alkot. A négyzetrács minden csúcspontjában egy processzor (cella, dinamikus rendszer) van. Ezen cellák csak egy véges (r-sugarú) lokális környezetben vannak kapcsolatban a környező cellákkal.

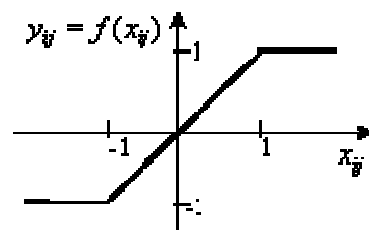


5. ábra. CNN elemi processzorainak elrendezése és kapcsolataik.
 Forrás: <http://lab.analogic.sztaki.hu/magyar/index.html>

A jelenlegi chipeken N és M száz körüli érték (azaz több tízezer cella működik párhuzamosan), r általában egy, azaz egy 3x3-as terület van közvetlenül összekapcsolva. A szomszédságon belül a cellák közötti interakciót általános esetben egy csatolt differenciál-egyenletrendszer írja le.

Az interakciók (csatolások) erősségét mátrixok adják meg: az előrecsatoló (B) és a visszacsatoló (A) mátrix, valamint a (z) érték, amely egy küszöbértéket beállító tényező. Minden cellának két olyan kezdeti jele van, amelyeken a dinamika működik: a bemenet u és a kezdeti állapot $x(0)$. A négyzetrácsban elhelyezkedő cellák viselkedését összességükben tehát a két kezdeti jelérték és a csatolási mátrixok (A, B, z) határozzák meg. Ezeket a csatolási mátrixokat template-nek nevezzük (ROSKA, 1993). A cellák x állapotából y kimenetük egy nem-lineáris függvény kiszámításával adódik.

$$C \dot{x}_{ij} = -\frac{1}{R} x_{ij} + \sum_{|k-1| \leq r, |l-1| \leq r} A_{ijkl} y_{kl} + \sum_{|k-1| \leq r, |l-1| \leq r} B_{ijkl} u_{kl} + z$$



Ezáltal a rendszer az élő központi idegrendszerhez hasonló felépítésű hálózatot alkot. Kézenfekvő a CNN és a képfeldolgozás kapcsolata. Feleltessük meg minden cellának a kép egy képelemét, pixelét, ekkor a cellák bemenetei, állapotai és kimenetei (u, x, y) egy-egy képet kódolnak. Jelentse +1 a fekete és -1 a fehér értékét, a köztes értékek

pedig a szürke árnyalatokat. A két független kezdeti kép a bemenet illetve a kezdeti értékek által kódolt képek, a kimenet pedig az eredmény-kép. Természetesen a rendszer térben diszkrét (digitális).

A CNN hagyományos működésekor a számítás végére kialakuló kimeneti képet tekintjük az adott processzálas eredményének. Az idő előrehaladtával a dinamikus rendszer általában egy stabil állapotba jut. A retinamodellzés (WERBLIN, 1995) esetén a CNN számítás folyamata (a cellák időbeli viselkedése) az értékes információ. Ezt az elemzési módot nevezzük téridőbeli működésnek. A hálózat tervezése, beállítása nyilván bonyolultabb a hagyományos csak térprocesszálo esethez képest. Számos konkrét megvalósítás mellett az élettudomány területén is születtek további alkalmazások, mint például a szív működés – keringés vizsgálata (REKECZKY, 1996).

A Magyar Tudományos Akadémia Számítástechnikai és Automatizálási Kutató Intézetében, az MTA SZTAKI-ban működő Analogikai és Neurális Számítógépek Kutatólaboratórium dolgozik e kutatási területen. A Laboratórium mellett működik a Neuromorf Információs Technológia (NIT) nevű Posztgraduális Központ, amelyet négy egyetem és két akadémiai intézeti kutatócsoport hozott létre (BME , JPTE , PPKE , VE , SzTAKI , SOTE).

Saját fejlesztésű neuronhálózatom (ADNC, Analog Digital Neural Computer) hasonló vonásokat mutat a CNN-UM -hez, azonban itt az elemi processzorokat mikrokontrollerek helyettesítik. Így az adatfolyam lassabb, de az összetettebb processzorok jóval bonyolultabb műveletek elvégzésére is alkalmasak (GODÓ, 2003, 2004).

3 Anyagok és módszerek

3.1 Trankvilláns kezelések

A GST inuktivitásának 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.

Az egyes fajoknál de fajon belül is eltérő dózis intervallumot határoz meg a szakirodalom. Például humán alkalmazásnál a *Risperidonum* napi maximális dózisa 8 mg (FÜRST, 2006), 10 mg (LAWRENCE et al., 1996), 12 mg (VIZI, 2002) és 16 mg (BORVENDÉG, 2002) szerint. Néhány vegyületről pedig nem áll rendelkezésre az általam vizsgált állatfajokra vonatkozó adat. Pl.: *Tiapridot* vagy a *Thioridazinumot* nem alkalmazzák az állatgyógyászatban, így nincs róla terápiás tapasztalat sem. Ezért egyes helyeken a más fajokra vonatkoztatott és testtömeg kilogramm szerint átszámított dózist határoztam meg. Az ellentmondó közléseknél egyedileg mérlegeltem illetve saját tesztvizsgálatok eredményei alapján határoztam meg a kísérleti dózist az adott fajnál.

Az alábbi táblázatban összefoglaltam, hogy mely vegyületet, mely területen alkalmazznak, milyen néven kerül forgalomba (a magyar gyógyszerkönyvi nyilvántartások szerint) és milyen átlagos dózistartományt határoz meg hozzá a szakirodalom. Forrás: (BORVENDÉG, 2002; PERÉNYI, 2002; TÓTH, 2004).

Típus	Vegyület	Humán dózis (hatóanyag/nap)	Állat dózis (hatóanyag/ttkg/nap)
típusos neuroleptikum	<i>Chlorpromazinum</i>	<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.
	<i>Acepromazinum</i>	–	<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
	<i>Thioridazinum</i>	<i>Melleril</i> 100-600 mg Maximum: 800 mg	–
	<i>Haloperidolum</i>	<i>Haloperidolum</i> 5 mg Maximum: 60 mg	–
atípusos neuroleptikum	<i>Tiapridum</i>	<i>Tiapridum</i> 200-1200 mg Maximum: 1800 mg	–
	<i>Risperidonum</i>	<i>Risperdal</i> 4-6 mg Maximum: 10 mg	–
anxiolitikum	<i>Diazepam</i>	<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.
Sedatio-hipnotikum	<i>Xylazine</i>	–	<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- <i>Xylazin</i> : élelmiszertermelő állatoknak nem adható. Más <i>Xylazin</i> tartalmú készítményeknél az élelmezés –eü. -i várakozási idő: Hús: 3-7 nap, tej: 3-7 nap

4. Táblázat. A vizsgált vegyületek gyógyszerkönyvi elnevezése, dózisa és az alkalmazási fajok

3.1.1 Laboratóriumi patkány

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

Az in vivo kezelések során hím, SPF (*specifid pathogen free*) Wistar patkányoknak 10 napon keresztül adagoltam, a humán terápiában alkalmazott maximális dózisban (a testtömeg kg-ra átszámítva) intraperitoneálisan a következő gyógyszereket:

Kezelés	Dózis / nap
Kontroll	-
<i>Risperidonum</i>	0,025 mg
<i>Tiapridum</i>	2,5 mg
<i>Thioridazinum hydrochloricum</i>	1,875 mg
<i>Chlorpromazinum hydrochloricum</i>	0,5 mg
<i>Haloperidolum</i>	0,25 mg

5. Táblázat. Laboratóriumi patkány kezelési dózisa

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.

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

Vegyület	Humán célzott mg	Humán mg /ttkg	Házi nyúl mg/ttkg/nap
<i>Tiapridum</i>	1800	26,47	26,47
<i>Risperidonum</i>	6	0,09	0,08823
<i>Haloperidolum</i>	60	0,88	0,88
<i>Chlorpromazinum</i>	600	8,82	8,8
Kontroll	-	-	-
<i>Thioridazinum</i>	800	11,76	11
<i>Diazepam</i>	40	0,59	0,5
<i>Xylazine</i>	-	-	4
<i>Acepromazinum</i>	-	-	2

6. Táblázat. Házinyúl kezelésénél alkalmazott, korrigált dózisek.

A második oszlop a humán napi dózis egy maximalizált értéke. A harmadik oszlopban a testtömeg kilogrammra leosztott érték látható. A negyedik oszlopban pedig a

ténylegesen beadott mennyiség testtömeg kilogrammonként, korrigálva a gyógyszerek kiszerezéséhez, adagolhatóságához.

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 (GONDA, 1977). A gyógyszereket azonos napszakban, napi egy alkalommal i.p. kapták meg. A kontroll azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot kapott.

3.1.3 Ezüstkárász

A hal esetében nem i.p. oltásokkal juttattam be a gyógyszereket, hanem a kísérleti akvárium vizében oldottam fel. A légzés során ugyanis a kopoltyún keresztül az állat felveszi az oldott vegyületeket. Továbbá gyakorlati szempontból –ha alkalmazásra kerül a szer például a csapkodási veszteség vagy az oxigénigény csökkentése érdekében a szállítás során– célszerűbb a hatást eleve a vízben oldott szer esetében vizsgálni, ahogyan az felhasználásra is kerülne.

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). Újabban sikeres próbálkozások vannak természetes szegfűszeg olajjal is (D.E. ATC).

A vízben oldott gyógyszer esetében több szempontot kell figyelembe venni. A víz mennyiségén kívül az állat tömegét, a víz hőmérsékletét, oxigén ellátottságát is. A vízből 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 nem letálisnak.

Vegyület	Dózis mg/nap/liter
<i>Tiapridum</i>	0,5294
<i>Risperidonum</i>	0,0018
<i>Haloperidolum</i>	0,0176
<i>Chlorpromazinum</i>	0,176
Kontroll	-
<i>Thioridazinum</i>	0,22
<i>Diazepam</i>	0,01
<i>Xylazine</i>	0,08
<i>Acepromazinum</i>	0,04

7. Táblázat. Ezüstkárász kezelésénél alkalmazott dózisek.

Minden csoportban 5 egyedem kezeltem 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.

3.2 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 gondoskodik 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 enzimkintetikai meghatározásig.

3.3 Fehérjetartalom meghatározása

A GST enzimaktivitásának korrekt összehasonlításához figyelembe kell venni az egyes minták fehérjetartalmát. Ehhez megfelelően érzékeny módszert nyújtott a Lowry – féle fehérje meghatározás (LOWRY, 1951; STOSCHECK, 1990).

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. Az egyenes egyenlete $y = mx + b$. Ha ismerjük az m és a b értéket, akkor az egyenes tetszőleges pontjának koordinátái kiszámíthatók az ismert x vagy y érték

behelyettesítésével. Ha csak egyetlen független x -változóval (extinkció) dolgozunk, akkor az m és a b érték kiszámítása a következő egyenletek segítségével történik:

$$m = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum (x^2)) - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{(\sum y)(\sum (x^2)) - (\sum x)(\sum xy)}{n(\sum (x^2)) - (\sum x)^2}$$

A függvénnyel kiszámolt egyenes pontossága természetesen függ a felhasznált adatok szórásának nagyságától. A függő és a független változók kapcsolata minél inkább közelít a lineárishoz, annál pontosabb a modell. Így az egyes standardok mérését 3 alkalommal ismételt meg és az átlagértéket használtam fel a kalibrációhoz.

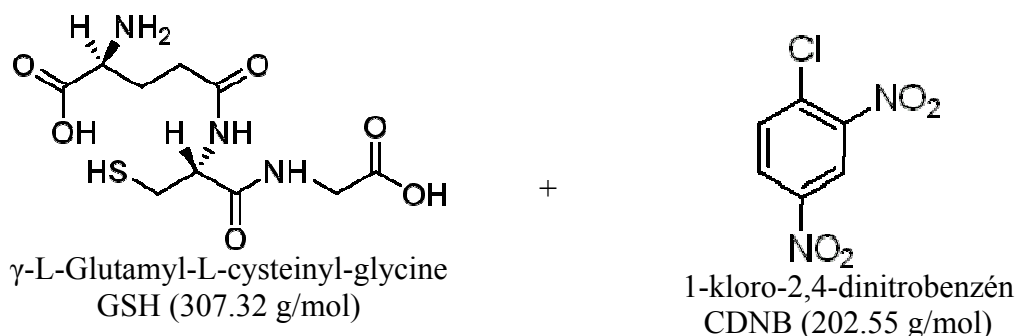
A munka során minden egyes mintának külön-külön meg kellett határozni a fehérjetartalmát és a mért Δ abszorbancia alapján kiszámítani a GST aktivitást Unit-ban.

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 kvantitatív meghatározások száma:					5 805

8. Táblázat. Fehérje kvantitatív meghatározások száma

3.4 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 korrigáltam és számoltam át $\mu\text{mol} / \text{kg}$ fehérje / sec értékre.

Szórással mértem és ábrázoltam a grafikonokon, hogy az értékek a várható értéktől (középtértéktől) milyen mértékben térnek el. Ahol \bar{x} az értékek átlagának középtérteke, 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 mérésel ellenőriztem. GST hozzáadása nélkül az abszorbancia 3 perc alatt sem változott értékelhető mértékben.

3.5 *In vitro* GST szubsztrát vizsgálat

A kompetitív gátlás vizsgálatához molárisan ekvivalens mennyiségű gyógyszerrel próbáltam gátolni a GSH – CDNB komplex képződését. A GST (ló májból nyert, SIGMA) hozzáadása követte. Az enzim teljesítménye katalógus szerint: 1 μmol 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 μl mennyiséget mértem. Az oldódási tényezők figyelembevételével a szubsztrátokból 5 mM –os oldat 50 μl-es mennyiségét használtam. Standard hőmérsékleten, foszfát pufferben (6,5 pH). Az 5 mM-os oldathoz felhasznált hatóanyag mennyiségek:

Vegyület	g/mól	g/5mM / l
<i>Tiapridum</i>	341,427	1,707135
<i>Risperidonum</i>	410,485	2,052425
<i>Haloperidolum</i>	375,864	1,87932
<i>Chlorpromazinum</i>	318,865	1,594325
Controll	-	-
<i>Thioridazinum</i>	370,577	1,852885
<i>Diazepam</i>	284,700	1,4235
<i>Xylazine</i>	256,790	1,28395
<i>Acepromazinum</i>	326,457	1,632285

9. Táblázat. Moláris ekvivalencia számítás kompetitív gátlás vizsgálatához

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 vizsgálható a GST-hez való affinitás.

3.6 GSH konjugátum szintézis

A konjugátumok hatékonyságát házinyúl és ezüstkárász esetében vizsgáltam. A gyógyszer konjugátum szintéziséhez a GHS 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/mól

Vegyület	g/mól	Napi dózis (mg)	GSH egyenérték (mg)
<i>Tiapridum</i>	341,427	26,47	23,83
<i>Risperidonum</i>	410,485	0,08823	0,07
<i>Haloperidolum</i>	375,864	0,88	0,72
<i>Chlorpromazinum</i>	318,865	8,8	8,48
Controll	-	-	-
<i>Thioridazinum</i>	370,577	11	9,12
<i>Diazepam</i>	284,700	0,5	0,54
<i>Xylazine</i>	256,790	4	4,79
<i>Acepromazinum</i>	326,457	2	1,88

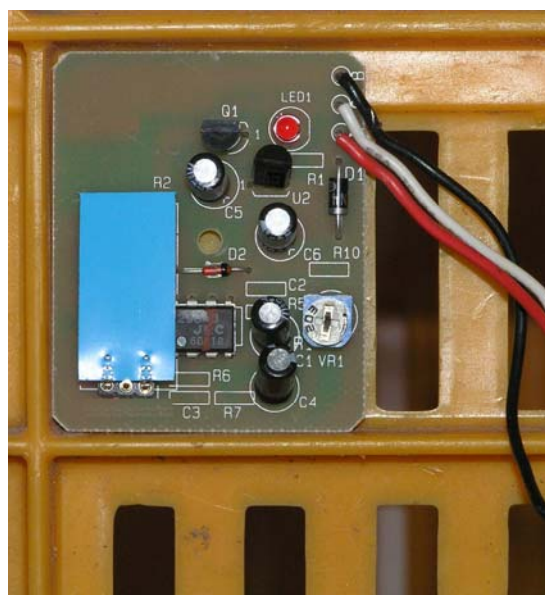
10. Táblázat. GSH egyenérték számítás a konjugátum szintézishez

A gyógyszer és a molárisan ekvivalens mennyiségű GSH összemérését fiziológias 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 GSH található benne.

3.7 Motilitás mérés

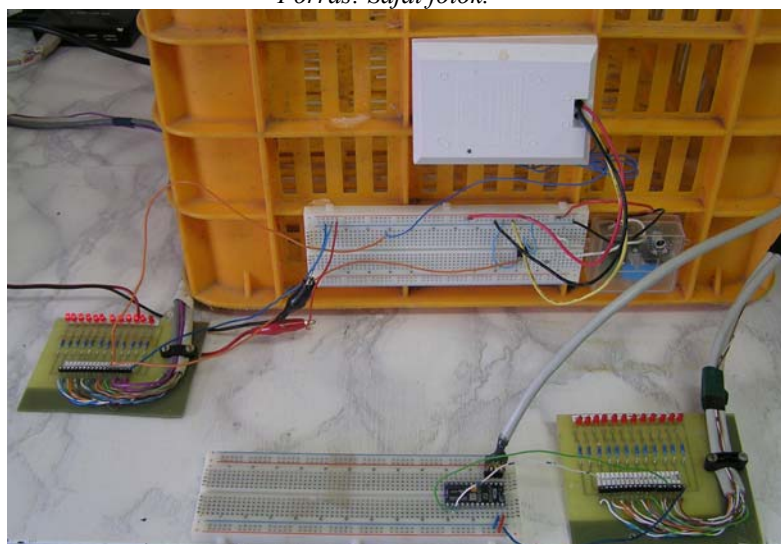
A központi idegrendszerre serkentő vagy gátló hatást kifejtő vegyületek hatékonyságának objektív vizsgálatára a motilitás mérése ad lehetőséget. Jelenleg gyakran alkalmaznak fotokapus és webkamerás mérőrendszereket (Például nemzetközi viszonylatban is jelentős elterjedtségű az EXPERIMETRIA, hazai cég által gyártott laboratóriumi motilitásmérő rendszer), 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 szenzorok a mérődoboz oldalára kerültek.



6. ábra. Aktív infravörös és piezo- elektromos mozgásszenzor.

Az előbbi minden fajta az utóbbi elsősorban a helyváltoztató mozgások érzékelésében hatékony.

Forrás: Saját fotók.



7. ábra. Mikrokontroller felügyeletű motilitásmérő rendszer „deszkamodellen”

Forrás: Saját fotó.

A motilitást mindig a gyógyszer beadása előtt mértem. Tehát megközelítőleg 24 órával az előző dózis beadása után. Így nem a gyógyszer közvetlen akut hatását hanem a krónikus kezelés okozta hosszabbtávú motilitás változást regisztráltam. Ez kevésbé kifejezett változásokat idéz elő de a 8 napos vizsgálati periódus során egyértelmű és stabilabb tendenciákat mutatott.

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 percre monitoroztam. Mikrokontrolleres (BS2SX) felügyeleti rendszer gyűjtötte és továbbította a PC-felé az adatokat, ahol azt saját fejlesztésű szoftver fogadta és dolgozta fel.

3.8 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.

3.9 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.

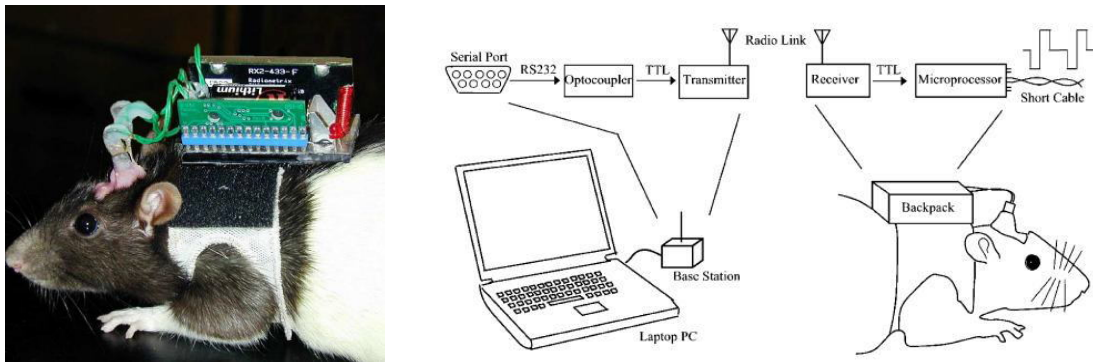
3.10 Mikrokontroller választás

Egészen a közelmúltig a neurális hálózatok elmélete, matematikai modellje de legfeljebb a neuronhálózatok szoftveres emulációja uralkodott a mesterséges neuronhálózat kutatások területén. A digitális technika utóbbi évtizedekben tapasztalható robbanásszerű fejlődése azonban lehetővé tette a multiprocesszoros hardveres implementációkat is, amelyek dinamikus fejlődésnek indultak.

A hagyományos, Neumann elven működő számítógépek csak a neuronhálózatok szoftveres emulációra alkalmasak. Az egyedi processzorok mesterséges neuronhálózatára a legjobb és legkorszerűbb megoldást a nagyteljesítményű mikrokontrollerek nyújtják. De ezek adnak lehetőséget a korszerű, egyedi mérési feladatokhoz flexibilisen alkalmazkodó laboratóriumi mérőberendezések fejlesztésére, vezérlésre, szenzorok olvasására, nagyteljesítményű adatfeldolgozására is. A laboratóriumi felhasználású mikrokontroller választásnál számos szempontot kell figyelembe venni (BEIL, 1996; BANNATYNE , 1998; AL-DHAHER, 2001).

A PIC alapú mikrokontrollerek megbízhatóak és elegendően gyorsak, biológiai folyamatok monitorozásához. A BS/1 a PARALLAX első generációs mikrokontrollere amely egy rendkívül látványos publikációban bizonyította a „NATURE” c. folyóiratban,

ahol kísérleti patkányt távirányítottak botkormánnyal (TALWAR, 2002; XU, 2004). A jelfogást és az agy stimulációt is BS/1 mikrokontrollerrel oldották meg.

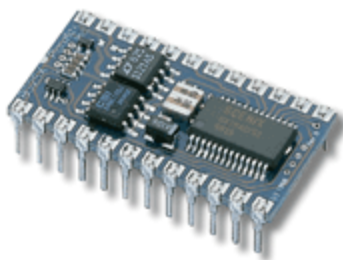


8. ábra. Patkány vezérlés BS/1 mikrokontrollerrel.

Forrás: Talwar et al. (2002): Rat navigation guided by remote control. Nature. 417:37-38.

A második generációs, 32 bites architektúrájú BS/2 a PIC16C57 processzoron felül egy nagyobb EEPROM memóriát és egy STAMP BASIC interpretert is magába foglal, amely jelentősen megkönnyíti az adott mérési körülményekhez alkalmazkodó program elkészítését. A BASIC szintaktika természetesen csak a PC editorában jelenik meg, a kontroller memóriájában annak már csak sűrítetten kódolt (tokenizált) formája. A kontroller a PC soros portjához 3 vonalon keresztül kapcsolható. Az interpreter mellett tartalmazza a PC-vel való kommunikáció protokollját is, az úgynevezett letöltő programot. A mikrokontroller és a PC közötti kommunikáció kétirányú is lehet vagyis lehetőségünk van arra, hogy a kontrolleren futó programot a PC-n debug-oljuk. 20 MHz-es órajel frekvenciája 4000 művelet végrehajtását teszi lehetővé másodpercenként. A BS/1 8 a BS/2 16 I/O kommunikációs vonalat tartalmaz, melynek mindegyike ki és bemenet valamint analóg és digitális egyben. Nem utolsó szempont, hogy áramfelvétele 60 mA körüli, így akár több hónapos megbízható monitorozásra is alkalmas elemről, a hálózattól függetlenül. Elektrofiziológiai alkalmazások estén jelentősége lehet a zsebtelep zajmentes és stabil energiaforrásként való felhasználása..

A munkám során a továbbfejlesztett, beépítésekor legkorszerűbb BS2/SX kontrollert 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 (!).



9. ábra. BS2SX mikrokontroller

Fotó: <http://partallax.com>

A standard PIC kontrollerek alkalmazásának lehetőségét a körülményes égetés és debuggolás, az ATMEL kontrollereket a megbízhatatlan interpreter miatt vettem el.

3.11 Mikrokontrolleres enzimkinetika mérés

A széleskörű vizsgálatok során rendkívül nagy mennyiségű adat keletkezett, amelynek mérésére és feldolgozására nem találtam megfelelő minőségű rendszert. Vizsgáltam a LAMBDA 2UV/VIS, NANOCOLOR LINUS és az SP6-500 UV spektrofotométer készülékeket, de a célorientált feldolgozáshoz nem nyújtottak megfelelő támogatást a szoftvereik.

A munka során nagy mennyiségű mintával és mérési adattal dolgoztam:

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

11. Táblázat. Enzimkinetikai mérések száma.

Ilyen nagy mennyiségű adat reális időben történő feldolgozásához és enzim kinetikai elemzéséhez új, célorientált mikrokontrolleres rendszer vált szükségessé. Még az előfeldolgozás során, a korrekt összehasonlíthatóság és a mérési hibák kiküszöbölése érdekében a kinetikai görbék komplex, függvénytani analízisét kell szoftveresen megvalósítani (lineáris szakasz keresés, maximális nettó produkciót mutató szakasz keresés stb.). Erre a korszerű, nagy teljesítményű mikrokontrollerek adnak megoldási lehetőséget. A rendszerrel a mérési és konverziós hibák felügyelhetőek és ezáltal a mérések azonnal ismételhetőek, elkerülhető a minták ismételt felolvasztása és ezzel az enzimaktivitás mértékének megváltozása, fals eredmények publikálása.

Az általam fejlesztett rendszerből két verzió készült el. A fotodetektor analóg jelét MAX110BEPE (Maxim Inc.) 14 bites (Ver: 1.0) illetve LTC2401 (Linear Technology) 24 bites (Ver: 2.1) A/D konverter segítségével digitalizáltam. Majd PIC16C57 alapú BS/2

(Parallax Inc.) mikrokontrollerrel dolgoztam fel (Ver: 1.0). A 2.1-es verzióban a beépítés időpontjában a világ leggyorsabb SX alapú processzorát tartalmazó (LAMÁR, 1999) BS2/SX mikrokontrollert építettem.

A mikrokontroller vezérlő, hibajavító, pufferező és adat továbbító algoritmusait STAMP BASIC nyelven valósítottam meg. A javított digitális jelet párhuzamos majd USB porton keresztül juttattam PC-be, ahol saját fejlesztésű szoftver fogadta. Újabb feldolgozás után kompatibilis „.CSV” állományokba mentette az adatokat.

3.12 Agytörzsi szöveti struktúra

A multielektroda tömb fejlesztése során fokozottan figyelembe kellett vennem, hogy milyen szöveti struktúrába fog kerülni az elektródátömb. Ezért mikroszkópos technikával vizsgáltam az emlős illetve a hal agytörzsi metszetein a sejt, sejt közötti mátrix és a vérerek elhelyezkedését és arányát. Összehasonlítva az elektródátömb egységeinek elhelyezkedésével, a szigetelés és a mátrix arányával. A tüzelési mintavételezés akkor hatékony, ha az egyes elektród egységek egymástól mindinkább független idegsejt csoportokat fednek majd le.

Az agytörzsi szeleteket mikrotóm készülékkel metszettem, majd három különböző festési eljárást alkalmaztam (KRUTSAY, 1980). A metszetkészítést és a festést a Debreceni Kenézy Gyula Kórház Patológiai Osztályán végeztem.

A felvételeket a Debreceni Egyetem, Élettani Intézetében ZEISS LSM510 fluoreszcensz mikroszkóppal készítettem 543nm-en gerjesztve és 548-666nm –en emittálva.

3.12.1 Hematoxilin-eozin festés

A sejtmagok festésére a hematoxilint (BÖHMÉR, 1865) vezette be a szövettani technikába. Az eozint a citoplazmák festésére elsőként (FISCHER, 1876) alkalmazta. Mindkét festék igen állandó, a velük megfestett metszetek évtizedek múlva is vizsgálhatók. A rögzítést formalinban végeztem, majd paraffin beágyazás után 7 µm vastag metszeteket készítettem. A festés során a sejtmagok kékre, az egyéb sejtalkotók rózsaszínűre festődnek.

Deparaffinálás után a metszeteket timsós hematoxilin-oldatban festettem 2 percig, majd desztillált vízben öblítettem. A kékítést csapvízben, 5 percig végeztem, majd ismételt desztillált vízzel öblítettem. 1 percig 0,5 %-os vizes eozin-oldattal festettem, amelynek 100 ml-éhez 1 csepp 2 %-os ecetsavat adtam, utána izopropil-alkoholban

öblítettem. A víztelenítést és derítést izopropil-alkohol-xilol sorozatban végeztem. Nitrolakkal és fedőlemezzel fedtem.

3.12.2 Velőhüvely festés

A velőhüvely (zöldeskék) célzott megfestésére szolgáló eljárás. A Nissl-állomány és a sejtmagok ibolyaszínűek lesznek. Formalinrögzítés és parraffinbeágyazás után 4 µm vastag metszeteket készítettem. A deparaffinált metszetek alkoholból 57 °C-os termosztátban 24 órára a következő oldatba kerültek (KLÜVER and BARRERA, 1953):

Luxol Fast Blue MBS	0,1 g
96 %-os alkohol	100,0 ml
jégecet	0,05 ml

Öblítés 96 %-os alkoholban, majd desztillált vízben, ezután gyors megmártás következett 0,05 %-os lítiumkarbonát-oldatban. Differenciálás 70 %-os alkoholban. A lítium-karbonáttal, illetve az alkohollal való differenciálás addig ismételttem, míg a szürke- és fehérállomány elkülönült. Ezután desztillált vízben mostam. 100 ml 0,25 %-os krezil - valódi ibolya oldathoz 0,05 ml ecetsavat adtam, és megsűrűt, termosztátban előmelegített oldatban 6 percig festettem a metszeteket. Öblítés több váltás 96 %-os alkoholban. Víztelenítés, derítés, lefedés követte.

3.12.3 Immunhisztokémia és hematoxin-eozin festés

Az eljárás egyszeres, indirekt Streptavidin-peroxidáz konjugált immunhisztokémia alapreakció.

Fixálás 10 %-os formalinban 24 órán keresztül. A kioldás tömény xilolban 4 x 5 perc, 96 %-os alkoholban 2 x 2 perc majd desztillált vízben történt. Az antigénfeltárás hővel, kuktában 11 mM-os citrát pufferben (pH 6.0) 2 percig. Utána 20 perc hűlési idő a lezárt kuktában. Öblítés desztillált vízben Endogén peroxidáz gátlás: 3 %-os H₂O₂ vizes oldatban, 10 percig, szobahőmérsékleten. Öblítés desztillált vízben, majd PBS pufferben (pH 7.5) 5 percig.

A további reakciókat nedves kamrában végeztem. Aspecifikus antitestkötődés blokkolása: 1 tömeg %-os BSA-val PBS-pufferben oldva (pH 7.5). Inkubálás a primer antitesttel: Anti-humán monoklonális, egérben termeltetve (1:100, Klón: BBS/NC/VI-H14, DAKOCYTOMATION). Inkubálása 30 perc szobahőmérsékleten. Frissen hígítva a szérumban. Öblítés PBS –pufferben 3 x 5 percig. Inkubáció a biotinilált szekunder antitesttel: kecskében termeltetett anti-egér (BAM,1:500). Hígítása a szérumban történt, és inkubációja 30 perc, szobahőmérsékleten. Öblítés PBS pufferben 3 x 5 percig.

Inkubáció a streptavidin-peroxidázzal (SPO): hígítása 1:500, mely a szérumban történt. Inkubáció 30 perc szobahőmérsékleten. Öblítés PBS-pufferben 3 x 5 percig. Antitest: egérben termeltetett anti neuron specifikus enoláz IgG (NSE).

Előhívás DAB (diamino benzidin) kromogénnel (barba színreakció, 10 perc). Utána desztillált vízben állítottam le a reakciót.

Megfestés hematoxilinnel (10 mp), utána csapvizet öblítés. Víztelenítés: 2 x 2 perc alkohol, 3 x 2 perc acetone, 2 x 2 perc xilol. Xilolos fedés követte.

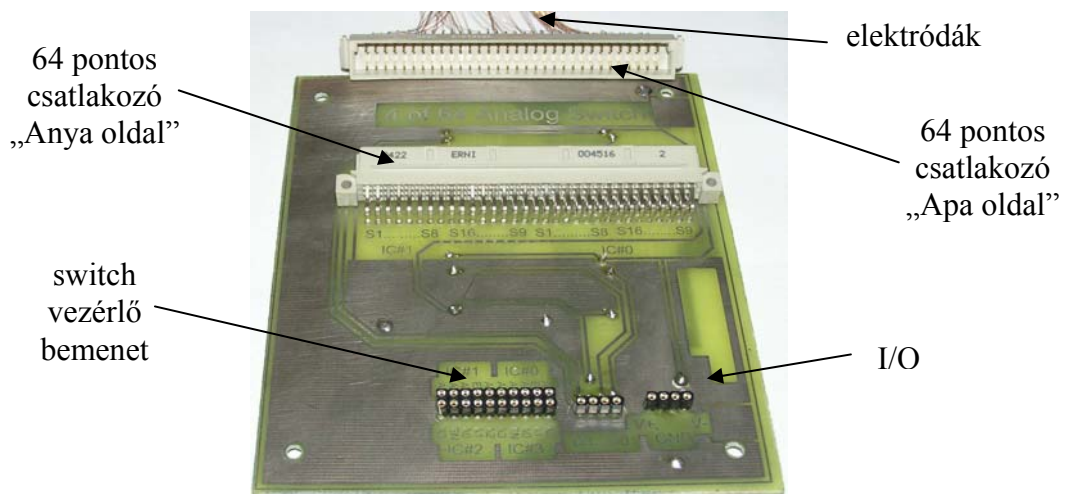
3.13 Multielektród fejlesztés

A multielektród tömbök gyártásának és forgalmazásának üzleti aspektusai miatt az egyes megoldások konkrét megvalósítási lépéseit csak elvétve pulikálják, üzleti titokként kezelik azt. 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. hajítás 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.

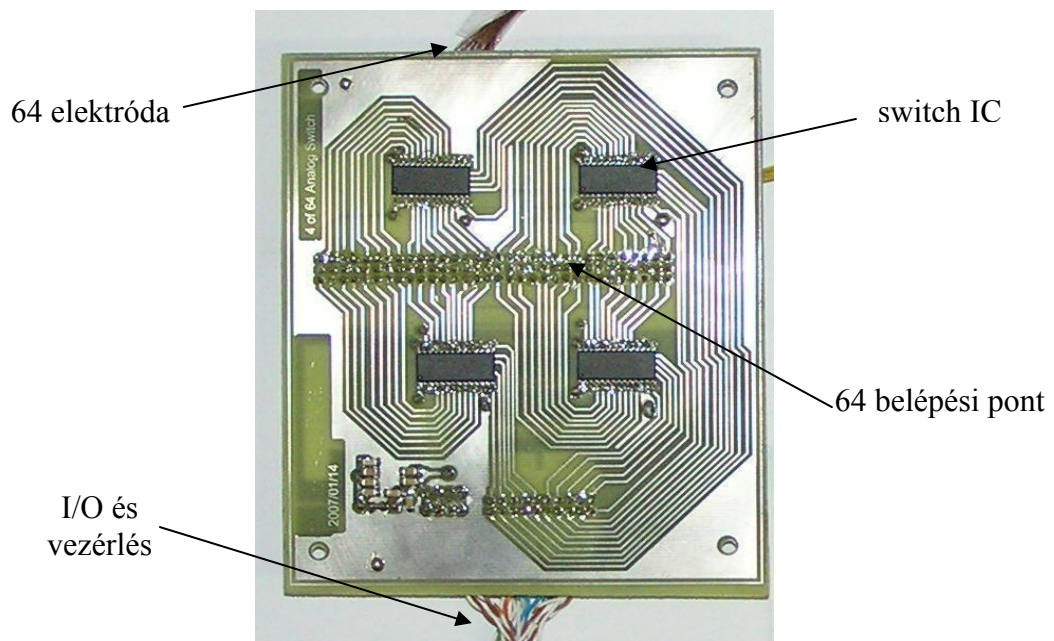
Az elkészült huzalköteg ezután fagyasztásra kerül. Egy optimális hőmérséklet elérésekor a tömb egyik végét 90° , 45° , 20° vagy más szögben elmeteszem. Ezáltal tompa vagy hegyben végződő elektródatömböt kapunk. Minél kisebb a szög annál nagyobb lesz az egyes egységek felülete és nagyobb felületen fog 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 elektródatömb másik vége szétbontásra és a szigetelőréteg leoldásra kerül. Ezután a szálatkat egyesével két 64 pólusú csatlakozó tömbhöz kell forrasztani. A csatlakozót egy saját fejlesztésű analóg switch IC rendszer fogadja.



10. ábra. Saját fejlesztésű fogadópanel alulnézetben.
Az elektródátömb 64 egységes csatlakozóját képes fogadni és szelektálni. Az ADNC két ilyen panelt tartalmaz.

Forrás: Saját fotó.



11. ábra. A panel felülnézetben 4 darab 16 egységes analóg switch IC-vel.

Forrás: Saját fotó

A switch rendszert más szerzők hasonló munkáiban szelektor néven említik (TÓTH és mtsai, 2007; NOTED 2006). Az eltérő elektronikai megoldás mögött azonban ugyanazon funkció valósul meg, vagyis az elektródátömb analóg demultiplexálása a stimulátor és a rekorder felé.

4 Eredmények és értékelésük

Disszertációmban trankvilláns gyógyszerek és azok GSH-konjugátumainak hatékonyságát, valamint a trankvillánsok GST enzim indukcióját, az enzim specifikus aktivitására kifejtett hatását vizsgáltam. A biokémiai, neurobiológiai, élettani vizsgálatokban alkalmazott neuroinformatikai rendszerek kidolgozása, megépítése és alkalmazása, az ezekhez a rendszerekhez megírt programok, algoritmusok és az általuk mért adatok éppúgy eredményét képezik a munkámnak mint a hagyományosnak tekinthető metodikákkal nyert vizsgálati eredmények. Ezért ezeket az adatokat is ebben a fejezetben tárgyalom.

4.1 Mikrokontroller alapú enzimkinetikai analizáló rendszer

4.1.1 Fotometriás analóg jelek digitális konverziója

A spektrofotometriás mérési technika működési alapelve az, hogy egy oldott színes termék bizonyos hullámhosszon elnyeli a fényt (abszorbeálja azt). Az abszorpció mértéke egyenes arányban áll a színes komplex vegyület koncentrációjával, vagyis ily módon alkalmas a színes termék kvantitatív meghatározására. A GST enzim által katalizált reakció során egy sárga színes termék képződik. A fényabszorpció alapján keletkezett termék mennyiségét meghatározhatjuk azaz következtethetünk az enzim működésére az enzim által katalizált reakció sebességére. Az átbocsátott fény, fotodióda segítségével elektromos feszültség jellé konvertálható. A spektrofotométer az enzim működése során létrejövő színes komplex mennyiségét méri az elegy fény abszorpciós képessége alapján.

A detektor analóg kimenetén a mért abszorbancia értékkel egyenes arányban álló, 0 – 1,2 V feszültség jelenik meg. A jelet árnyékolt koaxális kábelben vezettem az A/D konverterhez, mivel a felvett „zaj” sok hiba forrása lehet. Zaj keletkezhet a spektrofotométer mérési hibája során, az analóg jelátviteli kábelben, a mintavételi és a kvantálási eljárás során az A/D konverterben, ami később hibaként jelenhet meg a digitális átviteli vonalon és a mikrokontrollerben.

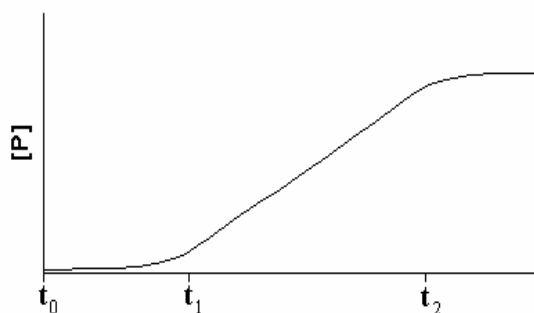
A 14 és 24 bites A/D konverter választása túlbiztosításnak tűnhet, hiszen a feszültség intervallumot 16 384 illetve 16 777 216 egységre kvantálják. Azonban az alsó néhány (2-5) bit gyakori „lebegését” figyelhetjük meg, így a stabilitás érdekében célszerű levágni azt. Standard azaz nem változó fényabszorpciójú mintát fotometrálva a konvertált

jel utolsó (0.), legalacsonyabb helyi értékű bitje folyamatosan változott. Az 1. bit értéke már ritkábban mozgott, míg a 2. bit mindvégig stabil maradt 14 bites konverzió esetén. Így a két utolsó bit összes eltérése (lebegése) maximálisan 3 értékű lehet, ami a 16384 – nek mindössze $1,83 \times 10^{-2}$ %-a. Ezért indokolt a két utolsó bit elhagyása, de pontatlanságot nem okoz. Így megközelítőleg 5×10^{-4} pontossággal állapítható meg az abszorbanancia. Ez az érték felülmúlja a detektor mérési pontosságát is, ez pedig lehetővé teszi, hogy a kvantálás során az analóg jel teljes pontossággal jelenjen meg mint digitális információ. Az enzimkinetikai vizsgálatoknál ugyanis kiemelt jelentősége van a nagy pontosságú kvantálásnak.

Az enzim működése során első lépésként a szubsztrát [S] kapcsolódik az enzimhez [E], létrejön az enzim/szusztrát komplex [ES] majd ezután képződhet belőle a termék [P], amely leválik az enzimről, az E pedig újabb szubsztráttal képes kapcsolódni. Azonban az enzim/szusztrát komplex [ES], –termékképződés nélkül– disszociálhat is; $E + S$ képződhet, vagyis a folyamat két irányú, ami a k_1 és k_{-1} sebességi konstanssal jellemezhető (MICHAELIS and MENTEN, 1913).



A k_{-1} és a k_2 sebességi állandók számértéke nagyságrendileg nem különböznek egymástól. Ideális esetben az enzimreakció során a képződött termék koncentrációja az idő függvényében lineárisan növekszik egy bizonyos időtartamon belül (BRIGGS and HALDANE, 1925; NELSON, 2000). Ez az úgynevezett „steady-state” állapot. Az ES-komplex koncentrációja ebben a szakaszban közel állandó.

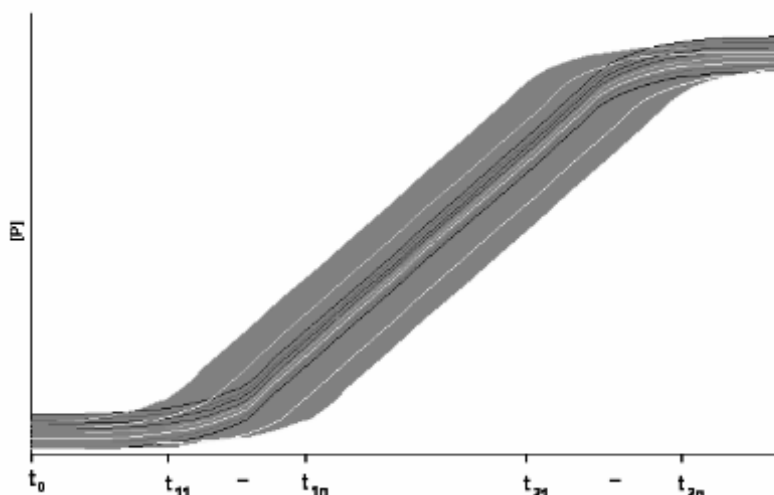


12. ábra. A termékkoncentráció változása az idő függvényében. Briggs-Haldane-féle kinetikát követő enzim esetében.

