

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Egy új fokális ischaemiás modell kialakítása és az oxálecetsav hatásainak vizsgálata patkány központi idegrendszerén

PhD értekezés

Knapp Levente

Témavezetők:

Dr. Farkas Tamás
egyetemi docens

és

Dr. Toldi József
tanszékvezető egyetemi tanár

2015

Szeged

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	2
2. Rövidítések jegyzéke.....	4
3. Bevezetés.....	6
3.1 Stroke.....	6
3.2 Állatkísérletes agyi ischaemiás modellek.....	7
3.3 Agyi ischaemia pathofiziológiája.....	12
3.4 Glutamát scavenging.....	16
3.4.1 Agyi glutamát homeosztázis.....	16
3.4.2 Glu scavenging.....	17
3.5 Az OxAc biológiai szerepéről.....	20
3.6 A bajusszőr-érzékelés anatómiai és funkcionális hátterének áttekintése.....	21
4. Célkitűzések.....	24
5. Anyagok és módszerek.....	26
5.1 Felhasznált állatok.....	26
5.2 Ischaemiás modell kialakítása.....	26
5.3 <i>In vivo</i> elektrofiziológiai vizsgálatok.....	27
5.3.1 EEG elvezetés.....	27
5.3.2 Szomatoszenzoros kérgi kiváltott potenciálok (SEP) elvezetése.....	27
5.4 <i>In vitro</i> ischaemia és elektrofiziológia.....	29
5.4.1 Túlélő agyszelet preparátum készítése.....	29
5.4.2 fEPSP regisztrálása.....	30
5.4.3 OGD kialakítása, alkalmazott anyagok.....	31
5.5 Szövettani vizsgálatok.....	31
5.5.1 TTC festés.....	31
5.5.2 Fluoro Jade C festés.....	32
5.5.3 Immunhisztokémia.....	32
5.5.4 Kvantitatív elemzés.....	32
5.6 Statisztikai analízis.....	32
6. Kísérletekben való részvétel.....	34
7. Eredmények.....	35
7.1 Fokális ischaemia modell kialakítása, vizsgálata.....	35
7.1.1 Modell kialakítása.....	35

7.1.2 EEG.....	36
7.1.3. Szomatoszenzoros kiváltott potenciálok.....	37
7.1.4 Hisztológiai eredmények	38
7.2 OxAc hatása a fokális ischaemiában	41
7.2.1 Elektrofiziológiai eredmények.....	41
7.2.2 Hisztológiai eredmények	42
7.3 Az OxAc hatása <i>in vitro</i> modellen	44
7.4 Az OxAc hatása a szomatoszenzoros kiváltott potenciálokra intakt állaton	47
7.4.1 OxAc dózis hatás-vizsgálata	47
7.4.2 OxAc és a 2- α -ketoglutarát hatása a kiváltott potenciálokra	48
8. Diskusszió.....	51
8.1. A fokális ischaemiás modell vizsgálata.....	51
8.2 OxAc hatása <i>in vitro</i> modellen	53
8.3 OxAc és Ketoglutarát hatása a szomatoszenzoros kiváltott potenciálokra	55
8.4 Az OxAc és a Glu scavenging alkalmazhatósága.....	57
9. Következtetések	60
10. Összefoglaló	62
11. Summary	66
12. Köszönetnyilvánítás	69
13. Irodalomjegyzék.....	70
14. Tudományos közlemények listája	82

2. Rövidítések jegyzéke

2VO: a két fő nyaki ütőér (CCA) leszorítása (2 vessel occlusion)

4VO: a két fő nyaki ütőér (CCA) és a két gerinc menti artéria (VA) elzárása (4 vessel occlusion)

ACA: elülső agyi artéria (Anterior Communicating Artery)

aCSF: mesterséges agy-gerincvelői folyadék (artificial cerebrospinal fluid)

AKG: 2- α -ketoglutarát (ketoglutarate)

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-methylisoxazol-4-propionát

Asp: aszpartát (aspartate)

ATP: adenozin-trifoszfát

BBB: vér-agy gát (blood-brain barrier)

CA1: Ammon szarv 1-es régió (cornu ammon 1)

CCA: fő nyaki ütőér (Common Carotid Artery)

CSF: agy-gerincvelői folyadék (Cerebrospinal Fluid)

dMCAO: disztális MCAO (distal MCAO)

EAAT: serkentő aminosav transzporter (Excitatory Amino Acid Transporter)

EEG: elektroencefalogram

fEPSP: mező-EPSP (field-EPSP)

