

Bevezető tájékoztatás

(1.) 2003 elején az eredeti témavezető, Dr. Komjáti Katalin Egyesült Államokbeli tanulmányútja során férjhez ment. Az OTKA Bizottság Enökéhez írt levelében jelezte ezt a körülményt és azt, hogy nem kíván hazatérni. Egyúttal kérelmezte, hogy a téma vezetését az abban addig társ-kutatóként szereplő Dr. Sándor Péter egyetemi tanár vehesse át.

Az OTKA Operatív Bizottsága az OB Elnök javaslatára a kérést engedélyezte, különös tekintettel arra a körülményre, hogy a kutatómunkában résztvevő három Ph.D. hallgató (Dr. Lacza Zsombor, Dr. Erdős Benedek, Dr. Lenzsér Gábor) kutatásainak anyagi fedezetét is ezen OTKA által támogatott pályázat jelentette.

Dr. Sándor Péter a kutatási téma folytatását és a három Ph.D. hallgató témavezetését vállalta.

(2.) A kutatási időszakban, 2002-2006 között Dr. Lacza Zsombor és Dr. Erdős Benedek Ph.D. fokozatot szerzett, Dr. Lenzsér Gábor Ph.D. értekezése munkahelyi vita előtt áll.

(3.) A kutatás kezdete óta megjelent publikációk összesítő adatai:

folyóirat közlemény: 29 (összesített IF: 111,06)

könyvfejezet: 4

jelentősebb előadás kivonat: 34

(4.) A zárójelentésben az eredmények ismertetésekor a publikációkra való hivatkozások az egyes vizsgált témakörök címei után, zárójelben található. Az egyes számok a zárójelentéshez tartozó közleményjegyzék sorszámai. A folyóiratcikkeket "F" jelzéssel, a könyvfejezeteket "K" jelzéssel, az előadás kivonatokat "A" jelzéssel láttuk el.

A kutatási eredmények rövid ismertetése, a vizsgált kérdések témakörei szerinti csoportosításban

Axon, oligodendrocyta sérülések vizsgálata vérzéses és ischémias állapotokban (1K)

Az agy kortikális és szubkortikális szürke állományának különböző pathológiás állapotokban bekövetkező sérüléséhez képest az ugyanezen állapotokban bekövetkező fehér állománybeli változások vizsgálata igen hiányos. Az axonokat, vagy oligodendrocytákat érintő sérülések kérdésével kapcsolatos kevés irodalmi adat is ellentmondásos. Feltételeztük, hogy az ellentmondások oka az, hogy az agyi ischémiát követő változások vizsgálatára használt két klasszikus állatkísérletes modell: az art.

cerebri media koagulációjával járó Tamura f. modell és az intraluminális fonalfelvezetéses Longa f. modell, - melyeket széles körben azonos hatásúnak tartanak, - valójában más-más területeken hoznak létre károsodásokat. Ha feltételezésünk igaz, a kétféle modellen végzett kísérletek eredményeit nem volna szabad összehasonlítani.

Patkányokon végzett kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a Tamura és a Longa féle eljárással létrehozott stroke képe sem anatómiai, sem immunhisztológiai képében nem azonos. A fehér állományban a Longa f. modellben a ventralis caps. interna, medialis középagyi köteg, commissura anteriorban mindig szignifikáns áramláscsökkenés volt megfigyelhető, - ugyanez sosem következett be a Tamura modell alkalmazása során. A rostralis caps. externa és a cingulum területén mindkét modell kismértékű, de statisztikailag jelentős áramláscsökkenést okozott. A szürke állomány területén is nagyok a különbségek: a Longa f. modell mindig szignifikánsan csökkentette az ipsilateralis n. accumbens, a hypothalamus és a globus pallidus véráramlását, - ugyanezen területeken a Tamura modell egyáltalán nem okozott szignifikáns véráramlás változást. A n. caudatus területén - melyet gazdagon átszőnek a fehérállományi rostok - mindig súlyosabb volt a Longa modell alkalmazása során az áramláscsökkenés, mint a Tamura modellben.

A kétféle modell által létrehozott axonsérülés pathológiai képét APP (amyloid precursor protein) immunhisztológiai eljárással határoztuk meg. Az APP pathológiás megjelenése teljes mértékben korrelált a véráramlás észlelt képével.

Hangsúlyozni kell, hogy a perikariális sérülések nagysága megegyezett, ha azt az általánosan használt metodikákkal (H+E, TTC) analizáltuk.

Eredményeink alapján jelentősen módosítani kell az anti-ischemiás szerek vizsgálatára használatos, megszokott eljárásokat, illetve azok értékelési methodikáját.