Az enzimatis reakció sebességének mérése csak akkor lesz pontos ha a termék képződését a steady-state állapotban, azaz a t_1 és a t_2 időintervallumban tudom mérni

megfelelően hosszú ideig. Ezért a lineáris szakasz felismerése elengedhetetlen, amihez rendkívül pontos digitalizálás és jól megválasztott mintavételezési frekvencia szükséges.

A GST enzim aktivitás mérések során –a standard módszer szerint– az állatok szerveiből preparált mintákból a méréseket többször megismételtem (min. 3x), továbbá egy kezelési csoportba több kísérleti állatból nyert minta tartozott (min. 5 db). Így az aktivitási görbék sávokat alkottak. A t_1 és a t_2 értékek pedig intervallumokká bővültek.



13. ábra. A megismételt mérések eredményei sávokat alkottak

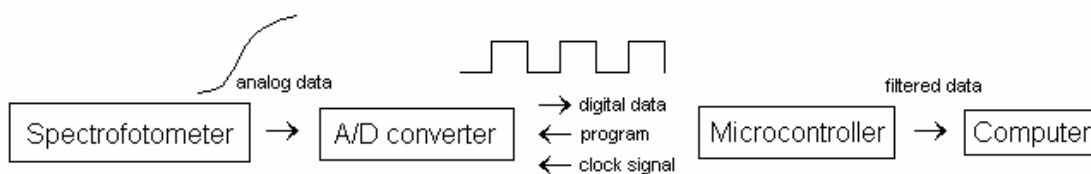
A GST-t tartalmazó minta bemérése után megindul az enzimreakció (t_0). A $[t_0, t_1]$ időintervallum az ún. lag-time. Ez idő alatt a minta összerázása és detektor elé juttatása történik meg. Tehát minden esetben késedelmet szenved a reakció monitorozásának kezdete. Azonban a t_1 állapotig rendszerint jóval több idő telik el, mint amit az előkészítő műveletek igényelnek, ezért a mikrokontroller szoftveres úton még egy konstans ideig várakozik az adatgyűjtéssel.

Jelen vizsgálataimnál a monitorozást 3 percen keresztül végeztem. Ha ez idő intervallum alatt 0,5 másodperces mintavételezési frekvenciát alkalmaztam, akkor a keresett lineáris szakaszt igen jó közelítéssel határozható meg, de a keletkező 360 adat a feldolgozásnál már meglehetősen soknak bizonyult. A tapasztalat azt mutatta, hogy célszerű 5 – 10 másodperces mintavételezési frekvenciát alkalmazni. Ekkor a meghatározni kívánt szakasz még mindig jó közelítéssel kalkulálható, de az adatmennyiség és ezáltal a feldolgozási idő jelentősen csökken. Mindezeket túl a mérés felvett adataiból a $[t_1, t_2]$ szakasznak csak egy, egy perces időintervallumát fogja ugyanazon algoritmus kiválasztani az összehasonlításához. Ezzel függetlenítjük a

méréseket az előre nem számolható kismértékű differenciáktól (pl. lassabban beinduló reakció) és a szakaszok hitelesen összehasonlíthatóak lesznek egymással.

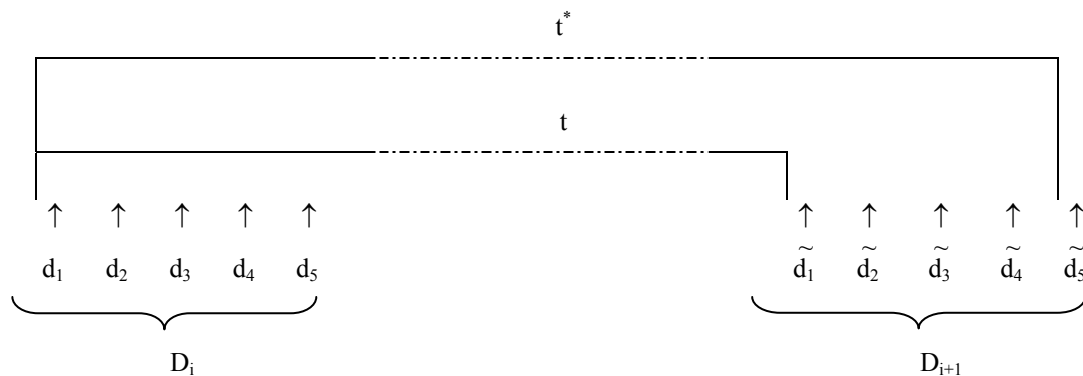
4.1.2 Mikrokontrolleres előfeldolgozás

A korszerű A/D konverterekből nem csak olvasnunk kell a digitalizált jeleket, hanem minden olvasáskor fel is kell programoznunk azt, továbbá folyamatosan órajelet kell generálnunk számára. A konverter digitalizált jeleit soros kommunikációval, egy bites vonalon kapjuk meg, amit a bitszámnak megfelelő órajel ciklus után állíthat össze a mikrokontroller egy leolvasott értéké. Így a konverter és a PC közé kerül az előfeldolgozást végző mikrokontroller.



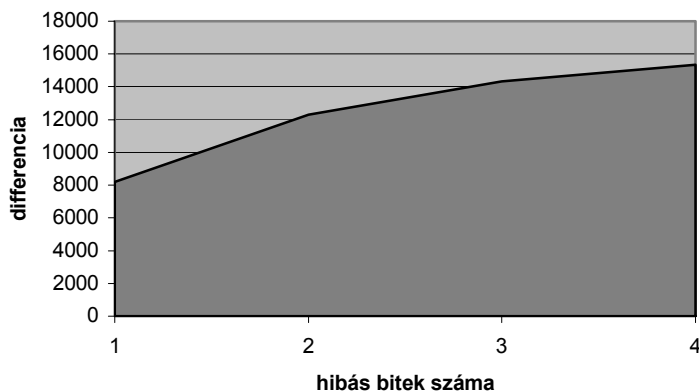
14. ábra. A GST aktivitást fotometriásan mérő rendszer felépítése

Az A/D konverter referencia feszültségét a spektrofotométer maximális kimeneti jelfeszültségéhez közeli értékre kell beállítani a nagyobb konverziós felbontás érdekében. A spektrofotométer jelét nem elegendő egyszer kiolvasnunk, az időnként fellépő konverziós hibák miatt. A mérési tapasztalat azt igazolta, hogy célszerű 5 konverziót maximálisan rövid időn belül, egymás után elvégezni (d_1, \dots, d_5), majd abból egy algoritmus alapján egyetlen értéket kiválasztani (D). Az egy adathoz tartozó mintavételezéseket igen rövid időintervallumban kell regisztrálni (néhány századmásodperc), mivel a több mérés közül csak egy adatot küldhet tovább az előfeldolgozást végző mikrokontroller és az öt mérés ideje alatt változhat a mért abszorbancia érték is. Ha egy mintavételezési csoport méréseit túl nagy időintervallumban vesszük fel, akkor extrém esetben például egy mintavételezési csoport első elemét ($D_1; d_1$), majd egy második mintavételezés utolsó elemét ($D_{i+1}; d_5$) figyelembe véve megnő a két valós adat felvétele között eltelt idő (t^*), amely az abszorpciós görbe torzulásához vezet. Ahol t a mintavételezési frekvencia alapján számított ideális idő, t^* pedig a mintavételezés idejével megnövekedett, torzult időintervallum.



15. ábra. Mintavételezési csoportok elemei között eltelt időintervallumok

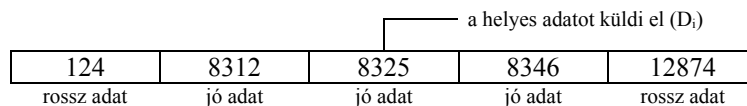
A mintavételezési csoportok (d_1, \dots, d_5) közül az algoritmusnak ki kell választani a mintát legjobban reprezentáló adatot (D). A helyes adat képzéséhez a matematikai átlag kevésbé alkalmas, mert a tévesen beolvasott érték jelentős eltérést okozhat, ha akár egyetlen bitje is hibás lenne.



16. ábra. Bithibák okozta lehetséges differencia 14 bites mintavételezésre

Legrosszabb esetben egy hiba előfordulhat a 13. biten, ami 8192 (2^{13}) értékű eltérést eredményez. Ez a teljes konverziós intervallum 50%-a (!) Két hiba legrosszabb előfordulása a 13. és a 12. biten lehet ami 12288 értékű ($2^{12}+2^{13}$) és 75%-át adja a teljes intervallumnak. stb. Ez erősen eltolja a matematikai közép értékét.

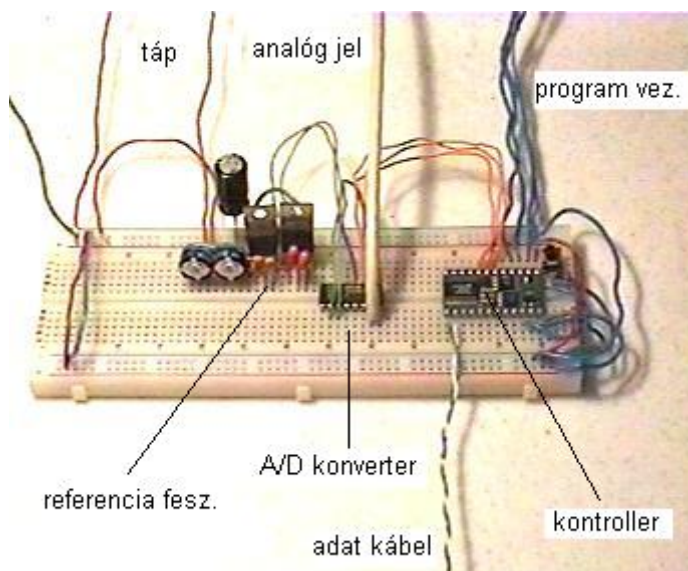
Nagyon jól alkalmazható azonban a medián. $Me = d_{(k+1)/2}$. A mikrokontroller az öt értéket egy pufferbe olvassa, majd egy egyszerű rendezési algoritmussal sorba rendezi. A számítógép felé már csak a középső elemet, $k=5$ esetén a harmadikat továbbítja. A példában két erősen hibás értéket is beolvasott a kontroller, a továbbjutó adat (D_i) értékét azonban még ez sem befolyásolta.



17. ábra. 5 elemű puffer mediánjának hibajavítási algoritmusa

A bithibák negatív illetve pozitív irányú eltérést is produkálhatnak 50%-os eséllyel. A rendezés után a hibák a középső elem elé és mögé is rendeződhetnek. Így akár negatív, akár pozitív irányban legalább három hibás értéknek kell lennie az öt közül, hogy a mikrokontroller a hibás értéket továbbítsa a számítógép felé. Egy konverziós szakaszban három hiba előfordulására igen kicsi az esély, de ha bekövetkezik, akkor is csak ezen esetek 25%-ában továbbítódik, amikor mindhárom pozitív vagy negatív eltérésű. Még négy hiba esetén is mindössze 62,5% eséllyel kerül a középső helyre a rossz érték. Így gyakorlatilag csak akkor jut tovább hibás adat, ha a puffer összes adata hibás. Mérőrendszerem tapasztalatai szerint elhanyagolhatóvá vált a továbbjutott hibás konverziók száma. Az algoritmus rendkívüli előnye, hogy az adatok drift-jét sem okozzák a hibák, így a kapott enzimaktivitási görbe egyáltalán nem torzul.

Természetesen a puffer mérete tetszőlegesen növelhető vagy csökkenthető. Célszerű páratlan számot választani, a középső érték arányos elhelyezkedése és az egyszerűbb algoritmus érdekében. A túlzottan nagy puffer nem előnyös a gyors enzimreakciók monitorozásánál, mert a konverzió és a rendezés hosszú időt vehet igénybe és a görbe torzulhat a nem megfelelő időben történő leolvasások miatt.



18. ábra. A mikrokontrolleres enzimkinetikai mérőrendszer „deszkamodellen”

Forrás: Saját fotó.

A mikrokontroller feladata, hogy az A/D konverter mintavételezését vezérelje, órajelet generáljon számára, az órajel ciklusára kiolvassa a konverter által küldött adatot és ugyan ezen órajel ciklus alatt felprogramozza azt a következő konverziós ciklus paramétereivel. A mikrokontroller programozási nyelve nélkülözi a modern strukturált programozási alapelveket (a célorientált interpreter miatt), így GOSUB – RETURN segítségével kell a konverziós eljárást pótolni.

```

1. ' ***** konverzio *****
2. transzfer:
3. high 0
4. pause 100
5. low 0
6. ' Megtörtént a konverzió, jöhet a kiolvasás!
7. pause 100
8. for n=15 to 0 ' Kiolvasás 15 órajel ciklus alatt
9. lookup 15-n,[NOOP,0,0,CONV4,CONV3,CONV2,CONV1,DV4,DV2,0
                ,0,CHS,CAL,NUL,PDX,PD],out2 'A/D konverter program
10. write n,in3 ' kiolvasott bitek memória tárolása
11. high 1 ' órajel generálás
12. pause 10
13. low 1
14. pause 10
15. next
16. return

```

A mikrokontroller 0. lába a MAX110BEPE konverter 9. CS (Chip-Select Input) lábához vezet (3. , 5. sor). A konverzióhoz szükséges idő a 4. sorral állítható be. A 2. lábba kötött DIN (Serial Data In) vonalat a 9. sorban lévő utasítás programozza fel, a megadott változók sorrendje szerint. A programbitek jelentését a konverter műszaki leírása tartalmazza. Mindeközben a 3. lábról bitenként leolvassuk az adatokat és az EEPROM folytonos memória címekre helyezzük (10. sor). Ez pótolja a tömb adatszerkezet hiányát. Később az adatokat binárisról decimálisra kell konvertálnia a programnak. Miután az adatvonal érvényes bitet tartalmaz, a kontroller az órajel ciklussal jelzi ezt (11. – 14. sor). A next (15.sor) lezárja a ciklust és a 8. sorra visszalépve következhet az újabb programbit kivitele majd az új adatbit beolvasása.

A mintavételezés frekvenciájától, valamint az egy méréshez tartozó adatok mennyiségétől függően dönteni kell, hogy puffereljük-e az adatokat, vagy minden konverzió után azonnal átküldjük azt a számítógépbe. Enzimkinetikai vizsgálatoknál az EEPROM viszonylag nagy mérete és az időigényes számítási műveletek miatt célszerű a pufferelést alkalmazni. Az enzimreakció befejeztével soros vagy a gyorsabb átvitel

érdekében párhuzamos (2,4 vagy 8 bites), közös órajeles szinkron átvitelt alkalmaztam. Ez gyors és megbízható átviteli protokollt nyújt a fotometriás mérések számára. Gyakori és nehezen felderíthető hibaforrás, ha a mikrokontroller és a számítógép között nagyságrendekkel eltérő a sebességkülönbség. Ekkor a közös órajelet kell az alacsonyabb sebességű processzorhoz igazítani vagy más típusú, például handshake protokollt kell alkalmazni, amely automatikusan hangolja önmagát az elérhető leggyorsabb adatátvitelre.

4.1.3 Adatfeldolgozás

Az enzimaktivitási görbék összehasonlítása során konstans intervallumot kell figyelembe venni valamennyi mérési görbén. Ez lehet a legmeredekebb, az egyeneshez legjobban közelítő vagy a kettőt minél jobban ötvöző szakasz kiválasztása.

```
1.   for n:=1 to max-dx do
2.       begin
3.           dy := data[n+dx]-data[n];
4.           m := dy / (dx*len);
5.           b := data[n]-(m*(n*len));
6.           line[n] :=0;
7.           for x:=n to n+dx do
8.               Inc(line[n],Abs(data[p]-(m * x + b)));
9.           steep[n] := dy;
10.        end;
```

max = az adatok száma

dx = a vizsgált intervallum (sec) / leolvasási gyakoriság (sec)

len = két adatleolvasás közötti idő (sec)

A legegyszerűsebb enzimaktivitási szakasz megállapításához a program veszi az adott pontot (n) és a ponttól dx távolságra lévő pontot (n+dx) összekötő egyenes egyenletét (3.,4.,5. sor). Majd kiszámítja a szakasz köztes pontjainak y irányú eltéréseinek abszolút értékű összegét. Célszerű tömbben, minden adathoz egy linearitási tényezőt (line[n]) hozzárendelni (8. sor). A legintenzívebb enzimaktivitási szakaszt az intervallum végpontjainak y irányú differenciája Δy adja (9. sor). A „line” tömbben elvégzett minimális elem kiválasztás valamint a „steep” tömbből történő maximális elem kiválasztás lehetővé teszi az egyes mérések egzakt összehasonlítását.

Az adatokat és az előszámítások eredményeit a program „CSV” kiterjesztésű állományokba menti. Így azok kompatibilisek lesznek pl. Excel táblázatkezelővel, ahol a görbék analízisét kényelmesebben és több szoftvereszköz lehetőségeinek igénybevételével lehet elvégezni.

4.1.4 „Black box” teszt

A fejlesztett mérőrendszer összehasonlítása más fotometriás eljárással

Az enzimkinetikai mérőrendszer hitelességének és pontosságának tesztelésére összehasonlító vizsgálatokat végeztem a kereskedelmi forgalomban kapható és számomra hozzáférhető NANOCOLOR LINUS fotométeren (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG). Irodalmi adatoknak megfelelően standard körülmények között mértem a GST enzim aktivitást mindkét fotométerrel. A reakcióelegy 850 μl 0,1 M-os nátrium-foszfát puffert (6,5 pH) 1 mM EDTA- Na_2 -vel), 50 μl 20mM-os GSH-t és 50 μl 20mM-os CDNB oldatot tartalmazott. A puffert és a szubsztrátokat 25 °C-on előinkubáltam valamint az enzim aktivitás mérés is ugyanezen a hőfokon történt a termosztáttal stabilizált fotométerekben. Az enzim reakciót 50 μl ló májból nyert, tisztított GST (SIGMA) enzim hozzáadásával indítottam, majd fotometráltam. A termékképződés mennyiségét az $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ irodalmi adat segítségével számítottam ki, specifikus aktivitása: 1 μmol CDNB – redukált GSH konjugáció/perc, pH 6,5 és 25 °C –on).

Mérőrendszerem pontossága $18,5 \pm 0,3 \%$ -al bizonyult. pontosabbnak a NANOCOLOR LINUS fotométerrel összevetve. A NANOCOLOR LINUS fotométernél a hibás adattovábbítások száma 1/87. A saját mérőrendszerénél 1/2115, azaz a hiba továbbítás kb. 24–szer kevesebbszer fordul elő. A saját enzimkinetikai mérőrendszer tehát hitelesnek, pontosabbnak és megbízhatóbbnak bizonyult egy a kereskedelmi forgalomban kapható műszernél.

4.2 *In vitro* szubsztrát vizsgálat

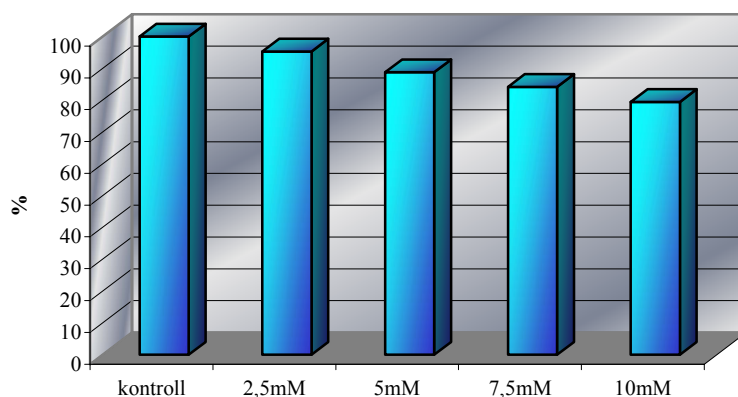
Feltételeztem, hogy a halogén szubsztituált gyógyszerek metabolizmusa lejátszódhat a GST enzim segítségével (GODÓ, 2001;2006). Amennyiben ez így van akkor ezeknek a vegyületeknek farmakodinámiás hatása nagymértékben függhet az egyes szervekben megtalálható GST-enzim aktivitásától. Másrészt ezeknek a vegyületeknek a glutation-konjugátumai (metabolikus intermedierek) amelyek az enzim reakció során képződnek, önmagukban is aktív komponensek lehetnek nemcsak az eredeti anyavegyület. Ezért első lépésben a kereskedelmi forgalomban kapható ló májból tisztított GST enzimmal végeztem kompetíciós teszt vizsgálatokat. A méréseket hasonló módon végeztem, mint a standard enzimaktivitás vizsgálatok esetén azzal a kivétellel, hogy a CDNB szubsztrát koncentrációját változtattam 0,005 és 5,0 mM koncentráció

tartományban. Azaz K_D és V_{Max} meghatározást végeztem. Ugyan ezt a kísérlet sorozatot megismételtem az egyes gyógyszerek 0,1 mM koncentrációjú jelenlétében is.

Mindkét halogén szubsztituált vegyület kompetitív módon gátolta a termék képződést azaz a V_{Max} érték csökkent, de a K_D érték nem vagy csak igen kicsi mértékben változott.

Tehát ezeknek a kísérleteknek az eredményei alapján kimondhatjuk, hogy például a *Haloperidolum* és a *Chlorpromazinum* (feltehetően más halogén szubsztituált vegyületekkel egyetemben) szubsztrátjai lehetnek in vivo körülmények között is a GST enzimnek, azaz lejátszódhat a glutation-S-konjugációja illetve ezek az intermedierek képződhetnek in vivo az állati szervezetben is.

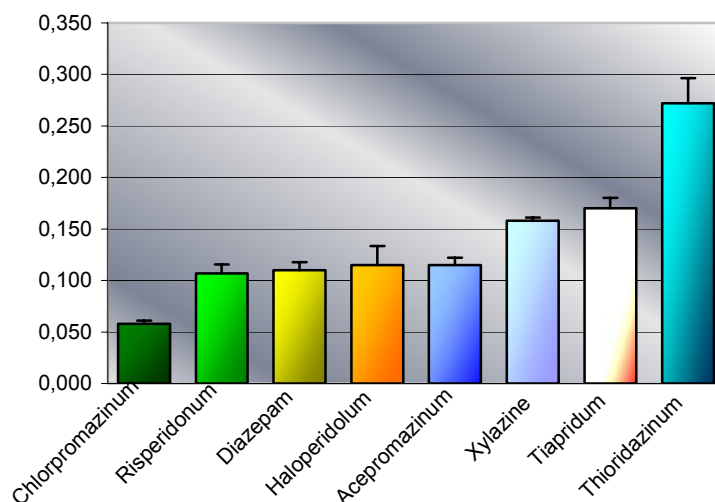
A kompetitív gátlás vizsgálatának célja, hogy in vitro körülmények között tesztelhesük, vajon a vizsgált gyógyszerek egymáshoz képest milyen mértékben gátolják a CDNB-GSH komplex létrejöttét. Eredményeim arra utalnak, hogy mindegyik vizsgált gyógyszer koncentrációfüggő módon gátolta a színes termék létrejöttének dinamikáját



19. ábra. A glutation-CDNB komplex képződés gátlása *Haloperidolummal*.

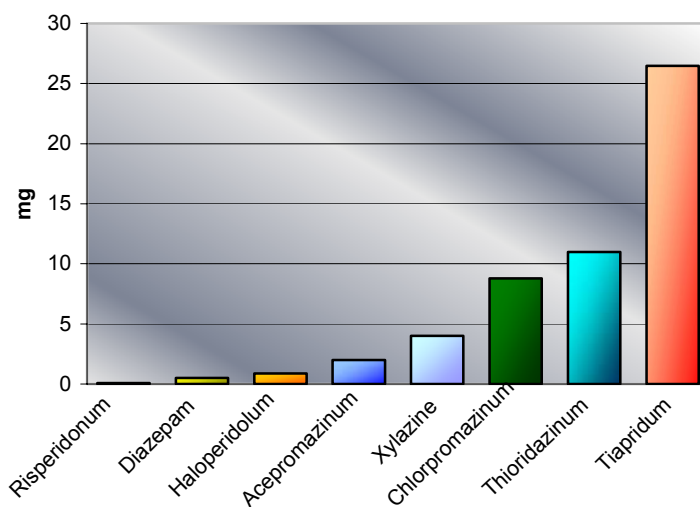
Az elkövetkező fejezetekben számos grafikonon ábrázolom az egyes gyógyszerekkel történő kezelések eredményeit. A könnyebb áttekinthetőség és összehasonlíthatóság érdekében minden gyógyszerhez illetve minden szervhez tartozó grafikonoszlopot azonos színnel jelöltem.

Érdekesebb ha azt vizsgáljuk, hogy a kísérleti állatoknak beadott dózisban milyen mértékű a gátlás, a gyógyszereket egymáshoz viszonyítva. Így a szervezetben kialakuló koncentrációhoz hasonló arányában vizsgálható a GST-hez való affinitás.



20. ábra. Kezelési dózisban hozzáadott gyógyszer mennyiség in vitro kompetitív gátlása

A 20. ábrán az Y tengelyen a vegyület nélküli és a kezelési dózis 10%-ának hozzáadásakor mért Δ abszorbancia különbsége látható 2 perc alatt. A nagyobb érték az intenzívebb gátlást jelzi. Összevetve az alábbi grafikonnal, ahol a kezelések során beadott mennyiség látható, kitűnik, hogy a gátlás mértékét nem a hozzáadott gyógyszer mennyisége határozta meg. A színek segítenek a könnyebb áttekinthetőségben.



21. ábra. A kezelések során egyszeri alkalommal beadott hatóanyag mennyiség

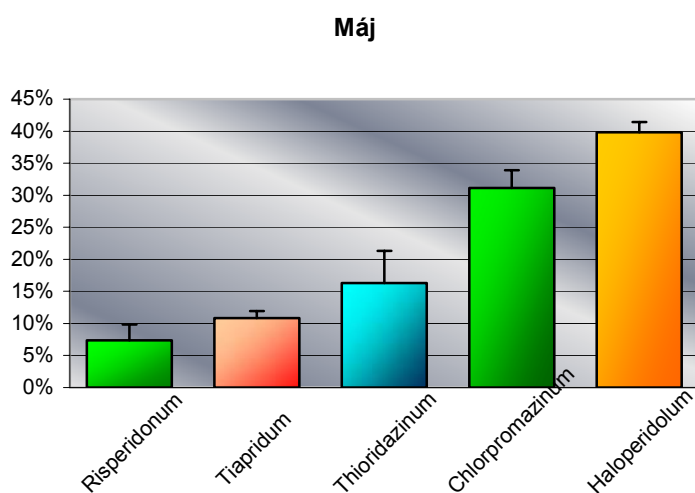
Láthatóan sem sorrendjében sem arányaiban nem egyeznek a két grafikon értéksorai. Leolvasható, hogy például a nagyobb dózisban beadott *Chlorpromazinum* kisebb gátlást idézett elő, mint a jelentősen kisebb dózisban alkalmazott *Diazepam*, etc.

4.3 Neuroleptikumok GST indukciója laboratóriumi patkányban

Amennyiben a trankvillánsok metabolizmusában szerepet játszhat a GST enzim is, akkor feltételezhetjük, hogy az egyes vegyületek in vivo ennek az enzimnek az

indukcióját, azaz az enzim fehérje szintézisét is fokozhatják vagy annak az aktivitását befolyásolhatják, növelhetik vagy gátolják.. A humán gyógyászatban alkalmazott gyógyszerek hatásmechanizmusának felderítését és a vegyületek in vivo metabolizmusának tanulmányozását, szinte minden esetben állatkísérletekben végzik és erre a célra leggyakrabban patkányt használnak. Ezért első vizsgálati körben a humán gyógyászatban alkalmazott trankvilláns vegyületeknek a hatását vizsgáltam arra nézve, hogy okoznak-e a GST enzim aktivitásban változást, a laboratóriumi patkányban. Másrészt ettől tettem függővé illetve az eredmények alapján kívántam meghatározni a további kutatásaim irányvonalát is. A pozitív eredmények tükrében terjesztettem ki a vizsgálatokat más fajokra, három újabb gyógyszerre és azok GSH konjugátumaira is. A kísérleteket a gyakorlati hasznosíthatóság reményében, gazdasági jelentőségű haszonállatokon és az állatgyógyászatban is alkalmazott szerekkel folytattam. Ezért kevesebb a laboratóriumi patkányon végzett vizsgálatok száma.

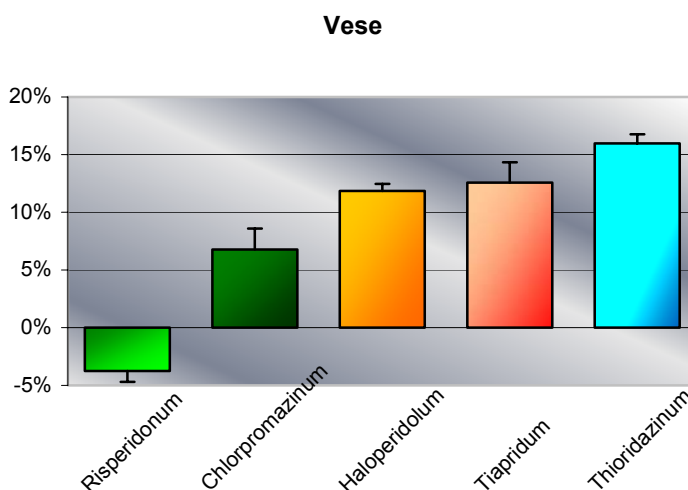
Mint ahogy az várható volt a kontroll patkányok májából nyert homogenizátumban található a legmagasabb GST specifikus enzimaktivitás; 7563 ± 56 , unit (egység: $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)., majd azt a vese (656 ± 24), agytörzs (491 ± 27) és a lép (482 ± 47) követte. A nyolc napos trankvilláns kezelés után valamennyi gyógyszer hatására, - kivétel a *Risperidonum*- szignifikáns GST specifikus enzim aktivitásnövekedés következett be. A legnagyobb emelkedést a *Haloperidolum* ($40,5 \pm 8$ %) okozta, majd azt a *Chlorpromazinum* ($32,2 \pm 5$ %), a *Thioridazinum* ($16,6 \pm 6,2$ %) *Tiapridum* ($11,2 \pm 2$ %) és *Risperidonum* ($7,3 \pm 2,5$ %) követte.



**22. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra patkány májban.
Kontroll : 7 563 Unit**

Érdekes azonban az, hogy a *Thioridazinum*, *Tiapridum* és a *Risperidonum*, amely vegyületek nem tartalmaznak halogén szubsztitúciót, mégis fokozták a GST enzim aktivitást. Feltételezzük, hogy ezeknek a vegyületeknek a metabolikus intermedierei azok amelyek kifejtik az induktív hatást. A *Risperidonum* és a *Tiapridum* tartoznak az új generációs trankvilláns vegyületek közé. Ezeknek a gyógyszereknek jelentősen kevesebb mellékhatása van mint a többi vegyületnek. Feltehetően intermedierei sem terhelik meg oly mértékben a detoxikációs mechanizmusokat mint a többi vegyület. A jelentősen kisebb számú mellékhatás összefüggésben állhat a kisebb GST indukcióval is.

A vesében bár kisebb mérvű, de szintén enzim aktivitás növekedés volt megfigyelhető a gyógyszeres kezelések után.

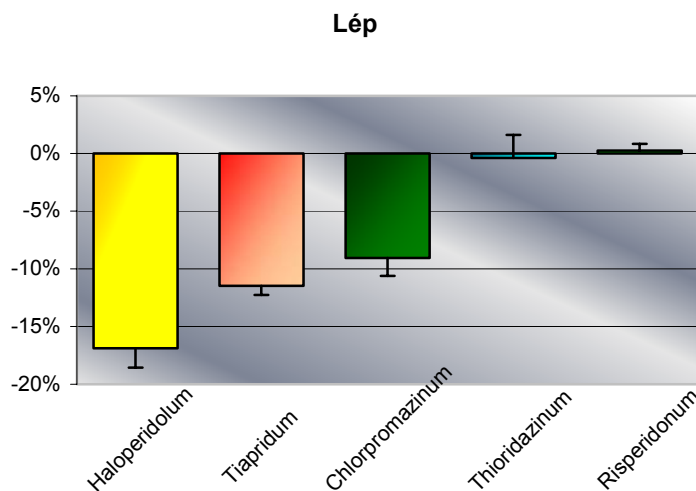


**23. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra patkány vesében.
Kontroll : 656 Unit**

Kivétel csak *Risperidonum* kezelés után mutatkozott, ez a gyógyszer nem szignifikáns, de enzimaktivitás csökkenést okozott ($-4,2 \pm 1,8$ %) A többi gyógyszer GST enzim induktív hatása nem azonos sorrendben jelent meg mint a májban. Ebben a szervben a *Thioridazinum* volt a legerősebb induktor (16,4 %), azt a *Tiapridum* (13,1 %) majd a *Haloperidolum* (12,4 %) és *Chlorpromazinum* (6,8 %) követte. Feltételezhetjük, hogy a *Thioridazinum* és a *Tiapridum* vízdékony intermedierei -amelyek a vérkeringéssel juthatnak a veséhez- tehetők felelőssé a GST enzim aktivitás növekedéséért. Mindemellett mivel az intermedierek vagy az anyavegyület is eljut/eljuthat a vesébe a keringés révén, ezeknek a vegyületeknek szervezetből való eltávolítása is megtörténhet a vesén keresztül.

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. A választ erre csak metabolizmus vizsgálatokkal kaphatnánk, ami viszont túlmutat a disszertációm keretein. Az sem kizárt, hogy más detoxifikációs mechanizmusok kerülhettek előtérbe az adott szervben, tehát a GST gén expressziója csökkenhetett, amelyre feltételezhetően ezekben az esetekben nem volt olyan mértékben szükség.

A lép, a nyirok rendszer fontos eleme és főleg az immunvédekezésben szerepet játszó monocitákat, makrofágokat, karéjos fehérvérsejteket és lymphocitákat tartalmaz nagy számban. Ebben a szervben, -az új generációs *Risperidonum* és a hagyományos *Thioridazinum* kivételével-, valamennyi más vizsgált gyógyszer jelentős GST enzimaktivitás csökkenését okozott.

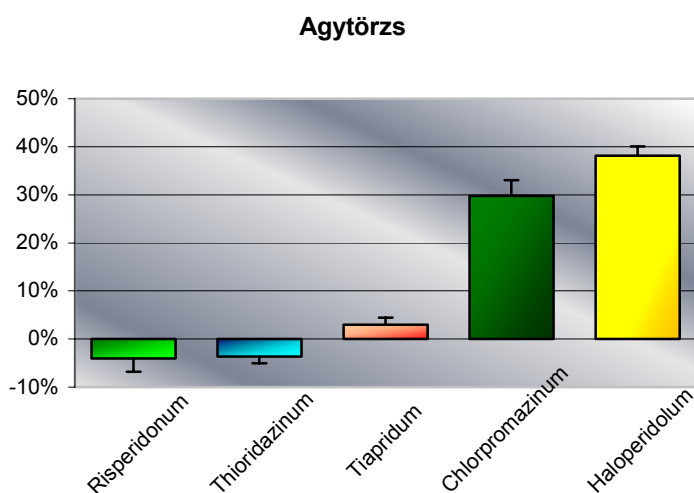


**24. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzimaktivitásra patkány lépében.
Kontroll: 482 Unit**

A *Haloperidolum*, amelyik a májban és a vesében a legnagyobb mértékben növelte az enzim aktivitást, ebben a szervben viszont jelentősen csökkentette (- 17,3 %). Ennek mi a pontos magyarázata nem tudjuk, de a hisztológiai vizsgálatok arra utalnak, hogy jelentős mérvű sejtszám csökkenést okoznak a lép szövetben ezek a vegyületek. Lehet, hogy éppen azok a sejtek tűnnek el a lépből, amelyek a GST enzimet expresszálják. Másrészt, éppen ezek a szerek amelyek a nagymérvű gátlást okozták a GST aktivitásban, in vitro modulálják, többnyire gátolják az immunsejtek normális

működését, az interleukinok által kiváltott sejtválaszokat csökkentik. Elképzelhető az is, hogy ezek a gyógyszerek a Dopamin receptoron keresztül módosítják a fehérje- így többek között a GST enzim szintézisét is (VARGA V. személyes közlése).

A neuroleptikumoknak –hatásukkal összefüggésben– a legfőbb támadáspontja a központi idegrendszer. A hatásukat többnyire a plazma membránhoz kötött transzporterek, receptorok és a receptorokhoz kapcsolt G-proteineken keresztül fejtik ki. Módosíthatják az intracelluláris eseményeket, celluláris válaszokat. Számos publikáció tárgyalja ezen vegyületek receptor kötődését. Azonban nincs adat arra nézve, hogy ezek a vegyületek metabolizálódnak-e az agyszövetben vagy azok metabolitjai megjelennek-e ott, vagy éppen maguk a metabolitok tehetőek (-vagy legalább részben-), felelőssé a farmakológiai hatásokért, vagy a mellékhatásokért. Feltételezésünk az volt, hogy a trankvilláns vegyületek metabolizálódhatnak az agyszövetben, és hogy azok glutation-S-konjugátumai is megjelenhetnek ott, ha a GST enzim is jelen van a szövetben. Ezért először azt vizsgáltam, hogy jelen van-e a GST az agyszövetben és hogy a gyógyszeres kezelések okoznak-e változást a GST enzim aktivitásában. Mivel az agytörzsi formatio reticularis elektromos aktivitását, -illetve gyógyszereknek, valamint azok GSH-konjugátumaimainak-, arra kifejtett hatását is vizsgálni kívántam, ezért a GST enzim aktivitás mérésekbe a KIR agytörzsi régióját vontam be elsősorban.



**25. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra patkány agytörzsben.
Kontroll : 491 Unit**

Az agytörzs GST specifikus enzim aktivitása egy nagyságrenddel kisebb mint a májszöveté (IU: 491 illetve 7563 egység). Azonban ebben a szövetben is a két –legtöbb mellékhatást kiváltó– hagyományos neuroleptikum, a *Chlorpromazinum* és a

Haloperidolum jelentős enzim aktivitás növekedést, indukciót hozott létre (~39 és ~30 %). A másik három vizsgált vegyület azonban nem indukált értékelhető változást a kontrollhoz képest. Bár az agyszövet GST enzim aktivitása alacsonyabb mint a májszöveté, azonban azok a tények, hogy az enzim jelen van ebben a szövetben is, és hogy ezek a vegyületek szubsztrátjai a GST enzimnek, valamint hogy a vegyületek enzim indukciót okoznak az agyszövetben is, együtt alátámasztják azt a feltételezésünket, hogy a vegyületek glutation-S-konjugátumai képződhetnek in loco az agyszövetben is. Ezek alapján tehát, érdemes a konjugátumok élettani hatását is vizsgálni, pl. az agytörzsi formáció retikuláris bioelektromos tevékenységére is (lásd később).

4.4 *Trankvilláns vegyületek hatékonyságának vizsgálata házinyúlban*

4.4.2 *Trankvillánsok hatása az állatok viselkedésére*

A trankvilláns kezelések hatása mindegyik csoportban jól látható változásokat idézett elő. Nyulakon (és a patkányokon is) a trankvilláns gyógyszeres kezelések hasonló tüneteket váltottak ki mint amelyek az embernél is megfigyelhetők. Ez többnyire a kezeléseket követő egy órában volt tipikusan megfigyelhető (l. később, akut hatások). Az aktivitás, a motilitás csökkent, gyakran inaktivitás, aluszékonyság volt megfigyelhető, a külvilági ingerekre adott válaszreakciók csökkentek. Általában elmondható, hogy a kontroll állatok súlygyarapodásához képest minden kezelt állatcsoportban lemaradás volt tapasztalható, de némely gyógyszer esetén szignifikáns testtömeg csökkenést figyeltünk meg (lásd később).



Kontroll állat



Tiapridum kezelés után

26. ábra. *Tiapridum* kezelés hatása a nyúlban

Változások a testtartásban: lehajtott fej, lekonyuló fülek, a szem részlegesen lecsukódva, a hát felpúposodva, a lábak széles terpeszben

Forrás: Saját fotó.

4.4.1 A motilitás mérőrendszer tesztelése

A mérőrendszerbe két típusú érzékelő szenzort építettem be. A láda talapzatába piezo-elektromos rezgésérzékelőt, az oldalfalára pedig infravörös mozgásérzékelőt. A célom a két típusú érzékelő alkalmazásával, hogy az állat tényleges és valamennyi mozgását, elmozdulását rögzítsem. Méréseim alapján azt tapasztaltam, hogy a piezoelektromos érzékelő nem regisztrálta pl. a fej elmozdítását akkor, ha az állat egyhelyben maradt, ugyanakkor az infravörös érzékelő már ezt a mozdulatot is regisztrálta, de nem regisztrálta pl. a ki- és belégzési mozgásokat ha az állat teste nem mozdul el a talapzaton.

A rendszer további funkciója, hogy az érzékelők által rögzített jeleket digitálisan tárolja és feldolgozza. Ehhez olyan szoftvert fejlesztettem, amely a regisztrálás mellett alkalmas arra is, hogy a mozgások változását, időbeli eloszlását is kövesse.

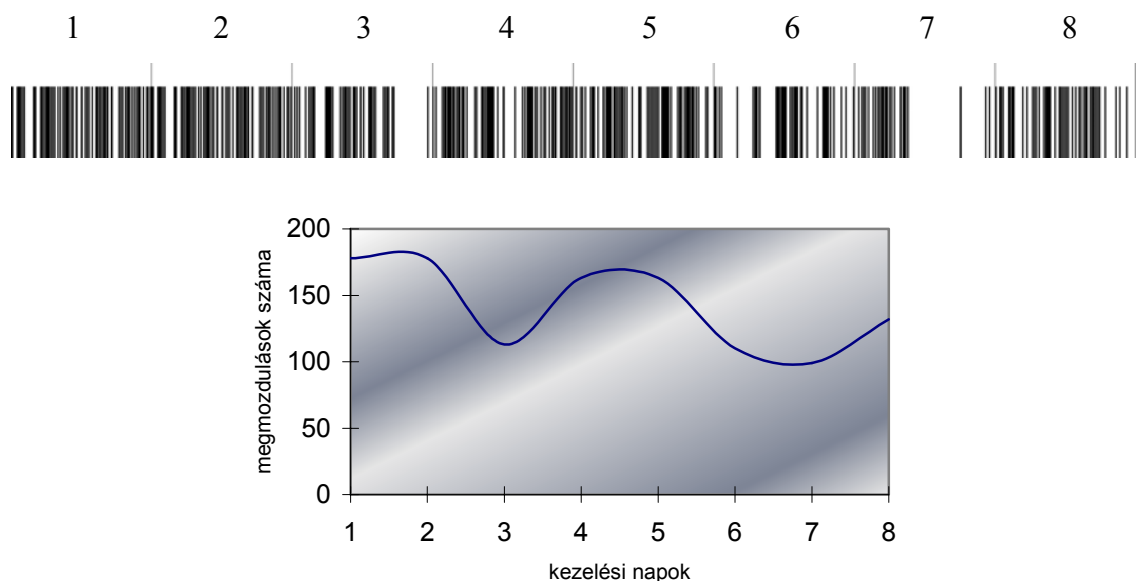
Vizsgálataim során bebizonyosodott, hogy a rendszer (hardver és szoftver) alkalmas a tervezett mérések elvégzésére. A laboratóriumi mérések során objektív és megbízható adatokat nyertünk az egyes gyógyszerek hatásvizsgálatához (lásd a következő fejezetekben).