Vérzéses és ischemiás állapotok hatásának vizsgálata az agykéreg ereinek falában végbemenő molekulárbioi folyamatokra, a vér-agy gát strukturájára és áteresztő képességére (7K, 58F, 60F, 13A, 16A, 34A, 35A)

Altatott patkányokon vizsgáltuk, milyen hatása van **standardizált vérzéses shock** kompenzált, illetve dekompenzált fázisában az agykérgi mikroerek falának fehérje expressziójára. A shockot véreztetéssel, az állatok art. nyomásának 40 Hgmm-ra való csökkentésével hoztuk létre. Dekompenzálnak tekintettük az állapotot, amikor az állatok art. nyomása ugyan változatlanul 40 Hgmm-en maradt, de ahhoz, hogy ezt a nyomást fenn tudják tartani, már elvesztett vérük felét visszavették a vér-reservoirból. Eredményeink szerint a shock kompenzált fázisában a vér-agy gát transzmembrán áteresztő képessége még változatlan. A dekompenzált fázis elején még ugyanezt látjuk, azonban ekkor (már 20 perces, 30 Hgmm-re történt véreztetés után) a paracelluláris áteresztőképesség szignifikánsan nő. Megállapítottuk, hogy ezen állapot kialakulásában alapvető szerepe van a transzmembrán tight junction protein *occludin* és a transzmembrán adherens junction protein *cadherin* expresszió csökkenésének.

A vér-agyagát **permanens globális ischemia** hatására bekövetkező funkcionális és strukturális változásait szintén altatott hím Wistar patkányokon vizsgáltuk. A globális agyi ischemiát a kétoldali art. carotis 20 perces leztorításával és az art. nyomás egyidejű, azonos időtartamu csökkentésével (50 Hgmmre való véreztetéssel) hoztuk létre. Az ischemia mértékét az agyi véráramlás laser-Doppler technikával történő folyamatos mérésével határoztuk meg. A vér-agy gát kontroll állatokhoz viszonyított működőképességét (permeabilitás változásait) kétféle módszerrel vizsgáltuk: a paracellularis extravasatiót i.v. adott NA-fluoreszeinrel, a transzendothelialis permeabilitást i.v. Evans késsel. A vér-agy gát strukturális változásainak vizsgálatát a szoros sejtkapcsolatokat biztosító junctionális fehérjék mennyiségének meghatározásával végeztük, agykérgi mikroér izolátumban, Western-blott analízissel. Eredményeink szerint a corticalis véráramlás 80%-os csökkenése mellett a transzendothelialis extravazáció nem változott, ugyanakkor a paracelluláris átteresztőképesség szignifikánsan nőtt és az ischemiás agyból izolált kapillárisokban a "tight junction"-t alkotó fehérjék közül az occludin szintje szignifikánsan csökkent. Ez arra utal, hogy a vér-agy gát már 20 perces globális agyi ischemiában megnyílik és ebben elsősorban a paracelluláris átteresztőképesség növekedése játszik szerepet, melynek háttérében viszont a csökkent occludin expresszió lehet fontos tényező.

Kísérleteink egy további csoportjában a mitochondriális K^+ csatornáknak a vér-agy gát működésében játszott szerepét vizsgáltuk **agyi ischemia és reperfüzio állapotában**. Altatott patkányokon és azok agyi endothelsejt kulturáján a K^+ csatorna nyitó diazoxid alkalmazásával elsőként igazoltuk, hogy (1) a K^+ csatorna nyitása (diazoxid előkezelés) szignifikánsan csökkenti a vér-agy gát átteresztőképességének ischemia/reperfüzio során megfigyelhető fokozódását, (2) a diazoxid - endothelsejt kulturán – depolarizálja a mitochondriumok membránját. Ez utóbbi körülmény a diazoxid közvetlen, endothelialis mitochondriumokra gyakorolt hatására utal.

A Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) enzim jelentősége a diabeteszes, kardiovaszkuláris és központi idegrendszeri ischemiás sérülésekben és a természetes öregedés folyamán (19F, 20F, 24F, 29F, 46F, 66F, 9A, 10A, 11A,12A)

A szabadgyökök számos pathológiai folyamatban, (diabetes, gyulladásoos folyamatok, ischemiás kórképek), valamint a természetes öregedés során roncsoló hatást gyakorolnak a legkülönbözőbb sejttípusokra (endothelsejtek, szív- és simaizomsejtek, neuronok). Hatásuk a sejt egyik legérzékenyebb pontján, a sejtmagban évenyesül, ahol a DNS szerkezete sérül, a szabályos kettős spirál töredezik. Erre a szignálra azonnal aktiválódnak olyan DNS- károsodásokat korrigáló enzimek, mint pl. a PARP. Az enzim működése azonban rendkívül energiaigényes és aktivitása során teljesen felélheti az amúgy is csökkent energiaellátás (-pl. ischaemiás sejt) energiakészletét és ez által sejtnekrozist hoz létre.

Kísérleteink során a **PARP enzim túlműködése által okozott kardiovaszkuláris és központi idegrendszeri károsodások lehetséges mechanizmusait** vizsgáltuk öt kísérletes modell állapotban:

- 1 központi idegrendszeri ischaemiában - fokális stroke modellben, patkányon
- 2 krónikus ischaemias szívelégtelenségben, patkányon
- 3 humán diabéteszes microangiopathiában (szemikvantitatív módszerrel)
- 4 természetes öregedés során, patkányon
- 5 postischemiás vér-agy gát zavar állapotában, patkányon

A specifikus szabadgyökök (ONOO) felszaporodását, valamint a szabadgyök károsító hatást korrigálni igyekvő PARP enzim aktiválódását valamennyi kísérleti protokollban immunhisztokémiai módszerekkel igazoltuk. Eredmények:

(1) Intraluminális fonal-modell segítségével **transziens, fokális agyi ischaemiát** hoztunk létre Sprague-Dawley patkányokon. A modellben két anyag, a peroxyinitrit kialakulást katalizáló FP 15, valamint a PARP enzim gátló INO 1001 ischaemiás agyra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Az általunk alkalmazott stroke modellben az FP 15 hatástalannak bizonyult. A PARP enzim gátló INO 1001 adagolása azonban az infarctusos terület nagyságának 84%-os csökkenését okozta, - mind a szürkeállományi (TTC), mind a fehérállományi sérülés (APP) nagyságát szignifikánsan csökkentette. A morfológiai változásokkal párhuzamosan javította az ischaemia okozta neurológiai tüneteket is. A "terápiás ablak" 6 órában volt meghatározható. INO 1001 adagolása után a PAR festődések szignifikáns csökkenését és a NT festés változatlan voltát immunhisztokémiai technikával igazoltuk.

(2) A PARP blokkoló PJ 34 adagolása patkányokon, a **bal oldali artéria coronária leszálló ágának krónikus lekötésével létrehozott infarctus modellen** szignifikánsan javította a szív bal kamra funkcióját. A bal kamra funkció változásain kívül immunhisztokémiai módszerekkel igazolni tudtuk, hogy bár a PJ 34 kezelés nem változtatott a nitrogén eredeti szabadgyöktermelés mértékén, a szívfunkció javulásával párhuzamosan a PAR pozitívan jelölődő sejtmagvak száma szignifikánsan csökkent. Ez a megfigyelés valószínűsíti a PARP mechanizmus szerepét a krónikus szívelégtelenség pathomechanizmusában.

(3) **2-es típusú diabéteszben szenvedő betegekből származó szövetmintákban**, azok immunhisztokémiai analizisével igazolni tudtuk a PARP aktiváció jelentős mértékű fokozódását a bőr mikroerek endothelsejtjeiben. Ezt igazolni lehetett olyan magas rizikójú vizsgálati csoport szövetmintáiban is, ahol az alanyok szülei 2-es típusú diabéteszben szenvedtek. Ez a körülmény felveti a PARP patomechanizmus jelentőségét a diabéteszes mikrovascularis károsodások kialakulásában.

(4) **Természetes öregedés során, idős patkányokon** igazoltuk a reaktív oxigén- és nitrogén eredeti szabadgyökök felhalmozódását, és az általuk indukált PARP aktiválódást. Ezen vizsgálatok során 22 hónapos állatok ereinek kontrakciós, illetve endothelfüggő és endothel-független relaxációs képességét tanulmányoztuk izolált aortagyűrűkön. Míg a kontrakciós, és endotheltől független relaxációs aktivitás az öregedés során nem változott, az endothelfüggő relaxáció szignifikánsan csökkent. Ezt a csökkenést a PARP blokkoló PJ34 adagolásával teljesen vissza lehetett fordítani.

Kísérleteink egy további részében fokális agyi ischemiás patkányokon vizsgáltuk: milyen hatása van az INO 1001 PARP gátlónak az apoptosis-inducing-factor (AIF) expressziójára, illetve transzlokációjára? Az AIF flavoprotein, mely fiziológiásan a mitochondriumokban expresszálódik, neuronális károsodások során transzlokálódik a sejtmagba. Eredményeink arra utalnak, hogy a PARP enzim gátlása az általunk alkalmazott dózisban és patkány modellben statisztikailag jelentős mértékben gátolta az AIF stroke folyamán kialakuló transzlokációs folyamatát.

(5) **Post-ischemiás vér-agy gát zavar állapotában**, patkányokon (a carotisok 20 perces lekötését és az artériás nyomás egyidejű, 45-50 Hgmm-ra történt csökkentését követően vizsgáltuk, milyen hatása van a PARP enzim PJ34-el történő specifikus bénításának (N-(6-oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-N, N-dimethylacetamid.HCl, 10 mg/kg, i.v.). Eredményeink: A PARP bénítása (1) jelentősen csökkentette a vér-agy gát ischemia során kialakult áteresztőképesség fokozódását, (2) csökkentette az agyödémát, (3) csökkentette az agykéreg neutrofil infiltrációját (4) csökkentette az agyi kapillárisok endothel sejtszöveti közötti postischemiás occludin veszteséget. Mindez arra utal, hogy a PARP enzimnek szignifikáns szerepe lehet az agyi keringészavarok kialakulásában

Neurális tényezők és szomatikus fájdalomigerek hatása az agyi erek CO₂-érzékenységére és a regionális agyi véráramlásra (21K, 64K, 61F, 25F, 36F, 67F)

Altatott, lélegeztetett macskákban végzett kísérleteinkben jelzett mikroszfér technikával vizsgáltuk, **van-e szerepe az opioid peptiderg idegeknek, illetve az ezek axon terminálisairól felszabaduló endogén opioidoknak az agyi és gerincvelői erek CO₂-szenzitivitására** 1/ normotensios állapotban és 2/ vérzéses hypotensio két különböző szintjén, 80 Hgmm-es és 40 Hgmm-es szisztémás artériás nyomás mellett. Vizsgálatainkat 10 jól definiált agyi ill. gerincvelői régióban végeztük. A CO₂-szenzitivitást megfelelő gázkeverékek segítségével vizsgáltuk, melyek belélegeztetésével normoxiás, de egyúttal vagy normokapniás, vagy hypokapniás, vagy hyperkapniás állapotokat tudunk létrehozni. A széndioxid-érzékenység fokának megállapítása céljából az art. PaCO₂ értékek függvényében ábrázoltuk az egyes régiókban mért áramlás értékeket, a kapott pontokra számítógéppel illesztettük a legjobban illeszkedő regressziós egyenest, és ezek meredekségét megfelelő program segítségével hasonlítottuk össze. Az opiát receptorok bénítása 1.0 mg/kg i.v. adott naloxonnal történt.