Összefoglalva tehát, fontos eredménynek tartom azt, hogy az általam tervezett és megépített motilitás detektáló rendszer alkalmas az állatok mozgási aktivitásának és a gyógyszerek arra kifejtett hatásának vizsgálatára.

4.4.2 A trankvillánsok hatása az állatok motilitására

Általánosan ismert tény az, hogy az állatokkal való foglalkozás, pl. a kézbe vétel, a kezelések elvégzése, de önmagában csak az új helyre (pl. a motilitás mérő rendszerbe) való elhelyezés következtében, lényegesen megnő az állatok motilitása. Ez magyarázható azzal, hogy új stresszhatások érik az állatot, pl. félelem az embertől, a fájdalomtól, de önmagában az új terep felderítésére irányuló érdeklődés is mozgásfokozódást eredményez. A kísérletek során ezt magunk is tapasztaltuk. Továbbá az is szembetűnő volt, hogy az egyes egyedek magatartásában és motilitásában lényeges különbségek voltak. Ezért a trankvillánsok hatását vizsgálandó mindig megmértük az egyes egyedek motilitását a kezelések előtt és után is. A kezelések előtti adatokhoz hasonlítottuk mindig a kezelések utáni értékeket. A gyógyszerek hatásának tesztelésére, két különböző módot illetve időpontot választottam a motilitási tesztek elvégzésére, nevezetesen a kezelést követő egy óra letelte után valamint a kezeléseket követő 23.-ik, 24.-ik órát. Az elsőben az akut, míg a másodikban többnyire a hosszan tartó hatásokat elemeztem, illetve a hosszabb kezelések (8 napos) hatását kívántam vizsgálni.

Az eredmények bemutatására két különböző ábrázolási módot választottam. Az ábrák felső részén az egyes napokon külön-külön, a mozgásdetektorok által mért megmozdulásokat tüntettem fel, amelyeket a mikrokontrolleres adatfeldolgozásokból nyertem (függőleges csíkok a megmozdulások, a kiemelkedő vonalak az egyes mérési napok határa). Az ábra alsó részén a grafikon a kezelési (nyolc napos) időszakban mért megmozdulások összegét (y-tengely) és a kezelési napokat ábrázolja (x-tengely).

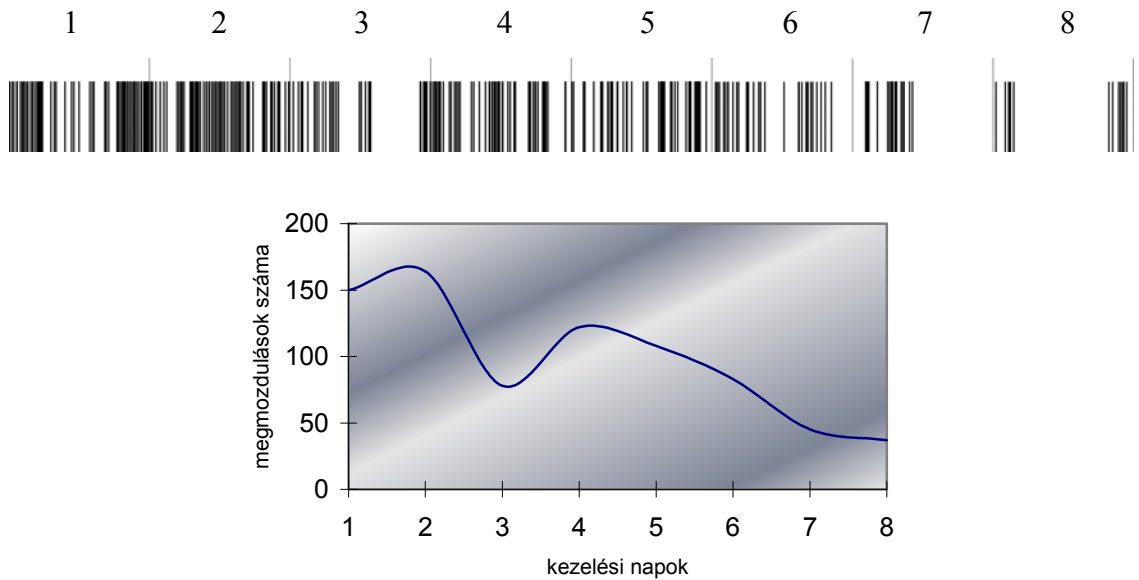


27. ábra. A kontroll motilitás frekvenciája

A kontroll állatok esetében egy lassú, de szignifikáns motilitás csökkenést figyeltünk meg a nyolc nap folyamán. A nyolcadik nap végére már mintegy ~ 26 % -kal csökkent az állatok mozgása. Ezt azzal magyarázhatjuk hogy a kísérleti állatok lassan kezdenek hozzászokni a mérési körülményekhez.

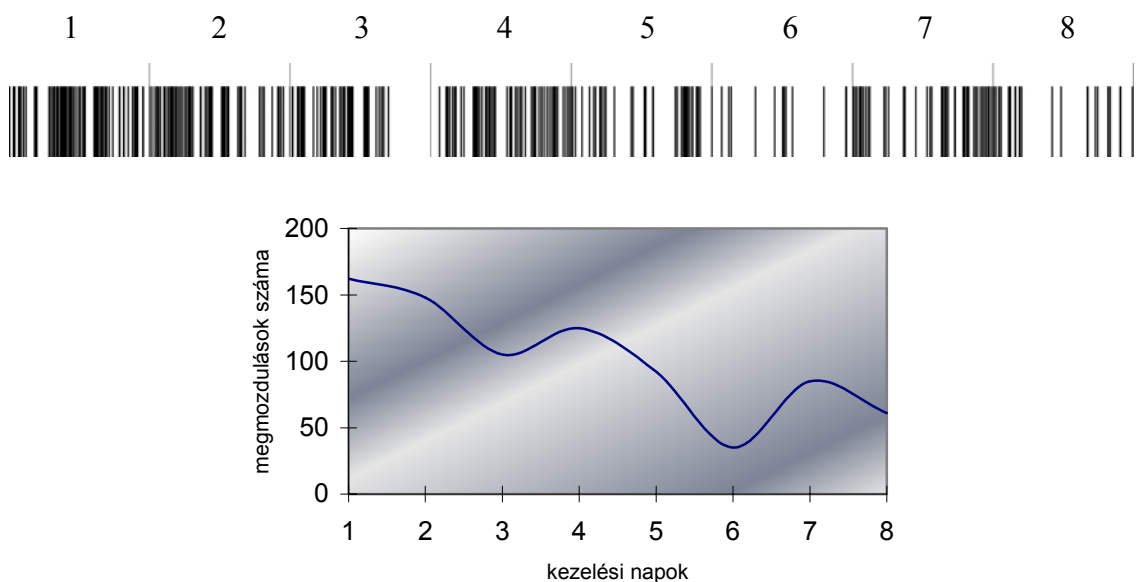
A gyógyszeres kezelések során az akut kísérletekben a vizsgált vegyületek szinte kivétel nélkül igen hatásosan befolyásolták az állatok viselkedését. Hasonló tüneteket váltottak ki mint az embernél. A motilitás csökkent, gyakran inaktivitást regisztráltunk, a külvilági ingerekre adott válaszreakciók csökkentek, aluszékonyság volt felfedezhető a gyógyszerek subcután injektálása után. A motilitás mintegy 85-98 %-kal csökkent az abszolút kontrollhoz és az önmagukhoz (a kezelések megkezdése előtt mért adatokhoz) képest is. Az akut hatások és tünetek meglehetősen nagy variabilitást mutattak. De a motilitás csökkentő hatás erősségében a *Diazepam* > *Tiapridum* > *Thioridazinum* > *Chlorpromazinum* > *Haloperidolum* > *Acepromazinum* > *Xylazin* sorrend állítható fel.

A kezelések utáni 23-24-ik órában mért motilitási tesztekben viszont, két egymástól jól elkülöníthető gyógyszerhatás spektrumot figyeltünk meg. Az egyik karakterisztikus vonás az volt, hogy a kezelések elején az akut hatás lassan eltűnt a nap végére, de ennek ellenére az állatok szemmel láthatóan nyugodtabbak voltak mint bármelyik másik csoportban az egész nap során. Ebbe az első csoportba sorolhatjuk a *Thioridazinummal*, *Haloperidolummal* és a *Chlorpromazinummal* kezelt állatokat. Ebben a kezelési csoportban a következő napokban egyre inkább megjelentek, az akut hatásra emlékeztető tünetek és fokozatosan, egyre erősebben érvényesült a motilitást csökkentő hatás a 24 óra letelte után is, (de fogalmazhatunk úgy is, hogy inkább megmaradnak a gyógyszerek beadását követő egy órán túl is, tehát az akut tünetek, bár csökkenő tendenciát mutattak, de fennmaradtak a továbbiakban is). Ez a motilitás csökkentő hatás a nyolcadik napra már eléri a 70-80 %-ot. A *Thioridazinum* ~80 %-kal a *Haloperidolum* ~75 %-kal és a *Chlorpromazinum* ~72 %-kal csökkenti a motilitást (28., 29. és 30. ábrák).



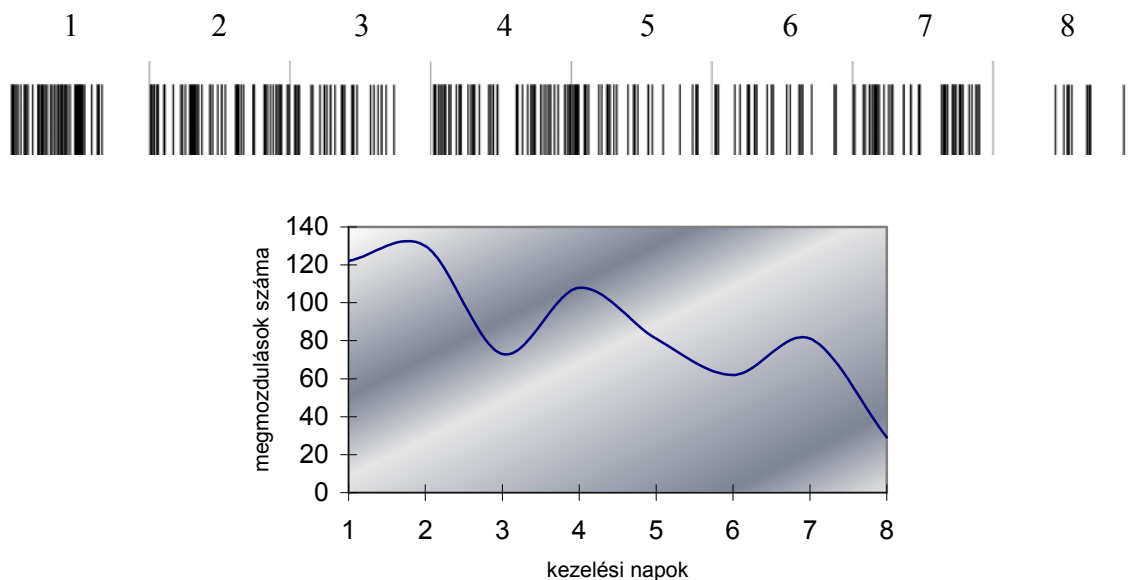
28. ábra. *Thioridazinum* kezelés hatása a motilitás frekvenciára

Világosan megfigyelhető a motilitás csökkenés, már a kezelések kezdeti időszakában is, ami szinte lineárisan csökken a nyolcadik napig. A *Thioridazinum* az állatgyógyászatban nem alkalmazott vegyület. A hatásprofilján azonban úgy tűnik hasonlóan hatékony nyulaknál mint a már bevált gyógyszerek. A vizsgált napok közül előforduló legnagyobb aktivitáshoz képest az utolsó kezelési nap értéke 77%-os aktivitáscsökkenést mutatott, hasonlóan a *Chlorpromazinum*hoz.



29. ábra. *Haloperidolum* kezelés hatása a motilitás frekvenciára

A *Haloperidolum* graduális és folytonos csökkenést idézett elő a nyolc nap folyamán. Láthatóan nem kellett több napnak eltelnie a mérhető aktivitáscsökkenésig. A hatékonyság az eltelt napokon folyamatosnak mutatkozott, közel lineárisan. A vizsgált napok közül előforduló legnagyobb aktivitáshoz képest a 8. kezelési napon 62%-os aktivitáscsökkenés figyelhető meg.



30. ábra. *Chlorpromazinum* kezelés hatása a motilitás frekvenciára

A *Chlorpromazinum* szignifikáns csökkenést idézett elő már a második naptól kezdődően. Ez a csökkenés folyamatosan megfigyelhető volt az utolsó vizsgálati napig. A grafikon nagyon hasonló a *Haloperidolum* okozta változáshoz és az értékeiben sem különbözik jelentősen. Pedig a két vegyület jelentősen eltérő szerkezetű (dimetilamin és butirofenon származék). A vizsgált napok közül előforduló legnagyobb aktivitáshoz képest a 8. kezelési nap értéke 78%-os aktivitáscsökkenést mutatott.

Ebben, 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.

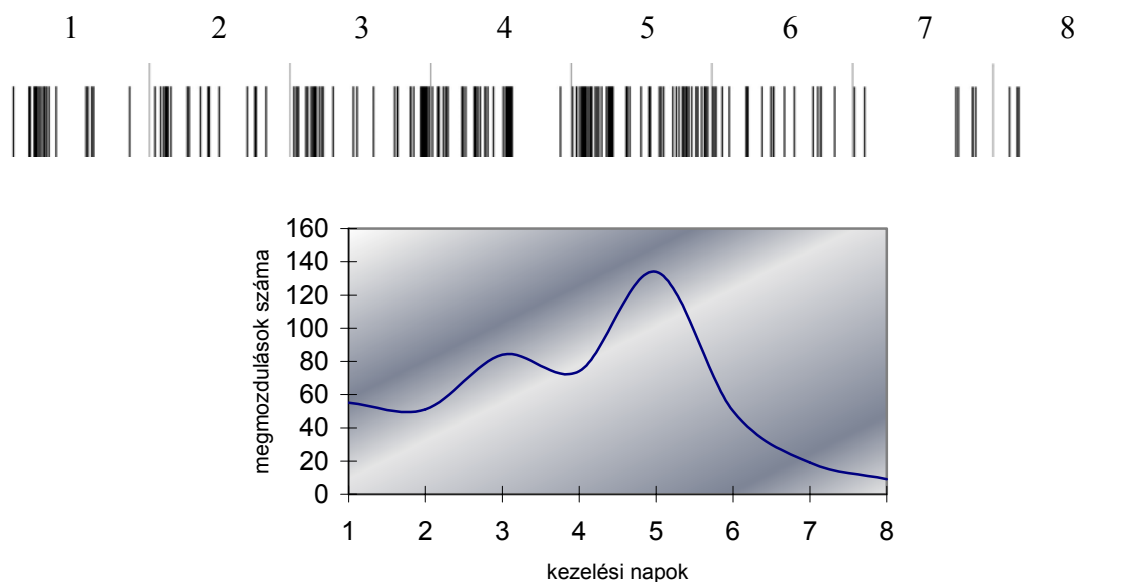
Érdekes az a megfigyelés, hogy a humán terápiás hatásokhoz hasonlóan a nyulaknál is csak pár napos kezelés után jelenik meg egy kb. 50%-os motilitás csökkenés kifejlődése. Tehát az itt megfigyelt változások is arra utalnak, hogy a neuroleptikus gyógyszerek hatása fokozatosan kumulálódik a kezelési napok során. Az első csoport

állatainál talált lassú, graduálisan megjelenő mozgás frekvencia csökkenés, nagyon hasonló, sőt jó egyezést mutat a *Haloperidolummal*, *Chlorpromazinummal* és *Thioridazinummal* kezelt pszichotikus betegeknél a farmakológiai, antipszichotikus hatás megjelenésével. Ezeknél a betegeknél is csak pár napos kezelése után manifesztálódik az antipszichotikus hatása a trankvillánsoknak. 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 D₂ 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.

Miért fokozódik akkor mégis a trankvilláns hatás a későbbi napokon? Erre több magyarázatot is adható. Először az, hogy a gyógyszer adagolás során az egyre fokozódó glutation szintézis ellenére lecsökken a szabad glutation szint, ezért a konjugáció sem játszódik le minden molekula esetében, tehát növekedhet a szabad trankvilláns koncentráció. Másrészt ha a konjugáció lejátszódik akkor a keletkező glutation-S-trankvilláns konjugátumok koncentrációja is nőhet, amelyekről feltételezzük,

hogy szintén neuroaktív vegyületek lehetnek. Ezt bizonyítja az is, hogy némely esetben, maguk a glutation konjugátumok is hatásosan csökkentik az állatok motilitását (lásd. 46-53. ábra). Az sem zárható ki azonban, hogy a konjugátumok pl. a vesébe eljutva ott újra felszívódhatnak a különböző anion-, kation transzportáló mechanizmusok révén, azaz a vérkoncentráció huzamosabb ideig is fennmaradhat. Ezáltal a farmakológia hatás is sokkal hosszabb ideig fennmaradhat.

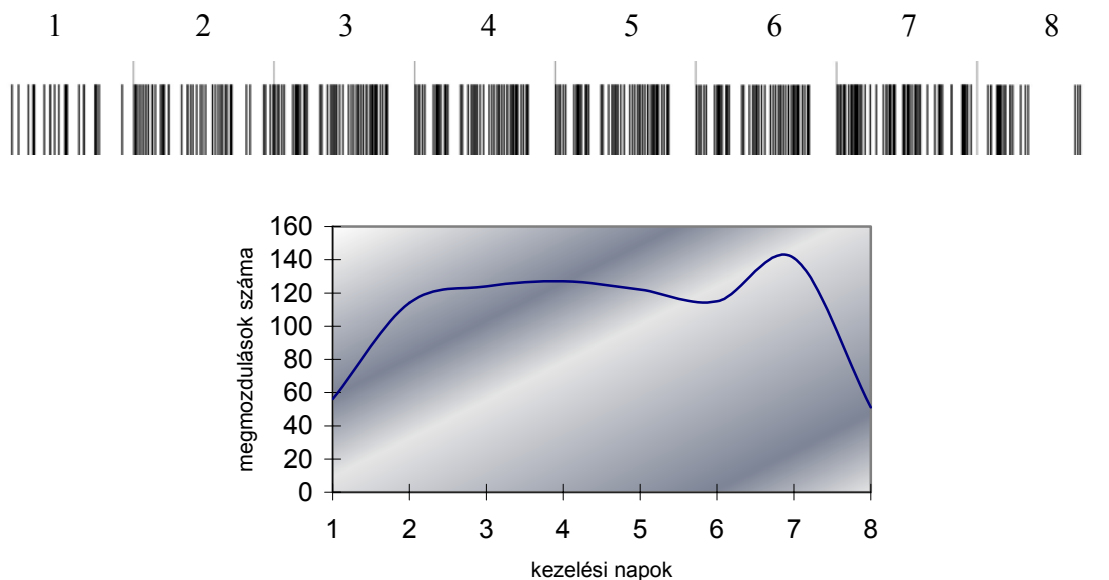
A másik csoportba egy másféle hatás spektrum alapján sorolhatjuk, a *Tiapridum*, *Risperidonum*, *Acepromazinum*, *Xylazin* és a *Diazepam* gyógyszereket. Annak ellenére, hogy az akut hatások igen hasonlóak voltak mint az első csoport esetében, az ezekkel a gyógyszerekkel kezelt nyulaknál, a kezelés első napjának végén lényegesen alacsonyabb volt a motilitás (30-70 %-kal), mint a kezelés előtt (saját kontrolljuk) a kontroll (nem kezelt) vagy éppen a másik kezelési csoportba tartozó egyedek adataihoz hasonlítva (31. - 35. ábrák). Azonban az első nap/napok utáni szignifikáns mozgásszegényebb állapot után szinte kivétel nélkül egyfajta mozgásfokozódás, aktivitás növekedés figyelhető meg. Ez a fokozódás többnyire egy csúcsot ér el és azt követően csökkenés volt megfigyelhető. A nyolcadik napra pedig újra egy mozgásszegényebb állapot következett be



31. ábra. *Tiapridum* kezelés hatása a motilitás frekvenciára

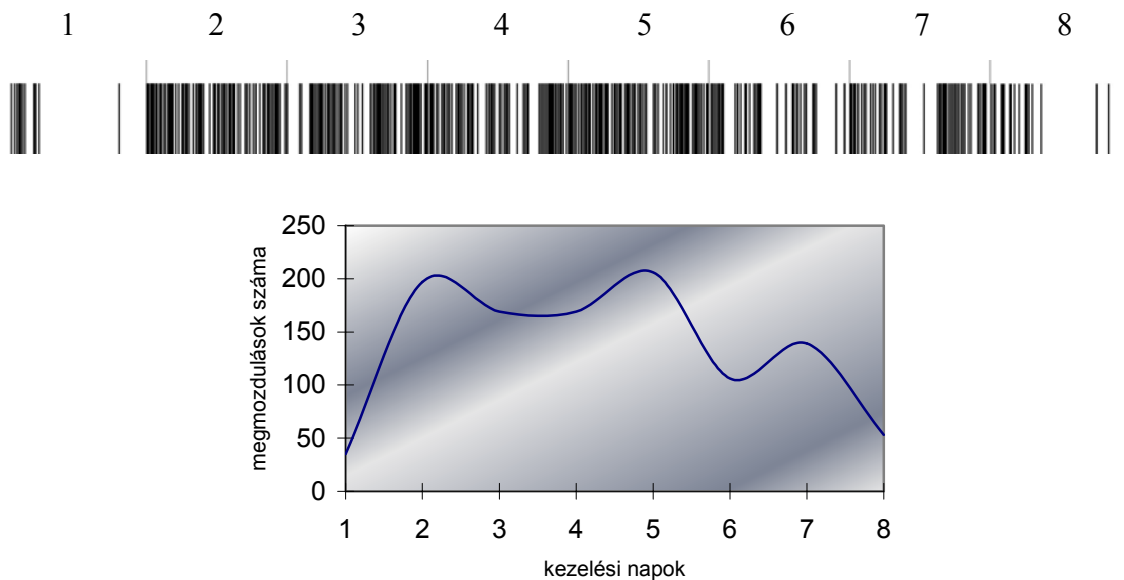
Az „új típusú” neuroleptikum, a *Tiapridum* kezelések hatására bifázisos motilitás változást regisztráltunk. Az első két nap mozgásszegény állapot után egy markáns motilitás fokozódás következett (csúcs az ötödik napon), majd folytonos csökkenés

figyelhető meg. A vizsgált napok közül előforduló legnagyobb aktivitáshoz képest a 8. kezelési napon 93%-os aktivitáscsökkenést idézett elő a gyógyszer, ami kiváló eredménynek tekinthető



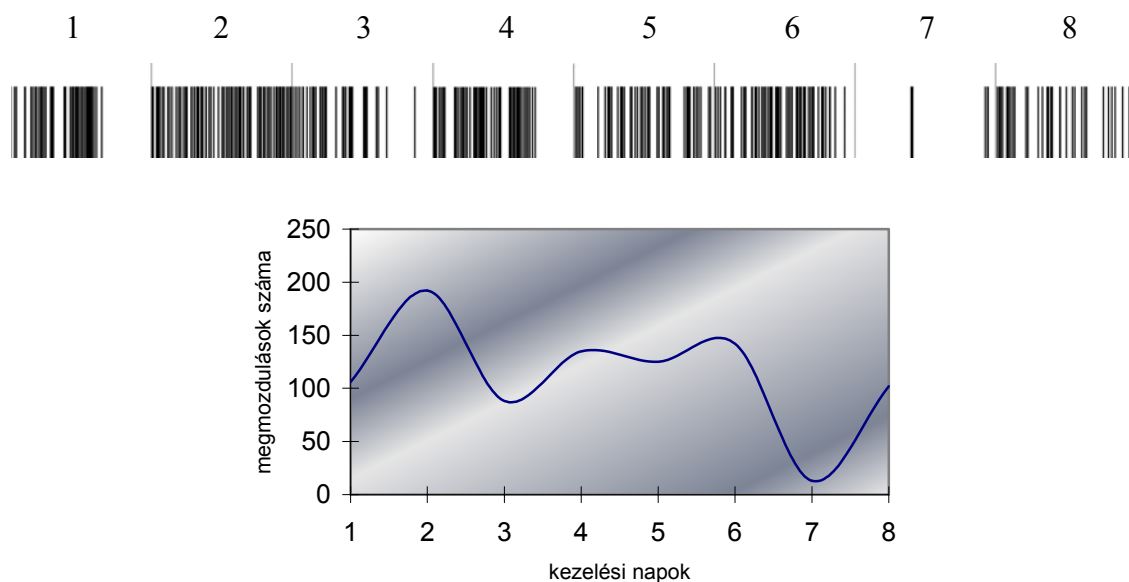
32. ábra. *Risperidonum* kezelés hatása a motilitás frekvenciára

A szintén „második generációs” benzoxazol-piperidin-piridopirimidin származék *Risperidonum* az első nap utáni kezdeti aktivitásfokozódás után csak a hetedik naptól idézett elő számottevő csökkenést a mozgás aktivitásban. Így a gyógyszer hosszú távú hatása itt is csak későbbi napokon érvényesült, hasonlóan mint a *Tiapridum*-nál. A vizsgált napok közül előforduló legnagyobb aktivitáshoz képest a 8. kezelési napon 64%-os aktivitáscsökkenést idézett elő.



33. ábra. Diazepam kezelés hatása a motilitás frekvenciára

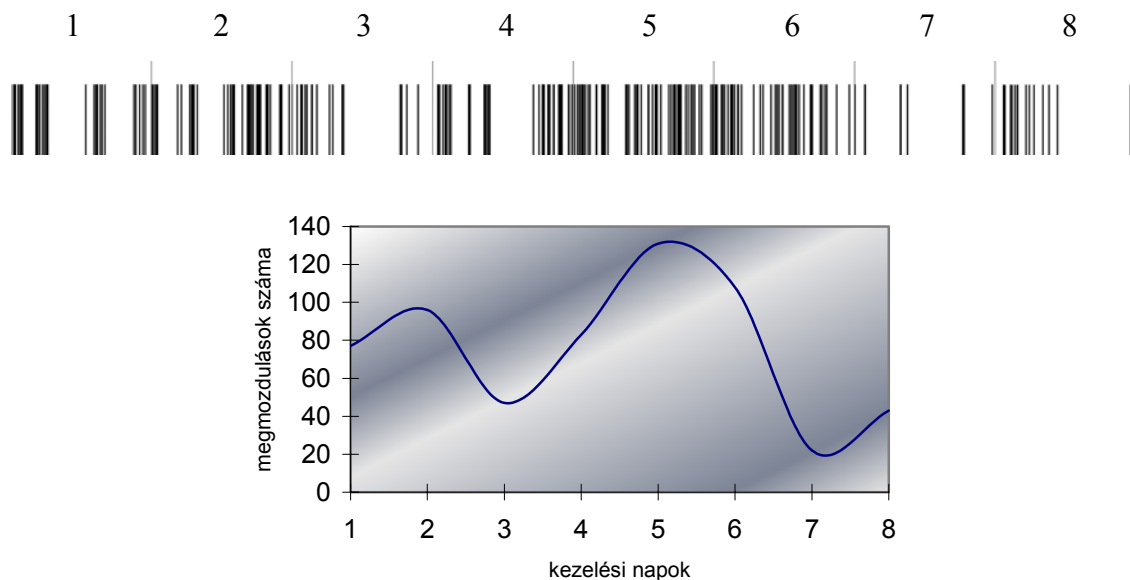
A *Diazepam* rendkívül elterjedt mind humán mind állatgyógyászati területen. Az első napon igen jelentős motilitás csökkenést tapasztaltunk, de a várakozásokkal ellentétben a második naptól kezdődően inkább agitációt okozott az állatoknál. Határozott csökkenést csak a hatodik naptól kezdődően váltott ki, azt követően pedig egyre csökkent a mozgás. A vizsgált napok közül előforduló legnagyobb aktivitáshoz képest a nyolcadik napon már 74%-kal csökkent az aktivitás.



34. ábra. Xylazine kezelés hatása a motilitás frekvenciára

A *Xylazin* a vizuális megfigyelések alapján is igen hatékonynak bizonyult akut kísérletekben. Azonban a hatás viszonylag hamar elmúlt és 24 óra elteltével már alig volt

hatása a vegyületnek. A következő napokban is csak kisebb motilitás csökkenést okozott. A vizsgált napok közül előforduló legnagyobb aktivitáshoz képest az utolsó kezelési nap értéke mindössze 47%-os aktivitáscsökkenést mutatott.



35. ábra. *Acepromazinum* kezelés hatása a motilitás frekvenciára

Az *Acepromazinum* hosszú távú hatásában is viszonylag nagy variációt tapasztaltunk. Az első és második napi kismértékű csökkenés után a harmadik napon már kisebb aktivitást, de azt követően az ötödik napon újra a kontrollhoz hasonló értéket regisztráltunk. A hetedik és nyolcadik napon pedig szintén jelentős csökkenés volt megfigyelhető. A vizsgált napok közül előforduló legnagyobb aktivitáshoz képest az utolsó kezelési napon mintegy 67%-os aktivitás csökkenést mértünk

Ebbe –a második csoportba– önkényesen besorolt vegyületek kémiai szerkezete, farmakokinetikája, gyógyszer mellékhatásai, metabolikus újtjai, egymástól igen különböznek. A benzamid származék *Tiapridum* a G-proteinhez kapcsolt D₂ receptor szelektív antagonistája, azonban igen jó anxiolitikus hatással is rendelkezik. Ugyanakkor mellékhatásai között megemlítik, 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 megemlítik, 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 betegeknél a benzodiazepinek agitációt váltanak ki, vagy idősebb arteriosclerotikus betegeknél 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 *Chlorpromazinum*éhoz. Azonban lényeges különbség az, hogy a fenotiazin gyűrűn nincs halogén szubsztitúció, viszont a hármas 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.

Ezek az adatok arra hívják fel a figyelmet, hogy bizonyos gyógyszerek annak ellenére, hogy jól bevált szerekről van szó, fajonként más-más hatásokat produkálhatnak. Ezért csak kellő elővigyázatossággal és megfontolással alkalmazhatjuk a különböző állatfajokon nyert kísérleti eredményeket közvetlenül a humán gyógyászatban. Másrészt mindenképpen figyelembe kell venni ezeknek a gyógyszereknek a hatásspektrumát, mellékhatásait az állatok kezelése során is. Nevezetesen azt, hogy rövid távú akut vagy esetleg hosszabb ideig fennmaradó hatásokat kívánunk elérni. Ezért fontos, a pontos kezelési stratégia kidolgozása arra vonatkozóan, hogy mi a cél. A második csoportba sorolt vegyületekkel nem biztos, hogy a legmegfelelőbb nyugtató hatásokat érhetjük el ha a kívánt hatást pl. három négy napon belül szeretnénk elérni. Ugyanakkor jelentős trunkvilláns hatást produkálnak viszonylag rövid időn belül, de hatásuk viszonylag hamar meg is szűnik. Ezeket a szereket inkább az akut pl. műtéti előkészítésre un. premedikációra alkalmazzák. Más szerekekkel kombinálva viszont kiválóan alkalmasak az állatok agykérgi, főleg fájdalom érzet kikapcsolására is, így alkalmazásukkal kisebb

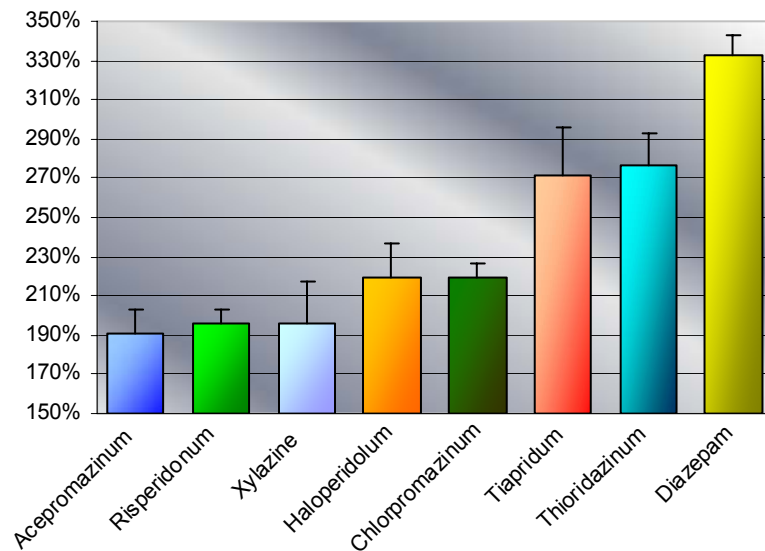
műtéti beavatkozások elvégezhetőek az állatokon. Továbbá az agresszív állatok teljes mértékben megszelídíthetőkkelé válnak ezekkel a gyógyszerekkel és viszonylag rövid időn belül kezelhetővé válhatnak.

4.4.2.1 Motilitás változás a kezelés végére a legaktívabb naphoz képest

Általánosságban megfigyelhető volt a kezelések során egy emelkedés az aktivitásban. Ez a környezet (vagyis a mérő doboz) fokozatos megszokásával, az idegen környezet okozta stressz csökkenésével magyarázható, habár a standard metodika szerint a mérések előtt hagytam 10 perc akklimatizációs időt. További magyarázatot adhat a gyógyszerek hosszabb távon kifejlődő, krónikus stresszoldó hatása is, amely segítségével könnyebben felülkerekedhetett a kíváncsiság és a környezet felderítésére irányuló motiváció a későbbi napokon. Ezért jellemzően előfordult egy mozgási kiemelkedő csúcs, a legaktívabb nap. Ehhez képest minden kezelésnél az utolsó nap jelentős csökkenést mutatott. Ennek különbsége a kontrollal összevetve jó mérőszámot adott a kezelés miatti motilitás változás mértékének megállapításához.

Ennél a kiértékelésnél (*lásd lejjebb*) figyelembe vettem a kontroll állatok mozgásának csökkenését a kezelési napok előrehaladtával. A vizsgált napok közül előforduló legnagyobb aktivitáshoz képest a 8. kezelési nap adata mindössze 26%-os aktivitáscsökkenést mutatott a kontroll csoportnál. Ez tehát a kezelési idő alatt a megszokás okozta érdektelenség.

Tehát meghatároztam az előforduló legaktívabb mérési adatot és különbséget képeztem a kezelés végén megfigyelhető aktivitással. Majd ezt az értéket a kontroll ugyanezen változásához képest százalékos arányban fejeztem ki.



36. ábra Motilitás csökkenésének aránya a kontroll változásához képest a kezelés végére

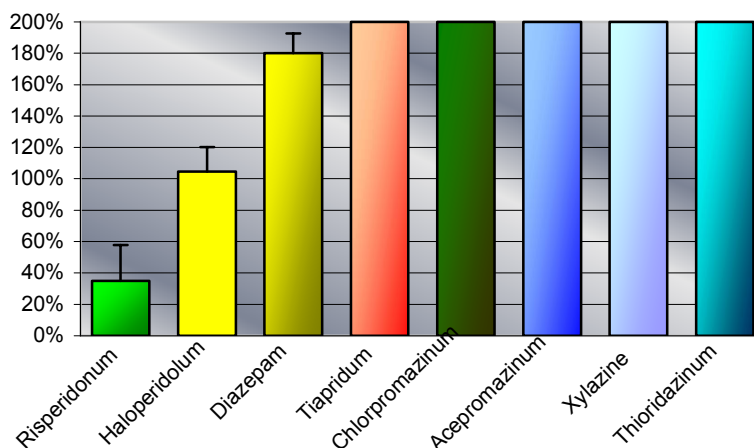
Látható, hogy mindegyik kezelés jelentősen (191 % – 333 %) csökkentette a motilitást a kontrollhoz képest. A leghatékonyabb vegyületnek ebben a kiértékelésben a *Diazepam* bizonyult. A gyógyszert igen gyakran alkalmazzák a humán és az állatgyógyászatban egyaránt. Hatékonyságát az eredményeim is alátámasztják. Meglepő azonban hogy az állatgyógyászatban rendkívül elterjedt *Xylazine* és még inkább az *Acepromazinum* jelentősen háttérbe szorult a hosszú távú hatékonyság szempontjából a vizsgált vegyületek között. Az állatgyógyászat területén egyáltalán nem alkalmazzák a *Thioridazinumot* és a *Tiapridumot*. Az előbbi „hagyományos” míg az utóbbi korszerűnek tekinthető „új típusú” neuroleptikum. A házinyúl esetében mindkét szer jó hatékonyságúnak bizonyult.

Fontos eredménynek tartom azt is, hogy az általam tervezett és megépített motilitás detektáló rendszer hatékonynak bizonyult a laboratóriumi mérések során és megbízható adatokat nyertünk az egyes gyógyszerek hatásvizsgálatához.

4.4.3 A trankvillánsok hatása a fájdalomérzetre (Hot-plate teszt)

A Hot-plate tesztrel a hő okozta fájdalomérzetet befolyásoló gyógyszerek, analgetikumok hatékonyságának tesztelésére alkalmazzák. Azonban szinte standard eljárásként alkalmazzák a pszicofarmakonok hatékonyságának vizsgálatában is. (MALMBERG and BANNON, 1999; MOGIL et al., 1999; WILSON and MOGIL, 2001). A tesztben az állatot forró lapra helyezük, amit a hő okozta fájdalom a forró lap elhagyására készítet. A forró lapra való helyezés és annak elhagyása között eltelt idő

összefüggést mutat az analgézia és a szedáció mértékével, vagyis a gyógyszerek hatékonyságával. Mivel az egyedek fájdalomérzete, toleranciája, vérmérséklete különböző lehet, ezért a tesztet a gyógyszeres kezelések előtt és után egyaránt elvégeztem és a nyert adatokat saját kontrollhoz (gyógyszeres kezelés előtt) és kontroll csoport adataihoz hasonlítva analizáltam.



37. ábra. A trankvillánsok hatása a fájdalomérzetre (Hot – Plate teszt).

Az Y tengelyen a %-os eltérést ábrázoltam. Az értékek a kontroll csoport illetve saját kontroll (kezelések előtti) adatokhoz viszonyított időintervallum növekedést jelentik százalékban kifejezve.

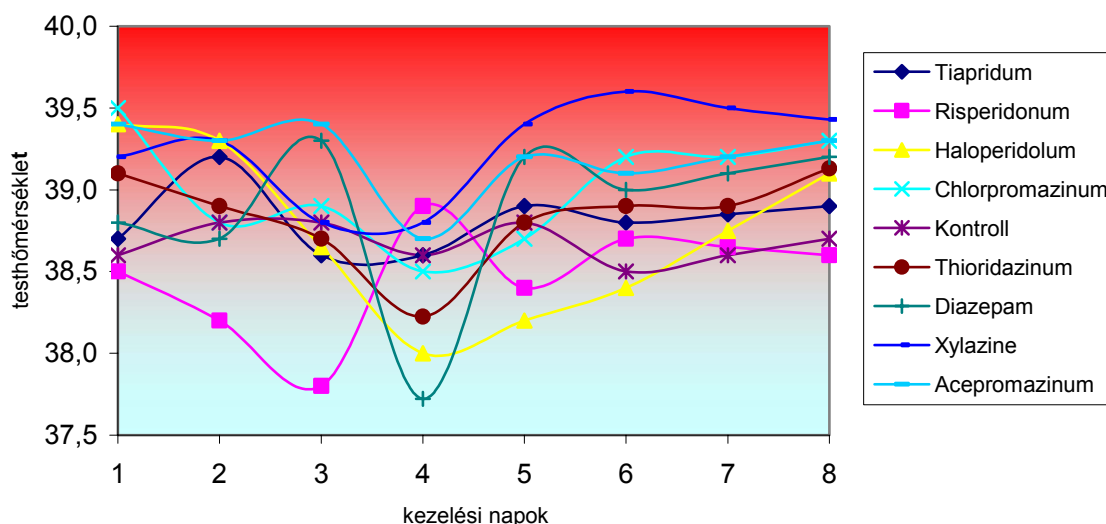
A mérések során ha az állatokat kezelés előtt is a „hot plate-re” helyeztem és ezt a tesztet megismételtem egy bizonyos idő eltelte után, akkor megfigyelhető volt, hogy az állatok hamarabb hagyták el a forró felületet mint korábban. Tehát ebben az esetben mondhatnánk „megtanulták” vagy emlékeztek a fájdalomra, amelyet elszenvedtek korábban. Ezért az abszolút kontroll csoportban mért adatokhoz hasonlítottam a későbbiekben a kezelt állatoknál mért reakcióidőt. Azonban valamennyi alkalmazott gyógyszer igen szignifikáns időeltolódást okozott valamennyi kezelt állat esetén.

A Fájdalomérzetet leghatásosabban a *Thioridazinum* és a *Xylazin* csökkentette, majd azokat az *Acepromazinum* > *Chlorpromazinum* > *Tiapridum* > *Diazepam* > *Haloperidolum* > *Risperidonum* követte. Ebben a tesztben az új típusú *Risperidonum* és a hagyományos neuroleptikum a *Haloperidolum* növelte meg legkevésbé a fájdalomérzet kialakulásához szükséges időintervallumot. Tehát ez a két gyógyszer önmagukban alkalmazva feltehetően a legkevésbé alkalmasak a fájdalomérzet csökkentésére. Mindkét vegyületet egyelőre csak humán gyógyászatban alkalmazzák. A *Diazepam* és a másik öt gyógyszer olyan mértékű fájdalomérzet csökkentést okozott, hogy azok már többszörösen

felülmúlták a normál reakció időt, (a 90 másodpercet), gyakorlatilag békésen pihentek az állatok a forró felületen. Itt azonban meg kell jegyezni hogy a Hot-Plate tesztnél az analgészia mértékét a szedatív hatások is jelentős mértékben befolyásolják.

4.4.4 Trankvillánsok hatása a testhőmérsékletre

Általában elmondható, hogy a vizsgált gyógyszerek nem okoztak dramatikus változást az állatok testhőmérsékletében. (maghőmérséklet). A *Risperidonum* az első három napon fokozatosan csökkentette az állatok hőmérsékletét, de a negyedik nap után azok újra elérték a kontroll szintet. A *Haloperidolum* kezelés hasonlóan a *Risperidonum*hoz kezdetben csökkentette később pedig fokozatosan növelte azt. A legmagasabb testhőmérsékletet a *Xylazine* kezelések okozták, ami az ötödik nap után meghaladta a 39,5 °C –ot.



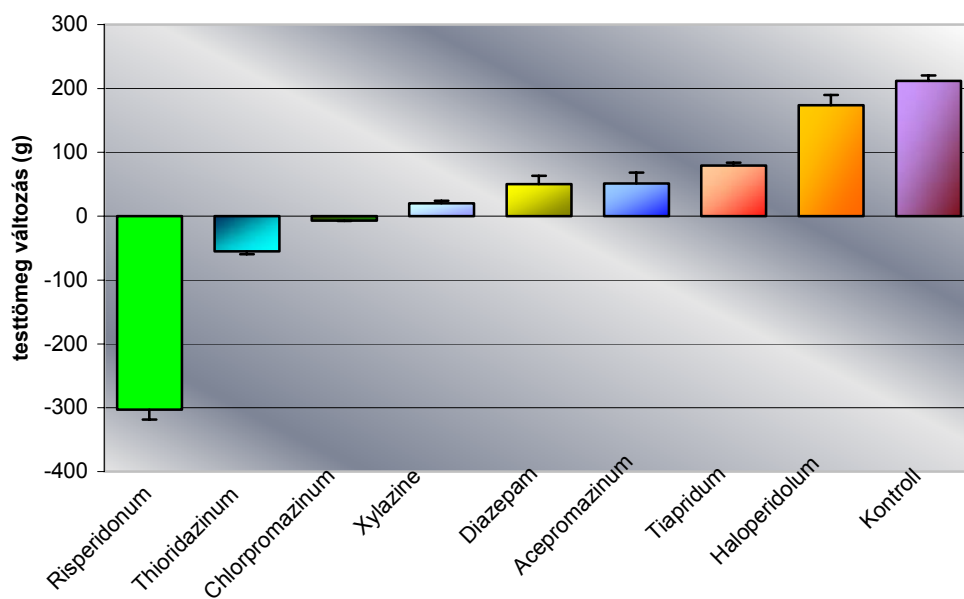
38. ábra. Testhőmérséklet változás házinyúlnál a nyolc napos kezelés alatt

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 izoenzimek hiányát teszik felelőssé. A megemelkedett trankvilláns 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 harántsíktolt szkeletális 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 figyelhattunk volna meg a nyulak esetében is.