Eredményeink szerint normotenzív állatokon az opiát receptorok generalizált bénítása nem okozott változást az egyes vizsgált agyi régiók CO₂-érzékenységében. 80 Hgmm-es hypotenzióban általánosan csökkent minden regio CO₂-érzékenysége, de ezt a naloxon adása szintén nem befolyásolta. 40 Hgmm-es, súlyos hypotensio során azonban nemcsak tovább csökkent minden regio CO₂-érzékenysége, hanem egy eddig ismeretlen jelenséget sikerült megfigyelni: CO₂ hatására az agyi véráramlás nem nőtt, hanem szignifikánsan csökkent. Ez arra utal, hogy az endogén opioidok ugyan sem normotenszióban, sem kisfokú hypotenszióban nem módosítják az agyi erek CO₂ iránti

érzékenységét, - súlyos hypotensioban azonban szerepet játszhatnak a CO₂-érzékenység megőrzésében.

A nem fájdalmas szomatikus ingerek centrális neuronokat aktiváló hatása és az ezt követő anyagcsere és véráramlás fokozódás kérdése általánosan ismert, - **a szomatikus eredetű fájdalomingerrek regionális agyi véráramlásra (rCBF) gyakorolt hatása** ezzel szemben még mindig tisztázatlan. Vizsgálataink során altatott, lélegeztetett, vérgáz stabilizált patkányokon vizsgáltuk, milyen hatása van a n. ischiadicus fájdalmas elektromos ingerrel történő stimulálásának a somatosensoros cortex és a fájdalomérzés pályájának nagy relay-magja, a thalamus lokális véráramlására. Az vizsgált területek celluláris aktiválódásának meghatározása a c-fos expressio mérésével történt.

Eredményeink szerint az ischiadicus ingerlés során a cortex területén 47%-al, a thalamus területén 44%-al nőtt a lokális véráramlás, az art. nyomás szimultán 35%-os emelkedése mellett. Az áramlásnövekedést azonban nem a nyomásemelkedés okozta, mert ugyanilyen nyomásemelkedés i. art. vér injekciójával nem okozott hasonló áramlásváltozásokat. Szimpatikus α -receptorok, opiát-receptorok, cyclooxygenase bénítása nem változtatta meg ezt a képet, - de az ATP-szenzitív káliumcsatornák, vagy szimpatikus β -receptorok bénításával az áramlásnövekedés kikapcsolható volt. (NO-blokkolóval csak a thalamus véráramlás-fokozódását lehetett meggátolni). Eredményeink arra utalnak, hogy fájdalmas ingerlés során az agyi véráramlás vazokonstriktor autoregulációs és specifikus vazodilatátor mechanizmusok segítségével alkalmazkodik a megnövekedett lokális neurális aktivitáshoz, mely mechanizmusokban szerepe van a szimpatikus β -receptoroknak, az ATP szenzitív K csatornáknak és a nitrogén monoxid release-nek.

Kísérleteink egy további, altatott patkányokon végzett csoportjában azt a kérdést vizsgáltuk: **hogyan változik a teljes agyi vértérfogat (gCBV) a n. ischiadicus C-rostjainak fájdalmas paramétereikkel történő ingerlése során?** Ezt a paramétert – méltánytalanul – némileg elhanyagolják az agyi keringési kutatások. A gCBV ugyanis egyszerre ad tájékoztatást az agyi artériás, arteriolás, kapilláris-, és vénás keringés aktuális állapotáról. Ezekben a kísérletekben a teljes agyi vértérfogat szilikon fotódiódás módszerrel történt folyamatos mérése mellett mintavételszerűen ellenőriztük azt, hogyan változik a gCBV-vel egyidejűleg a hypothalamus véráramlása. Elsőként írtuk le azt a jelenséget, hogy míg a szomatikus fájdalomingerrek hatására szignifikánsan nő az artériás nyomás és a regionális agyi (hypothalamikus) véráramlás, addig a teljes agyi vértérfogat változatlan marad. Ennek oka ismeretlen, de nem lehet kizárni azt a lehetőséget, hogy az agyi véráramlás autoregulációjához hasonlóan léteznek olyan mechanizmusok is, amelyek a *teljes agyi vértérfogat autoregulációját* biztosítják.

Endothel sejtek, ioncsatornák szerepe az agyi keringés szabályozásában fiziologiás és pathologiás állapotokban (K1, 14F, 22F, 23F, 37F, 42A, 53A)

A központi idegrendszerben a bradykinin (BK) nemcsak az ödémaképződés fő mediátora, de az agyi artériák igen hatásos dilatátora is. A mechanizmus azonban, mely az artériák

tágulatához vezet még ismeretlen. Kísérleteinkben a topikálisan agyfelszínre juttatott **bradykinin agyi keringésére gyakorolt hatásait** vizsgáltuk ujszülött malacokon. Az NO és prostanoid hatások kizárása céljából valamennyi kísérletet L-NAME és indomethacid előkezelésben végeztük. Célunk a K^+ csatornák és az EDHF szerepének vizsgálata volt a bradykinin okozta vazodilatációban.

Eredményeink szerint a topikálisan adott BK 62%-os vazodilatációt váltott ki a pialis erekben, - ezt a dilatációt az endothelium károsítása és a BK2 receptor antagonistá HOE-140 kikapcsolta. Western blottal kimutatható volt a BK2 receptorok jelenléte a cortexben és a pialis érfalban. Cytochrom P-450 antagonistával, lipoxigenáz inhibitorokkal ugyanezt nem lehetett elérni. A H_2O_2 scavenger katalázzal és az ATP szenzitív K^+ csatorna bénító glibenclamiddal a BK dilatátor hatását meg lehetett szüntetni.

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a BK-indukált, nem NO és nem prostanoid dependens pialis vazodilatációt H_2O_2 mediálja, BK2 receptorokon keresztül, ATP dependens K^+ csatornák nyitásával.

Hím Wistar patkányokon vizsgáltuk a **mitochondriális ATP-szenzitív K^+ csatorna nyitó diazoxid (DIZ) hatását a 90 perces, MCA occlusioval létrehozott ischémiás agyi sejtkárosodásra**. A DIZ 15 perccel az MCAO előtt került beadásra, oldalsó agykamrába adott infúzióval. A neurológiai "score" az ischémia kialakítása után 24 órával szignifikáns javulást mutatott a kontrollokhoz képest. Az infarctus volumene a kontrollok 41.9%-os értékével szemben 20.9%-ra csökkent. A neuroprotectív hatás a cortexen kívül a basalis ganglionokban is megfigyelhető volt. A DIZ ezen protektív hatásai teljesen kivédhetőek voltak a szelektív mitochondriális K_{ATP} blokkoló 5-HD segítségével. Az izolált agyi mitochondriumok fluorescens imaging technikával történő vizsgálatával bizonyítható volt, hogy a DIZ csökkentette a membrán potenciált. Western blottal az agyi mitochondriumokban "inwardly rectifying" kálium csatornák jelenléte volt kimutatható. Eredményeink arra utalnak, hogy a mitochondriális K_{ATP} csatornák szelektív nyitásának neuroprotectív hatása van az ischémia-reperfüziós károsodásokkal szemben.

Az agykéregben lejátszódó, sokat tanulmányozott agykérgi "spreading depression" (CSD) jelenség szerepet játszhat a migrén kialakulásában, de feltételezzük, hogy szerepet játszik az ischémiás stroke és az agyi traumákat követő kórképek kialakulásában is. Kísérleteinkben azt a kérdést vizsgáltuk, **felelőssé tehető-e endothelium mediált vazodilatációs mechanizmusok abban a corticalis hyperemiában, mely a spreading depression (SD) folyamán alakul ki**.

Kísérleteinket patkányokon végeztük, háromféle megközelítésben. 1.: az endothelialis vazodilatációs utak gátlását követően (cyclooxygenase gátlás indomethacinnal, NO-szintáz gátlása L-NAME-val, cytochrom P-450 epoxygenáz gátlása miconazollal). 2.: akút farmakológiai endothel károsítás phorbol 12,13dibutyrat-tal. 3: krónikus endothelium károsítás diétával kialakított inzulin rezisztens állatok létrehozásával. Az agyi véráramlás mérése laser-Doppler technikával történt. A CSD-t kálium klorid topikális alkalmazásával váltottuk ki.

Eredményeink szerint az endothelium dependens vazodilatáció bénítása egyik alkalmazott módszerrel sem befolyásolta a CSD során kialakuló agykérgi hyperemiát.

Ezért ezen eredmények alátámasztják azt a véleményünket, hogy a CDS során kialakuló kérgi értágulat és véráramlás fokozódás mechanizmusában az endothelium által mediált mechanizmusoknak nagy valószínűséggel nincs jelentős szerepe..

A nitrogén monoxid szintáz (NOS), a hem oxigenáz és ciklooxigenáz (COX) reakcióutak szerepe az agyi véráramlás szabályozásában (27F, 30F, 49F, 62F, 65F, 3A, 8A, 15A, 18A, 21A, 26A, 28A, 31A, 32A, 33A, 41A, 43A, 44A, 45A, 47A, 48A, 50A, 51A, 52A, 54A, 55A, 57A, 59A, 60A)

Az agyi véráramlás oszcillációja számos fiziologiás és pathologiás állapotban megfigyelhető és jelentősen befolyásolhatja az agyi anyagcsere viszonyokat. Korábbi "in vivo" vizsgálataink során bizonyítottuk, hogy az NO szintézis gátlásával az oszcilláció kiváltható, - de ennek mechanizmusa még tisztázatlan. További kísérleteink során izolált arteria cerebri media szegmenteken megfigyeltük, hogy a vazomóció NO-blokáddal való kiváltása a thromboxán-út aktivációjával kapcsolatos. Ezért tisztázni kívántuk, hogy "in vivo" körülmények között milyen hatása van a thromboxán receptor antagonistá U-46619-nek az oszcillációk kialakulására normál- és csökkent NO-szintézis állapotában.