4.4.5 Trankvillánsok hatása a testtömeg változásra

A testtömeg változás vizsgálata figyelemreméltó eredményt mutatott. Kivétel nélkül minden kezelés a súlygyarapodás elmaradását idézte elő a kontrollhoz képest. Három gyógyszer pedig súlycsökkenést.



39. ábra. A házinyulak testtömeg változása a nyolc napos kezelés után

A *Risperidonum*, amelyet széles körben alkalmaznak a humán terápiában, a nyulaknál jelentős súlyvesztést idézett elő. A fogyás mértéke meghaladta azt az értéket is mint amennyivel ugyan ezen idő alatt a kontroll csoport gyarapodott. Ezzel szemben a humán terápiás tapasztalatok a kezelt betegek gyakori elhízásáról számolnak be.

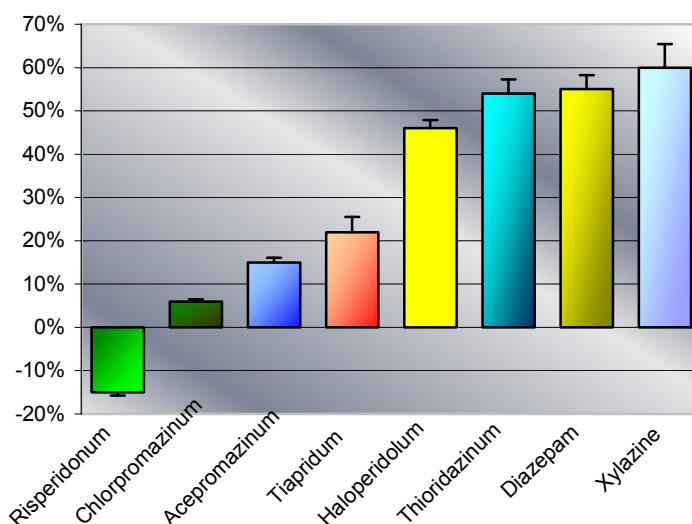
Szintén fogyást okozott a klasszikus neuroleptikum, a *Thioridazinum* és a *Chlorpromazinum* is. Az új generációs *Tiapridum* csak kismértékű testtömeg gyarapodás elmaradást okozott. Mivel nem mértem az elfogyasztott táp mennyiségét, messzemenő

következtetéseket nem tudok levonni arra vonatkozóan, hogy a táplálék felvétel csökkent-e vagy a táplálék hasznosítása volt rosszabb az egyes csoportokban. Az összes kezelt csoport táplálkozott, és nem figyeltünk meg lényeges különbséget az elfogyasztott takarmány mennyiségét illetően. A táplálékfelvétel többnyire csak a kezeléseket követő 1-2 órában az akut fázisban volt láthatóan kevesebb. A felvett táplálék és folyadék mennyiségének mérése további adatokat szolgáltatna a hatás okának elemzéséhez.

4.5 Trankvillánsok GST indukciója házinyúlban

A házinyúl GST enzim specifikus aktivitása jelentősen (olykor két nagyságrenddel is) meghaladta a patkány szerveiben mért értékeket. Erre a pontos magyarázatot nem tudunk adni. Azonban elképzelhető, hogy az SPF Wistar patkányok, -amelyeket már hosszú évtizedeken keresztül, nemzedékeken át laboratóriumi körülmények között tenyésztettek-, talán lényegesen kevesebb xenobiotikummal találkoznak, kevesebb toxikus illetve környezeti hatás éri, mint a házinyúl. A patkányoknak ennek megfelelően nincs oly mértékben szüksége a detoxifikációs mechanizmusokra, azaz pl. a GST enzim aktivitás is emiatt lehet alacsonyabb ezekben az állatokban. Másrészt az sem kizárt, hogy a nyulakban ez az enzim játszik igen fontos, kitüntetett szerepet a xenobiotikumok metabolizmusában.

Figyelembe véve, hogy a detoxifikációs mechanizmusok legfontosabb szerve a máj, ezért elsőként a nyúl esetében is ebben a szervben vizsgáltuk a GST enzim aktivitást.

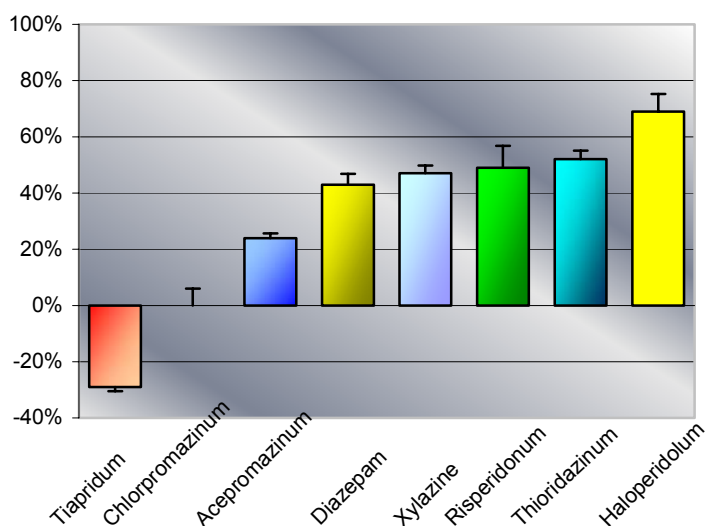


40. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra házinyúl májban.
Kontroll: 20 909 Unit

Az specifikus enzimaktivitási grafikonok Y tengelyén a kontrolltól (alpvonal) való százalékos eltérés látható az egyes kezelések hatására.

Hasonlóan a patkányok kezelése során nyert adatokhoz a trunkvilláns gyógyszeres kezelések hatására a nyúl májban is megnövekedett a GST specifikus enzim aktivitás. Ettől eltérést csak a *Risperidonum* kezelés után tapasztaltunk, ebben az esetben aktivitás csökkenést ($-14 \pm 2,2$ %) figyeltünk meg. A *Xylazin* ($62 \pm 4,8$ %-kal), a *Diazepam* ($55,6 \pm 2,8$ %-kal), a *Thioridazinum* ($54,3 \pm 3,8$ %-kal), a *Haloperidolum* ($46,8 \pm 2,9$ %-kal), A *Tiapridum* ($23,4 \pm 3,4$ %-kal), az *Acepromazinum* ($14,9 \pm 1,6$ %-kal), a *Chlorpromazinum* ($5,6 \pm 0,9$ %-kal) növelte a kontrollhoz képest az aktivitást (100 %, IU: 20 909). Bár a patkány esetében csak öt gyógyszert vizsgáltam, de ha összevetjük az eredményeket akkor azt látjuk, hogy a gyógyszerek enzim induktív hatásának a sorrendje más a nyúl-, mint a patkány májban. Ez utóbbiban a *Haloperidolum* > *Chlorpromazinum* > *Thioridazinum* > *Tiapridum* > *Risperidonum*, a nyúl májban pedig a *Xylazin* > *Diazepam* > *Thioridazinum* > *Haloperidolum* > *Tiapridum* > *Acepromazinum* > *Chlorpromazinum* sorrend volt megfigyelhető az enzim indukciós hatásban. A *Haloperidolum* mindkét állat májában közel azonos mértékben (~ 47 és ~ 40 %-kal) növelte a GST spec. akt. -t, ugyanakkor a másik klasszikus neuroleptikum a *Chlorpromazinum* a nyúl májban sokkal gyengébb induktor volt mint a patkány májban ($5,6 \pm 0,9$ illetve ~ 33 %). Egyébként mindkét vegyület halogén klórt és a *Haloperidolum* plusz még egy Fluort is tartalmaz szubsztituensként, tehát szubsztrátja lehet a GST enzimnek. Érdekesség, hogy a *Xylazin* és a *Thioridazinum* amelyek nem tartalmazznak halogén szubsztitúciót, mégis a legnagyobb mérvű GST enzim aktivitás növekedést váltottak ki a nyúlban. A két utóbbi vegyület mellett a *Tiapridum* és az *Acepromazinum* sem tartalmaz halogént, a vegyületek mégis jelentős GST enzim induktív hatással bírnak a nyúl májban. Ezen vegyületek esetében azt kell feltételeznünk, hogy a metabolizmusuk, a szervezetből történő eliminációjuk során olyan intermedierek képződnek amelyek a monomer- vagy éppen a dimer- enzimhez kapcsolódva allosztérikus modulációval fokozhatják vagy csökkentik az enzim aktivitást. Azonban az sem kizárt, hogy ezek az intermedierek kölcsönhatásba lépnek olyan citoplazmatikus fehérjékkel amelyek a GST enzim expresszióját regulálják. További lehetőség az is, hogy a lényegesen összetettebb intracelluláris kaszkád mechanizmusok modulálása révén aktiválják vagy éppen csökkentik (pl. *Risperidonum* a májban) a GST enzim szintézisét. .

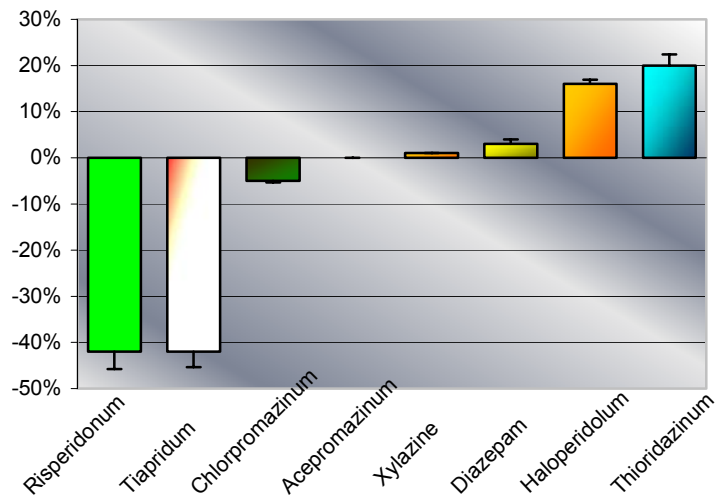
A nyúl vese homogenizátum GST specifikus enzim aktivitása szintén sokkal magasabb volt mint a patkányé (IU: 16 442 illetve 656). A gyógyszeres kezelések hatására ebben a szervben is többnyire növekedett az enzim aktivitás (41.ábra). A *Haloperidolum* (67,2 ±6,8 %-kal), a *Thioridazinum* (46,6±4,7 %-kal), a *Risperidonum* (53,4± 8,9 %-kal), a *Xylazine* (46,5±3,6 %-kal), a *Diazepam* (43,2±3,3 %-kal), az *Acepromazinum* (24,1±2,3 %-kal) fokozták az enzim specifikus aktivitását. A *Chlorpromazinum* nem befolyásolta számottevő mértékben, viszont a *Tiapridum* 27,6±2,6 %-kal csökkentette az aktivitást. Ez a negatív irányú hatás még inkább szembeűnő, ha figyelembe vesszük azt, hogy a patkány vesében inkább fokozta (~13%-kal) a GST enzim aktivitást. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a két állatfajban nem azonos módon metabolizálódnak az egyes vegyületek, vagy magának az anyavegyületnek a szervezetben belüli megoszlása, nem teljesen azonos a két állatfajban



**41. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra házinyúl vesében.
Kontroll : 16 442 Unit**

Figyelemre méltó, hogy a házinyúl lépének homogenizátumában mért GST specifikus enzim aktivitás még a nyúl májban talált értékeket is meghaladta (IU: 29 585 illetve 20 909). Ebben a szervben a GST enzim aktivitás két nagyságrenddel magasabb volt mint a patkány lépben (IU: 29 585 illetve 482). A nyúl lépben a *Thioridazinum* és a *Haloperidolum* hatására szignifikánsan növekedett (20± 4,2 illetve 16,3 ±2,3 %-kal) míg a *Risperidonum* és a *Tiapridum* kezelések után pedig jelentősen csökkent a spec. aktivitás (44±5,1 illetve 42,6±4,8 %-kal, 42.ábra). *Risperidonum* a patkány lép enzim aktivitását nem befolyásolta szignifikánsan, de a nyúl lépben erősen csökkentette azt. További

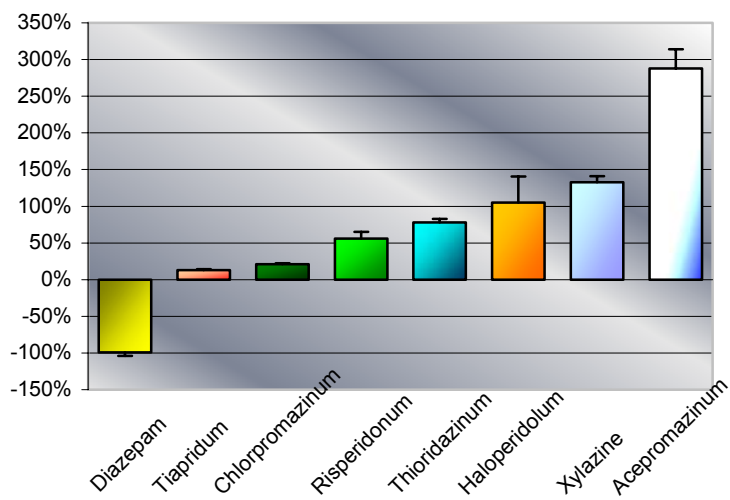
érdekesség, hogy a nyúl lépben a *Haloperidolum* fokozta az aktivitást ($16,3 \pm 2,3$ %-kal), a patkány lépben viszont csökkentette azt ($18,3 \pm 2,3$ %-kal),



42. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra házinyúl lépben.
Kontroll : 29 585 Unit

Mivel ezek a vegyületek más-más hatásokat váltanak ki a különböző állatfajok hasonló szerveiben, ismételten arra utalnak, hogy az egyes vegyületek metabolizmusa nem azonos módon játszódik le a különböző állatfajokban.

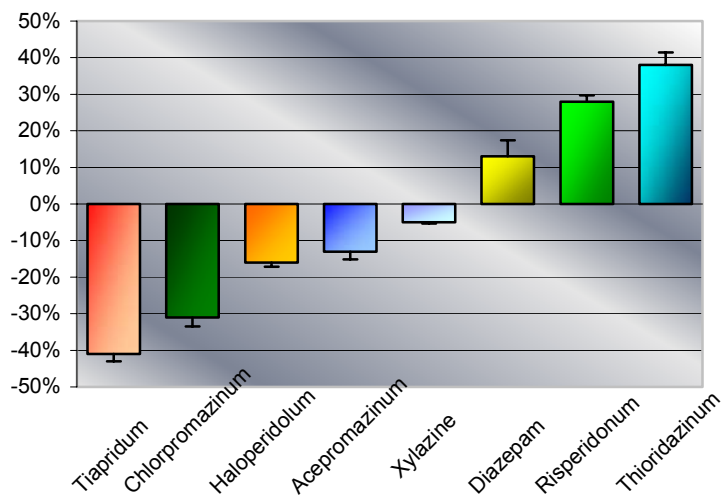
A kontroll nyulak szervei közül a szívizomzat homogenizátumban találtuk a legalacsonyabb GST enzim aktivitást (IU: 5 413). A vizsgált gyógyszerek közül a *Diazepam* kivételével valamennyi vegyület hatására megemelkedett az enzim aktivitás. A legnagyobb aktivitás emelkedés az *Acepromazinum* hatására következett be ($290,41 \pm 23$ %-kal) és azt a *Xylazin* > *Haloperidolum* >, *Thioridazinum* > *Risperidonum* > *Chlorpromazinum* < *Tiapridum* követte (43.ábra). Magas értéket mutatott a két, csak állatgyógyászatban alkalmazott szer a *Xylazin* és az *Acepromazinum*. A meglepő az volt, hogy eddig egyetlen szervben sem tapasztaltunk ilyen mérvű aktivitásnövekedést, mint a szívizomzatban.



43. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra házinyúl szívben.
Kontroll : 5 413 Unit

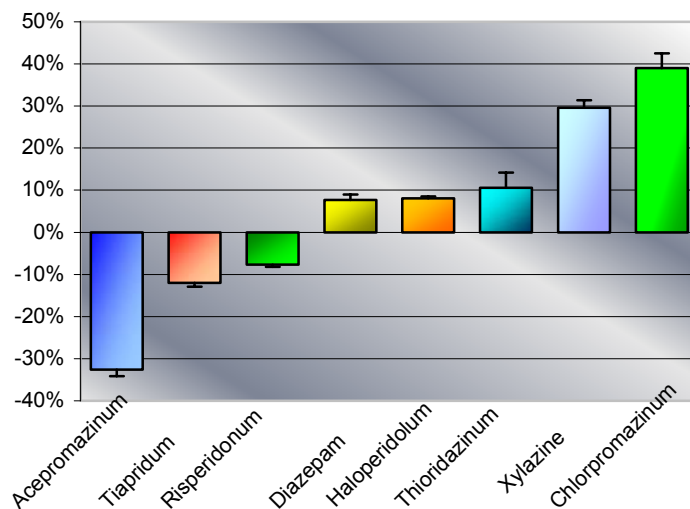
Az *Acepromazinum* és *Xylazin* kezelések során gyakran megfigyeltek cardiovascularis mellékhatásokat. Pl. a *Xylazinnal* a kezelések első fázisában vérnyomás emelkedést, majd azt követően, vérnyomás csökkenést, bradycardiát és szívritmus zavarokat regisztráltak. Az *Acepromazinum* szintén tachycardiát és hypotensiót idéz elő egyes betegekben. Mindkét vegyület (*Xylazin* és *Acepromazinum*) nagy affinitást mutat a szívizomhoz. Ezért feltételezhető, hogy azok metabolizmusa is fokozottabb mértékben játszódik le a szívben mint más szervekben. A gyűrűs vegyületek vízdékonyságának fokozása érdekében leginkább a citokróm P450 enzimek vesznek részt, az általuk katalizált reakciókban gyakran reaktív intermedierek képződhetnek amelyek oxidatív stresszt válthatnak ki a sejtekben. Az oxidatív stressz pedig az „antioxidáns” védekező mechanizmusok beindítását indukálhatja így az antioxidáns fehérjék, enzimek szintézisét fokozhatják. Ebbe az antioxidáns csoportba tartozik a GST enzimesalád is.

A *Xylazin* kémiai szerkezete hasonlít a Clonidinéhez. Ezért az sem zárható ki, hogy a fent említett *Xylazin* farmakológiai mellékhatásai, az α_2 -adrenerg receptorokkal való kölcsönhatásban keresendő. A receptor funkció modulációja révén pedig az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ befolyásolásával, az intracelluláris Ca-dependens folyamatokat befolyásolva érvényesülhet GST enzimszint fokozó hatása.



44. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra házinyúl tüdőben.
Kontroll : 10 108 Unit

A tüdő szövetben három vegyület a *Thioridazinum* > *Risperidonum* > és *Diazepam* fokozta a GST enzim aktivitást ebben a sorrendben. A többi szer csökkenést idézett elő a kontrollhoz képest A *Haloperidolum* amely szinte minden szervben inkább fokozta, a tüdőben viszont jelentősen (~40 %-kal) csökkentette a specifikus enzim aktivitást.



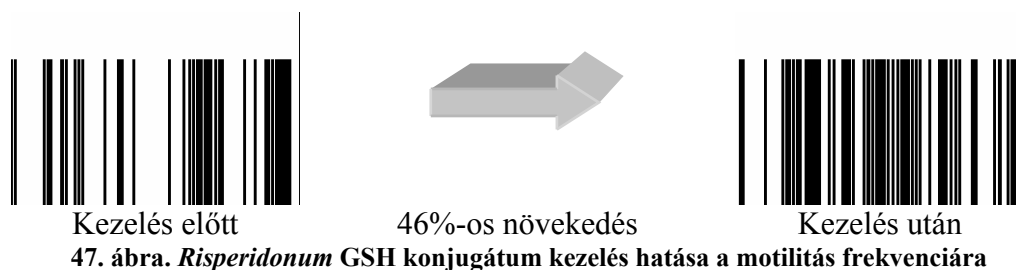
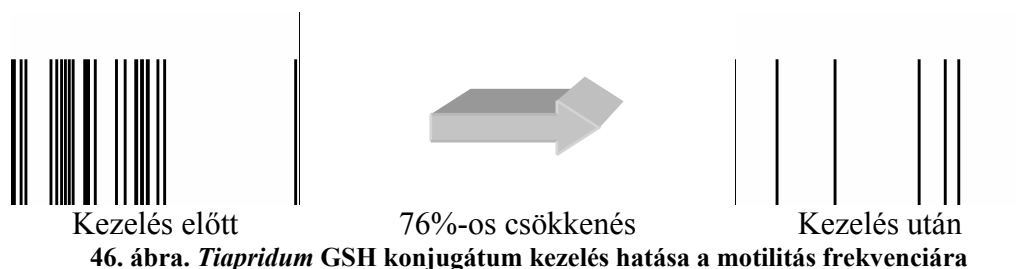
45. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra házinyúl agytörzsben.
Kontroll : 15 260 Unit

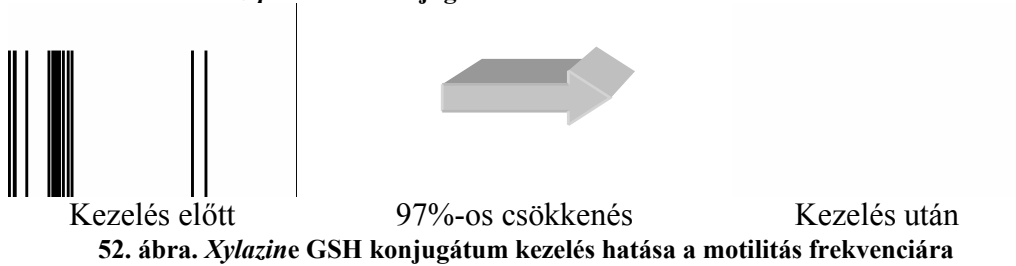
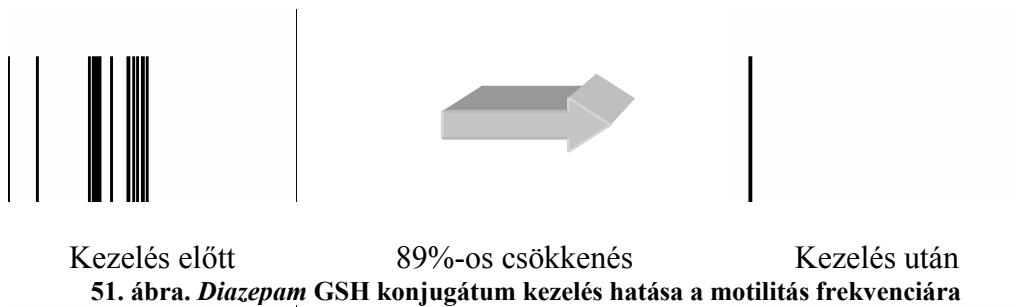
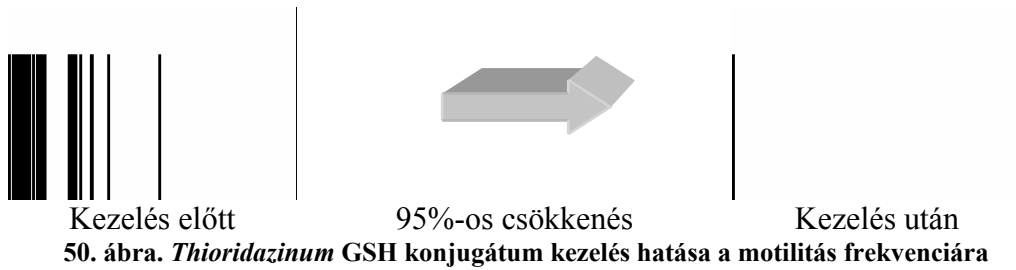
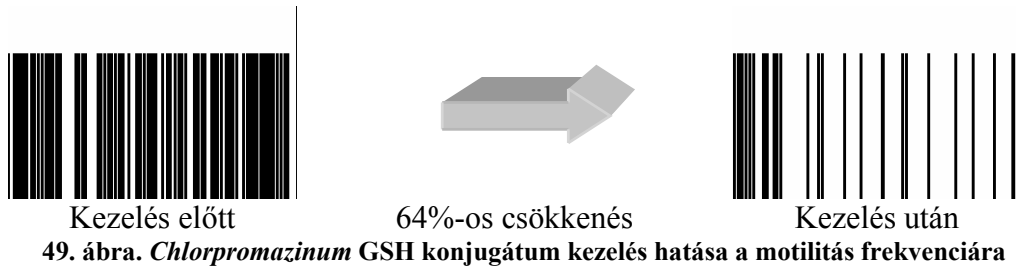
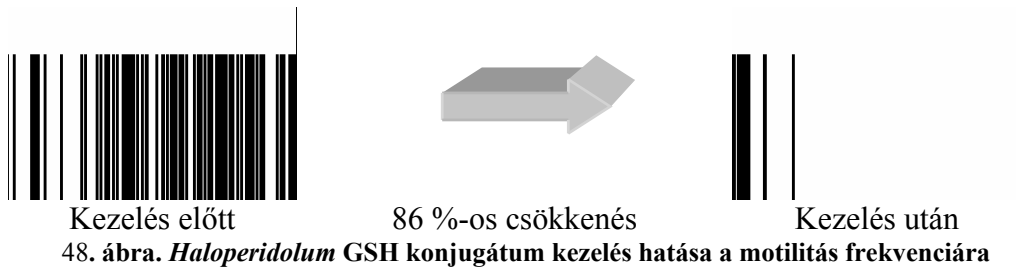
Az *Acepromazinum*, a *Tiapridum* és a *Risperidonum* kivételével minden vizsgált vegyület GST enzim aktivitás növekedést idézett elő a nyúl KIR agytörzsi régiójában is. A legerősebb aktiválást a klasszikus antipsychotikus terápiás gyógyszer a *Chlorpromazinum* kezelés váltotta ki (38,9±5,4 %). Az a tény, hogy a KIR-t alkotó

sejtekben is jelen van a GST enzim, továbbá, hogy a vizsgált szerek növelték a GST specifikus aktivitást és mindezek mellett némely vegyület szubsztrátja a GST enzimnek a GST-konjugációs reakcióban, azt a feltevésünket igazolja, hogy a KIR-ben képződhetnek ezeknek a gyógyszereknek γ -glutamil-konjugátumai. Tehát a GSH konjugátumok megjelenhetnek agyszövetben is. Ezek a γ -glutamil-konjugátumok viszont a glutamáterg neurotranszmissziós folyamatokat befolyásolhatják, hasonlóan a többi számos γ -glutamil peptidhez és glutation analóghoz. (VARGA és mtsai, 1988; MCMOHAN et al., 2000). A két új típusú neuroleptikum —amelyeket egyelőre nem alkalmaznak állatgyógyászatban—, pont az agytörzsben nem befolyásolta a GST enzim specifikus aktivitását. Elképzelhető, hogy a GSH konjugátumok felhalmozódásának hiánya lehet az egyik oka ezen szerek jelentősen kevesebb mellékhatásának.

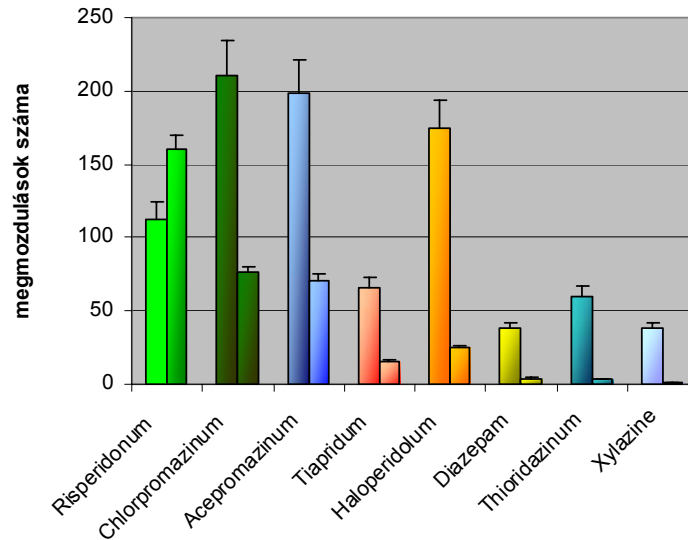
4.6 Glutation konjugált Trankvillánsok hatékonysága házinyúlban

Az állatokat a kezelés előtt a motilitásmérő készülékbe helyeztem. Az akklimatizációs idő után 5 perces regisztráció történt. Ezután megkapták a megszintetizált GSH + gyógyszer konjugátumot. A következő regisztráció a beadást követően 1 órával készült. Az ábrákon a kétszer 5 perc átlagos konkrét megmozdulási frekvenciája látható. Az ábrákon jól érzékelhető a gyakoriság változása.



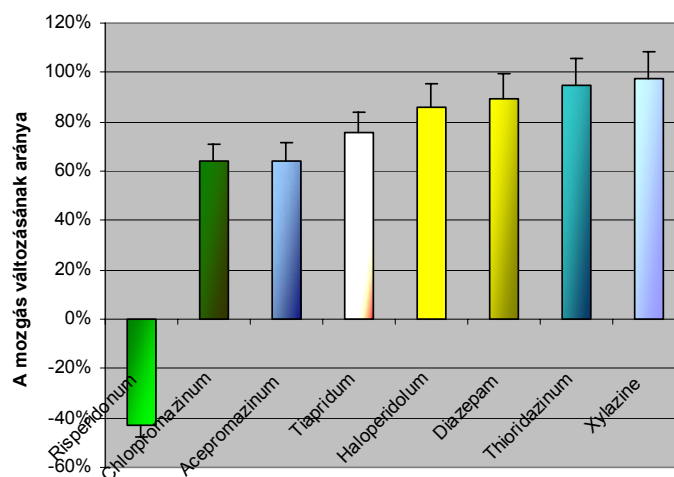


Az egyes glutation konjugált gyógyszeres kezeléseknél jól látható a motilitási frekvencia csökkenése, illetve emelkedése –a GSH-*Risperidonum* esetében– valamint a mozgás arányának időbeli eltolódása. Úgy tűnik, hogy a GSH-*Risperidonum* komplex kevésbé hatékony a mozgás deprimációját tekintve.



54. ábra. Glutation konjugált trankvillánsok hatása a motilitás frekvenciára

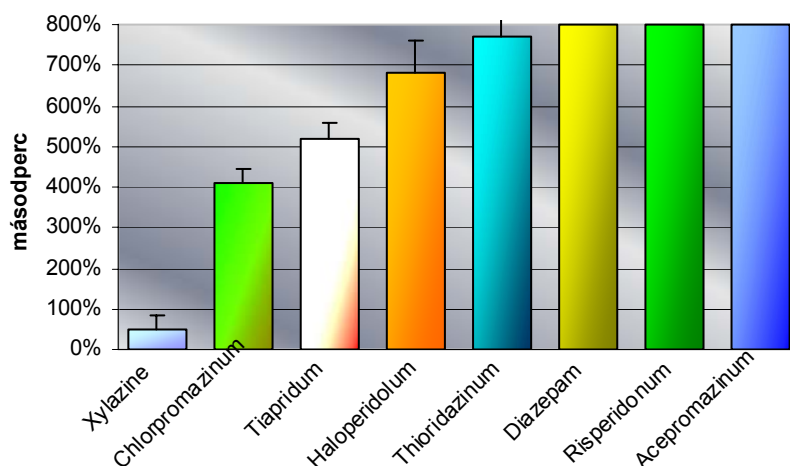
Az első oszlop a kezelés előtti a második a kezelés utáni felvétel. A grafikon a konjugátumok által okozott motilitás változás százalékos aránya szerint növekvő sorrendbe van rendezve. Tehát az egyre nagyobb változást előidéző konjugátumok helyezkednek el balról jobbra emelkedve. Rendkívül figyelemreméltó összefüggés, hogy ez a sorrend szinte teljesen megegyezik a májban mért GST indukció mértékének sorrendjével. Csak a *Diazepam* és a *Thioridazinum* sorrendje fordult meg, de a kettő GST indukciós különbsége a májban nem jelentős.



55. ábra. Glutation konjugált trankvillánsok hatása a motilitás frekvenciára, százalékban.

A fenti ábrán százalékos arányban van ábrázolva a motilitás változása a GSH konjugátumokkal történő kezelések után.

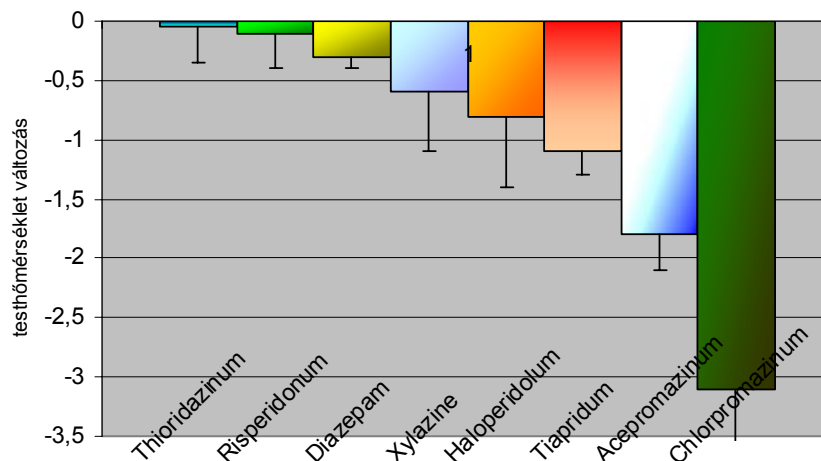
A Hot-Plate teszt adatait a szimpla gyógyszeres kezeléshez hasonlóan minden egyednél önmagához képest mértem.



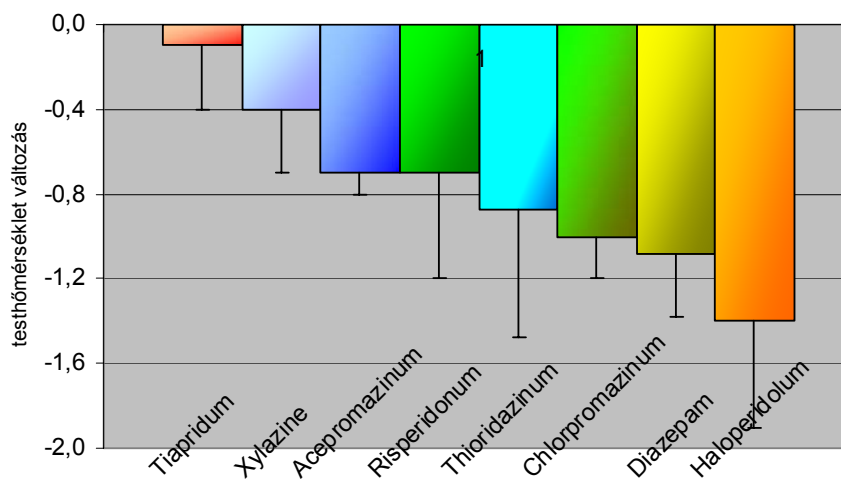
56. ábra. Hot-Plate teszt változása GSH konjugált trankvillánsok hatására

Az *Acepromazinum*, *Risperidonum* és a *Diazepam* kezelés hatására a változás nem volt mérhető. Azaz az állatok nem reagáltak a meleg felületre. A két utóbbi azonban GSH konjugátumként jelentős hatékonyság fokozódást mutatott a teszt szerint az alapvegyülethez képest. Különösen szembetűnő a *Risperidonum* tekintetében. Aktívabb trankvilláns hatásúnak mutatkozott a *Haloperidolum* is konjugátumként. Az is megfigyelhető, hogy a *Xylazin* a *Chlorpromazinum* a *Tiapridum* és a *Thioridazinum* a szimpla gyógyszeres kezeléshez képest itt már mérhető értékeket produkált. A teszt szerint tehát a GSH konjugátumaik hatékonyak, de kevésbé mint az alapvegyület.

A testhőmérsékletet az összes vizsgált trankvilláns vegyület konjugátuma csökkentette.



57. ábra. Testhőmérséklet csökkenése 1 óra alatt trankvillánsok GSH konjugátumával történő kezelés után



58. ábra. Testhőmérséklet csökkenése 1 óra alatt trankvillánsokkal történő kezelés után

A testhőmérsékletre jelentősen eltérően hatottak a gyógyszerek mint azok konjugátumai. A *Chlorpromazinum*, az *Acepromazinum* és a *Tiapridum* GSH konjugátuma jelentősen nagyobb hibernációt okozott mint az alapvegyület ($>1^{\circ}\text{C}$). A *Xylazin* konjugátum kismértékben ($0,2^{\circ}\text{C}$) volt hatékonyabb testhőmérséklet csökkentő mint a *Xylazin*. A többi vegyület GSH konjugátuma azonban kisebb hőmérséklet csökkenést idézett elő a szimpla vegyületnél.

4.7 Trankvillánsok és GSH konjugátumainak hatékonysága ezüstkárászban

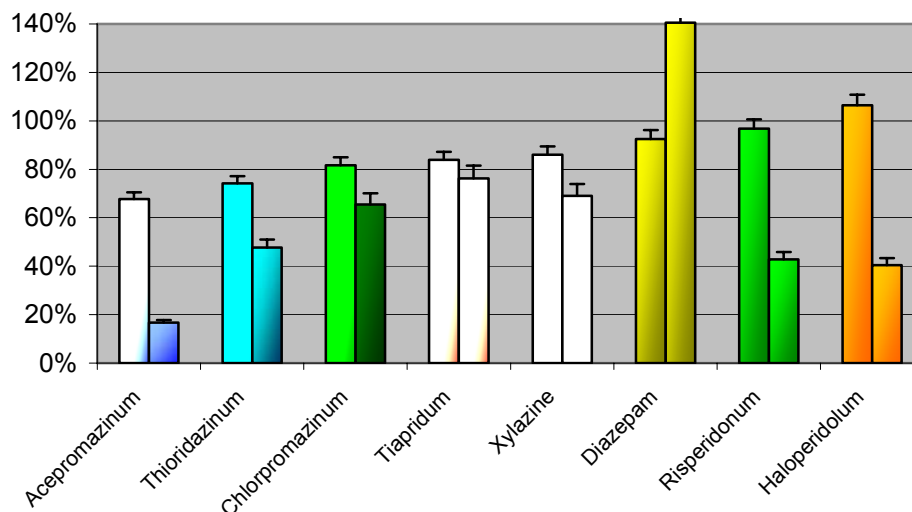
Halak esetében egy pszichofarmakon hatékonyságát nem könnyű objektíven mérni. Értelemszerűen a rezgésérzékelős motilitás mérés nem jöhetett szóba, de az infra detektor sem volt képes a halak mozgását regisztrálni, feltehetően azért, mert az állatok

hőmérséklete nem különbözött jelentősen az akvárium vizétől. Ezért a gyógyszerek és a megszentizált konjugátumok hatékonyságát a viselkedés vizuális megfigyelése és a légzésszám megváltozása alapján rögzítettem. A légzésszám csökkenése utal az állat életfolyamatainak lassulására, a csökkent oxigén felvétel pedig minden bizonnyal segít például a szállítási stressz jobb tolerálásában is.



59. ábra. Hatékonyság teszt. Megfigyelhető a ferde testtartás, mozdulatlanság, egyes esetekben azonban agitáció, hirtelen nagyon gyors 'cikázó' mozgással

A légzésszámot azonos körülmények között tartott állatokon (hőmérséklet, fényviszonyok, a víz oxigén telítettsége, akvárium mérete és a külső környezeti látvány), a korábban kikalkulált arányos dózsis kezelés után mértem. A számlálást az operculum mozgásának vizuális megfigyelésével, stopperórával végeztem.



60. ábra. Ezüstkárász légzésszáma a kontrollhoz képest trankvillánsok és GSH konjugátumaival történt kezelés hatására

A grafikonon a kontroll a 100 % érték. Minden gyógyszer első oszlopa magával a vegyülettel kezelt állatok légzésszámát mutatja, a második oszlop pedig a gyógyszer GSH konjugátumával történő kezelés utáni értéket. A grafikon a sima gyógyszeres kezelés

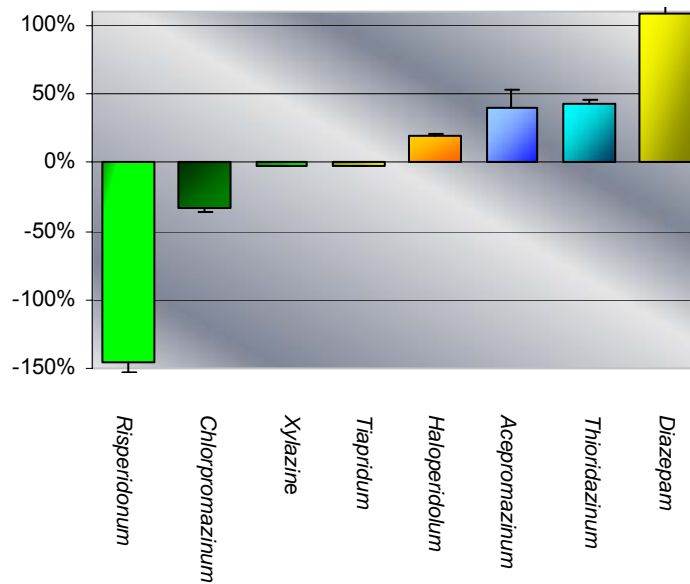
során nyert értékek emelkedő sorrendjébe van rendezve. Az alacsonyabb oszlop tehát a légzés erőteljesebb depressziójára utal. Meglepő, hogy eközben a GSH konjugátumok értékei szinte pontos Gauss görbét eredményeztek. Kivételt a *Diazepam* okozott, ahol úgy tűnik a konjugátum nagyobb hatékonyságot mutatott az alapvegyületnél. Halak esetében tehát általánosságban elmondható, hogy a konjugátumok hatékonyabbnak mutatkoztak mint az alapvegyületek.

Az alábbi táblázat az ezüstkárász viselkedésének szubjektív megítélését írja le a kezelések hatására:

	Alapvegyület	GSH konjugátum
<i>Tiapridum</i>	Mozdulatlanság, lassú légzés	Egyenetlen légzés, váratlan csapkodások azután mozdulatlan ismét
<i>Risperidonum</i>	Mozdulatlanság, lassú légzés	Egyenetlen légzés, mozdulatlanság
<i>Haloperidolum</i>	Mozgékony, agitált	Légzés egyenletes, nem felületes, nyugodt mozdulatlan
<i>Chlorpromazinum</i>	Mozdulatlanság, lassú légzés	Élénk mozgások, egyenetlen légzőmozgások
<i>Thioridazinum</i>	Ferde tartás, nagyon lassú légzés	Változó élénkség, ferde tartás vagy a fenékre fekszik
<i>Diazepam</i>	Élénk mozgások	Mérsékelten aktív, élénk úszómozgások
<i>Xylazine</i>	Mozdulatlanság, lassú légzés	Teljesen inaktív, kézzel megfogható
<i>Acepromazinum</i>	Mozdulatlanság, lassú légzés	Nagyobb légzőmozgások

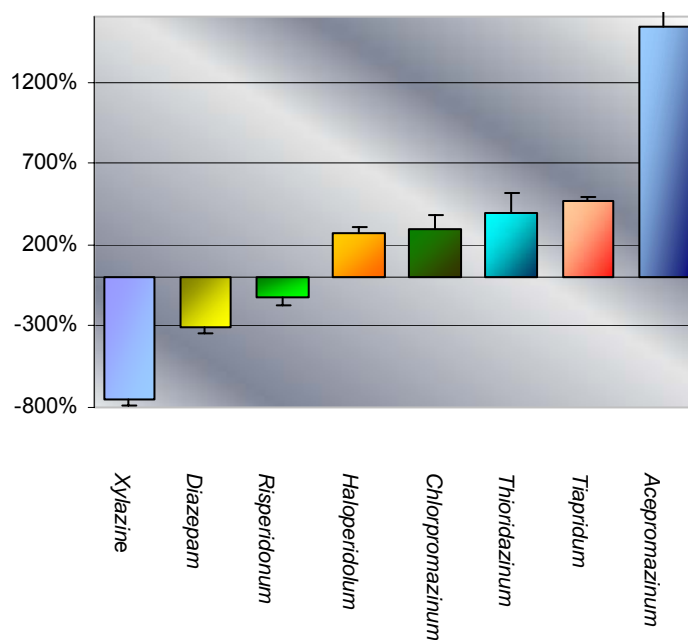
A megfigyelések alapján az *Acepromazinum*, *Thioridazinum* és a *Chlorpromazinum* mutatkozott leginkább hatékony nyugtatószereknek. A *Thioridazinum* azonban a kezelési dózisban úgy tűnt veszélyesen megzavarta az állatok viselkedését, elképzelhető hogy hosszabb távon a kezelés letálassá is vált volna. A gyógyszerek GSH-konjugátumai jelentősen eltérő hatást mutattak. A *Diazepam* kivételével hatékonyabbnak látszottak a konjugátumok mint az alapvegyületek. A *Xylazin* konjugátum látványosan hatékonyabb volt. Az állatok kézzel történő megfogásra sem reagáltak mozgással. A *Tiapridum* esetén megfigyelhetők voltak agitált epizódok, a szinte alig mérhető nyugtató hatás mellett.

4.8 Trankvillánsok GST indukciója ezüstkárászban



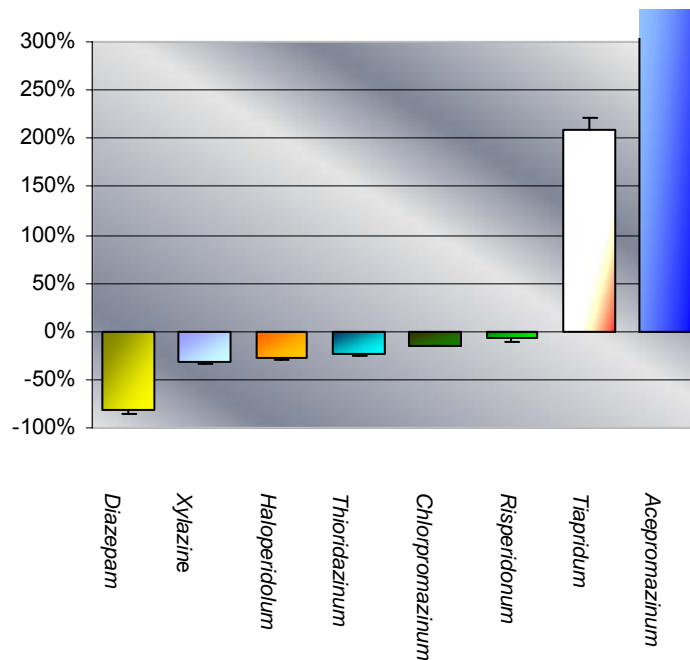
61. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra ezüstkárász agyban.
Kontroll : 3 183 Unit

Az agy GST indukciója nagyban hasonlít a nyúl májban tapasztalt értékekhez. Az ezüstkárász esetében azonban a *Xylazin* hátrébb míg az *Acepromazinum* előrébb került a sorrendben. A hal agyban sorrendben a *Diazepam*nak, *Thioridazinum*nak, *Acepromazinum*nak és a *Haloperidolum*nak nagyobb az esélye hogy GSH – gyógyszer konjugátumok alakuljanak ki.



62. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra ezüstkárász májban.
Kontroll : 255 Unit

Meglepő, hogy amíg a két emlős faj esetében jelentős GST aktivitás figyelhető meg a májban az agyhoz képest, a halnál ez megfordul és az agyban mutatott nagyobb értéket. Az *Acepromazinum* igen jelentős indukciót váltott ki. Az aktivitási értékek is igen széles tartományban helyezkedtek el.

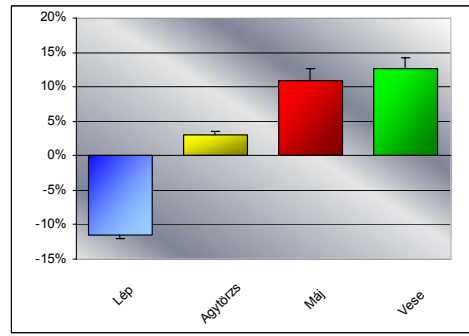
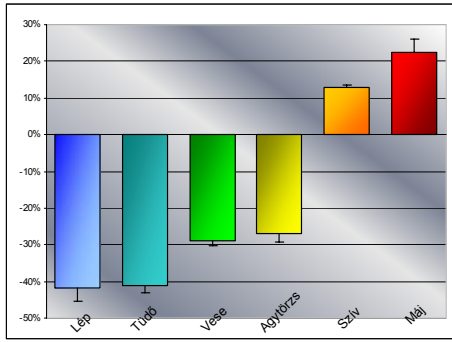


63. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra ezüstkárász izomban.
Kontroll : 802 Unit

A *Risperidonum* hasonlóan sok korábbi eredményhez (nyúl agy, máj, lép stb.) itt minden mintában negatív értéket mutatott. Az *Acepromazinum* a májhoz hasonlóan rendkívül magas értéket mutatott. A *Diazepam* azonban csak az agyban mutatott emelkedést.

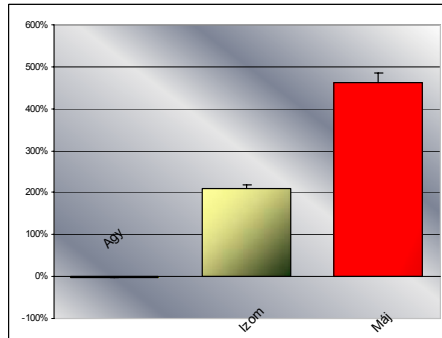
4.9 Fajspecifikus összehasonlítások

Az egyes fejezeteknél a grafikonok elemzése kapcsán már kitértem a hasonlóságok és különbségek néhány vonatkozásának tárgyalására. Itt azonban néhány összehasonlítást kívánok tenni más szemszögből is. Az egyes szervek azonos színnel vannak jelölve.



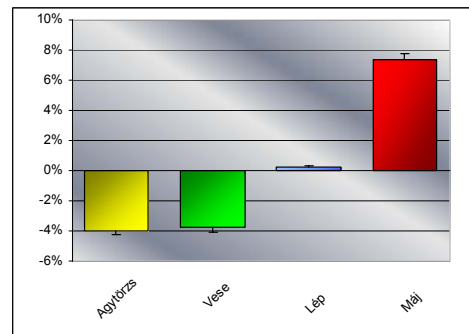
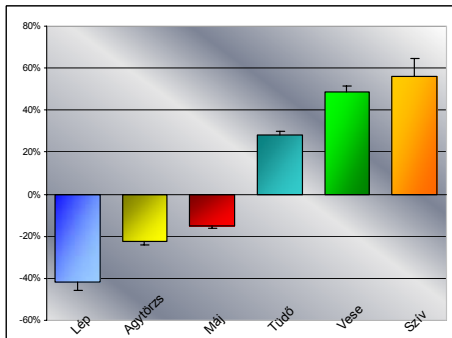
Házinyúl

Laboratóriumi patkány



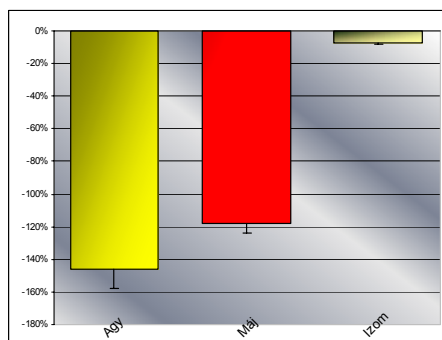
Ezüstkárász

64. ábra. *Tiapridum* kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben



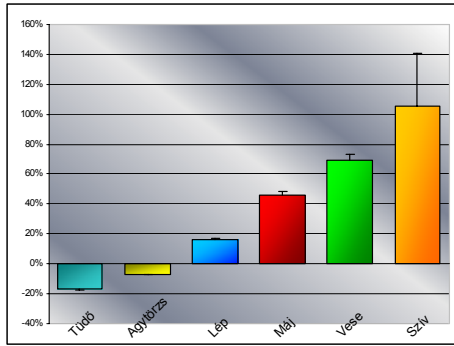
Házinyúl

Laboratóriumi patkány

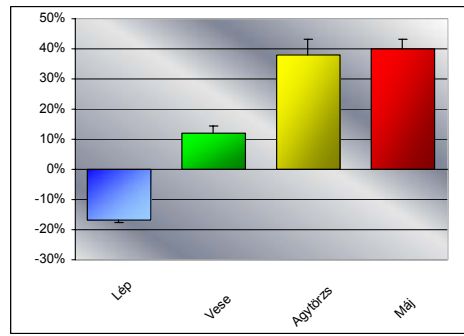


Ezüstkárász

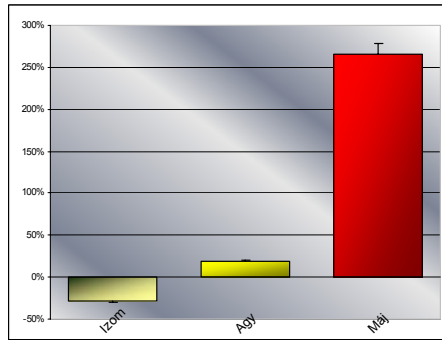
65. ábra *Risperidonum* kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben



Házinyúl

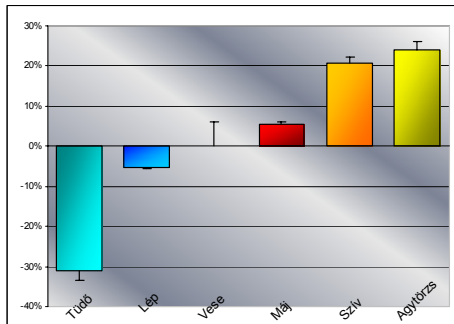


Laboratóriumi patkány

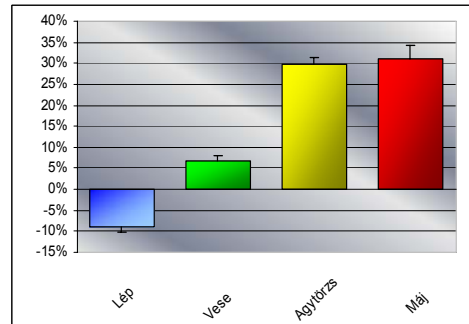


Ezüstkárász

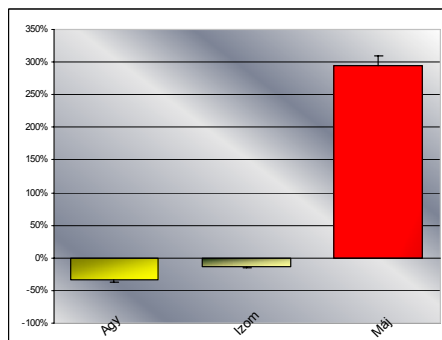
66. ábra. Haloperidolum kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben



Házinyúl

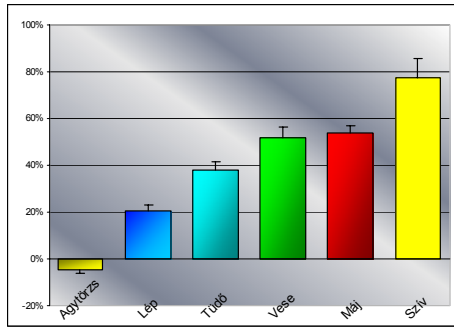


Laboratóriumi patkány

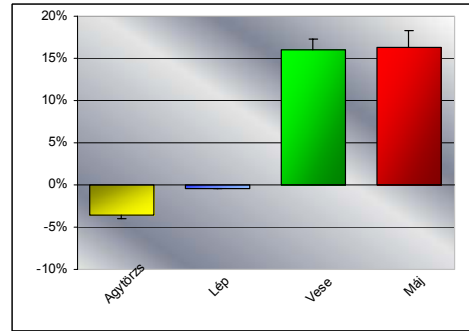


Ezüstkárász

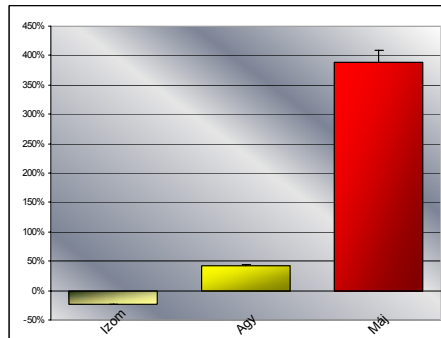
67. ábra. Chlorpromazinum kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben



Házinyúl

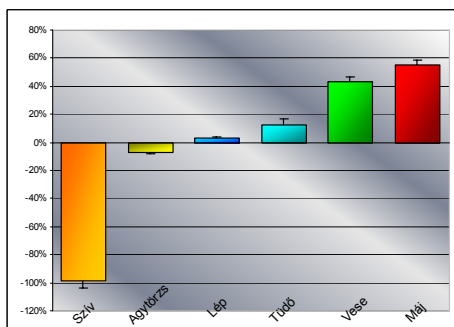


Laboratóriumi patkány

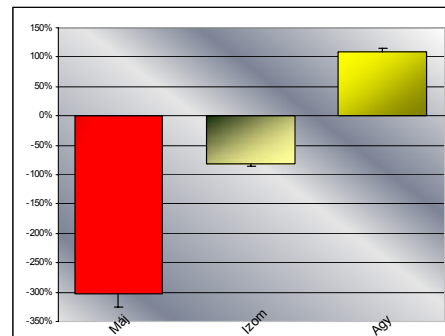


Ezüstkárász

68. ábra. Thioridazinum kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben

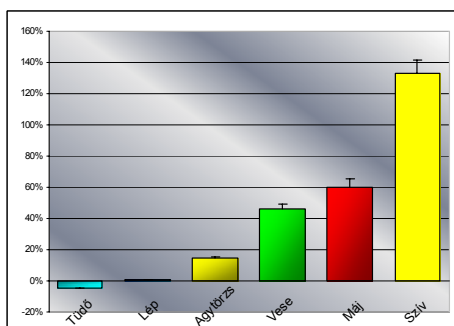


Házinyúl

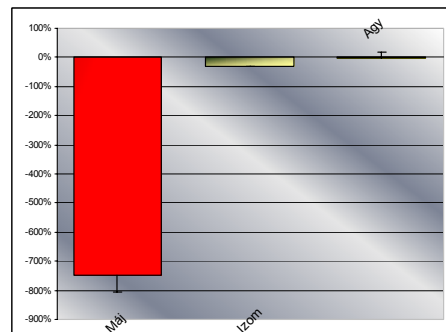


Ezüstkárász

69. ábra. Diazepam kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben

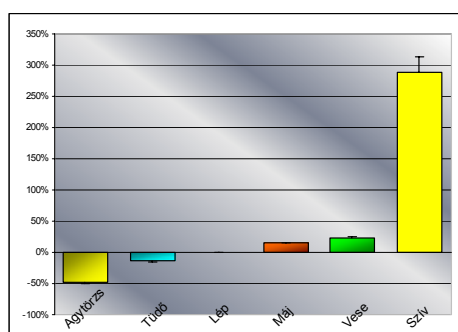


Házinyúl

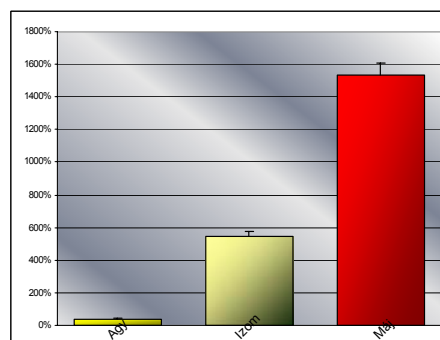


Ezüstkárász

70. ábra. Xylazin kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben



Házinyúl



Ezüstkárász

71. ábra. *Acepromazinum* kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben

A *Tiapridum* mindhárom faj esetében erősebb indukció növekedést idézett elő a májban mint az agyban. Hasonlóan a nyúl és a hal esetében az izomszövetekben (szív és harántcsíktolt izomszövet) szintén nagyobb aktivitás mutatkozott mint az agyban. Hasonló a viselkedése a másik új típusú neuroleptikumnak a *Risperidonum*nak is. Habár itt az izom inkább fajnál megelőzte a máj aktivitását, ami igen elgondolkodtató eredmény. Az agyszöveti indukció itt is alacsonyabb értéket mutat. A *Tiapridum* és a *Risperidonum* mint új generációs neuroleptikumok igen jó mellékhatás profillal rendelkeznek. Ez esetleg kapcsolatban lehet a GSH konjugátumok csekélyebb képződésével.

Érdekes a *Haloperidolum* agytörzsi indukciója. Míg a hal és a nyúl esetében alig emelkedik, addig patkánynál mintegy 40%-os emelkedéssel jelzi a konjugátumok létrejöttét. Látható, hogy a máj jelentősen részt vesz a detoxifikációjában mindhárom fajnál. A nyúlnál azonban további megterhelést ró a vesére és főként a szívre.

A *Chlorpromazinum* csak a két emlős fajnál okozott emelkedést az agytörzsben, a hal agyban inkább némi csökkenést a kontrollhoz képest. A máj detoxifikációs mechanizmusát azonban mindháromnál fokozta.

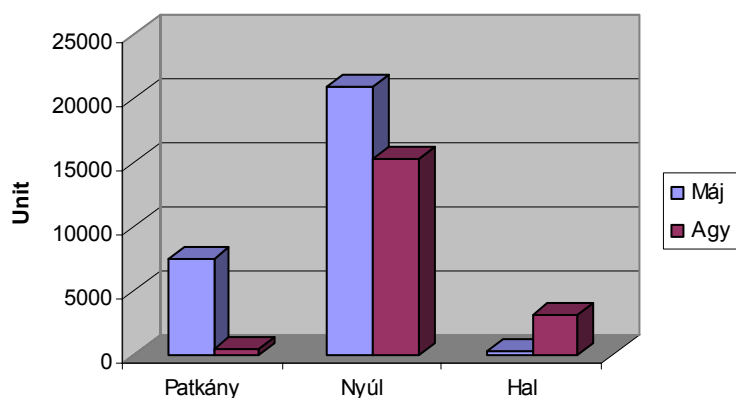
A *Thioridazinum* annak ellenére hogy jelentős mellékhatásokkal rendelkező, hagyományos neuroleptikum, az agyban egyik fajnál sem okozott jelentős aktivitás fokozódást. A májat azonban mindháromnál jól azonosítható mértékben megterhelte. Csaknem ugyanolyan emelkedést idézett elő a patkány és a nyúl veséjében is.

A házinyúl szívizomzatának detoxifikációs rendszerét a *Diazepam*on kívül minden vizsgált vegyület jelentősen megterhelte. A nyúl májában fokozódást míg a hal májban csökkenést idézett elő. Úgy tűnik halaknál eltérő metabolikus útvonalat jár be a vegyület. Az agyi GSH konjugátumok megjelenésének azonban nagyobb lehetősége van a hal agyban, hiszen itt egyértelmű GST indukció figyelhető meg, míg a nyúl esetében depléciónak.

A *Xylazin* a nyúlnál egyértelműen fokozta a máj aktivitását, míg a halnál igen jelentősen csökkentette. A hal májra gyakorolt drasztikus hatás arra utalhat, hogy nem GST útvonalon indult meg a metabolizáció, hanem más méregtelenítési mechanizmusok terhelték le a szervet. A vegyület hatékonyságában feltehetően nincs túlzott jelentősége a GSH konjugátumoknak, mivel az agyban nem tapasztaltam jelentős fokozódást.

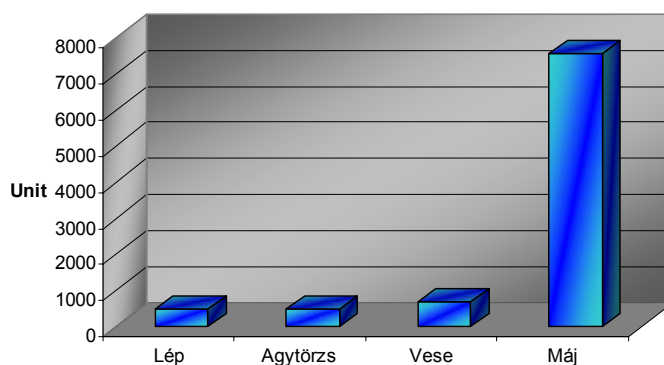
Az *Acepromazinum* hasonlóan, nem az agyban okozta a jelentősebb indukciót. Helyette extrém mértékben megterhelte a nyúl szívizomzatát, és a hal izomzatán túl a májat.

A három vizsgált faj enzimaktivitása nagyságrendekkel különbözött egymástól, szervenként. A máj tekintetében az ezüstkárász mutatta a leggyengébb aktivitást, de az agyban magasabb értéket adott mint a patkányéban.

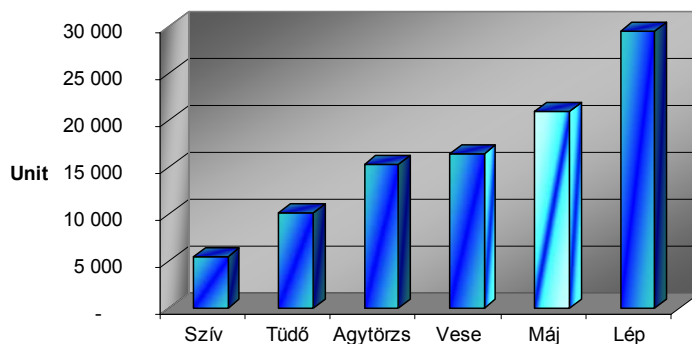


72. ábra. GST aktivitás mértéke az egyes fajoknál a májban és az agyban

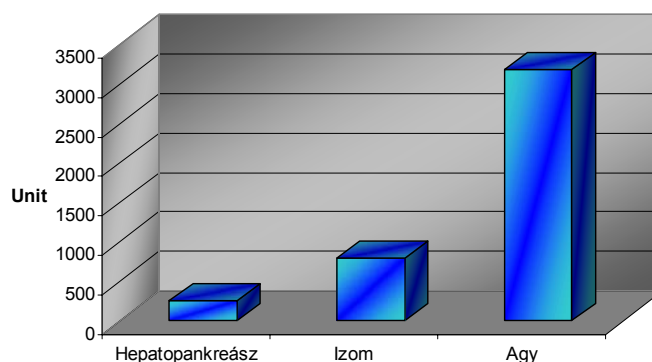
Érdekes megfigyelni a kezeletlen csoportokban a fajonként eltérő enzimaktivitást az egyes szervekben.



73. ábra. Patkány szervek enzimaktivitása a kontroll csoportban



74. ábra. Házinyúl szervek enzimaktivitása a kontroll csoportban



75. ábra. Ezüstkárász szervek enzimaktivitása a kontroll csoportban

Összefoglalva tehát, az agy területén megfigyelhető GST indukció fokozódás a GSH konjugátumok megjelenését feltételezi. A tünetek mögött összetettebb receptor kölcsönhatás húzódhat. Így például a glutamát receptorok működésének befolyásolása az NMDA receptor antagonizmus következtében tónusos dopamin felszabadulást indukálhat amelynek további következményei lehetnek. Ez újabb vizsgálatok létjogosultságát vetíti előre.

A más szervekben történő aktivitás fokozódás a glutation konjugált detoxifikációs rendszer aktiválódására utal. Ez csökkentheti a redukált glutation koncentrációját, intenzív génexpresszióra és aminosav felhasználásra utal és ezáltal védtelenebbé teszi más ártalmas hatásokkal szemben az érintett szöveteket.

A jelentős GST indukció csökkenés hasonlóan rossz jel. Feltehetően nem érte ezeket az állatokat kisebb xenobiotikum terhelés a kontroll csoporthoz képest (mivel ugyanazon körülmények között voltak), ami indokolná a GSH konjugációs rendszer tehermentesülését. Azonban utalhat arra, hogy más méregtelenítési mechanizmusok terhelték meg az adott szövetet olymértékben, ami elvonta a kapacitást a GST indukcióról. Ami megint csak labilisabbá teheti a homeosztázist.

Az ideális gyógyszer tehát kézzelfogható hatékonyság mellett nem emelné de nem is csökkentené jelentősen a GST indukciót egyetlen szövetben sem.

4.10 Analog Digital Neural Computer (ADNC)

Az irodalmi adatok szerint a trankvillánsok megszakítják a kapcsolatot az agytörzsben a külvilággal. A RAS területén, trankvillánsok hatására az idegrostok tüzelésében olyan mintázati változások következnek be, amely kihat a kéreg aktivitására és létrehozza a gyógyszer hatását. Nem ismerjük, hogy a RAS-ban felszálló impulzusok miképpen befolyásolják az agykérgi szinkronizált aktivitást. Mivel a RAS ébreszti és éber állapotban tartja az állatot, feltételezhető, hogy a RAS-aktivitás inkább növeli, mintsem csökkenti az agykérgi neuronok ingerlékenységét. Feltételezhető, hogy a RAS aktivitása bizonyos fokú agykérgi gátlást okozva megszünteti a kéreg véletlenszerű tüzelést.

A trankvillánsok és más pszichofarmakonok hatását új aspektusból lehetne vizsgálni, ha a RAS tüzelési mintázatát minél szélesebb körben elemezni tudnánk. A RAS azonban rendkívül összetett, poliszinaptikus pályarendszert alkot. A tüzelési mintaelemzés akkor hatékony ha minél több idegsejt csoport párhuzamos, valós időben történő monitorozása valósul meg. Még jobb lehetőséget biztosít ha az adatokat azonnal fel lehet dolgozni és vissza lehet stimulálni az idegrendszert ugyan azon elektródátombon keresztül. Jelenleg egy 128 egységből felépülő elektródátomb igen nagy összetettségűnek számít, a közlemények többsége ennél kisebb elemszámú eszköztől számol be. Ennek egyik oka hogy az idegrendszer nagymennyiségű analóg jele a hagyományos felépítésű digitális számítógépekkel valós időben nem dolgozható fel hatékonyan. Erre a célra alkalmasabbak az idegrendszer felszínes analógiája szerint szerveződő multiprocesszoros neuronhálózatok. A nagy teljesítményű önálló processzorokból, ténylegesen megvalósuló hardverek megalkotására a digitális technika közelmúltbeli robbanásszerű fejlődése adta meg a lehetőséget.

Ezért célul tűztem ki, hogy korszerű digitális technika alkalmazásával olyan célorientált neuronhálózatot fejlesztek, amely 128 elektródával képes a központi idegrendszer egy célzott területéhez kapcsolódni. Valós időben tüzelési mintatömböket képes detektálni, műveleteket végrehajtani azokkal és visszastimulálni. Ezáltal a mesterséges neuronhálózat kétirányú kommunikációt valósít meg az élő idegrendszerrel, amelyet ismeretlen kapcsolású részeként kezel. Új elven közelíti meg a mesterséges neuronhálózatok és az élő idegrendszer interakcióját. Közelebb vihet minket a pszicofarmakonok hatására a központi idegrendszerben történő változások hatékonyabb funkcionális elemzéséhez.

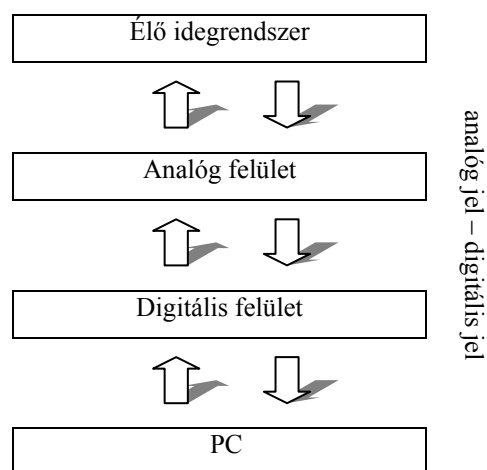
4.10.1 Általános felépítés

Az ADNC két felületből épül fel. A DS (Digital Surface) feladata a működési algoritmusok megvalósítása, az AS (Analogue Surface) vezérlése és leolvasása valamint a computerrel (PC) való kapcsolattartás. A DS első verziója öt, második verziója már 9 nagyteljesítményű mikrokontrollerből (Basic Stamp BS2 SX-IC, Parallax Inc.) épül fel.

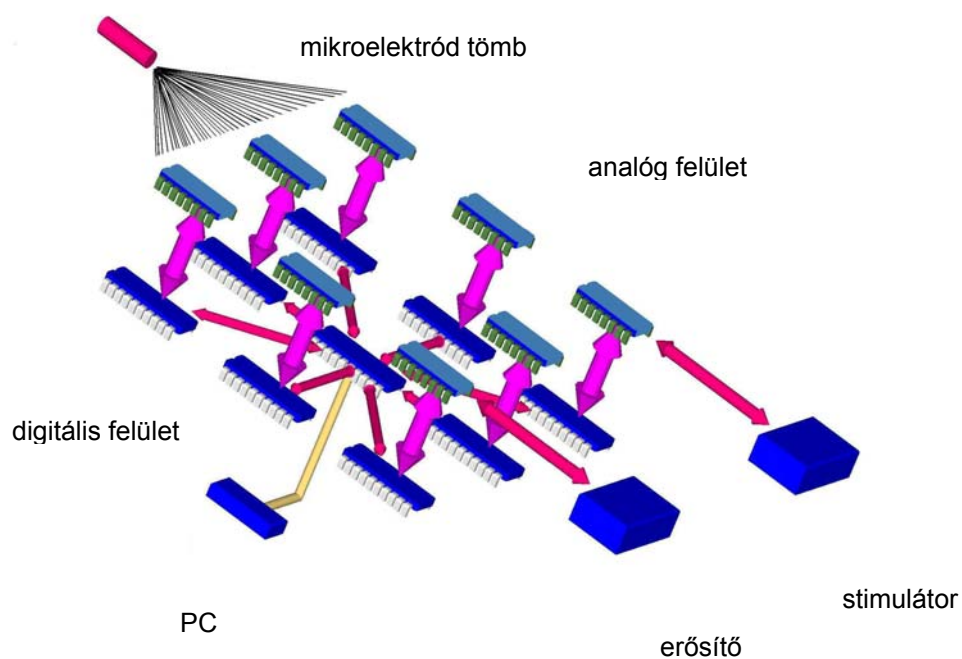
A DS –t alkotó neuronhálózat rendhagyó felépítésű. Nem csak egyenértékű egységek építik fel, hanem egynek kitüntetett, server szerepe van. A rendszer csillag topológiát alkot, így a szerver minden kliens processzorhoz közvetlenül eljut. A kialakítást a befutó speciális adatok feldolgozási módja indokolta. A szerver kapcsolatban van a PC –vel, attól veszi át az utasításokat és oda küldi az eredményeket. A szerver processzor adja ki a parancsokat a kliens processzoroknak, fogadja azok adatait, kiértékeli a további lépéseket és útvonalat választ az adatfolyamnak. A kliens processzorok végrehajtják a kapott parancsokat, kapcsolatban állnak az AS –el és vezérlik azt, valamint fogadják annak adatfolyamát.

Az AS közvetlenül, 128 egységes MA-n (Mikroelectrode Array) keresztül kapcsolódik a kísérleti állat idegrendszeréhez. A (jelen vizsgálatban az agytörzsből) befutó elektródák elsődlegesen kétirányú, analóg kapcsoló (switch) rendszerbe futnak. Korábban (az első ADNC verzióban) CD4066BC (Fairchild Semiconductor Corp.) IC-t alkalmaztam. Mivel az 5 processzorból 4 vezérelte őket ezért külön, 4 vezérlőbites demultiplexereken (HEF4514B, Philips Semiconductors) keresztül kellett a kapcsoló IC-eket meghajtani. A BS-2 SX processzorok ugyanis csak 16 I/O pin –nel rendelkeznek és adatvonalakat kell fenntartani a többi processzorral való kommunikációra is. Az új integrált áramkörök megjelenésével a DG506A (Maxim) került beépítésre amely nem csak 16 csatornás kétirányú analóg switch funkciót lát el, hanem demultiplexál is. Így a második verziójú ADNC 9 processzorából 8 kliensnek csak egy-egy analóg IC-t kell vezérelnie 4 címlábon keresztül ($4^2=16$). Ez nagy mértékű sebességnövekedést és az adatfeldolgozás egyszerűsítését okozta. A switcheken keresztül analóg stimulátor és rekorder éri el a mikroelektródákat.

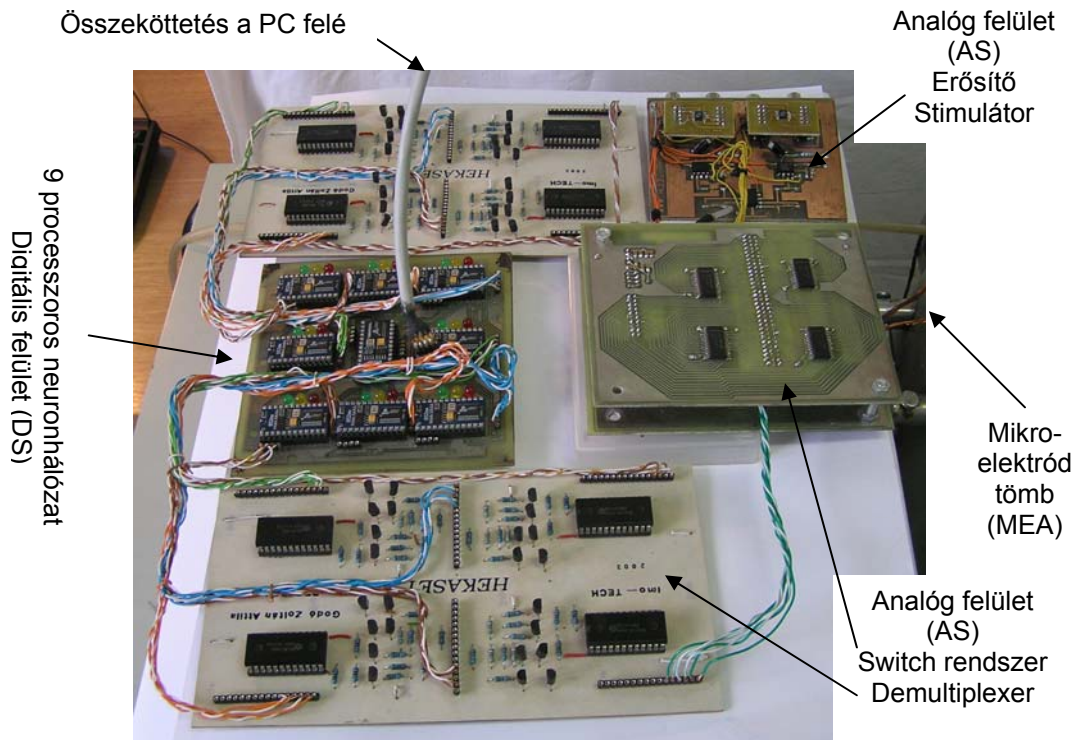
Az ADNC harmadik felületének magát az élő idegrendszert tekinthetjük, hiszen szervesen kapcsolódik az AS –hez. Jeleket fogad attól és a természetes struktúrájából adódó „feldolgozás” után módosított adatfolyamot „küld” vissza, akcióspotenciál mintázat formájában az AS felé. Tehát két irányban kommunikálni képes azzal. Jelen értekezés alapjául szolgáló kísérletekben csak a detektálás funkciót alkalmaztam.



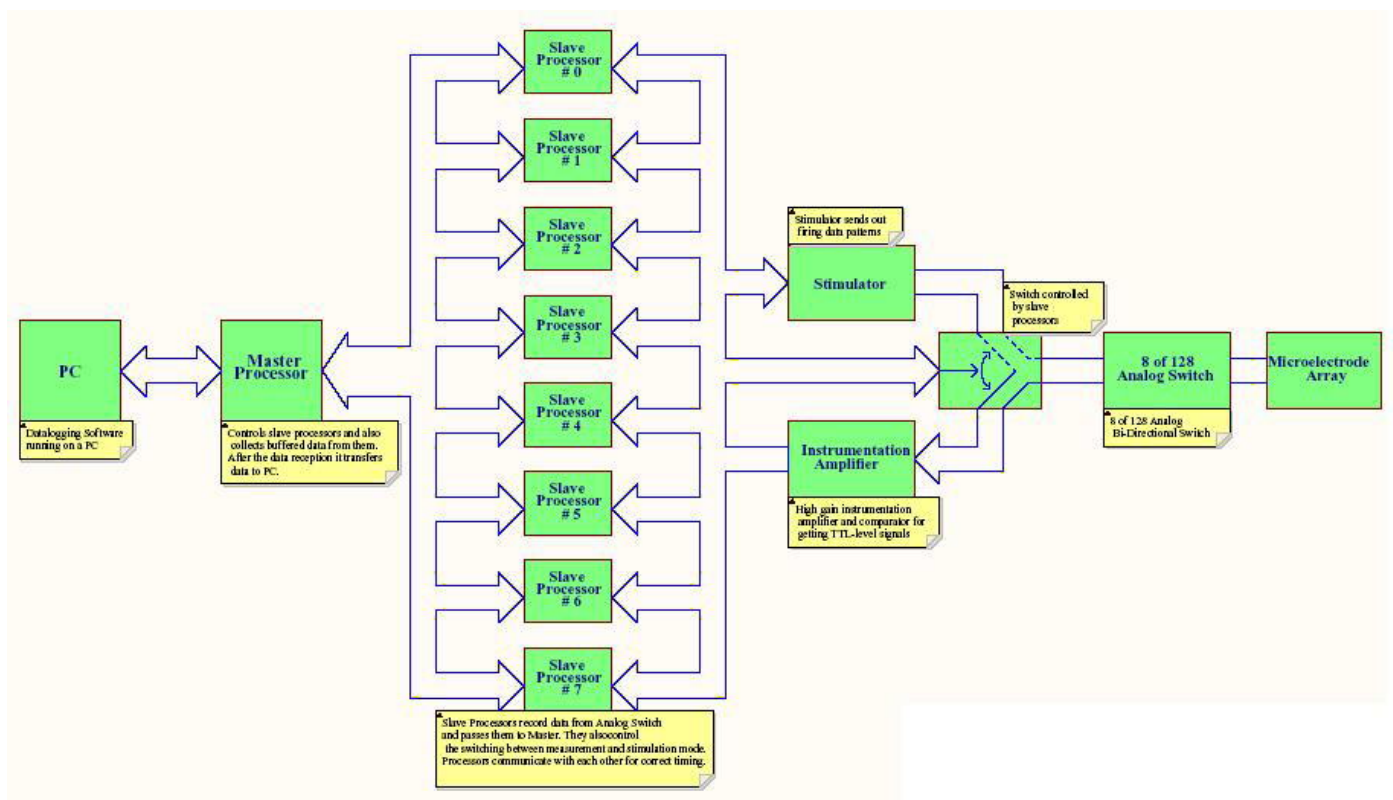
76. ábra. Az analóg és digitális jel útja. A felületek kapcsolódása a PC től a mikroelektródákkal megcélzott élő idegrendszeri területig



77. ábra. Az ADNC sematikus felépítése. A világoskékkel jelzett IC-k (switch - demultiplexerek), az AS-t a sötétkék IC-k (mikrokontrollerek) a DS-t alkotják



78. ábra. Az ADNC AS és DS , teljes rendszer
Fotó: Saját felvétel

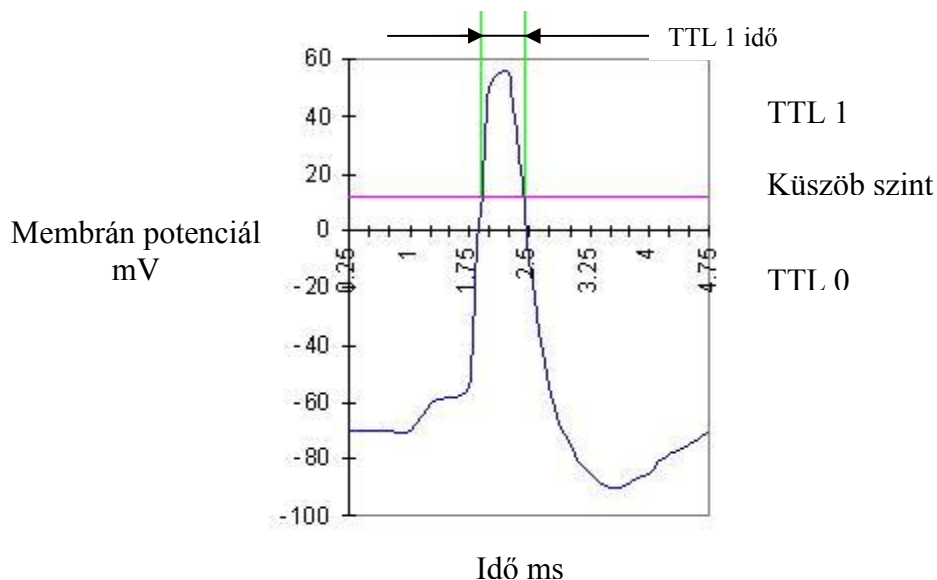


79. ábra. Az ADNC funkcionális felépítése

4.10.2 Analóg jelfeldolgozás

Az ADNC AS multielektrod tömbhöz kapcsolódó switch és demultiplexer IC tömbből, erősítőtől és stimulátorból épül fel. A rendszer legérzékenyebb pontja az erősítő. Az idegsejtek ionáramaiból keletkező rendkívül gyenge potenciál útjába áll a vékony elektródák és a switchek ellenállása is. Ezután jut a jel az erősítőbe amelynek csak milliszekundum nagyságrendű ideje marad a jel stabil detektálására. Az ADNC – AS erősítője ezért egyedi felépítést követel meg.

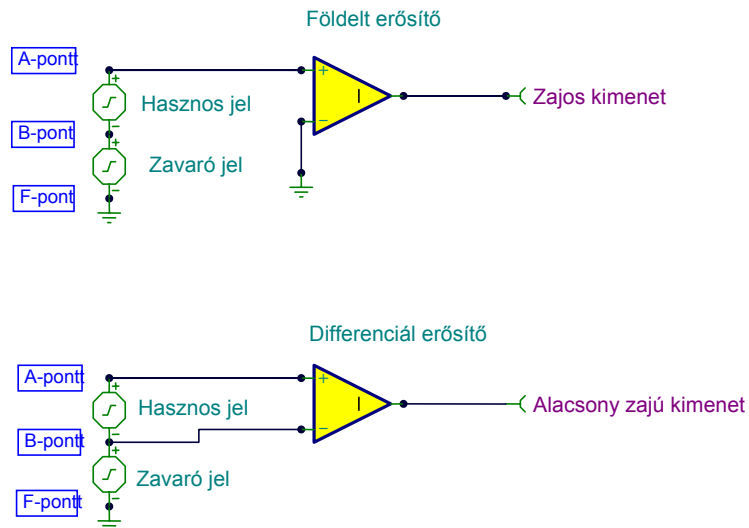
A közeledő akciós potenciál először kezdeti depolarizációt okoz. Ennek értéke 15 mV, melynek kialakulása után egyre nagyobb sebességgel nő a depolarizáció mértéke. Ez a küszöbpotenciál vagy tüzelési szint, amely fölött az akcióspotenciál kialakulása már visszafordíthatatlan. A jel gyorsan eléri, majd túllépi a zéró potenciált, egészen átlagosan +35 mV-ig, ez az ún. túllövés (overshoot). Az idegi impulzusok mindent vagy semmit törvény alapján működnek.