Altatott, spontán légző, normoxiás-normokapniás patkányokon laser-Doppler (LD) technikával folyamatosan mértük a kéreg véráramlását mindkét oldali hemispheriumban. Az LD regisztrátum 5 perces szegmentumait értékeltük az U-46619 i.v. adása előtt és 20 perccel azt követően. A kísérletek későbbi szakaszában, 75 perccel az U-46619 adása előtt adott i.v. L-NAME-el NOS blokádot hoztunk létre. Az LD áramlás frekvenciáját és korrespondáló amplitudóját Fourier analízissel vizsgáltuk. Eredményeink szerint steady state nyugalmi állapotban az LD flow nagyon alacsony frekvenciájú oszcillációt mutatott. A thromboxán antagonistá adását követően sem a frekvencia, sem az amplitudo nem változott. NOS blokádot követően - ahogy ez várható volt, - nőtt az arteriás nyomás és szignifikánsan csökkent az LD flow. Ugyanakkor alacsony frekvenciájú és amplitudoju oszcilláció alakult ki. Ezt követően adott U-46619 hatására nem változott jelentősen az LD flow és annak frekvenciája, de szignifikánsan nőtt az oszcillációk amplitudója.

Eredményeink arra utalnak, hogy a thromboxán receptoroknak fiziologiás körülmények között ugyan nincs jelentős szerepe az oszcillációk létrejöttében, nitrogén monoxid hiány kialakulását követően azonban szignifikáns szerepet játszanak ebben a folyamatban. Ez azt jelentheti, hogy ez a mechanizmus jelentősen befolyásolhatja az agy perfuzióját és anyagcsere-viszonyait olyan pathologiás állapotokban, melyek csökkent NO produkcióval és vérlemez aktivációval járnak.

A hem-oxigenáz (HO) által mediált hem bomlás egészséges szervezetben is folyamatos szénmonoxid (CO) termeléssel jár. A CO és a nitrogén monoxid (NO) sok szempontból mutat hasonlóságokat, pl. mindkettő szerepelhet neurotranszmitterként a központi- és perifériás idegrendszerben, mindkettő endothelium eredetű relaxáló faktor az erekben. Kísérleteinkben altatott patkányokon azt vizsgáltuk: 1. hogyan befolyásolja az endogén CO az agy (hypothalamus) nyugalmi véráramlását, 2. kimutatható-e a cerebrovaszkuláris rendszerben kölcsönhatás a hem-oxigenáz-CO mechanizmus és az L-arginin-NO mechanizmus között?

A hem-oxigenáz gátló cink deuteroporphyrin 2,2-bis glikol (ZnDPBG) intraperitonealis adását követően nem változott meg a hypothalamus laser-Doppler technikával mért véráramlása, ugyanakkor viszont 67%-al nőtt a hypothalamus NO-szintáz aktivitása, miközben a cerebrospinális folyadék cGMP koncentrációja is változatlan maradt. Az NO-szintáz bénítását követően a csökkent a hypothalamus áramlása és ezt még további 22%-al csökkentette a ZnDPBG adásával létrehozott hem-oxigenáz gátlás.

Eredményeink arra utalnak, hogy az endogén szénmonoxid szignifikánsan befolyásolhatja az agyi keringési viszonyokat minden olyan pathológiás állapotban, amelyben csökken az NO szintézis.

A nitrogén monoxid (NO), szemben a legtöbb prostanoiddel, szerepet játszik a coronáriák nyugalmi véráramlásának fenntartásában is. Amikor azonban endothel sérülés, vagy csökkent NO-szintézis jön létre, nő az egyéb vazodilatátor mechanizmusok jelentősége.

Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, kimutathatók-e izolált patkányszíven kölcsönhatások az L-arginin-NO rendszer és a prosztanoid rendszerek között? A coronaria véráramlását és a szív munkavégzését standardizált Langendorff perfúziós preparátumon vizsgáltuk. Indomethacin nem változtatta meg a coronariák véráramlását, - NO blokádnál (L-NA) ugyanakkor szignifikánsan csökkentette azt. Indomethacin jelenlétében az L-NA még jelentősebben redukálta a coronaria áramlást. Sem az L-NA, sem az indomethacin nem változtatta meg a szív munkavégzését ha külön-külön alkalmaztuk őket, - de együttes adásuk esetén ez a paraméter 45%-al csökkent. (A szívfrekvencia a kísérlet során nem változott, és nem különbözött szignifikánsan az egyes kísérleti csoportokban). A szívből elfolyó folyadék prostacyclin tartalma szignifikánsan magasabb volt az NOS blokkolt állatok esetében.

Eredményeink arra utalnak, hogy abban az esetben, ha csökken a coronariák NO szintje, az értónus fenntartásában a prostacyclin veszi át a fő szerepet.

Az NO szintáz neuronális izoformájának (nNOS) jelenléte az astrocytáknak és a neuronoknak ugyanolyan jól dokumentált, mint az agy perivaszkuláris idegeiben és a cerebrovaszkuláris endotheliumban. A nNOS szerepe az agyi keringési rendszerben azonban még tisztázatlan.