80. ábra. Intracelluláris akciós potenciál időbeli lefutása

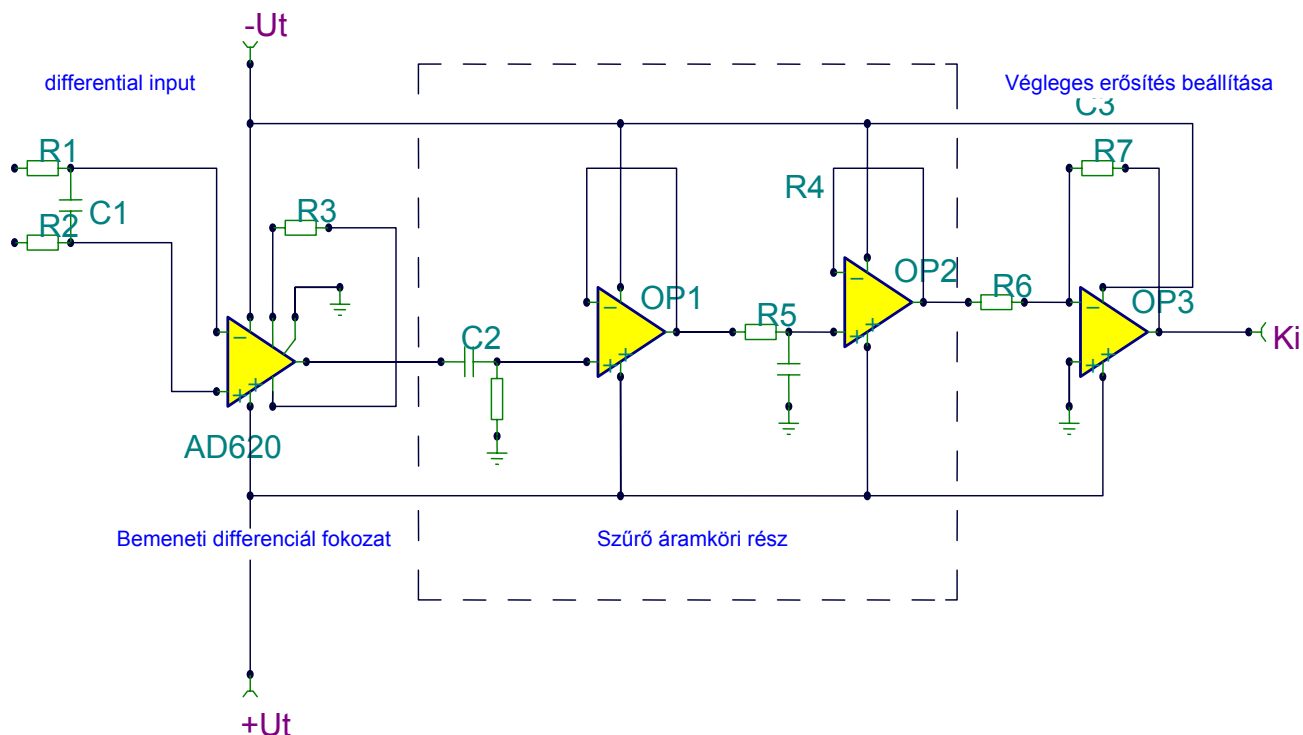
A MEA-n keresztül extracelluláris mezőpotenciál jeleket detektáltam, amelyek amplitúdója gyakran csak néhány 100 μV nagyságrendűnek bizonyultak. Az akciós potenciál analóg jelformájának számunkra nincs informatív jelentősége. Az erősítő kimenetére A/D konverter illesztése ezért felesleges volna. Helyette egy komparátor (LM339) fogadja az erősített jelet, amely egy beállított küszöbszint függvényében TTL logikai 1 vagy TTL logikai 0 jelet generál. Az idegsejt kommunikációja ezután bináris, digitális jelként értelmezhető. A küszöbszint meghatározását digitális úton a szerver processzor végzi. Ezáltal egy érzékenységhez hasonlítható beállítási lehetőséget kapunk.

A bementi fokozat egy az erre a célra gyártott differenciál erősítő AD620 IC-n alapul. Az erősítő már a bemeneten csillapítja a zajt, hogy a nem hasznos jelek erősítését elkerülje. Az idegek tüzelési mintázatának erősítéséhez kis zajú, FET bemenetű műveleti erősítőket használtunk. Pl. precíziós INA115 erősítő (Texas Instruments) OPA 2134 szűrőkkel.



81. ábra. Földelt és differenciál bekötésű erősítés

A differenciál erősítő mindkét bemeneti vonala az idegszövetbe ágyazott elektródákhoz kapcsolódik a switcheken keresztül, nem földeléshez. Ideális esetben az elektródák minél nagyobb számban a maguk által elmetszett axonok citoplazmájával kerülnek kontaktusba, míg az összes (128) elektróda közös ellenpólusa az intersticiális térbe ágyazott. Az ADNC-AS erősítője szűrt, differenciál műveleti erősítésen alapul.

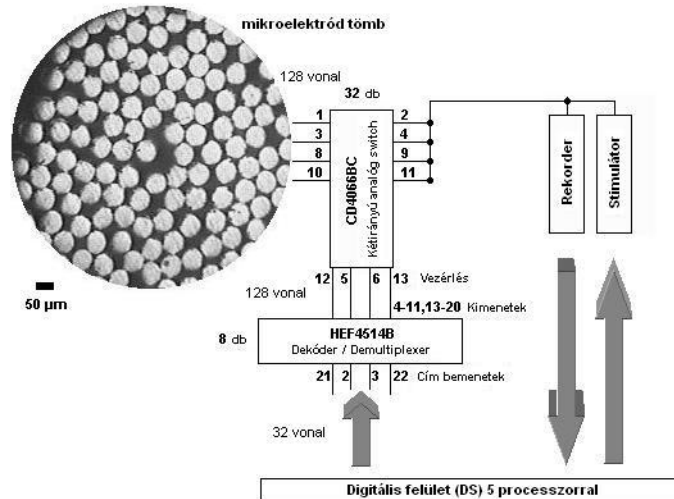


82. ábra. Az ADNC-AS szűrt differenciál erősítőjének sematikus rajza

A szűrő rész feladata, hogy az alacsony és magas frekvenciákon érkező zajokat kiszűrje. A vágási frekvenciák intervallumát dinamikusan korrigálni lehet. A differenciál erősítő után következő két műveleti erősítő csak felső és alsó határfrekvenciát határoz meg, feszültség követő kapcsolásban van kötve, vagyis erősítése egyszeres. A fennmaradó erősítést az utolsó erősítő végzi. Mértékét egyetlen ellenállás határozza meg. A rendszer kiépítése célorientált. Az első fokozat, azaz a differenciál erősítő az érzékelési ponthoz közel helyezkedik el. Rövid vezetékkel és elektródákkal, hogy a zajfelvételt minimalizálja. A rendszert földelt Faraday kalitka védi a környezeti elektromos zajtól. Az erősítő tápellátása szintén minimális zajforrású, de egyes méréseknél mégis inkább elem használata indokolt.

További vizsgálataimhoz célul tűztem ki, hogy a membránpotenciál analóg értékét is értékelni kívánom majd. Ezért az AS-t alkalmassá tettem a jel erősítésén túl a pontos A/D konverzióra is. Így két működési állapota van. Az egyik az egy bites bináris átbillenés komparátorral, a másik a több bites kvantálás A/D konverterrel. Az egy bites felvétel értelemszerűen jóval gyorsabb hiszen csak határérték átbillenést kell érzékelni. Jelen méréseknél ez az egyszerűbb módszer volt a feldolgozási cél, miközben igen nagy mennyiségű adatot szolgáltatott.

A switchek valósítják meg az elektródátömb összeköttetését a stimulátorral és az erősítővel. Mivel ezek nem készültek minden elektródához külön-külön, ezért multiplex funkciót is megvalósítanak. Vezérlését a DS végzi csakúgy mint a stimulátorét és az erősítőjét.



83. ábra. Az AS kapcsolata a mikroelektród tömbbel és a DS –el az 5 processzoros (Ver.: 1) architektúra esetében

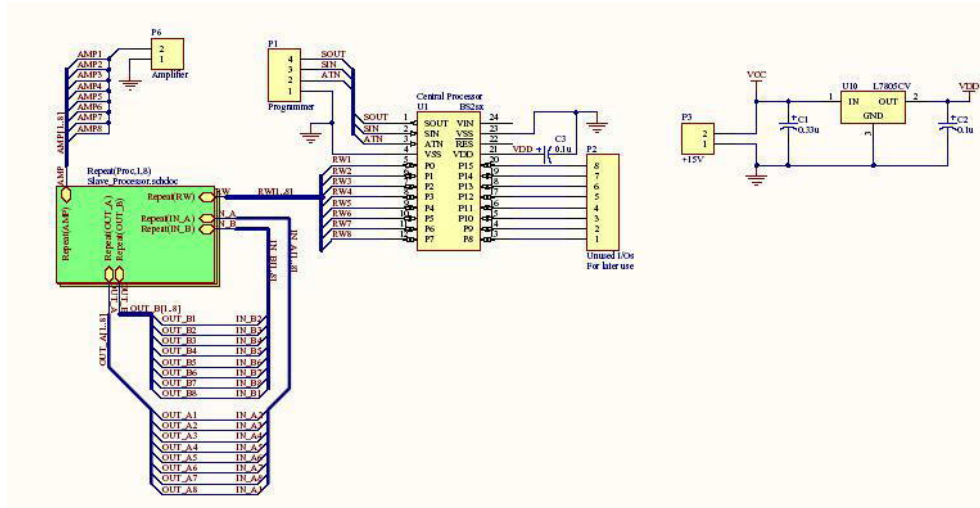
A 9 processzoros rendszerben értelem szerűen a demultiplexerek és a switchek helyét 8 darab integrált IC vette át.

Az idegrendszer akcióspotenciáljai millivoltos nagyságrendűek. Ez a feszültség jut át a switcheken keresztül az erősítőbe és a stimulátorokból a mikroelektródákon keresztül vissza az idegrendszerbe. Az erősítő komparátora után a TTL jelek a DS-be kerülnek pontosabban az adott kliens processzorban kerül rögzítésre. A stimulátor egy digitálisan beállított frekvencián folyamatosan jeleket generál. Ez csak a kliensprocesszor parancsára kerülhet ki a switchek által megcímezett elektródára. Ezzel egyidőben pedig az erősítő bemenete lezárásra kerül, a védelme érdekében és azért hogy a stimulált jelet ne olvassa vissza. Az AS gyorsaságára jellemző, hogy a switchek kapcsolási sebessége 25 ns míg a demultiplexerek elektródcímzése 65 ns körüli. Tehát teljes sebességgel az AS mind a 128 elektródát mintegy 11,5 µs alatt képes megcímezni és egyesével az erősítőhöz vagy a stimulátorhoz kapcsolni. Ez a frekvencia természetesen jóval felette van a szükségesnek.

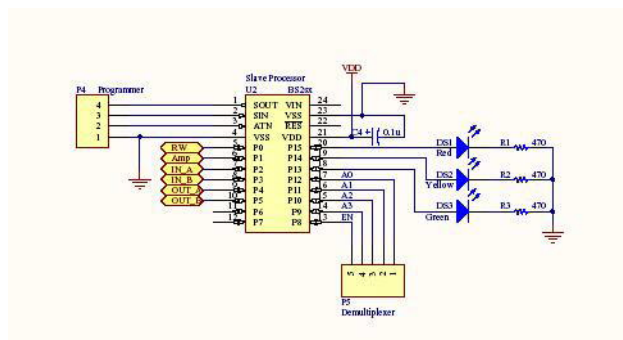
4.10.3 Digitális felület

A központi helyzetű server processzor egy PC-n futó, saját fejlesztésű célorientált interpreter (ADNC-LI , ANDC-Language Interpreter) parancsait veszi át. A sebesség itt már nem játszik fontos szerepet. A PC-n kiadott utasítást a szerver feldolgozza és a kliens processzoroknak kiosztja a feladatot. A processzorok között szinkronjeles soros

adatkommunikációt valósítottam meg. A 2. verziójú, 9 processzoros architektúrában a szerver körül nyolc kliens processzor helyezkedik el. Ezek mindegyike egy-egy 16 csatornás switch/demultiplexer áramkört vezérel 4 címvonalon keresztül. Két PIN –nel a szerverhez kapcsolódik és egy – egy PIN –nel a stimulátorhoz és az erősítőhöz. Egy kliensprocesszor tehát 16 mikroelektród teljes felügyeletét látja el, a nyolc kliensprocesszor pedig együttesen 128 elektródáét.



84. ábra. A neuronhálózat szerver processzorának kapcsolási rajza



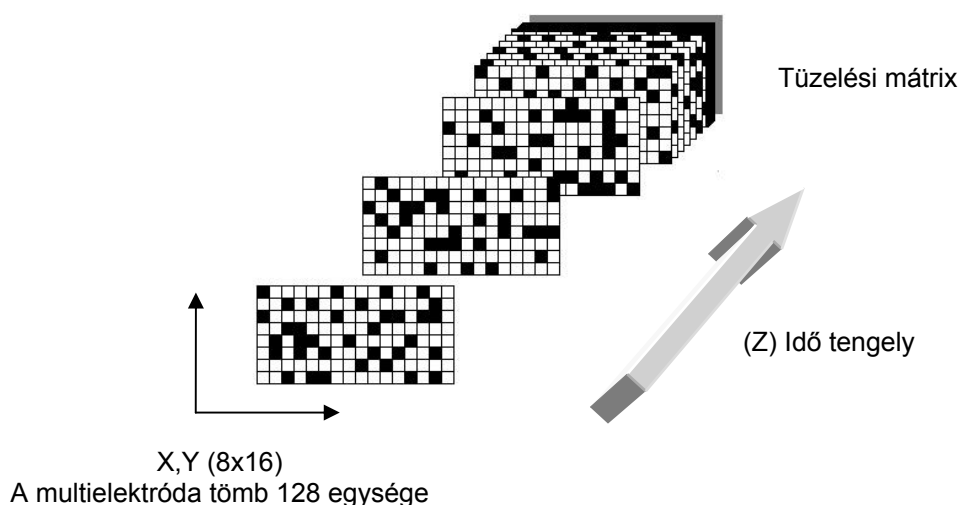
85. ábra. A neuronhálózat kliens processzorainak kapcsolási rajza

A kliens processzorokon elhelyezkedő LED-ek a működési állapotról nyújtanak információt (85.ábra). A mikrokontroller sebessége esszenciális fontosságú a rendszer működőképességéhez. A választás többek között azért is esett a drágább BS2-SX –re, mert sebessége a 10 000 műveletet is eléri másodpercenként. Az ADNC minden processzora önállóan, párhuzamosan működik, így sebessége megközelíti a 90 000 művelet/másodperc értéket is.

4.11 Tüzelési mintaelemzés ADNC segítségével

A trunkvillánsok és GSH konjugátumainak RAS tüzelési mintázatára gyakorolt hatása főként a benne elhelyezkedő szinapszisok működésének módosítása útján valósulhat meg. A MEA egyes elektródjaival lefedett idegsejt csoportjai között számunkra ismeretlen összetettségű poliszinaptikus kapcsolat rejtőzik.

Először a kezeletlen kísérleti állatba ültetett MEA-ból kell tüzelési tömböket felvenni. Ezek valós idejű mintavételezései a (Z) időtengely mentén háromdimenziós tüzelési mátrixot alkotnak.

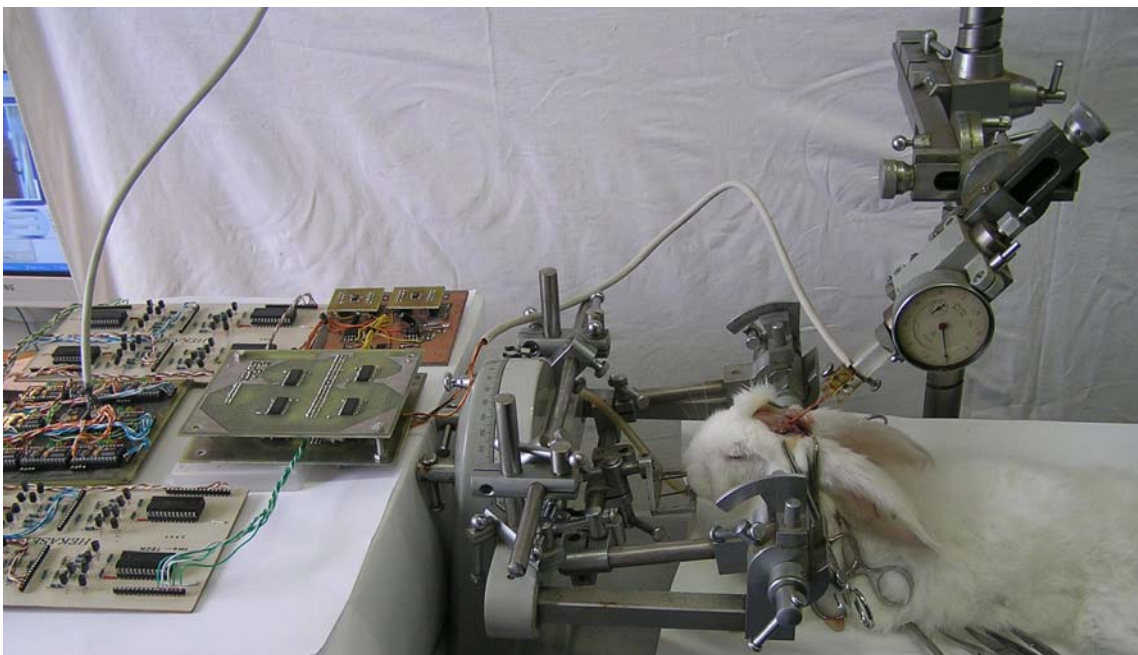


86. ábra. A MEA-n keresztül beérkező tüzelési mintázat mátrixokat alkot.

A kliens processzorok együttműködése segítségével ekkor már megtalálhatóak a szignifikánsan együtt tüzelő sejtcsoportokat lefedő mikroelektrodok. Ezek elhelyezkedése távol is eshet egymástól, a processzorokhoz rendelt elektród egységek pozíciója nincs meghatározva. Tehát az egyes processzorok memóriájába kerülő bitek egymás mellett, de egymástól távol eső elektródákból is érkeztek. Ezért a processzorok a felvett tüzelési mintázatokat közlik egymással. Így megindul egy igen gyors adatfolyam a neuronhálózaton belül. Irányát a mikroelektrodokkal lefedett élő idegrendszer természetes struktúrája és funkcionalitása határozza meg. Az algoritmusok szerint a szerver processzor a beérkező mátrixok mintája alapján határozza meg, hogy mely kliens processzorokkal vezérelt mikroelektrodok alatt lévő idegsejt csoportok állhatnak funkcionális kapcsolatban egymással. Az adatfolyamot e szerint irányítja. Így a mesterséges neuronhálózat és az idegrendszer egy rövid időre szorosan együttműködő egységet alkot. Az ADNC-LI egyes utasításaira a tüzelési mátrixok algoritmikus műveleti eredménye visszajuttatható az idegrendszerbe a MEA-n keresztül, stimulus formájában.

Természetesen figyelembe kell venni, hogy bár az axon vezetése antidrómos is lehet mesterséges stimulálás hatására, a szinapszisok azonban diódként egyirányúsítják az adatforgalmat. Mivel az elektródák általában idegsejtek csoportját fedik le, így a kétirányú kapcsolat általában működőképes. A multielektroda tömb nagyszámú egysége biztosítja hogy legtöbb esetben értékelhető számú elektróda mutat kétirányú kommunikációs aktivitást.

Következő lépésként a MEA helybenhagyása mellett beinjiciáljuk a vizsgálni kívánt pszichofarmakont a kísérleti állatba. Az agytörzs struktúrájának összetettsége olyan nagyfokú, hogy a legpontosabb mikromanipulátoros sztereotaxiás célzás sem tudná megismételni ugyan azt a sejtcsoport lefedettséget a MEA alatt. Így a kontroll és a kezelt állat ugyan az marad, elmozdítás nélküli MEA beültetéssel. Az ezután felvett mátrix – esetleg ugyan azon stimulálás után– összehasonlítása a kezeletlen mátrixszal értékes információt hordoz. Elsősorban a gyógyszer szinapszisokra gyakorolt hatását vizsgálhatjuk általa.



87. ábra. ANDC a sztereotaxiás célzóberendezéssel és a nyúlba beültetett mikroelektrod tömbbel
Fotó: Saját felvétel

A MEA sztereotaxiás bejuttatása nem mindig sikerül pontosan. Az idegpályarendszer bonyolultsága miatt olyan területekre is kerülhet, amelyben nem tapasztalhatóak a vizsgálni kívánt szinkronizációs jelenségek. Az ANDC rendkívüli gyorsasága és könnyű alkalmazhatósága miatt rövid időn belül eredményt produkál. A kísérlet ezért nagy hatékonysággal megismételhető új lokalizációval.

A mérés – kezelés – újramérés mindössze pár percet vesz igénybe. A mérés után az állatot túlaltatjuk. A server processzor a tüzelési matrixokat visszajuttatja a PC –be, ahol saját szoftver segít a további kiértékelésben.

4.11.1 A DS néhány fontosabb algoritmus

A DS a tüzelési mátrixokat digitális, logikai jelként dolgozza fel háromdimenziós tömbműveletekben. Számos algoritmust dolgoztam ki a minták elemzéséhez, melynek részletes tárgyalása meghaladná a dolgozat célkitűzéseit és terjedelmi korlátait. Ezért az alábbiakban csak néhány fontosabb elemző algoritmus formális leírását tárgyalom.

4.11.1.1 Inaktív egység kiszűrés

A beérkező jelek a 128 elektródáról egy 16x8 kétdimenziós tömbbe kerülnek egy bites jelekként. Az ideg akciós potenciálja ugyanis ha átlép egy küszöbértéket akkor a „mindent vagy semmit” törvénye alapján teljes depolarizációba kerül (akciós potenciál). Ezt tekintjük 1 'true' míg a nyugalmi membránpotenciált 0 'false' értéknek.

$in[x,y]$

Az egymást követő tüzelési mintatömbök a harmadik dimenziót hozzák létre a mátrixban, ez az időtényező vagyis a Z tengely.

$int[x,y,z]$

Az elektródák egy része nem érintkezik idegsejtekkel, a sejt közötti mátrixba, erekbe vagy más inaktív területre kerül. Ezekből az elektródákból nem érkezik értékelhető jel. Az inaktív egységek kiszűréséhez definiálunk egy százalékos tüzelési limitet (lim). Ezután átvizsgáljuk a beérkezett tömböket a mérés végéig (t). Az inaktív elemeket feljegyzzi egy eredménytömbbe (inact).

```
For x=1 to 16 do
  For y=1 to 8 do
    {
      For z=1 to t do if int[x,y,z] then Inc(sum);
      if sum / t < lim then inact[x,y] := True
      else inact[x,y] := False;
    }
```

Ahol (sum) segédváltozóban összegezzük egy x,y elektródához tartozó tüzelések számát a mintavételezés végéig (t).

4.11.1.2 Kapcsolat keresés

Azok az elektródák amelyekből konzekvensen egyidőben érkeznek jelek, valószínűleg szinaptikus kapcsolatban lévő sejtcsoportokat fednek le. Az is lehet hogy átfedésben helyezkedik el a két elektróda (tehát rövidzárlat van) és ugyan azon akcióspotenciált detektálják, de ennek kiszűrése más algoritmus feladata. Az ilyen mátrixpontoknál a gyógyszerek beadása után sem fog megváltozni a szinkrontüzelés. Az alábbi algoritmus x,y egység viszonyát keresi x1,y1 egységhez ha egyszerre pontosabban rövid időintervallumon belül tüzelnek.

```
For z=1 to t do
  if int[x,y,z] = int[x1,y1,z] then Inc(sync)
if sync = t then 'szinkrontüzelő szubrutin futtatása' (x,y,x1,y1);
```

A periodikus hullámokban együtttüzelő egységek aránya mutatja a szinkronizációs jelenséget. A kiszámított eredménytömböt visszastimulálhatjuk az idegrendszerbe. Így stimulálhatjuk azokat a sejtcsoportokat amelyek egymással feltehetőleg szinaptikus kapcsolatban vannak. Az ezután felvett újabb tüzelési mátrix a feldolgozási lehetőségek egész sorát nyújtja.

4.11.1.3 Tüzelési gyakoriság

A tüzelési gyakoriság megváltozását százalékos arányban lehet szemléletesen kifejezni. Egy mátrixban a 'True' értékű egységek számának változása fontos információ a pszichoaktív drogok hatékonyságáról.

```
For x=1 to 16 do
  For y=1 to 8 do
    {
    For z=1 to t do if int[x,y,z] then Inc(sum);
    Fr[x,y] := sum / t;
    }
```

Ahol (Fr) tömb az (x,y) elektródák tüzelési gyakoriságát tárolja százalékban kifejezve.

4.11.1.4 Teszt algoritmusok.

Új elektród csatlakoztatásakor tesztalgoritmusokkal kell vizsgálni az elemi elektródaszálak helyes működését. A szigetelés sértetlensége zárlat vizsgálattal ellenőrizhető. Ekkor a MEA nem érintkezhet semmivel, tehát a levegőben lóg.

```

For x1=1 to 16 do
  For y1=1 to 8 do
    For x2=1 to 16 do
      For y2=y1 to 8 do
        {
          'Stimulátor Be' (x1,y1);
          If 'Beolvasás' (x2,y2) then 'Zárlat' (x1,y1,x2,y2);
        }

```

Ha x1,y1 egységen stimulátor jelet küld és ez az x2,y2 egységen visszaolvasható akkor a két egység között rövidzár van. Az algoritmus eredményeként a 'Zárlat' szubrutin paraméterként megkapja az egymással rövidzárlatot képző elektródák koordinátáját.

Az elektróda behelyezése előtt vezetési ellenőrzést végez a rendszer. Ekkor elektrolit oldatba (telített NaCl vagy KCl) merítjük az elektróda hegyét. A stimulátor kimenetét az elektrolitba vezetjük és az elektródatömbön teljes beolvasást végezzük. Minden egységen meg kell jelennie a stimulátor jelének.

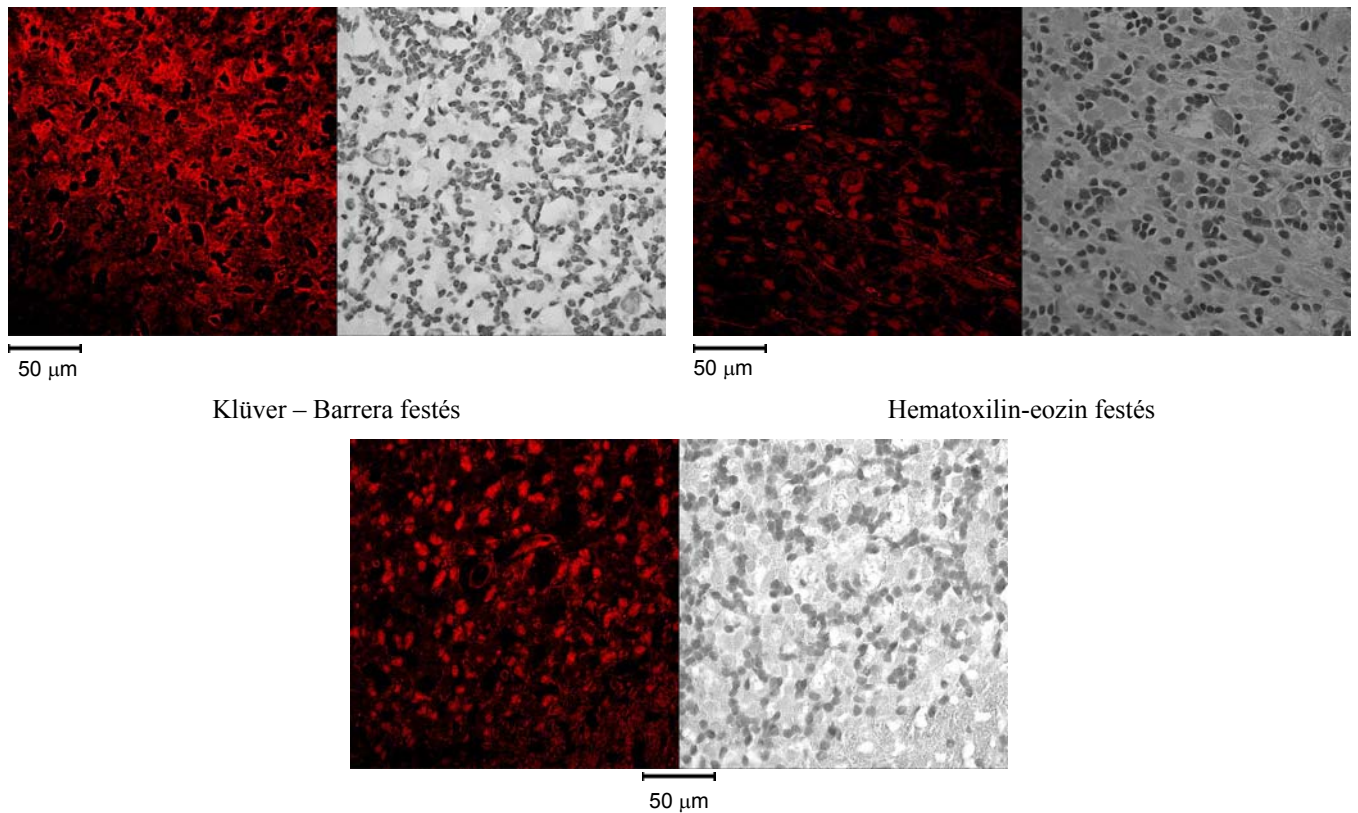
4.11.1.5 Összetett algoritmusok.

A fenti alapalgoritmusokból kombinálható számos újabb lehetőség. Például a bejövő mátrix alapján meghatározhatóak a gyakran együtt tüzelő egységek. Ezek adott százalékát visszastimulálva kivonható az újraolvasott mátrixból hogy a stimuláció következtében hány százalékát készítette szimultán tüzelésre. Azaz mennyivel emelhető a szinkron tüzelések száma.

A bejövő mátrix elemzése alapján stimulálhatóak a szimultán tüzelők, ezek negáltja, a leggyakrabban tüzelők vagy negáltjuk, a legritkábban tüzelők vagy negált tömbjük, ezek bármilyen aránya, valamilyen eloszlás vagy minta maszk bináris műveleti eredménye (AND, OR , XOR) stb. Csak a kutatói fantázia szab határt a kiértékelési lehetőségek sokaságának és kombinálásának.

4.12 Agytörzsi mintavételezés és feldolgozás ADNC-vel

Agytörzsi tüzelési mintavételezést a házinyúlánál és az ezüstkárásznál végeztem. Az elektróda paramétereit, topológiáját, alakját, behelyezési körülményeit és a várható jeleket alapvetően meghatározza a célszövet anatómiai struktúrája. Mivel ez egy eddig még nem alkalmazott technológia és módszer, ezért mikroszkópi technikával összevettem a szöveti mintákat az elektródák finomszerkezetével. Figyelembe kellett venni a sejtek eloszlását, sűrűségét, a bioelektromos szempontból aktív és inaktív komponensek arányát.



Klüver – Barrera festés

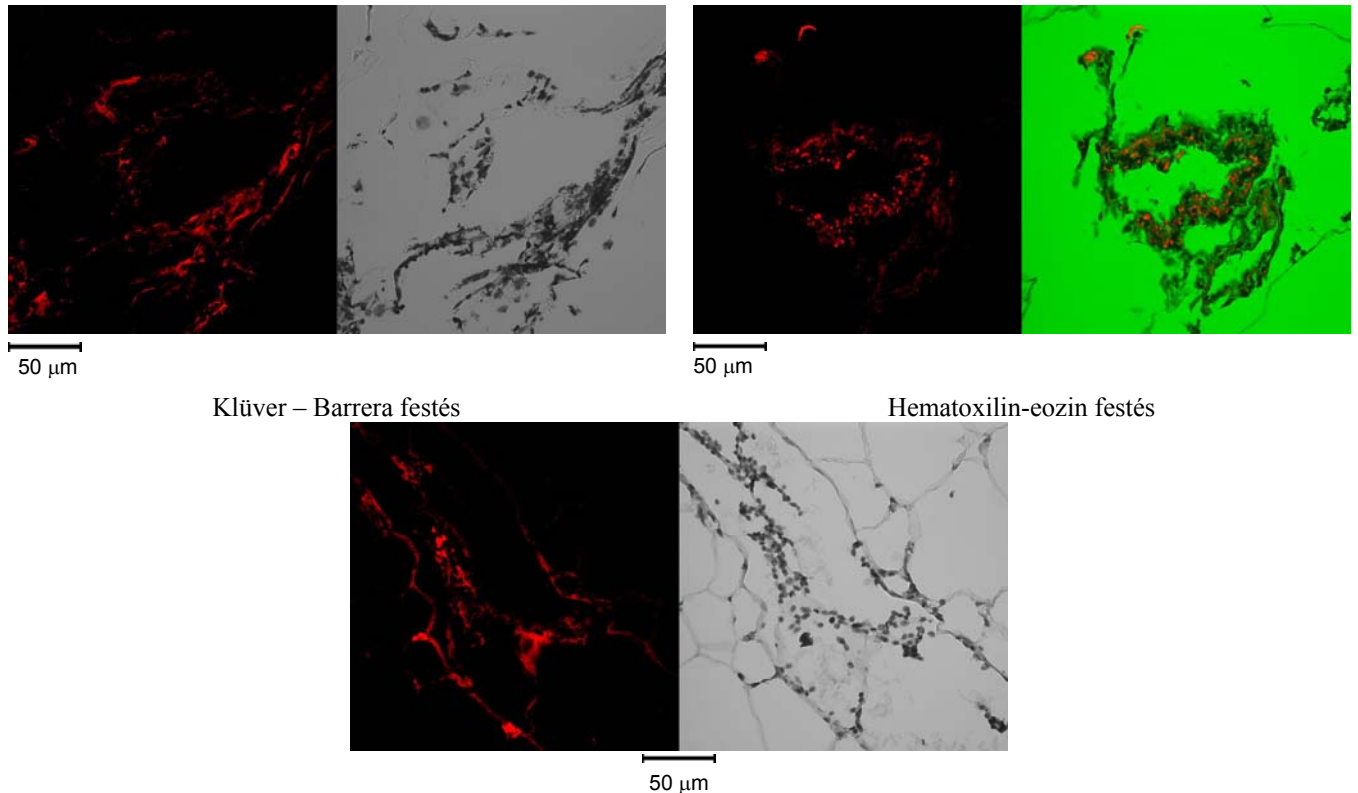
Hematoxilin-eozin festés

Streptavidin-peroxidáz konjugált immunhisztokémia + hematoxilin-eozin festés

88. ábra. Házinyúl agytörzs (RAS) mikroszkópi képe

A házinyúl agytörzsének felső magcsoportjai szintjénél készült metszetekből látható, hogy a sejtmagok kis, egymástól elszeparált, sűrű csoportokban helyezkednek el. A csoportok 10 – 50 µm távolságban található a metszési síkban. A Klüver-Barrera festés nem mutat fluoreszcenz aktivitást ezért áteső fényben vizsgáltam az így festett metszeteket. A velőhüvely a sejtmagok és a Nissl állomány festődött markánsan. A felvételeken jól azonosítható a vérerek helyzete is. A köztük lévő nem festődő mátrixot itt az axonok sűrű hálózata adja. A tüzelési tömbök detektálásakor várhatóan ezek számítanak aktív területnek.

Az eozin gerjeszthető így a megvilágítás során a kompartmentek fényt emittálnak. A sejtmag és a citoplazma is jól azonosítható. Az immunhisztokémiai reakcióban humán streptavidin-peroxidáz antitest került felhasználásra, de a tapasztalat szerint más fajoknál is van bizonyos mértékű kötődés. Ez a házinyúl és az ezüstkárász esetében is megfigyelhető volt. Az immunhisztokémiai reakció részletgazdagabbá tette a mikroszkópi képet. A sejtcsoportok helyzete jól látható.



Klüver – Barrera festés

Hematoxilin-eozin festés

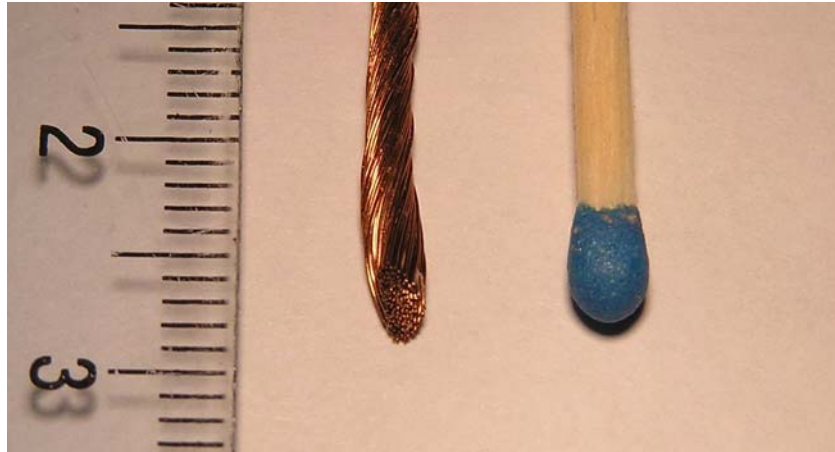
Streptavidin-peroxidáz konjugált immunhisztokémia + hematoxilin-eozin festés

89. ábra. Ezüstkárász agytörzs (RAS) mikroszkópos képe

Az ezüstkárász agyszövege lágy, kocsonyás szerkezetű. Ritka de sűrű sejtcsoportok figyelhetők meg benne. Közöttük jelentős, sejtmag mentes tér látható. Várhatóan az elektródák nagyobb százaléka kerül inaktív területre. A sejtsűrűség jóval alacsonyabb az emlősök hasonló metszeteinél.

A beültetett MEA bizonyos mértékig elroncsolja a célzott terület agysejtjeinek struktúráját. Elvágja az axonok és sejttestek sűrű hálózatát és kontaktus alakul ki a fém és a sejtek citoplazmája között. Az ideghálózat traumája minden bizonnyal kihat a tüzelési minta jellegére. Azonban a kezeletlen és a kezelt mintafelvétel között nincs újabb fizikai behatás, a MEA kontaktus pedig rövid idejű (<1 perc). Így a két eredmény közötti különbség minden bizonnyal a beadott pszichofarmakon tényeges hatása.

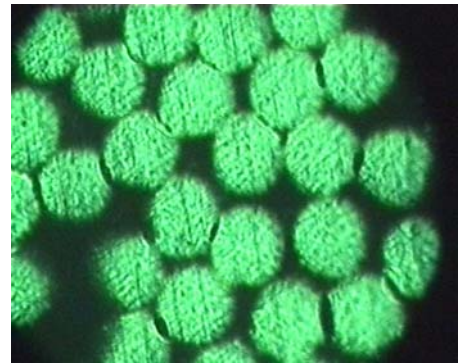
Az alábbiakban néhány saját fejlesztésű MEA nagyított képe látható:



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



100 μm



50 μm

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

A tesztalgoritmusok lefuttatása után az elektróda bejuttatása altatott állaton történik. (N_2O 80 tf% + Aether ad narcosim). A koponyacsont feltárása után vagy fűréssel, vagy a csont egy részének eltávolításával jutunk az agyszövethez. A fűrés kisebb traumát okoz az agyműködésében.



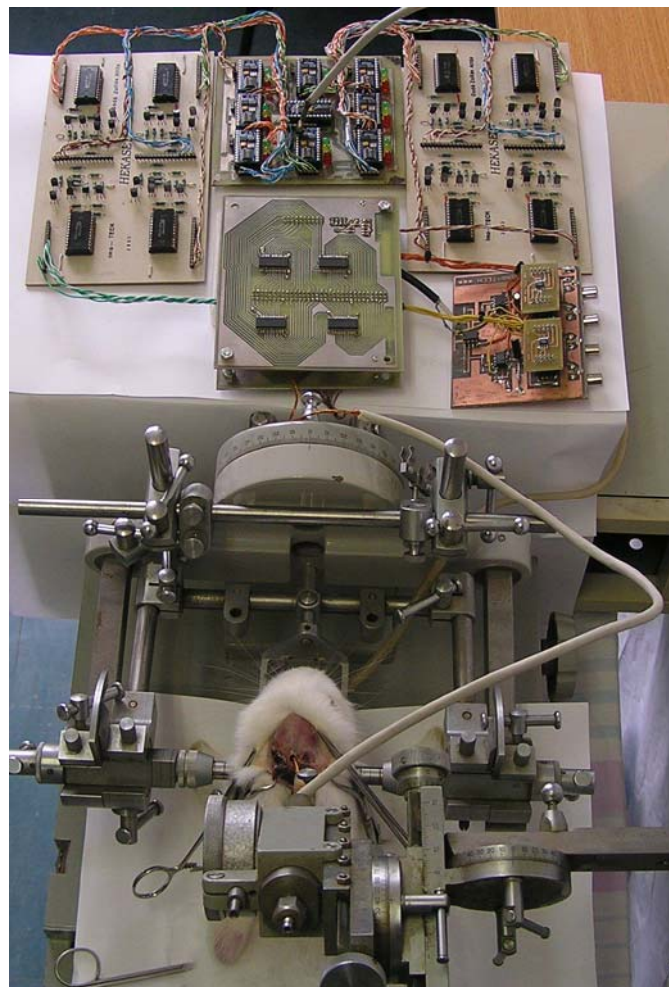
Koponyacsont részleges eltávolításával



Fúrt nyíláson keresztül

92. ábra. Elektrod beültetés stereotaxiás célzóberendezés segítségével

Fotó: Saját felvételek

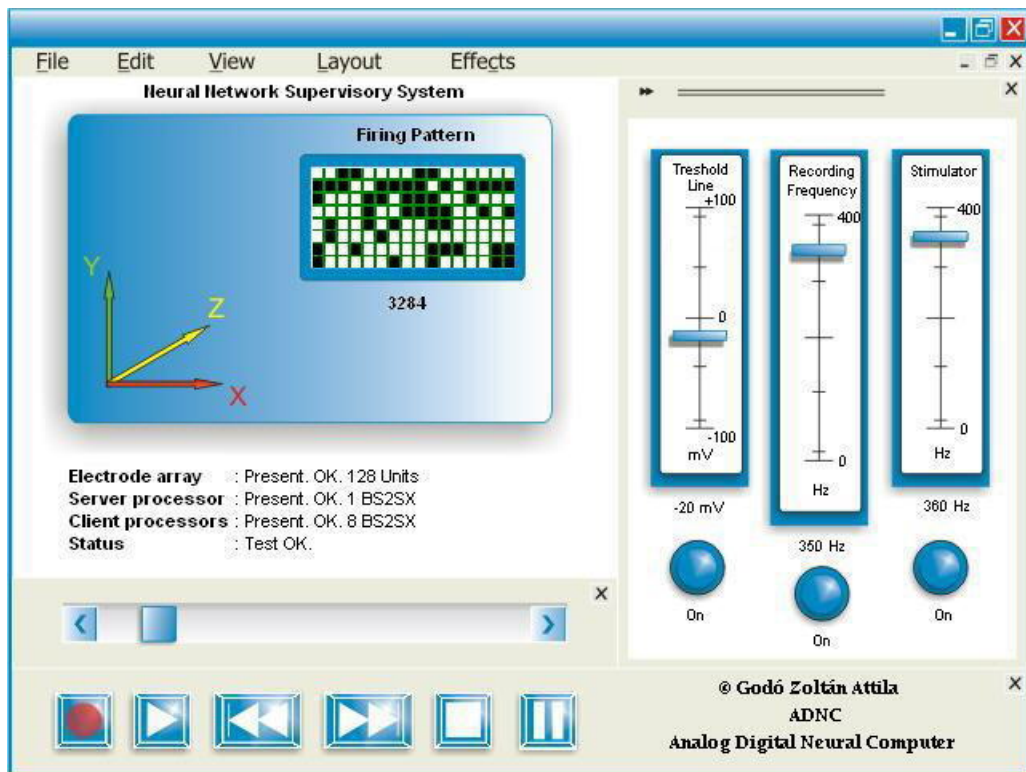


93. ábra. A teljes rendszer működés közben

Fotó: Saját felvétel

Az elektród bejuttatása után a narkózismélységet csökkentjük fenntartó szintre. Közben a tüzelési mátrixot folyamatosan rögzítjük és megjelenítjük a monitoron. Amikor a tüzelési mátrix eléri a standard mintázatra jellemző arányt (ez egy tapasztalati érték

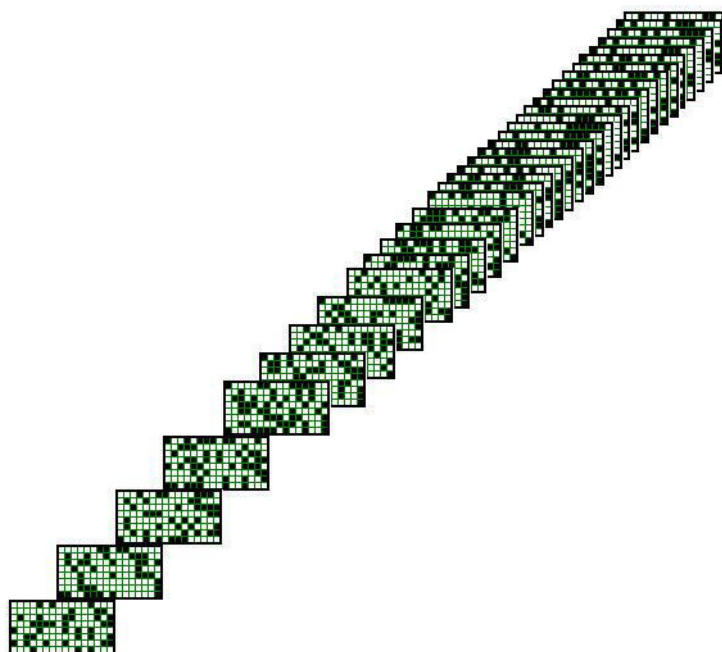
amely az adott narkózismélységre jellemző), felvételre kerül a kontroll mátrix. Ezután az állat közvetlenül a véráramba injiciálva kapja meg a gyógyszerkezelést. Néhány másodperc múlva a hatás már észlelhető a tüzelési mátrixon.



94. ábra. Az ADNC PC oldali kezelő felülete

A PC oldali kezelő felületről a neuronhálózat teljes működése felügyelhető (saját fejlesztésű szoftver). Beállítható a komparátor küszöbszintje amely alapján 'true' vagy 'false' érték képződik az akciós potenciál analóg jelgömbjének adott szakaszából. Beállítható továbbá a mintavételezés és az ingerlő frekvencia. Valamint a tüzelési mátrixokkal való műveletek, algoritmusok deklarációk a konzolon.

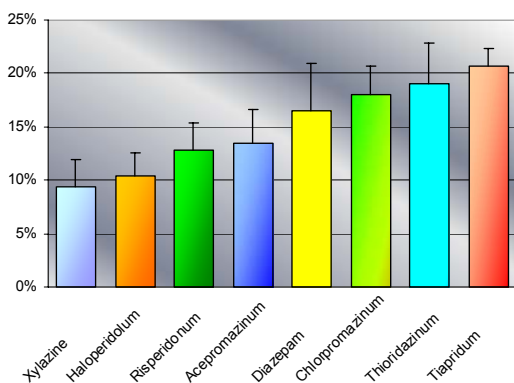
Az ADNC egy fejlesztés alatt lévő teljesen új módszeren alapuló, mikroelektronikai csúcstechnológiát alkalmazó, neuronhálózatos mérési rendszer. Így a tüzelési mátrixok értékelésének eredményeire egyelőre még nem dolgoztam ki a nyomtatott publikációkban is szemléletes ábrázolási módszert. Ezért jobb híján hagyományos grafikonokon igyekeztem ábrázolni a tüzelési mátrixban bekövetkező változások százalékos arányait. Lévéen rendkívül nagy mennyiségű adat prezentálására volna szükség. Egy perces 200Hz-es mintavételezés eredménye kb. 1,5 Mbit. Ez szabad szemmel átláthatatlan adatmennyiség lenne.



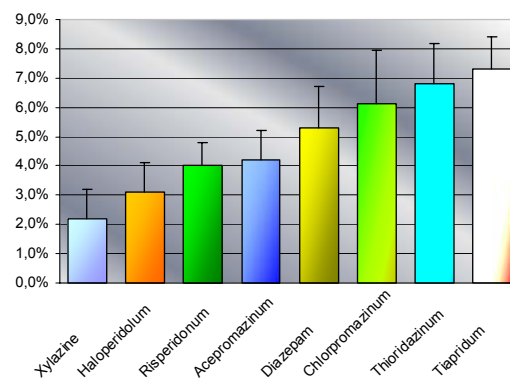
95. ábra. 0,16 másodperc tüzelési mátrix nyúl agytörzsből
(32% inaktív elem, 46% gyakoriság)

4.12.1 Házinyúl

Az alapvegyületekkel történt kezelés során az adatok kismértékű de értékelhető eltérést mutatnak a házinyúl agytörzs RAS területéről gyűjtött tüzelési mátrixokon. A változást minden esetben önmagukhoz képest határoztam meg.



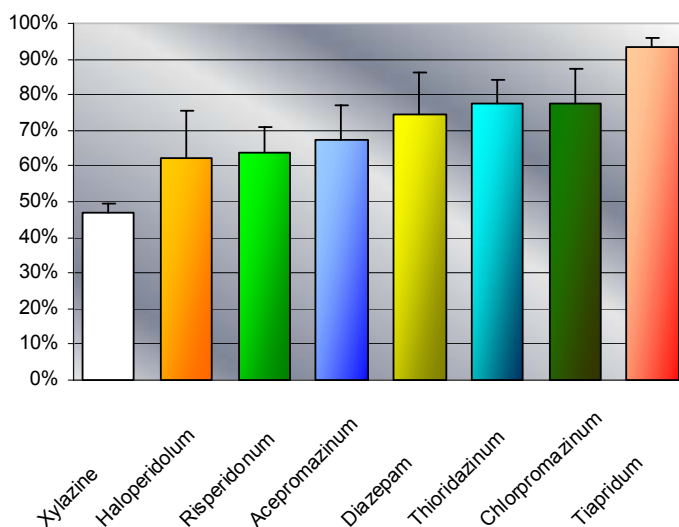
96. ábra. Alapvegyület kezelés után bekövetkező tüzelési gyakoriság csökkenése



97. ábra. Szinkron tüzelő egységek arányának változása kezelés hatására

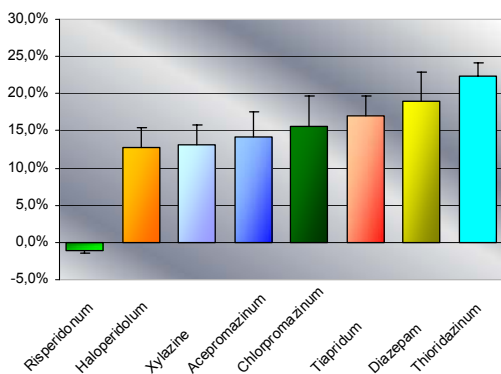
A tüzelési gyakoriság csökkenése jól azonosítható módon korrelált a szinkronban tüzelő egységek számának emelkedésével. Amellett a két adatsor között jelentős nagyságrendbeli különbség tapasztalható. A gyógyszerek a célzott terület bioelektromos tónusának csökkenése mellett tehát fokozták annak szinkron aktivitását. Az adatok

szignifikáns összefüggést mutatnak a motilitás csoportonkénti csökkenésének arányával. Csekély eltérés csupán a *Thioridazinum* és a *Chlorpromazinum* esetében figyelhető meg.

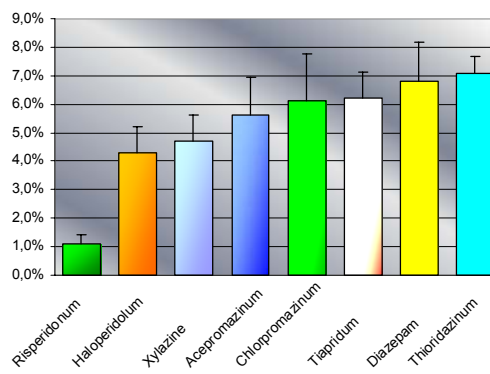


98. ábra. Motilitás csökkenés aránya kezelés hatására önmagukhoz képest

A gyógyszerek megszintetizált GSH konjugátumainak tesztje során további összefüggéseket figyelhettünk meg. A *Chlorpromazinum* – *Tiapridum* – *Diazepam* – *Thioridazinum* négyes ismét a hatékonyabb kategóriában helyezkedett el. A *Risperidonum* konjugátum azonban nem mutatott értékelhető változást, tehát hatástalannak mutatkozott.

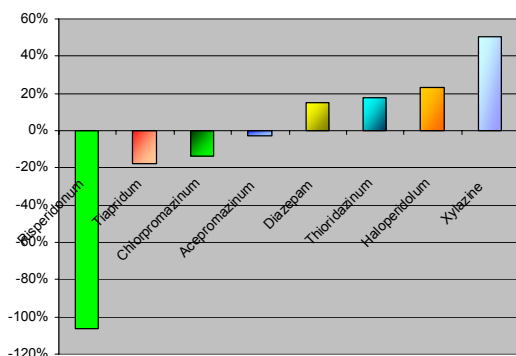


99. ábra. GSH konjugátum kezelés után bekövetkező tüzelési gyakoriság csökkenése

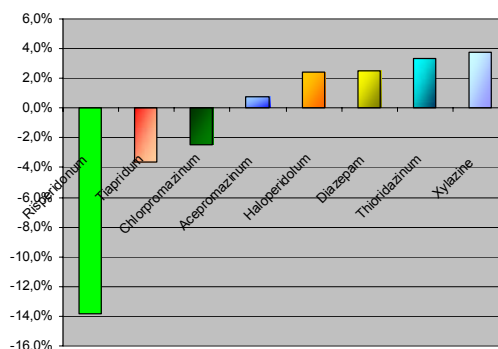


100. ábra. Szinkron tüzelő egységek arányának változása kezelés hatására

A tüzelési mintázatra gyakorolt hatásuk tekintetében jelentősen eltérő sorrend alakult ki, mint az alapvegyületekkel történt kezelés során. Azonban a gyógyszerrel és konjugátumával történt kezelés során kapott különbség szoros korrelációt mutatott a motilitás különbségében mutatkozó változással.



101. ábra. A gyógyszerek GSH konjugátumainak hatékonysága a motilitásra az alapvegyületekhez képest

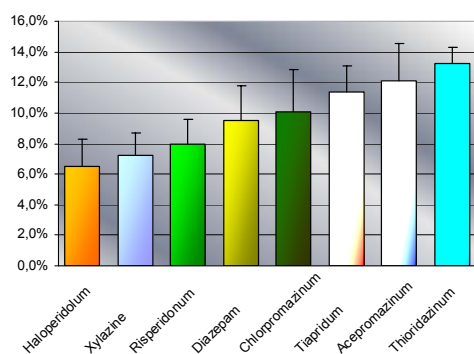


102. ábra. Tüzelési gyakoriság változás a gyógyszer konjugátumaival történő kezelés hatására az alapvegyülettel való kezeléshez képest

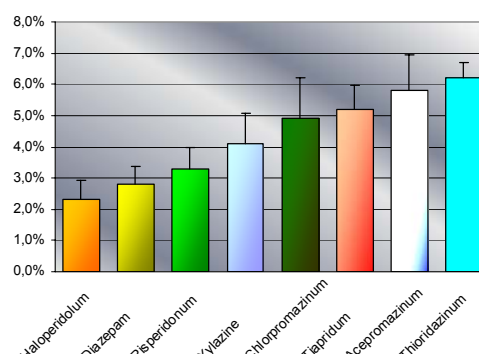
4.12.2 Ezüstkárász

A mintavételezés a hal esetében a vártnál is nehezebbnek és körülményesebbnek bizonyult. Számos alkalommal értékelhetetlen eredményt adott vagy egyáltalán nem detektált a rendszer tüzelési mintát. Ezért sok mérésismétlésre volt szükség.

A rendelkezésre álló hagyományos stereotaxiás készülék nem volt alkalmas a halak rögzítésére, ezért erre a célra egy saját berendezést konstruáltam. A méréseket szárazon végeztem, az akváriumon kívül. A hypoxiás stressz feltehetően nem lehetett jelentős, vagy legalábbis ugyan olyan mértékű volt, mint a kontroll csoportnál. A vízből történő kiemelésből a mérés végéig minden egyednél azonos kb. 2-3 perc idő telt el a rutinosan begyakorolt vizsgálatok során. A kontroll csoportot megegyező körülmények között vizsgáltam.



103. ábra. Kezelés után bekövetkező tüzelési gyakoriság csökkenése

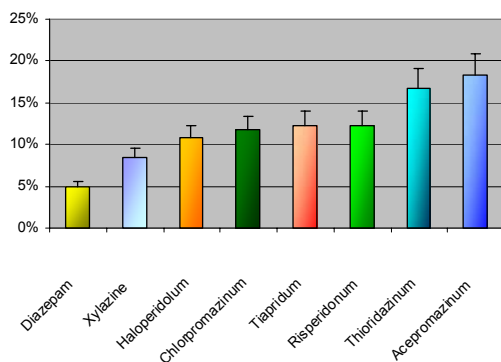


104. ábra. Szinkron tüzelő egységek arányának változása kezelés hatására

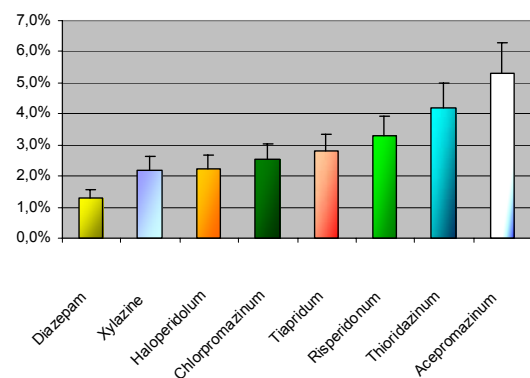
A tüzelési gyakoriság csökkenése a hal estében is szoros korrelációt mutatott a szinkronban tüzelő egységek számának emelkedésével. Sorrendjükben sok közös vonás fedezhető fel a légzés depressziójának mértékével (ld.: „Trankvillánsok és GSH

konjugátumainak hatékonysága ezüstkárászban” c. fejezet). Mindhárom grafikonon a *Thioridazinum* és az *Acepromazinum* mutatkozott a leghatékonyabbnak. A tüzelési mintázatra gyakorolt hatásában előrébb került a *Tiapridum* mint a légzés vizsgálat grafikonján, de a *Chlorpromazinnal* együtt minden mérés tekintetében nagy hatásfokúak közé sorolhatók az ezüstkárász esetében. A *Xylazin* nagyobb mértékben csökkentette a légzésszámot, mint az agytörzs tüzelését. Ezért jelentősen elmozdult az oszlopa a két vizsgálat eredményei között. További levonható következtetés, hogy a *Diazepam* a *Risperidonum* és –meglepetésre– a *Haloperidolum* a legcsekélyebb hatásfokúaknak bizonyultak mindkét kísérletsorozatban.

A GSH konjugátumok közül az *Acepromazinum* csökkentette legmarkánsabban a tüzelési gyakoriságot. A *Thioridazinummal* együtt, hasonlóan az alapvegyülettel történt kezelés eredményeihez, az első helyeket foglalják el. Kitűnik, hogy a *Risperidonum* GSH konjugátuma hatékonyabban csökkentette a tüzelési gyakoriságot, mint az alapvegyülete.

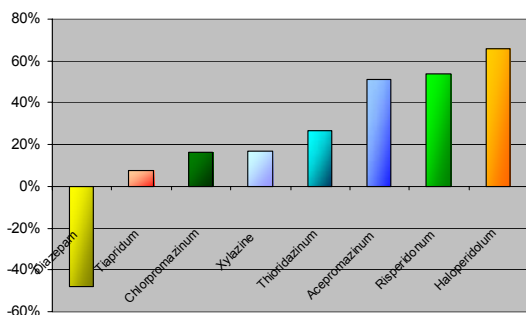


105. ábra. GSH konjugátum kezelés után bekövetkező tüzelési gyakoriság csökkenése

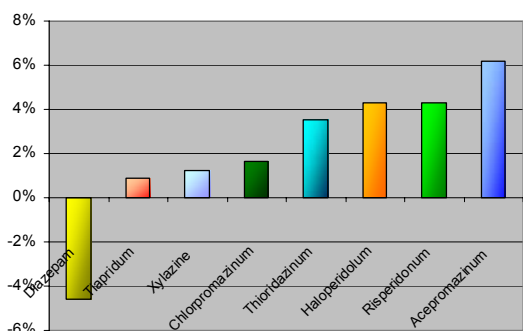


106. ábra. Szinkron tüzelő egységek arányának változása kezelés hatására

A tüzelési gyakoriság változásának az alapvegyület és konjugátuma közötti arányát ismét összevettem egy fizikális hatékonyság vizsgálati teszt eredményeivel (jelen esetben a légzésszám változás arányával ugyanezen kezeléseket követően). A két grafikonról jól azonosítható a szoros összefüggés.



107. ábra. A gyógyszerek GSH konjugátumainak légzésszám csökkenése az alapvegyületekhez képest



108. ábra. Tüzelési gyakoriság változás a gyógyszer konjugátumaival történő kezelés hatására az alapvegyülettel való kezeléshez képest

Megalapozottnak tűnik az a feltételezés, hogy a trankvilláns vegyületek, hasonlóan a narkotikumokhoz a RAS-ban a vezetés depressziója révén fejtik ki hatásukat. 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 központi idegrendszerre gyakorolt hatásuk jobb megértéséhez. Sajnos jelen értekezés terjedelmi korlátai ezt nem teszik lehetővé, így ez további célkitűzéseimként szerepel.

5 Az értekezés új és újszerű eredményei

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

Nagyszámú minta hatékonyabb GST enzimkinetikai analíziséhez újszerű, mikrokontroller alapú hardver és algoritmusainak kidolgozását végeztem el. A hibatűrő rendszer segítségével nagyobb pontossággal detektálható és elemezhető a trankvillánsok hatása a GST indukcióra.

Bizonyítottam, 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.

A fenti vegyületek tekintetében a házinyúl és ezüstkárász fajoknál hatékonysági sorrendeket állapítottam meg, motilitás, hot-plate, testhőmérséklet és testtömeg illetve légzésszám paraméterek értékelésével.

Kimutattam és összehasonlítottam, hogy az *Acepromazinum*, *Chlorpromazinum*, *Diazepam*, *Haloperidolum*, *Risperidonum*, *Thioridazinum*, *Tiapridum* és *Xylazine* vegyületek a laboratóriumi patkány, a házinyúl és az ezüstkárász egyes szerveiben (máj, agy, vese, lép, tüdő, szív, harántcsíkolt izom) különböző mértékű GST enzimaktivitás változást okoztak.

Megállapítottam és összehasonlítottam a fenti vegyületek GSH konjugátumainak hatékonyságát a házinyúl és ezüstkárász fajoknál a motilitás, hot-plate, testhőmérséklet és testtömeg illetve légzésszám paraméterek függvényében.

Olyan új elvű, analóg és digitális tulajdonságokat egyesítő multiprocesszoros mesterséges neuronhálózatot fejlesztettem és algoritmusait dolgoztam ki, amellyel 128

elemű mikroelektrodatömbön keresztül kétirányú kommunikáció valósítható 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.

Megállapítottam és fizikális hatékonysági teszt eredményeivel összehasonlítottam a vizsgált gyógyszerek hatását az agytörzs tüzelési mintázatára a házinyúl és az ezüstkárász esetében.

Megállapítottam és fizikális hatékonysági teszt eredményeivel összehasonlítottam a vizsgált gyógyszerek megszintetizált GSH konjugátumainak hatását az agytörzs tüzelési mintázatára a házinyúl és az ezüstkárász esetében.

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.

6 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 trankvillánsok 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.

7 Összefoglalás

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 trankvillánsok, szorongást oldó anxiolitikumok, szedatívumok. Azonban a trankvillánsok –különösen a neuroleptikumok– jelentős számú kellemetlen és olykor veszélyes mellékhatással rendelkeznek (dyskinesziák, parkinsonismus, akatizia, agresszivitás, endokrin-, cardiovascularis-, antikolinerg-, haematológiai mellékhatások, stb.). Ezek oka és mechanizmusa nem teljesen tisztázott.

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 filogenézis 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.

Feltételeztem, hogy a fenti gyógyszerek némelyike glutation-S-transzferáz enzim (GST) segítségével, a glutation-S konjugáció útján is metabolizálódhatnak, illetve kiürülhetnek 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 idegrendszeri glutamáterg neurotranszmisszió folyamatait is.

A trankvillánsok egyik fő támadáspontja az agytörzsi formatio reticularis és elsősorban a retikuláris aktiváló rendszer (RAS) összetett pályarendszereinek idegsejtjei. A gyógyszerek jellegzetes szinkrontüzelési jelenséget váltanak ki a kéregben, ami feltételezhetően kapcsolatban áll a központi idegrendszerre gyakorolt nyugtató hatással.

A tüzelési mintázat értékelése akkor lehet hatékony, ha egy időben minél több elektródával tudunk valós időben regisztrálni (jelen méréseim során 128 elemű elektróda tömbbel). 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 disszertációmban néhány a humán- és állatgyógyászatban (csak részben) alkalmazott trunkvilláns gyógyszerek hatását vizsgáltam a GST indukciójára, három állatfaj különböző szerveiben. A GSH-gyógyszer konjugátumok képződésének lehetőségét és azok biológiai hatását teszteltem. Bioinformatikai módszereket alkalmaztam és dolgoztam ki a GST enzim aktivitás mérésére. 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 neuroinformatika területeiről.

A gyógyszerválasztási szempont a heterogén kémiai szerkezet hasonló hatásprofil mellett, a hagyományos és új generációs besorolás, valamint a humán, állat és mindkettőnél történő gyakorlati alkalmazás elterjedtsége. Vizsgáltam a szedatívumok közül a *Xylazint*, az anxiolyticumok közül a *Diazepamot*, a második generációs neuroleptikumok közül a *Tiapridumot* és a *Risperidonumot* valamint a hagyományos neuroleptikumok közül a *Chlorpromazinumot*, *Acepromazinumot*, *Thioridazinumot* és a *Haloperidolumot*.

A kísérleti fajok közül első körben laboratóriumi patkányon vizsgáltam, csak a humán gyógyászatban alkalmazott neuroleptikumokat. A patkány kísérletek sikerességének tükrében később gazdasági haszonállatok modelljeként, kiterjesztett kísérleteket végeztem házinyúlön és ezüstkárászon.

A GST enzim egyik szubsztrátja a CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzén). A GSH-val történő konjugáció következtében színes komplex képződik. A standard körülmények között képződött termék mennyisége egyenes arányban áll a GST enzim aktivitásával, ami fotometriás úton mérhető. A három faj egyedei nyolc napon keresztül kaptak kezelést

a gyógyszerekből, az irodalmi adatok –illetve annak hiányában– kalkulált, testtömeg arányos dózisban.

A kezelés ideje alatt a fizikális paraméterek, mint a testhőmérséklet, testtömeg, valamint szedációs és analgézia tesztek mint a hot-plate teszt és a motilitás mérés, folyamatos regisztrálásra kerültek. A méréseket a megszintetizált GSH-gyógyszer konjugátumokkal is elvégeztem.

Az enzimkinetikai mérésekhez az állatok feláldozása után a szerveikből standard eljárás szerint homogenizátumot készítettem és GSH valamint CDNB hozzáadásával a GST enzimaktivitást mértem.

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 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 során sikeresen bizonyított.

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.

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 *Haloperidolum* és a *Chlorpromazinum* okozta a legnagyobb GST indukciót. Így ezek konjugátumainak megjelenése a legvalószínűbb.

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 kerülhettek előtérbe az adott szervben, tehát a GST gén expressziója csökkenhetett, amelyre feltételezhetően ezekben az esetekben nem volt olyan mértékben szükség.

A házinyúl motilitás változását a kezelések hatására több szempontból értékeltem. A legaktívabb mérés és az utolsó kezelési nap differenciája alapján a *Diazepam* a *Thioridazinum* és a *Tiapridum* bizonyult a leghatékonyabbnak. A *Tiapridum* mint csekély mellékhatású új típusú neuroleptikum a patkány agyban sem okozott jelentős GST indukciót ellentétben a *Thioridazinummal*.

A Hot-Plate teszten csak a *Risperidonum* a *Haloperidolum* és a *Diazepam* szerepelt gyengébben. A kezelések 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 *Thioridazinum* és a *Chlorpromazinum* esetében pedig fogyás volt tapasztalható. A *Thioridazinum* és a *Chlorpromazinum* 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 *Haloperidolum* okozta a legkisebb tömeggyarapodás elmaradást.

Az egyes szervekben általában a *Haloperidolum* és a *Thioridazinum* mutatta a legnagyobb GST indukciót és a *Tiapridum* az alacsonyabbakat. A máj mint a detoxifikációs mechanizmusok legfontosabb helyszíne, a *Risperidonum* 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 befolyásolhatják a neurotranszmisszió folyamatát. Az agytörzsi mintákban az *Acepromazinum*, 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 leírták. A két új típusú neuroleptikum —amelyeket egyenlőre 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 *Chlorpromazinum* 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 *Chlorpromazinum* bizonyult a leggyengébb míg a *Thioridazinum* 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 *Chlorpromazinum* 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 *Chlorpromazinum* és az *Acepromazinum* csökkentette a legjelentősebben. Míg az alapvegyületeknél a *Haloperidolum* és a *Diazepam*. Az új típusú szerek közül a *Risperidonum* konjugátuma csekélyebb a *Tiapridum*é jelentősebb hibernációt idézett elő az alapvegyületnél.

A házinyúl GST aktivitása jelentősen nagyobbak mutatkozott mint a 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 házinyulat. Így a detoxifikációs rendszere sem olyan aktív.

Az ezüstkárász esetében a légzésszámot az *Acepromazinum* és a *Thioridazinum* csökkentette a legjelentősebben és a GSH konjugátumai is hasonlóan hatásosak voltak. A *Risperidonum* és a *Haloperidolum* nem csökkentette a légzésszámot de a glutation konjugátumai jelentősen, tehát a konjugátumok hatékonyabbnak mutatkoztak. A *Diazepam* konjugátum azonban emelte a légzésszámot az alapvegyülethez képest. A GST indukciót általában az *Acepromazinum* váltotta ki jelentősen. Az agyban emellett a *Diazepam* és a *Thioridazinum*. Az új típusú neuroleptikumok alacsony indukciót mutattak, a *Risperidonum* pedig jellemzően negatív értéket. Feltehetően az ezüstkárászban nem a GSH a fő metabolikus útvonal első lépcsője.

A GST indukciós adatokat vegyületenkénti csoportosításban is összehasonlítottam.

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 mikroelektródatömbön keresztül kétirányú kommunikációt valósíthattam meg az élő idegrendszer egy célzott területével. A rendszer újszerűen közelíti meg a neuronhálózat és az idegrendszer interakcióját, azt ismeretlen kapcsolású analóg részeként kezeli. Az ADNC analóg és digitális felülete a legkorszerűbb 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.

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.

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 lehetne vizsgálni a szinkron tüzelés természetét és viszonyát a tüzelési aktivitással. Célszerű lenne 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 teszik lehetővé, így ez további célkitűzéseimként szerepel.

Eredményeim arra utalnak, hogy a vizsgált pszichoaktív vegyületek GST-enziminduktív hatással is rendelkeznek. Mindamellet 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

haszonlóan, befolyásolhatják a központi idegrendszeri glutamáterg neurotranszmissziót, így hozzájárulhatnak egyes mellékhatások 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 glutation komplexek megjelenésével is.

Az eredményeim tükrében célszerű lenne egyes, a humán gyógyászatban már hosszabb ideje bevált gyógyszerek bevezethetőségét tovább vizsgálni az állatgyógyászat egyes területein. Az új generációs neuroleptikumok jóval kedvezőbb mellékhatás profil mellett kevésbé terhelik meg a szervezetet. Mérsékeltőbbek 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 tehát, a jelentős GST indukciót kiváltó gyógyszerek GSH konjugátumainak további vizsgálata, a konjugátumok hatékonyságának részletesebb elemzése, szerepének vizsgálata a mellékhatások kialakulásában egyes szervek szintjén és esetleges interakcióinak felderítése a glutamáterg neurotranszmisszió folyamatával is.

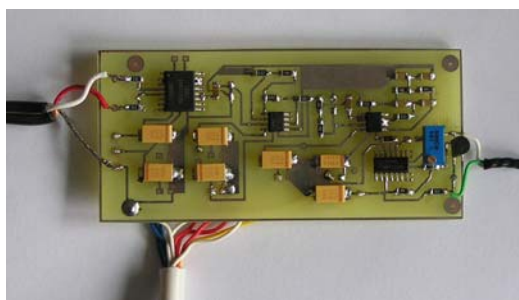
8 Új célkitűzések

Az eddigi vizsgálataim eredményei felbátorítottak a multiprocesszoros neuronhálózatok és a központi idegrendszer interakciójának további kutatására. A pozitív visszajelzések és több kutatóintézet érdeklődése tovább inspirál.

Terveim között szerepel egy 128 később 256 processzorból felépülő neuronhálózat kiépítése és algoritmusainak kidolgozása, amelyben minden egyes elektródatömb elemet egy-egy önálló processzor felügyel. Így nem csak a kommunikáció minőségén lehet javítani, hanem összetettebb algoritmusok is elvégezhetővé válnának. Meggyőződésem, hogy a neuronhálózat architektúrájának minél inkább konvergálnia kell az élő idegrendszer struktúrájához. Switch rendszer kiépítésével hardver szinten szeretném emulálni az idegrendszeri plaszticitás jelenségét.

Az elektródatömb továbbfejlesztésével minél több idegsejt tüzelésének valós idejű feldolgozását szeretném megoldani minél kisebb fizikai beavatkozással. Meg kívánom vizsgálni annak lehetőségét, hogy fizikai kontaktus nélkül, nagyfrekvenciás elektromágneses impulzusokkal hogyan oldható meg a kétirányú kommunikáció az idegsejtekkel.

Folyamatosan jelennek meg az újabb FET bemenetű CMOS differenciál erősítő IC-k amelyek egyre jobb karakterisztikát mutatnak. Így az ADNC analóg felületébe integrálva törekedni kívánok a még precízebb analóg jelfeldolgozásra.



Legújabb, beépítésre még nem került analóg jelfeldolgozó az ADNC-AS –hez.

A neuroleptikumokon kívül egyéb pszichofarmakonok, más agytörzsi területeken (pl. kéreg) indukált változásainak regisztrálására is alkalmassá kívánom tenni a neuronhálózatot. Tanulási algoritmusok kidolgozásával a mesterséges neuronhálózat és az élő idegrendszer egy magasabb szintű kétirányú kommunikációjának lehetőségeit kívánom tanulmányozni.

9 Summary

9.1 Introduction

Tranquilizers that have a strong blocking effect on the central nervous system of vertebrata, reduce stress and aggression, anxiolytics and sedatives that decrease anxiety have a very significant role in human therapeutics, veterinary practice, animal experiments as well as in stock-raising. They are the most important medicines used for the treatment of schizophrenia in human therapeutics. The anxiety and excitement of psychotic patients decrease, hallucinations and delusions remit or cease as the effect of the treatment with neuroleptic (antipsychotic) medicine.

The application of a small dose sedates wild and aggressive animals and makes them treatable. It turns off the natural or artificially evoked anger reactions and fighting, aggressive behavior. Therefore, they are used in the case of laboratory animals (rodents, rabbits, monkeys, etc.) in order to be able to perform various operations.

They are also widely used in both veterinary science and breeding. In the case of smaller, pain-free but unpleasant surgery it makes animals treatable, or – combined with analgetics – even painful operations can be carried out (neurolepanalgesia). With their use, the application of the more dangerous hypnotics or narcotics can be avoided.

In the case of livestock breeding they are used mainly to reduce the negative effects of transportation stress, to protect valuable animals and as a tool in medical taming. Stress can have a serious negative effect on homeostasis, therefore on reproduction, growth, capability of resistance and various other breeding parameters. Therefore, tranquilizers have economic significance and a *raison d'être* in the field of livestock breeding as well.

At the same time, tranquilizers – and neuroleptics in particular- have a significant number of, sometimes dangerous, side effects (dyskinesia, Parkinsonism, akatisia, aggressiveness, endocrine-, cardiovascular-, anticholinergic- or haematologic side effects, etc.). On the long run, this can result in the alteration of the fat and muscle ratio, may cause behavioral problems, may decrease the index of reproduction, etc. Their application is also limited because the quantity of chemical agents remaining in livestock is strictly controlled by the considerations of consumer protection. Statutes of the Ministry of Health (2/1999. (II.5) EüM.) and the European Parliament and Council (2377/90/EGK)

regulate the maximum quantity of animal medicament remains in food, including that of tranquilizers.

The applied medicaments used to achieve various biological effects – including the compounds that I have examined – are xenobiotics (are not present in the body normally.) For their removal from the organism special metabolism enzymes and transporting mechanisms developed during phylogenesis. Increased metabolism encumbers the detoxification mechanisms of particular organs to a varying degree. As a result of this, there is a decreased capacity for protection against other harmful phenomena. It reduces the immune protection performance of animals which may influence the quality and quantity of useful production.

A significant number of metabolites of antipsychotic and tranquilizing medicaments have been identified. However, not all the intermediers are known and it is not known either what kind of biological effect they have or whether they play a role in the almost always observable development of side effects or in the evolution of individual capacity for endurance and toxic effects (DAHL and STRANDJORD, 1977; DOLLERY, 1991; YEUNG et al., 1993; JAVAID, 1994).

I have supposed that some of the above mentioned medicaments (primarily halogen substituent compounds) with the help of Glutathione-S-Transferase enzyme (GST), through Glutathione S- Conjugation can metabolize, or rather can be removed from the organism. If this happens, we can also suppose that the compounds themselves can have an induction effect on the synthesis of enzymes that are involved in their metabolism. Therefore, the synthesis of the GST enzyme can also intensify. This way the glutathione conjugates of tranquillant compounds can be generated in an increased degree (e.g. in the brain tissue as well). It may also be supposed that the glutathione conjugates can interact in the central nervous system with proteins and receptors that have a role in the effect mechanism of tranquilizers. At the same time, glutathione conjugates, similarly to other γ -glutamine peptides and glutathione analogues, can influence the glutamatergic neurotransmission of the central nervous system. (VARGA et al., 1988; MCMOHAN et al., 2000; JANÁKY et al., 2000; HERMANN et al., 2004). Thus, these compounds can take effect in the central nervous system in another route, through the blocking of the stimulating mechanism as well. This way they can also influence the development of side effects.

One of the main targets of tranquilizers is the formatio reticularis of the brain stem and the neurons of the reticular activating system (RAS). Based mainly on EEG

(Electroencephalography) examinations it seems that tranquilizers evoke a typical synchronous firing phenomenon in the cortex which is probably related to the sedative effect on the central nervous system. The mechanism for the development of the synchronization is not known, but we know that the RAS has a crucial role in its regulation. The EEG examination provides rather indirect information about the operation of the nervous system, therefore the investigation of various regions of the central nervous system and the neurons having a role in it is absolutely necessary. To carry this out we need neuroinformatic methods of investigation. With the help of this the firing of particular neurons - that is their depolarization frequency -, the alteration of field potential (developed as a result of the activity of neurons) or the registration or analysis of action potentials can be examined. Little is known about the nature of firing patterns and their relation with tranquilizers and their glutathione conjugates' efficiency, the effect mechanism of certain compounds. It is not known what kind of firing pattern changes do these compounds cause in the formatio reticularis.

The evaluation of the firing pattern can be efficient if we can register with as many electrodes as possible in real time (with an array of 128 electrodes in my investigations.) It provides a number of other possibilities for examination, if a system like this is also capable of stimulation, i.e. it is capable of establishing two directional communication with a targeted part of the central nervous system. An artificial neural network, that shows a surface analogy with the structure of the living nervous system connected to it, can be capable of processing such a large amount of data. The amazing development of digital technology made the practical, neurobiological use of high performance microcontrollers possible, however, up to the present only very few such applications were created. There is no bibliographical data that would show that a microcontroller based artificial neural network would be able to establish two-directional communication through a multielectrode array with the central nervous system connected to it. Therefore, I aimed at developing a neuroinformatic system based on new principles and at writing its algorithms. With the help of this system we can examine the firing patterns in the brain stem, the operation of the nervous system, the communication of particular areas with other, distant regions and the effects of tranquilizers and their metabolites on the electronic activity of the brain stem's formatio reticularis.

Intensive research is being carried out in order to reduce the significant number of side effects and to synthesize new, more efficient compounds; therefore the medicaments are changing from time to time in the medicaments register. It is an important task to

understand the metabolism of this chemically diverse group of medicaments and its elimination in animals. The more precise knowledge of the bioelectric activity of the nervous system and the analysis of the tranquillizer effects on it can help us understand their effect mechanism better. My investigations can help in testing the new and more efficient compounds, and in the examination of their biological effects. Experiments on various animals can provide data regarding which medicaments can be used trustworthily with which animals and can largely contribute to the exploration of biometabolic ways.

In my dissertation I have examined the effects of some of the tranquilizers (only partially) used in human and animal therapeutics on GST induction, in different organs of three animal species. I have tested the possibility of formation of GSH-medicine conjugates and their biological effects. I have used and developed bioinformatic methods for measuring GST enzyme activity. I have developed an original, microcontroller based multiprocessor artificial neural network that integrates both digital and analog characteristics, as well as its algorithms with which I have examined the effect of medicaments and their metabolites on the firing pattern of the brain stem. The results of my investigation are interdisciplinary, from the area of neurobiology and neuroinformatics.

9.2 Objectives

I examine certain significant medicaments from the compounds with tranquilizing effect. The selection is based on heterogeneous chemical structure with a similar effect-profile, on the traditional and new generational classification, and the extent of practical use in human and animal therapeutics (or in both.)

In my dissertation I am looking for answers and have developed solutions for the following questions:

1. The development of a new, microcontroller-based measuring system, its hardware and software that enables the fast and precise measurement of the enzyme activity of a large number of biological samples, alongside with the monitoring, analyzing and evaluating data gained during enzyme kinetic measurements.
2. Are the examined compounds in vitro substrates of GST enzymes? The 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as a toxic xenobiotic is the substrate of the GST enzyme and the enzyme activity can be measured photometrically by it. Do the examined medicaments block competitively the development of GSH-CDNB conjugates?

3. In which organs and to what extent do some compounds with a tranquilizing effect generate GST enzyme induction, i.e. the protein synthesis of the new enzyme, gene expression?
4. Is there a difference between the GST induction in particular organs Whatof laboratory rats (*Rattus Norvegicus*) widely used in laboratory practice; in rabbits (*Oryctolagus Cuniculus*) that are used as the model for mammal farm animals and in the case of fish, silver crucian (*Carassius Auratus*) that holds significance in animal breeding?
5. What is the efficiency and applicability of certain medicaments on farm animals (using rabbits and the silver crucian as models) compared to widespread compounds used in human and animal therapeutics? Special emphasis is put on the role of first- and second-generation neuroleptics.
6. Are the GSH conjugates effective in the case of the above mentioned species? Can they have a role in the appearance of side effects?
7. Developing and working out an original multi-electrode diversion system, a multi-electrode array and an amplifier system based on the newest technology that enables the examination of the effect of various compounds on the firing pattern of the neurons in the brain stem.
8. The development of a new multiprocessor artificial neural network (and related algorithms) that is able to process in real time the multi-electrode firing sample matrixes and to establish two-directional communication with the nervous system.
9. Using the above described system, do the examined tranquilizing compounds cause firing pattern changes -and if yes, what kind – in the brain stem's formatio reticularis? Is there a difference in the case of the firing pattern changes caused by the GSH conjugates of the same compounds?

*Between 1998 and 2007 I have worked in the following institutions
(in chronological order):*

- University of Debrecen Medical School, Institute of Physiology
- Kossuth Lajos University, Faculty of Sciences, Department of Animal Anatomy and Physiology
- University of Debrecen, Faculty of Engineering, Department of Electrical Engineering

- University of Debrecen, Centre of Agricultural Sciences, Faculty of Engineering, Department of Environmental- and Chemical Engineering. Laboratory of Electrophysiology and Bioinformatics.

9.3 Results

For the complex enzyme kinetic analysis of the huge amount of data (more than 5,000 enzyme kinetic measurements, the same amount of protein content determinations, that is more than 110,000 data lines) I have developed a microcontroller based processing system with its algorithms. The 14 (or in the 2nd version 24 bit) A/D converter quantized the detector's analog signals with an increased precision. In order to correct the problems causing inaccuracy I have developed a correcting algorithm, I have tested it and applied it. For the analysis of kinetic curves I have developed various algorithms (linear section search, biggest netto product formation section search) for the BS2/SX microcontroller. The system proved to be successful during processing the great amount of data and during comparative examinations.

Under In Vitro circumstances all the examined drugs competitively hindered the formation of the CDNB-GSH conjugates in the presence of GST. All compounds proved to be the substrates of the enzyme with different affinity and catalyzed the formation of the GSH drug complex. *Thioridazinum* showed the most significant blocking in treatment dose, followed by *Tiapridum*, *Xylazin*, etc. During the treatment, a concentration of similar ratio develops in the organism, which implies the possibility of the formation of the conjugates.

In all the treated groups of the laboratory rats the GST activity in the liver increased. The same tendency was observable in the brain stem's homogenizate as well, although GST activity was only one-20th or one-30th of that of in the liver. Traditional neuroleptics – with more side effects – caused less GST induction in general, than new generational medicaments – causing fewer side effects. In the brain, *Haloperidolum* and *Chlorpromazinume* caused the biggest GST induction. Therefore, the appearance of their conjugates is the most likely.

The compounds, except for the new generational *Risperidonume*, caused significant increase in the kidney as well. In the spleen, GST activity typically decreased compared to the control. The increase of enzyme activity signals activation of the GSH

detoxification system. The larger scale it is, the more the substance burdens the defense capacity of the cells in the given organ. The negative value may show that other detoxification mechanisms came to the foreground, which distracted the capacity from the GST gene expression, for which there was no need to a large scale in these cases.

For the decrease of motility in rabbits the *Diazepam*, the *Thioridazinum*, and *Tiapridum* were the most effective. The *Tiapridum*, as a new generational neuroleptic with few side effects did not cause significant GST induction in brains of rats either (as opposed to *Thioridazinum*.)

In the case of Hot Plate Tests, only *Risperidonum*, *Haloperidolum* and *Diazepam* performed badly. The treatments caused hibernation usually on the 3rd or 4th day; for these the body compensated the following days. There was no body weight gain observable during treatments. In the case of *Risperidonum*, *Thioridazinum* and *Chlorpromazinum* weight loss was observed. *Thioridazinum* and *Chlorpromazinum* are high efficiency, traditional neuroleptics, so in these cases this result is not surprising. However, *Risperidonum* is second generational, so a more positive side effect profile would be expected (this is the case regarding humans.) *Tiapridum* and *Haloperidolum* caused the least body weight gain leeway.