Kísérleteinkben rapídan elvégzett patkányokból származó basiláris arteria szegmenteken vizsgáltuk a cerebrovaszkuláris nNOS szerepét, oly módon hogy összehasonlítottuk a specifikus nNOS gátló 7-NINA és az aspecifikus, általános NOS inhibitor L-NA érfali símaizomzatra gyakorolt hatását.

Eredményeink szerint 7-NINA nem gyakorolt jelentős hatást a nyugalmi értónusra, míg L-NA erős kontrakciókat hozott létre. Bradykinin relaxáns hatása L-NA jelenlétében csökkent, 7-NINA jelenlétében nem változott. 7-NINA viszont jelentősen csökkentette az acetylcholin kiváltott, endothel függő vazodilatációt.

Eredményeink arra utalnak, hogy az nNOS szignifikánsan hozzájárul az acetylcholin értágító hatásához, - tehát ezen izoenzym a cerebrovaszkuláris endothelium működésében jelentős funkcionális szerepet játszik.

Az NO és az NO metabolizmus igen sokféleképpen involvált a mitochondriális folyamatokban. Ezért nemcsak érdekesnek, de fontosnak is tartottuk vizsgálni azt a

kérdést: vajon **képesek-e maguk a mitochondriumok is az NO produkcióra a centrális neuronokban?**

Egér agyból izolált mitochondriumokat NO szenzitív fluorochrom diaminofluoresceinnel (DAF) töltöttünk fel és flow cytometria analízist végeztünk,- de sem NOS gátló szerrel, sem a NOS gének genetikai disruptiójával nem lehetett a DAF fluoreszcenciát csökkenteni, - viszont peroxynitrit scavengerok redukálták a fluoreszcenciát. Ez arra utal, hogy a DAF szignál nem specifikus NO-ra. Clark-típusú NO-szenzitív elektróddal sem lehetett az agyi mitochondriumokból NO release-t detektálni. A teljes agyi NOS aktivitásnak a mitochondriális NOS aktivitás csak 1%-át tesz ki, - ez viszont letet extramitochondriális kontamináció eredménye.

Eredményeink arra utalnak, hogy az egér agysejtjeinek mitochondriumai nem tartalmaznak NOS izoformákat és NOS-dependens mechanizmusokon keresztül nem termelnek nitrogén monoxidot.

Benyó vizsgálatai fényt derítettek arra a fontos körülményre, hogy **az NO-szintáz enzim bénításának hatása az agyi keringésben teljesen eltérő lehet aszerint, hogy a bénítás akútan, vagy krónikusan történt.** Akút bénítás (i.v. L-NAME) drámaian csökkenti a hypothalamus véráramlását, míg krónikus L-NAME itatást követően ugyanezen regio véráramlása változatlan marad. Vizsgálataink során megfigyelhető volt, hogy a krónikus NOS blokádnál adott L-arginin infúzió jelentős hypothalamikus áramlásfokozódást okoz, jelezve, hogy NO hiányában kompenzáló vazodilatátor mechanizmusok indulnak be. Annak érdekében, hogy tisztázzuk, szerepet játszanak-e a vazodilatátor prosztanoidok ezekben a kompenzáló mechanizmusokban, meghatároztuk a hypothalamus szöveti COX mRNA és protein szintjeit, - de az ismert izoenzimek közül (COX-1, COX-2, COX-3) egyikében sem jelentkezett upreguláció a krónikus NOS blokádnál. A vazodilatátor prosztanoid metabolitok (PGI₂, PGE₂, PGD₂) szintje sem emelkedett. A COX indomethacinnal történő bénítása (a diclofenac-al történt bénítással ellentétben) kontroll állatokban csökkentette a hypothalamus véráramlását, de egyik sem változtatta meg a hypothalamus véráramlását a krónikus NOS blokkolt állatokban. Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a hypothalamus véráramlásának krónikus NO gátlást követő adaptációjában (= emelkedésben) a vazodilatátor prosztanoidok nem játszanak jelentős szerepet.

Inzulin rezisztencia hatása az agyi erekre és az agyi keringésre (4F, 5F, 38F, 39F, 40F, 63F, 6A, 7A)

Inzulin rezisztencia (IR) embereken bizonyítottan növeli a stroke kialakulásának veszélyét,(súlyosabb kimenetel, lassúbb gyógyulás, megnőtt mortalitás). Idősebb embereken az IR jelentős rizikó faktor a demencia és az axonális károsodásokkal társuló Alzheimer kór szempontjából. Az inzulin rezisztenciának az agyi vérkeringés szabályzó mechanizmusaira gyakorolt hatása azonban, - a kérdés fontossága ellenére - máig sem tisztázott.

Kísérleteink egy részében fruktózzal táplált **inzulin rezisztens (IR) és kontroll patkányokból izolált arteria cerebri media szakaszok reakcióképességét vizsgáltuk** "in vitro" körülmények között. A Na-nitroprussziddal kiváltható érválasz a két csoport erein azonosnak bizonyult. Ezzel szemben a bradykininnel (BK) vagy a kalcium ionofor A23187-tel kiváltható endothelium dependens vazodilatáció sokkal kisebbnek bizonyult az IR állatok erein, mint a kontrollokén. L-NAME csökkentette a kontrollok BK-indukált értágulatát és teljesen megszüntette ugyanezt az IR állatok erein. Indomethacin csökkentette a kontrollok ereinek BK indukált vazodilatációját, de hatástalannak bizonyult az IR állatok erein. Kombinált L-NAME és indomethacin kezelés (ugyanúgy mint az endothelium denudációja) mindkét állatcsoport erein megszüntette a BK és az A23187 által indukált vazodilatációt.

Eredményeink arra utalnak, hogy az IR állatok ereinek csökkent endothelium-függő vazodilatációja elsősorban a cyclo-oxigenase által mediált folyamatok károsodásának a következménye. Az NO-mediált vazodilatáció az inzulin rezisztens állatok agyi erein is működőképes marad.

Vizsgálataink során felmerült az a gondolat, hogy az IR állatok endothelium-függő vazodilatációjának gyengülése az érfali símaizomzat K^+ függő csatornáinak diszfunkciójával kapcsolatos. Ezért megvizsgáltuk: hogyan alakul a kontroll állatokból, illetve az IR állatokból származó izolált art.cerebri media (MCA) relaxációs készsége különböző K^+ csatorna típusainak aktivációja, illetve gátlása esetén?

Megállapítottuk, hogy az inzulin rezisztencia típus-specifikus K^+ csatorna diszfunkción keresztül hozza létre az agyi artéria dilatációs készségének romlását: az IR állatokban bekövetkezett változások a BK_{Ca} és K_{ATP} csatornák működésének változásával kapcsolatosak, míg a K_{ir} és a K_V működése változatlan marad. BK_{Ca} és K_{ATP} csatornák működésének ezen változásai az IR okozta oxidatív stressz következményei, mely ROS scavengerekkel meggátolható. Az IR nem befolyásolta a vizsgált K^+ csatornák pórusformáló sub-unitjainak expressióját, - így nem valószínű, hogy csatorna-denzitás változás szignifikáns szerepet játszana a csökkent K^+ csatorna mediált válaszokban.

További kísérleteinkben **az inzulin rezisztencia genetikai modelljén**, az (fa/fa) "Zucker Obese" (ZO) patkányokon és kontrollként szolgáló "Zucker Lean" (ZL) állatokon, a koponyaalapba épített ablak-technikával vizsgáltuk az art. basilaris és oldalágainak vazokonstriktor-vazodilatációs készségét.

Eredményeink szerint az IR az agyalapi artériák vazokonstriktor készségét nem befolyásolta, - a vazodilatációs készség romlását pedig - melyek alapvetően a BK_{Ca} és K_{ATP} csatornák működésének változásával kapcsolatosak, - az oxidatív stressz és a Protein Kinase C mediálja.

Ösztrogén és progeszteron hatása a regionális agyi véráramlás autoregulációjára (62F)

Ezen kísérlet sorozatunkban azt a kérdést vizsgáltuk: van-e szerepe a női nemi hormonoknak, az ösztrogénnek és a progeszteronnak az agy, - konkrétan a vegetatív működéseket szabályzó hypothalamus - véráramlási autoregulációjában. Altatott,

lélegeztetett, álműtött kontroll, illetve ovariektomizált patkányokon, lépcsőzetes vérnyomáscsökkentés során, H₂-gáz clearance módszerrel mértük a lokális hypothalamikus véráramlást. Eredményeink: (1) ovariektomia hatására szignifikánsan csökkent a hypothalamus nyugalmi véráramlása és 80Hgmm-ről 40 Hgmmre csökkent az autoreguláció alsó határa, tehát a fiziologias autoregulációs görbe balra tolódott, jelezve, hogy az állatok hypothalamikus véráramlása ebben az állapotban még 40 Hgmm-es szisztémás artériás nyomás mellett is (!) normál szinten marad, (2) ösztrogén pótlással mind a nyugalmi véráramlást, mind az autoreguláció változásait teljesen kompenzálni lehetett, (3) progeszteron pótlás emelte a nyugalmi véráramlást, de az autoregulációt nem befolyásolta .

A PUMA-G receptorok és a prostaglandin receptorok szerepe a nikotinsavval kiváltható „flushing” reakcióban (56F)

A flushing (elvörösödés), mint mellékhatás, igen jelentősen gátolja a nikotinsavnak, mint antidyshlipémiás anyagnak a terápiás használatát. A „flushing” reakció mechanizmusát vizsgáltuk knock-out egereken. Feltételeztük, hogy az art. carotis externa területén kialakuló jelenség kialakulásában esetleg prostaglandin receptorok, vagy egy G-fehérjéhez kapcsolt receptor, a GPR109A (PUMA-G/HM74A) receptor játszhat szerepet. Knock out egereken végzett, „pilot study”-ként szolgáló vizsgálataink eredményei szerint (1) prostaglandin D2 és E2 knock-out egereken némileg csökkent ugyan a nikotinsav okozta flushing mértéke, de nem szűnt meg, (2) PUMA-G receptor hiányos egereken viszont egyáltalán nem lehetett nikotinsavval a bőr vörösödését kiváltani. Adataink egyértelműen bizonyítják, hogy a flushing reakciót a PUMA-G receptorok mediálják. (Ezen adatok alapján a vizsgálatokat irányító kutató, Dr. Benyó Zoltán pályázatot nyújtott be és támogatást nyert az OTKA-tól a jelenség mechanizmusának további tisztázására).