Usually, *Haloperidolum* and *Thioridazinum* caused the biggest GST induction in organs and *Tiapridum* the lowest. The liver, as the most important place of detoxification mechanisms, reacted with significant GST induction in the case of all treatment, except for *Risperidonum*. The kidney, similarly to the liver and heart showed strong GST induction, except for *Tiapridum*, or in the case of the heart for *Diazepam*. This substance caused significant increase only in the liver.

Apart from the organs' detoxification load, the brain deserves special attention, where glutathione conjugates can influence neurotransmission the most.

In the brain stem samples all examined compounds with the exception of *Acepromazinum*, *Tiapridum* and *Risperidonum* caused GST induction, which could cause the appearance of GSH conjugates in the brain tissue. This can influence the process of glutamatergic neurotransmission, as it has been seen in the case of various γ -glutamine peptides and glutathione analogs (VARGA et al., 1988; MCMOHAN et al., 2000). The two new generational neuroleptics- that are not used in animal therapeutics so far – did not increase GST induction. It is possible that the lack of accumulation of GSH

conjugates can be one of the reasons for the fewer side effects of these substances. In the brain stem of rabbits chlorpromazine and *Xylazin* caused the biggest GST induction.

I have carried out the same efficiency tests on the synthesized glutathione conjugates of the medicaments as well. From among the conjugates *Risperidonum* and *Chlorpromazinume* proved to have the weakest, while *Xylazin* and *Thioridazinum* the strongest effect. The order is almost the same as in the case of the scale of GST induction in the liver. In the hot plate test, however, *Xylazin*, *Chlorpromazinume* and *Tiapridum* showed smaller values. This, however, can be connected to the smaller degree of analgesia as the test is based on pain stimulus. Body temperature one hour after the treatment was decreased most significantly by *Chlorpromazinume* and *Acepromazinum*. While in the case of base compounds it was the *Haloperidolum* and *Diazepam*. From the new type of substances, the conjugate of *Risperidonum* caused less, that of *tiapridum* more significant hibernation than the base compound.

It is interesting that the GST activity of rabbits was significantly (sometimes 10 times) larger than that of laboratory rats. This is probably the result of the fact that SPF Wistar rats have been bred in laboratory circumstances for several generations; therefore they are less affected by the environment than rabbits are. Therefore, their detoxification system is less active too.

In the case of silver crucian carp breathing was slowed down most significantly by *Acepromazinum* and *Thioridazinum* and their GSH conjugates were similarly effective. *Risperidonum* and *Haloperidolum* did not slow down breathing but their glutathione conjugates did so significantly. The *Diazepam* conjugate increased breathing compared to the based compound. GST induction was evoked significantly by *Acepromazinume*; in the brain also by *Diazepam* and *Thioridazinum*. New type neuroleptics showed low induction, and *Risperidonum* a negative value. Supposedly in the case of silver crucian carp it is not the GSH that is the main metabolic path's first step.

GST induction data have been compared in compound grouping as well.

I also examined the effect of medicaments and their glutathione conjugates on the bioelectric activity of the brain stem. To achieve this I have developed an original multiprocessor artificial neural network incorporating analog and digital features (ADNC: Analog Digital Neural Computer) and its related algorithms, with the help of which we can establish two-directional communication with a targeted section of the living nervous

system through a 128 multi electrode array (MEA). The system offers a new approach towards the interaction of the neural network and the nervous system; it treats it as its analog part connected to it in an unknown way.

The analog and digital surface of the ADNC integrates microelectronic hardware of the newest technology. The digital surface consists of 9 high performance BS2/SX microcontrollers. Apart from detecting firing matrixes it can also perform algorithmic operations on them and by re-stimulating its result it can communicate with the nervous system.

As a result of treatments, with the decrease of firing frequency, the ratio of synchronous firing grew; therefore the bioelectric tone of the brain stem moderated and became more ordered at the same time. The decrease of the firing rate by certain medicaments, that is the ratio between the base compound and its GSH conjugate revealed a close connection with efficiency tests, in the case of rabbits with motility results, and in the case of fish with the scale of breathing depression.

It seems valid that tranquilizing compounds, similarly to narcotics may be effective in the RAS as a result of the depression of conduction. The RAS activity's effect can be the change of the ratio of the "sign-noise relation", with the decrease of absolute irritability. Next to the decrease in the firing rate, the ordered firing activity increased to a certain degree. My investigations also show that the effects of psychopharmacons in the central nervous system's firing matrix still provide new possibilities for analysis. The nature of synchronous firing and its relation with firing activity should be examined in more detail. The nature of response patterns for stimulation could be investigated, comparing the effects of various treatments. Patterns could be analyzed from numerous, new point-of-views and with new algorithms that would bring us closer to the better understanding of the effect of tranquilizers on the central nervous system. Unfortunately, the length of this publication does not allow this so it is part of my future objectives.

My findings show that the examined psychoactive compounds have GST enzyme inductive effect as well. At the same time, as a result of GST activity in the brain stem the glutathione conjugates of the compounds can be formulated in the brain tissue or in other organs as well. The glutathione conjugates, similarly to other γ -glutamine peptides and glutathione analogs can influence the central nervous system's glutamatergic

neurotransmission, this way contributing to the development of symptoms of certain side effects, like that of pseudo parkinsonism.

Certain psychopharmacons caused the blocking of GST. Probably other metabolic mechanisms play a role in this. Probably the isoenzymes found in the organs are responsible for the specific tissue effects caused by medicaments.

The results show the differences between the traditional and new compounds. The known side effects are in a supposedly close relation with the appearance of the formed glutathione complexes.

Based on my findings, it seems that it would be useful to examine the applicability of medicaments used successfully in human therapeutics in the case of certain animal species. The new generational neuroleptics have better side effect profiles and do not burden the organism so much. The negative effects of chronic treatment could be more moderate in the case of animal breeding as well. At the same time, their efficiency is not worse than that of traditional medicaments.

The continued examination of GSH conjugates of those medicaments that cause significant GST induction may be necessary. The efficiency of conjugates and their role in the development of side effects on the level of particular organs and the examination of their possible interaction with the process of glutamatergic neurotransmission.

9.4 The new and original findings of the dissertation

1. During my investigations I have touched upon various fields of study with my results. In the following, I will summarize my findings according to the nature of the various disciplines.
2. I have developed a novel microcontroller based hardware and its connected algorithms for a more effective GST enzyme kinetic analysis of a great amount of samples. With the help of the system the effect of tranquilizers on GST induction can be detected and analyzed more precisely.
3. I have proven that *Acepromazinum*, chloropromazin, *Diazepam*, *Haloperidolum*, *Risperidonum*, *Thioridazinum*, *Tiapridum* and *Xylazine* medicines with a tranquilizing effect, all – to a different degree- competitively block the in vitro development of GST induced CDNB-GSH conjugates. All compounds are substrates of the GST enzyme and catalyze the formation of medicine-GSH conjugates.

4. As regards the above mentioned compounds in the case of rabbits and silver crucian carp I established an efficiency order considering the parameters of motility, hot-plate, body temperature, body weight and breathing.
5. I showed that *Acepromazinum*, *Chlorpromazinume*, *Diazepam*, *Haloperidolum*, *Risperidonum*, *Thioridazinum*, *Tiapridum* and *Xylazine* compounds resulted in a different scale of GST enzyme induction effect in the case of particular organs (liver, brain, kidney, spleen, lungs, heart) of laboratory rats, rabbits and silver crucian carp.
6. I showed and compared the efficiency of GSH conjugates of the above mentioned compounds in the case of rabbits and silver crucian carp (regarding motility, hot-plate, body temperature, body weight and breathing)
7. I have developed an original multiprocessor artificial neural network incorporating analog and digital features and its connected algorithms that can establish two-directional communication with a targeted section of the living nervous system through a 128 multi electrode array. The system offers a new approach towards the interaction of the neural network and the nervous system; it treats it as its analog part connected to it in an unknown way. With its help – in my present investigations – the efficiency and effect mechanism of psychopharmacons in the central nervous system can be examined.
8. I have found out and compared with the results of an efficiency test the effect of the synthesized GSH conjugates of the examined drugs on the brain stem's firing pattern in the case of rabbits and silver carp.
9. I have found out that the presumption that the tranquilizing compounds cause the alteration of the signal/noise ratio of the firing pattern in the upper part of the brain stem is adequate. Alongside the decrease of the firing rate the synchronized activity increases proportionately.

10 Irodalomjegyzék

- ACHER J., Bulteau G. (1973): Process for preparing benzamides. DE 2327192.
- AL-DHAHER A.H.G. (2001): Integrating hardware and software for the development of microcontroller-based systems. *Microprocessors and Microsystems*. 25, 317-328.
- ALLEN R. D., Webb R. and Schake S. A. (1997): Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Rad. Biol. Med.* 23, 473-479.
- ALTHAUS F.R. (2006): *Veterinärpharmakologie und -toxikologie*, Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie, Zürich, Schweiz.
<http://www.vetpharm.unizh.ch/> (2007. február 15.)
- ALURU Srinivas, ed. (2006): *Handbook of Computational Molecular Biology*. Chapman & Hall/Crc, (Chapman & Hall/Crc Computer and Information Science Series).
- AWAD M., Gavis M.: Peripheral-type benzodiazepine receptors in human cerebral cortex, kidney, and colon. *Life Sci.* 1991, 49: 1155-1161.
- BALDI P. and Brunak S. (2001): *Bioinformatics: The Machine Learning Approach*, 2nd edition. MIT Press.
- BANNATYNE R., G. V., (1998): Selecting a microcontroller. *Embedded Systems Programming*. 97-103.
- BARTKÓ Gy. (2004): A második generációs antipszichotikumok helye a schizophren kórképek kezelésében. *Gyógyszereink*, 54, 3-7
- BEIL J. (1996): Choosing a microcontroller. *Electronic Product Design*, 17 (9) 61-66.
- BITTER I. (1996): Szorongásos kórképek: <http://www.vitalitas.hu/konyvek/> Vitalitás, Springer (2007. február 13.)
- BLAU A., et al. (1997): Characterization and optimization of microelectrode arrays for in vivo nerve signal recording and stimulation. *Biosensors and Bioelectronics*, 12, 9-10, 883-892 p.
- BLUM R.A.; Ross J.D.; Simon C.M.; Brown E.A.; Harrison R.R.; DeWeerth S.P.A (2003): Custom multielectrode array with integrated low-noise preamplifiers. *Engineering in Medicine and Biology Society, Proceedings of the 25th Annual International Conference of the IEEE* 4, 3396 – 3399.
- BOOTH.J., Boyland E.. Sims P (1961): An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem J.* 79: 516-524.
- BOROSS L., Sajgó M. (1993): *A biokémia alapjai*. Mezőgazda kiadó, Bp. 512. p.

- BORVENDÉG J. és mtsai. szerk. (2002): Gyógyszer kompendium. Az Országos Gyógyszerészeti Intézet hivatalos kiadványa. MediMedia Inf. Kft. Bp.
- BOURQUIN J. P., D. Jany, R. Schwarb, G. (1961): 2-alkylmercapto-phenothiazine derivatives and their preparation. DE 1.098.944.
- BRIGGS G. E. and J. B. S. Haldane (1925): A note on the kinetics of enzyme action, *Biochem. J.*, 19, 339-339.
- BUNK M. J., Combs G. F. (1981): Relationship of selenium-dependent glutathione peroxidase activity and nutritional pancreatic atrophy in selenium-deficient chicks. *J. Nutr.* 111, 1611-1620.
- CARBERG I. & Mannervick, B. (1985): Glutathione transferase. In: *Methods in Enzymology*, (Fleisher, S. & Packer, L., eds.), Vol. 113, pp. 499-504. Academic Press, New York, NY.
- CATANIA V.A.1, Luquita M.G., Pozzi E.J.S., Mottino A.D. (1998): Differential induction of glutathione S-transferase subunits by spironolactone in rat liver, jejunum and colon. *Life Sciences*, 63, 26, pp. 2285-2293(9)
- CHARPENTIER, P. (1953): Phenothiazine derivatives. US Pat. 2,645,640.
- CHEM INDUSTRY: <http://www.chemindustry.com/apps/chemicals> (2007. február 9.)
- CHUA L. O. and L. Yang (1988): Cellular neural networks: Theory, *IEEE Transactions on Circuits and Systems*, Vol. 35, pp. 1257–1272
- CLOSE B. et al. (2000): Javaslatok a kísérleti állatok euthanasiájára. *Laborállattudományi Társaság*. Bp. 45.
- COMBES, Stakelum G.S., (1961): A liver enzyme that conjugate sulfobromoftalein sodium with glutathione *J. Clin. Invest.* 40:981-988.
- CSANAKY I. és mtsai (2003) :Fenobarbitál előkezelés hatása az arzenát (asv) és arzenit (asiii) metabolizmusára és kiválasztására patkányban. *Magyar Toxikológusok Társasága Zalakaros*, 2003. november 6-8. C2-3. 10. p.
- DAHL SG., Strandjord RE. (1977): Pharmacokinetics of *Chlorpromazinume* after single and chronic dosage. *Clin Pharmacol The.* 21: 437-448.
- DEMPSEY G. L., J. S. Alig, N. L. Alt, B. A. Olson and D. E. Redfield (1997): Control Sensor Linearization Using Artificial Neural Networks. *Analog Integrated Circuits and Signal Processing.* 13, 3
- DEMPSEY, G.L.; Alt, N.L.; Olson, B.A.; Alig, J.S. (1997): Control sensor linearization using a microcontroller-based neuralnetwork. *Systems, Man, and Cybernetics ;Computational Cybernetics and Simulation*ap; 4, 3078 - 3083 p.

- DOBLE A., Marin I.L. (1992): Multiple benzodiazepine receptors: No reason for anxiety. Trends Pharmacol. Sci.13: 76.
- DOLLERY C. (Ed). (1991): Therapeutic Drugs Volume 1. Edinburgh: Churchill Livingstone. C201-C206.
- DUHM B., Maul W., Medenwald M., Patzschke K. and Wagner, L., (1969): Untersuchungen mit radioaktiv markiertem BAY Va 1470 an Ratten. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift. 82, 104-109.
- EGAAS E, Falls JG, Svendsen NO, Ramstad H, Skaare JU, Dauterman WC. (1995): Strain- and sex-specific differences in the glutathione S-transferase class pi in the mouse examined by gradient elution of the glutathione-affinity matrix and reverse-phase high performance liquid chromatography. Biochim Biophys Acta. 1243(2):256-64 “b”
- EGAAS E. (2000): Effects of atrazine, endosulfan and butylated hydroxyanisole on glutathione-S-transferases in *Orthosia gothica*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 127(2):117-22.
- EGAAS E.; Falls, J. G.; Dauterman, W. C.; Collier, T. K.; Skaare, J. U.(1995): The Comparative In Vitro Glutathione S-Transferase Activity in Selected Plants, Fish, Insects and Mammalian Species Measured with Four Different Second Substrates. Marine Environmental Research 39, 1-4, pp. 350-351 “c”
- EGAAS E.; Falls, J. Greg; Dauterman, Walter C. (1995): A study of gender, strain and age differences in mouse liver glutathione-S-transferase. Comp. Biochem. Physiol. 110,1 pp. 35-40 “a”
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (1997): Corporate document repository, Agriculture Department , Rome, Italy. <http://www.fao.org/documents/> (2007. február 20.)
- FRANKS W., Tosatti S., Heer F., Seif P., Textor M. and Hierlemann A. (2007): Patterned cell adhesion by self-assembled structures for use with a CMOS cell-based biosensor. Biosensors and Bioelectronics, 22, 7, 1426-1433 p.
- FREAR DS, Swanson HR (1970) Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathione: partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn. Phytochem 9: 2123-2132
- FRENCH JO, King EE (1955): Mechanisms involved in the anesthetic state. Surgery. 38:228
- FÜRST Zs. (2006): Farmakológia. Medicina. Bp. 354-368

- GANONG W.F. (1994): Az orvosi élettan alapjai. 2. kiadás, Medicina, Budapest. 193-204
- GARCIA-Villar, R., Toutain, P-L., Alvinerie, M. and Ruckebusch, Y., (1981). The pharmacokinetics of *Xylazine* hydrochloride: An interspecific study. J. Vet. Pharmacol. Therap. 4, 87-92.
- GODÓ Z. A., Pirger Zs., Nagy G., Révész Cs., Varga V. (2001): Glutation-S-transzferáz enzim indukciója pszichoaktív farmakonokkal. XXXI. Membrane Transport Conference, Sümeg, Hungary p. 84.
- GODÓ Z. A. (2003) : Applying microcontrollers to bioinformatics. XXXIII. Membran transport conference. Sümeg (2003) 88. p.
- GODÓ Z. A. (2004) : Artificial neural network for analyzing the firing pattern of RAS. XXXIV. Membran transport conference. Sümeg (2004) 49. p.
- GODÓ Z. A. (2006): Glutathione-S-Transferase induction of certain Neuroleptics. Debreceni Műszaki Közlemények. V., 4, pp. 101-117.
- GONDA I. (1977): Nyúltartás a háztájon. Mezőgazdasági Kiadó. Bp. p. 117.
- GONZÁLEZ C. and Rodríguez M. (1997): A flexible perforated microelectrode array probe for action potential recording in nerve and muscle tissues. Journal of Neuroscience Methods, 72, 2, 189-195 p.
- GROSS ME. (2001): Tranquilizers, α 2-Adrenergic Agonists and Related Agents. Veterinary Pharmacology and Therapeutics (HR Adams, ed.) Iowa State University Press, Ames (USA) 8: pp 299-342.
- GUTTERIDGE J. M. C., Halliwell B. (1994): Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- HABIG W. H., Pabst M. J. and Jakoby W. B. (1974): Glutathione-S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249, 22, 7130-7139.
- JAKOBY WB, Habig WH (1980) Glutathione transferases. Zn WB Jakoby, ed, Enzymatic Basis for Detoxification. Academic Press, New York, pp 63-94
- JAVAID JI. (1994): Clinical pharmacokinetics of antipsychotics. J Clin Pharmacol. 34: 286-295.
- JAVITT D.C., Zuhin S.R.: Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. Amer. J. Psychiatry, 148, 1301–1308 (1991).
- JORGENSEN P. F., Wegger I.. (1979): Glutathione peroxidase and health in swine. Acta Vet Scand 20, 610-612

- KACSUK P. (1982): Multiprocesszoros rendszerek tervezése. BME Mérnöktoábbképző Intézet.
- KÁLLAI L. (2000): Laborállat tanulmány. Állatorvostudományi Egyetem. 65.
- KAPLAN, H.I., Sadock, B.J. (1998): Synopsis of Psychiatry. Williams & Wilkins, Baltimore. 8: 989-998.
- KARAGIANIS JL., Phillips LC., Hogan KP., LeDrew KK. (1999): Clozapine-associated neuroleptic malignant syndrome: two new cases and a review of the literature. *Ann Pharmacother* 33(5):623-30.
- KAREN C. et al. (2007): Flexible polyimide microelectrode array for in vivo recordings and current source density analysis. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 1783–1790 p.
- KE Wang, Harvey A., Hongjie Dai and James S. Harris (2006): Neural Stimulation with a Carbon Nanotube Microelectrode Array. *Nano Lett.*, 6 (9), 2043 -2048.
- KENNIS E.J., Vandenberg J. (1989): 3-Piperidiny-substituted 1,2-benzisoxazoles and 1,2-benzisothiazoles. US Pat. 4,804,663.
- KETTERER B, Meyer D, Clark AG (1988): Soluble glutathione transferase isozymes. In H Sies, B Ketterer, eds, *Glutathione Conjugation*. Academic Press, London, pp 73-135
- KLEIN, D. (1980): *Diagnostic and Drug Treatment for Psychiatry*, ed 2. Williams & Wilkins, Baltimore, 1980.
- KNOLL J. (1965): *Gyógyszertan. Medicina*, Budapest, 89-101. p.
- KÓSA L. (1998): Anxiolitikumok kutatás-fejlesztésének legújabb irányzatai *Gyógyszerészet* 42. évf. 1. sz. p. 12-22.
- KRUTSAY M. (1980): *Szövetteni technika. Medicina*. Bp.
- LAMÁR K. (1999): A világ leggyorsabb mikrovezérlője. *ChipCAD*, Bp. <http://www.chipcad.hu>. (2007.02.21)
- LAMOUREUX GL, Frear DS (1979) Pesticide metabolism in higher plants: in vitro enzyme studies. Zn GD Paulson, DS Frear, ED Marks, eds, *Xenobiotic Metabolism*, ACS Symposium Series 97. American Chemical Society, Washington, DC, pp 77-128
- LAWRENCE M, Tierney Jr., Stephen J. McPhee, Maxine A., Steven A. (1996): *Korszerű orvosi diagnosztika és terápia*. p. 1025-1033.
- LINDSLEY DB, et al (1950): Behavioral and EEG changes following chronic brain stem lesions in the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 2:483)
- LOWRI O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

- LUQUITA Marcelo Gabriel, V. A. Catania, E Sanchez Pozzi, A.D. Mottino (1998): Differential induction of glutathione S-transferase subunits by spironolactone in rat liver, jejunum and colon. *Life Sciences*, v.63, p.2285 – 2293.
- MAGYAR NEUROPSZICHOFARMAKOLÓGIAI EGYESÜLET (Hungarian College of NeuroPsychopharmacology = HCNP) Negyedik Antipszichotikumok Konszenzus Konferenciáján - 2003 november 26 - módosított és elfogadott dokumentum. <http://www.psychiatry.dote.hu/4/page101.htm>. (2007. február 6).
- MALMBERG A.B., and Bannon, A.W. (1999): Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Current Protocols in Neuroscience*;8.9.1-8.9.15.
- MANNERVIK B. and Danielson, U. H. (1988): Glutathione transferases - structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 23, 283-337.
- MATSUMOTO R.R. (1998): GABA receptors: are cellular differences reflected in function? *Brain Res. Rev.*, 14: 203-225.
- MAUCH F and R Dudler (1993): Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.* 102(4): 1193–1201.
- MAUCH F. and Dudler R. (1993): Differential induction of distinct glutathione S transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.* 102, 1193-1201.
- MCMOHAN S.; Oja S.S. ; Janaky R.; Varga V.; Saransaari P. (2000): Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochemistry International*, 37, 2, pp. 299-306(8)
- MELTZER H. Y.: What's atypical about atypical antipsychotic drugs? *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 53–57 (2004).
- MICHAELIS L., Menten M. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung, *Biochem. Z.* 49:333-369.
- MOGIL JS., Wilson SG, Bon K, Lee SE, Chung K, Raber P, Pieper JO, Hain HS, Belknap JK, Hubert L, Elmer GI, Chung JM, Devor M. (1999): Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain*;80:67-82
- MOLNÁR V. (2001): Laboratóriumi állatok érzéstelenítése, altatása, eutanáziája. SzIE-ÁOTK, Továbbképzés. Bp. 10.
- MOZER T. J., et al., Purification and characterization of corn glutathione S-transferase. *Biochemistry* 22, 1068-1072 (1983).

- MULTI CHANNEL SYSTEMS, MCS GmbH, Germany. (2007).
<http://www.multichannelsystems.com/>. (2007-03-05).
- MUTLIB, A., Chui, Y., Young, L. and Abbott, F., (1992). Characterization of metabolites of *Xylazine* produced in vivo and in vitro by LC/MS/MS and GC/MS. *Drug Metab. Dispos.* 20, 840-848.
- MÜLLER J. M., Schlittler E. und Bein H. J. (1952): Reserpin, der sedative Wirkstoff aus *Rauwolfia serpentina* Benth. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. Vol. 8. N° 9. 338.
- NELSON DL., Cox, MM. (2000): *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd Ed., Worth Publishers, USA
- NÉMET L. (1999): Laboratóriumi rágsálók és nyúlajkúak fertőző betegségei és az állatok higiénias állapotának ellenőrzése. Posztgraduális képzés. *Állatorvostudományi Egyetem.* 35.
- NIKOLICH, K., Urfer, R.: Novel concepts and therapeutic options for the treatment of schizophrenia. *DDW Summer*, 77–86 (2004).
- NOTED Bt. (2006): Micro-drives, preamps, digital amplifiers, analog & digital swivels, telemeters for EEG, EMG & multiple unit recordings from Brain Technology Team (Pécs, Hungary). <http://braintelemeter.atw.hu/preamplifiers.html> (2007-03-05).
- O'NEIL MJ, Smith A, Heckelman PE, Obenchain JR, Gallipeau JAR & D'Arecca MA (2001): *The Merck Index*. Merck & Co Inc, Whitehouse Station, NJ (USA); 2562 pp.
- PALG (1988): *Parallel Algorithms and Matrix Computation*, Clarendon Press Oxford
- PERÉNYI J. (2002): *Állatorvostudományi kézikönyvek*. Primavet. Bp.
- PICCOLOMINI R., et al., Glutathione transferase in bacteria: subunit composition and antigenic characterization. *J. Gen. Microbiol.*, 135, 3119-3125 (1989).
- PINKUS R, Bergelson S, Daniel V (1993): Phenobarbital induction of AP-1 binding activity mediates activation of glutathione S-transferase and quinone reductase gene expression. *Biochem. J.* 290 (Pt 3):637-40.
- PIZZI R.,Cino G.,Gelain F.,Rossetti D. and Vescovi A. (2007): Learning in human neural networks on microelectrode arrays. *Biosystems*, 88, 1-2, 1-15 p.
- POCERNICH C. B., Fontaine M. L., Butterfield D. A. (2000): In-vivo glutathione elevation protects against hydroxyl free radical-induced protein oxidation in rat brain. *Neurochem. Int.* 36, 3, pp. 185-191 (1 p.1/4)
- PUTTER, J. and Sagner, G., (1973). Chemical studies to detect residues of *Xylazine* hydrochloride. *Vet. Med. Rev.* 2, 145-159.

- RECTOR E, Otto K, Kietzmann M, Nolte I & Lehmacher W (1996): Pharmacokinetics and effects of *Xylazine* (Rompun) in dogs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 109(1): 18-22.
- REKECZKY Cs., Y. Nishio, A. Ushida, T. Roska, Á. Tahy (1996): Image Segmentation by Soft Computing on the CNN Universal Machine – A Case Study of Echocardiography, In: Proceedings NOLTA-96, Kochi, Japan, pp. 213–216.
- RICHELSON, E., Souder, T.: Binding of antipsychotic drugs to human brain receptors. Focus on newer generation compounds. *Life Sci.* 68, 29–39 (2000).
- ROSKA T. and L. O. Chua, (1993): The CNN Universal Machine: An analogic array computer, *IEEE Transactions on Circuits and Systems-II*, Vol. 40, pp. 163–173
- ROSKA T., Á. Zarándy, S. Zöld, P. Földesy, P. Szolgay (1999): The computational infrastructure of analogic CNN computing - Part I: the CNN-UM Chip Prototyping System, *IEEE Trans. on CAS I*, Vol. 46.
- ROSKA T., G. Bártfai, P. Szolgay: T. Szirányi, A. Radványi, T. Kozek, Zs. Ugray, A. Zarándy (1992): A digital multiprocessor hardware accelerator board for cellular neural networks: CNN-HAC, *Int. J. Circuit Theory and Applications* Vol.20.
- SALINAS A. E., Wong M. G. (1999): Glutathione S-Transferase – A Review. *Curent Medicinal Chemistry*, 6, 279-309.
- SARTORIUS N., Fleischhacker WW., Gjerris A., et al. The usefulness and use of second generation antipsychotic medications. *Curr Opin Psychiatry* 2002; 15(Suppl 1):S1-S51.
- SAWYER C. H., Everett J. W., Green J. D. (1954): The rabbit diencephalon in stereotaxic coordinates. *The Journal of Comparative Neurology*. 101, 801-824 p.
- SHEA TC, Claflin G, Comstock KE, Sanderson BJ, Burstein NA, Keenan EJ, Mannervik B, Henner WD. (1990): Glutathione transferase activity and isoenzyme composition in primary human breast cancers. *Cancer res.*50(21):6848-53.
- SOLV (1988): Solving Problems on Concurrent Processors, Volume I-II, Prentice Hall International
- STARZL TE, Taylor CW, Magoun HW (1951): Collateral afferent excitation of reticular formation of brain stem. *JNeurophysiol*; 14:479
- STOSCHECK C. (1990): Quantification of Protein. *Methods in Enzymology*, 182:50-68.
- SVENSSON, T. H.: Preclinical effects of conventional and atypical antipsychotic drugs: defining the mechanism of action. *Clin. Neurosci. Res.* 3, 34–46 (2003).
- TAKÁCSNÉ NOVÁK K., SZÁSZ GY. (2005): A neuroleptikumok gyógyszerészeti kémiaiája. *Acta Pharmaceutica Hungarica* 75. 37–53.

- TALWAR SK, Xu S, Hawley ES, Weiss SA, Moxon KA, Chapin JK. (2002): Rat navigation guided by remote control. *Nature*; 417:37-8.
- TAMAKI H., et al., Expression of two Glutathione STransferase genes in the yeast *Issatchenkia orientalis* is induced by o-dinitrobenzene during cell growth arrest. *J. Bacteriol.*, 181, 2958-2962 (1999).
- TÓTH A. és mtsai. (2007): Electronic devices making multiple recordings easier. XI. MITT. Magyar Idegtudományi Társaság Konferenciája. Szeged. 2007.január 24-27. p. 49.
- TÓTH J. (2004): *Állatorvosi aneszteziológia, analgészia és intenzív terápia*. Bp. Mezőgazda Kiadó.
- TÓTH Z. (2006): Párhuzamos programozás transzputeren. <http://dab.iit.uni-miskolc.hu/~toth16/dwork/descript.html>. (2007.03.08)
- TOUNG Y. P., et al. (1990): *Drosophila* glutathione S-transferase 1-1 shares a region of sequence homology with the maize glutathione-S-transferase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 31-35.
- VAIRETTI M, Feletti F, Battaglia A, Pamparana F, Canonico PL, Richelmi P, Berte F. (1999): *Haloperidolum*-induced changes in glutathione and energy metabolism: effect of nicergoline. *Eur J Pharmacol.* 367(1):67-72.
- VARGA V., Pirjo Kontro and Simo S. Oja (1988): Modulation of GABAergic neurotransmission in the brain by dipeptides. *Neurochemical Research.* 13, 11 pp. 1027-1034 (36)
- VIZI E. Sz. (szerk.) (2002): *Humán farmakológia*. Medicina 285-310.
- WAAGEPETERSEN H.S., Sonnewald U., Schousboue A. (1999): The GABA paradox: Multiple roles as metabolite, neurotransmitter, and neurodifferentiative agent. *J. Neurochem.* 73: 1335-1342.
- WERBLIN F., T. Roska, and L.O. Chua (1995): The analogic cellular neural network as a Bionic Eye, *International J. Circuit Theory and Applications*, Vol. 23, pp. 541–569.
- WILCE M. C. J., and Parker, M. W., Structure and function of Glutathione S-Transferases. *Biochem. Biophys. Acta*, 1205, 1-18 (1994).
- WILLIAMS D. A., Lemke T. L. Lippincot W.& W. NY (2002): *Foye's Principles of Medicinal Chemistry* 5th edition.
- WILSON S.G., and Mogil, J.S. (2001): Measuring pain in the (knockout) mouse: big challenges in a small mammal. *Behav. Brain Res.* 125:65-73

- WISHART D., Depts. of Computing Science & Biological Sciences, University of Alberta. <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/> (2006. november 10.)
- WITTKAMPF M., Cammann K., Amrein M. and Reichelt R. (1997): Characterization of microelectrode arrays by means of electrochemical and surface analysis methods. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 40, 1, 79-84 p.
- WOODWARD R.B., Bader F.F., BICKEL H., FREY A.J., & KIERSTEAD R. W (1965): The Total Synthesis of Reserpine. *J.A.C.S.* 78, 2023.
- XU S, Talwar SK, Hawley ES, Li L, and Chapin JK. (2004): A multi-channel telemetry system for brain microstimulation in freely roaming animals. *J Neurosci. Methods.* 133(1-2):57-63.
- YAMAMOTO K., Hornykiewicz O.: Proposal for a noradrenaline hypothesis of schizophrenia. *Prog. Neuro-Psychopharm. Biol. Psych.* 28, 913–922 (2004).
- YEUNG PK-F., Hubbard JW., Korchinski ED., Midha KK. (1993): Pharmacokinetics of *Chlorpromazine* and key metabolites. *Eur J Clin Pharmacol.* 45: 563-569.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni Prof. Varga Vincének, aki a nehéz körülmények és a nagy távolság ellenére mindig támogatott a munkámban, példás emberségéért és páratlan szakmai tudásáért. Dr. Kocsis Istvánnak aki a szerény lehetőségek ellenére biztosította a kutatáshoz szükséges feltételeket. Dr. Horváth Róbertnek akinek dinamizmusa és önzetlen támogatása új erővel segítette célbaérni a munkámat. Valamint Dr. Magyar Károlynak és Prof. Jávor Andrásnak a pozitív, haladó szellemiségű hozzáállásért és támogatásért.

Köszönet illeti Pogácsás Éva Zsuzsa és Balogh Brigitta környezetmérnök valamint Füredi Antal és Szabó László villamosmérnök hallgatóimat a kitartó munkájukért.

A szakmai segítségen túl köszönöm családomnak, feleségemnek és édesanyámnak a feltétlen bizalmukat és türelmüket az elmélyült munka hosszú ideje alatt.

Ábrajegyzék

1. ábra. 16 elemű mikroelektród tömb <i>in vivo</i> vizsgálatokhoz.	42
2. ábra. 60 elemű sík MEA izolált szövetmintákhoz	43
3. ábra. Az állat fejére helyezett „korona” a microdrive és a tetród szelektor.	44
4. ábra. Hosszú multielektródás elvezetés.	44
5. ábra. CNN elemi processzorainak elrendezése és kapcsolataik.	47
6. ábra. Aktív infravörös és piezo- elektromos mozgásszenzor.	59
7. ábra. Mikrokontroller felügyeletű motilitásmérő rendszer „deszkamodellen”	59
8. ábra. Patkány vezérlés BS/1 mikrokontrollerrel.	61
9. ábra. BS2SX mikrokontroller	62
10. ábra. Saját fejlesztésű fogadópanel alulnézetben.	66
11. ábra. A panel felülnézetben 4 darab 16 egységes analóg switch IC-vel.	66
12. ábra. A termékkoncentráció változása az idő függvényében.	68
13. ábra. A megismételt mérések eredményei sávokat alkottak	69
14. ábra. A GST aktivitást fotometriásan mérő rendszer felépítése	70
15. ábra. Mintavételezési csoportok elemei között eltelt időintervallumok	71
16. ábra. Bithibák okozta lehetséges differencia 14 bites mintavételezésre	71
17. ábra. 5 elemű puffér mediánjának hibajavítási algoritmusa	72
18. ábra. A mikrokontrolleres enzimkinetikai mérőrendszer „deszkamodellen”	72
19. ábra. A glutation-CDNB komplex képződés gátlása Haloperidolummal.	76
20. ábra. Kezelési dózisban hozzáadott gyógyszer mennyiség <i>in vitro</i> kompetitív gátlása	77
21. ábra. A kezelések során egyszeri alkalommal beadott hatóanyag mennyiség	77
22. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra patkány májban.	78
23. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra patkány vesében.	79
24. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzimaktivitásra patkány lépében.	80
25. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra patkány agytörzsben.	81
26. ábra. Tiapridum kezelés hatása a nyúlban	83
27. ábra. A kontroll motilitás frekvenciája	84
28. ábra. Thioridazinum kezelés hatása a motilitás frekvenciára	86
29. ábra. Haloperidolum kezelés hatása a motilitás frekvenciára	86
30. ábra. Chlorpromazinum kezelés hatása a motilitás frekvenciára	87
31. ábra. Tiapridum kezelés hatása a motilitás frekvenciára	89
32. ábra. Risperidonum kezelés hatása a motilitás frekvenciára	90
33. ábra. Diazepam kezelés hatása a motilitás frekvenciára	91
34. ábra. Xylazine kezelés hatása a motilitás frekvenciára	91
35. ábra. Acepromazinum kezelés hatása a motilitás frekvenciára	92
36. ábra. Motilitás csökkenésének aránya a kontroll változásához képest a kezelés végére	95
37. ábra. A trankvillánsok hatása a fájdalomérzetre (Hot – Plate teszt).	96
38. ábra. Testhőmérséklet változás házinyúlnál a nyolc napos kezelés alatt	97
39. ábra. A házinyulak testtömeg változása a nyolc napos kezelés után	98
40. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra házinyúl májban.	99
41. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra házinyúl vesében.	101
42. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra házinyúl lépben.	102
43. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra házinyúl szívben.	103
44. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra házinyúl tüdőben.	104
45. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra házinyúl agytörzsben.	104
46. ábra. Tiapridum GSH konjugátum kezelés hatása a motilitás frekvenciára	105
47. ábra. Risperidonum GSH konjugátum kezelés hatása a motilitás frekvenciára	105
48. ábra. Haloperidolum GSH konjugátum kezelés hatása a motilitás frekvenciára	106
49. ábra. Chlorpromazinum GSH konjugátum kezelés hatása a motilitás frekvenciára	106
50. ábra. Thioridazinum GSH konjugátum kezelés hatása a motilitás frekvenciára	106
51. ábra. Diazepam GSH konjugátum kezelés hatása a motilitás frekvenciára	106
52. ábra. Xylazine GSH konjugátum kezelés hatása a motilitás frekvenciára	106
53. ábra. Acepromazinum GSH konjugátum kezelés hatása a motilitás frekvenciára	106
54. ábra. Glutation konjugált trankvillánsok hatása a motilitás frekvenciára	107
55. ábra. Glutation konjugált trankvillánsok hatása a motilitás frekvenciára, százalékban.	107
56. ábra. Hot-Plate teszt változása GSH konjugált trankvillánsok hatására	108
57. ábra. Testhőmérséklet csökkenése 1 óra alatt trankvillánsok GSH konjugátumával történő kezelés után	109
58. ábra. Testhőmérséklet csökkenése 1 óra alatt trankvillánsokkal történő kezelés után	109

59. ábra. Hatékonyság teszt. Megfigyelhető a ferde testtartás, mozdulatlanság, egyes estekben azonban agitáció, hirtelen nagyon gyors 'cikázó' mozgással	110
60. ábra. Ezüstkárász légzésszáma a kontrollhoz képest trankvillánsok és GSH konjugátumaival történő kezelés hatására	110
61. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra ezüstkárász agyban.	112
62. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra ezüstkárász májban.	112
63. ábra. Trankvillánsok hatása a GST enzim aktivitásra ezüstkárász izomban.	113
64. ábra. Tiapridum kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben	114
65. ábra. Risperidonum kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben	114
66. ábra. Haloperidolum kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben	115
67. ábra. Chlorpromazinum kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben	115
68. ábra. Thioridazinum kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben	116
69. ábra. Diazepam kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben	116
70. ábra. Xylazin kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben	116
71. ábra. Acepromazinum kezelés hatása a GST aktivitásra a vizsgált fajok egyes szerveiben	117
72. ábra. GST aktivitás mértéke az egyes fajoknál a májban és az agyban	118
73. ábra. Patkány szervek enzimaktivitása a kontroll csoportban	118
74. ábra. Házinyúl szervek enzimaktivitása a kontroll csoportban	119
75. ábra. Ezüstkárász szervek enzimaktivitása a kontroll csoportban	119
76. ábra. Az analóg és digitális jel útja. A felületek kapcsolódása a PC től a mikroelektródokkal megcélzott élő idegrendszeri területig	122
77. ábra. Az ADNC sematikus felépítése. A világoskékkel jelzett IC-k (switch - demultiplexerek), az AS-t a sötétkék IC-k (mikrokontrollerek) a DS-t alkotják	122
78. ábra. Az ADNC AS és DS, teljes rendszer	123
79. ábra. Az ADNC funkcionális felépítése	123
80. ábra. Intracelluláris akciós potenciál időbeli lefutása	124
81. ábra. Földelt és differenciál bekötésű erősítés	125
82. ábra. Az ADNC-AS szűrt differenciál erősítőjének sematikus rajza	126
83. ábra. Az AS kapcsolata a mikroelektród tömbbel és a DS-el az 5 processzoros (Ver.: 1) architektúra esetében	127
84. ábra. A neuronhálózat szerver processzorának kapcsolási rajza	128
85. ábra. A neuronhálózat kliens processzorainak kapcsolási rajza	128
86. ábra. A MEA-n keresztül beérkező tüzelési mintázat mátrixokat alkot.	129
87. ábra. ANDC a stereotaxiás célzóberendezéssel és a nyúlba beültetett mikroelektród tömbbel	130
88. ábra. Házinyúl agytörzs (RAS) mikroszkópi képe	134
89. ábra. Ezüstkárász agytörzs (RAS) mikroszkópos képe	135
90. ábra. 128 db, 100 μm átmérőjű egységből felépülő 45°-os hegyes MEA, foto optikával nagyítva	136
91. ábra. 128 db, 50 μm átmérőjű egységből felépülő, tompa hegyű elektródátomb anyagvizsgáló mikroszkópos képe	136
92. ábra. Elektród beültetés stereotaxiás célzóberendezés segítségével	137
93. ábra. A teljes rendszer működés közben	137
94. ábra. Az ADNC PC oldali kezelő felülete	138
95. ábra. 0,16 másodperc tüzelési mátrix nyúl agytörzsből	139
96. ábra. Alapvegyület kezelés után bekövetkező tüzelési gyakoriság csökkenése	139
97. ábra. Szinkron tüzelő egységek arányának változása kezelés hatására	139
98. ábra. Motilitás csökkenés aránya kezelés hatására önmagukhoz képest	140
99. ábra. GSH konjugátum kezelés után bekövetkező tüzelési gyakoriság csökkenése	140
100. ábra. Szinkron tüzelő egységek arányának változása kezelés hatására	140
101. ábra. A gyógyszerek GSH konjugátumainak hatékonysága a motilitásra az alapvegyületekhez képest	141
102. ábra. Tüzelési gyakoriság változás a gyógyszer konjugátumaival történő kezelés hatására az alapvegyülettel való kezeléshez képest	141
103. ábra. Kezelés után bekövetkező tüzelési gyakoriság csökkenése	141
104. ábra. Szinkron tüzelő egységek arányának változása kezelés hatására	141
105. ábra. GSH konjugátum kezelés után bekövetkező tüzelési gyakoriság csökkenése	142
106. ábra. Szinkron tüzelő egységek arányának változása kezelés hatására	142
107. ábra. A gyógyszerek GSH konjugátumainak légzésszám csökkenése az alapvegyületekhez képest	143
108. ábra. Tüzelési gyakoriság változás a gyógyszer konjugátumaival történő kezelés hatására az alapvegyülettel való kezeléshez képest	143

Táblázatjegyzék

1. Táblázat. Elterjedten alkalmazott nyugtató - szorongásoldó - altató és antipszichotikus vegyületcsoportok	13
2. Táblázat. Az R és X szubsztituensek a fenotiazin vázon az egyes hatékony vegyületeknél	18
3. Táblázat. A kísérletek során vizsgált neuroleptikumok besorolása és kémiai szerkezete	22
4. Táblázat. A vizsgált vegyületek gyógyszerkönyvi elnevezése, dózisa és az alkalmazási fajok	50
5. Táblázat. Laboratóriumi patkány kezelési dózisa	51
6. Táblázat. Házinyúl kezelésénél alkalmazott, korrigált dózisok.	51
7. Táblázat. Ezüstkárász kezelésénél alkalmazott dózisok.	53
8. Táblázat. Fehérje kvantitatív meghatározások száma	55
9. Táblázat. Moláris ekvivalencia számítás kompetitív gátlás vizsgálathoz	57
10. Táblázat. GSH egyenérték számítás a konjugátum szintézishez	58
11. Táblázat. Enzimkinetikai mérések száma.	62