FJC: Fluoro Jade C

GABA: γ -amino-vaajsav (gamma-aminobutyric acid)

Glu: glutamát (Glutamate)

GOT: Glu-Oxálecetsav-Transzamináz

GPT: Glu-Piruvát-Transzamináz

H₂O₂: hidrogén-peroxid

i.v.: intravénás

ICA: belső fejverőér (Internal Carotid Artery)

ICH: intracerebrális haemorrhagia

ISF: intersticiális folyadék (interstitial fluid)

KIR: központi idegrendszer

LTP: szinaptikus áttevődés tartós megnövekedése (long-term potentiation)

MCA: középső agyi artéria (Middle Cerebral Artery)

MCAO: a középső agyi artéria elzárás (Middle Cerebral Artery Occlusion)

NMDA: N-metil-D-aszpartát

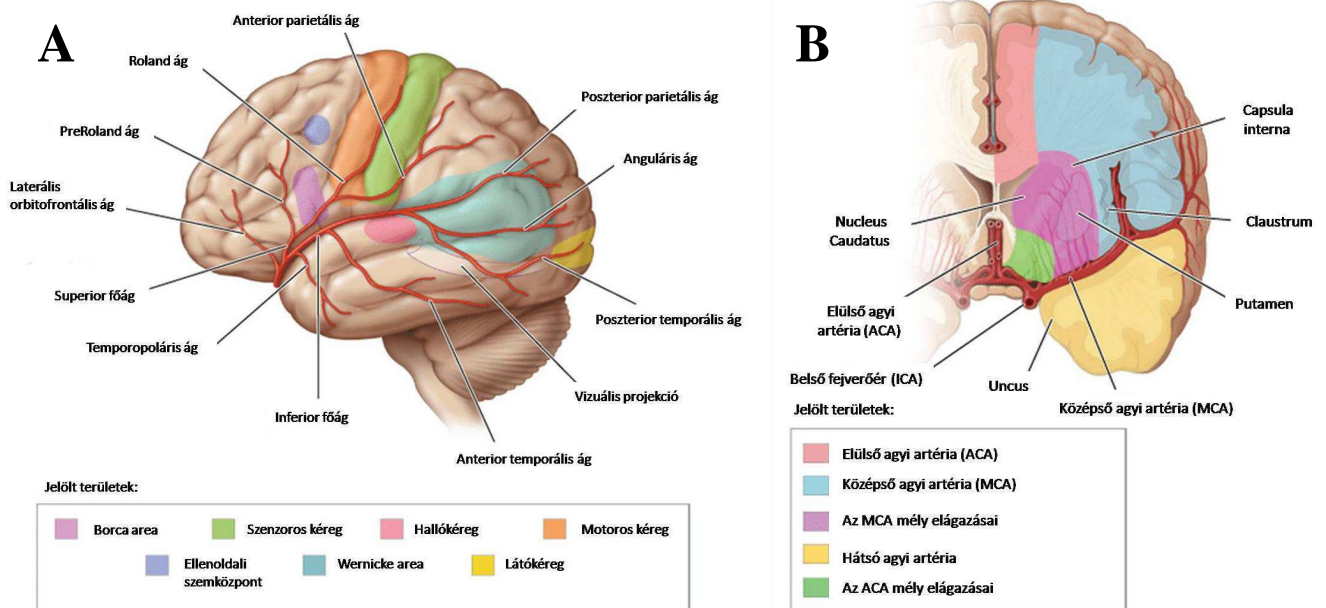
NOS: nitrogén-monoxid-szintetáz
OGD: oxigén-glükóz depriváció
OxAc: oxálecetsav (Oxaloacetate)
PB: foszfát puffer
PCA: hátsó agyi artéria (Posterior Communicating Artery)
pMCAO: permanens MCAO (permanent MCAO)
POm: poszterior nukleusz középső része
PrV: nukleusz principalis
Pyr: piroszőlősav, piruvát (pyruvate)
rtPA: rekombináns szöveti plazminogén aktivátor
SAH: subarachnoidális haemorrhagia
SEP: szomatoszenzoros kiáltott potenciál (Somatosensory Evoked Potential)
TG: Gasser dúc (Trigeminal Ganglion)
TIA: tranziens ischaemiás attack (Transient Ischemic Attack)
tMCAO: átmeneti MCAO (transient MCAO)
TN: agytörzsi trigeminális magcsoport (Trigeminal nuclei)
TTC: 2, 3, 5-trifeniltetrazolium klorid
VA: gerinc menti artéria (Vertebral Artery)
VPM: nukleusz ventrális poszteromediális

3. Bevezetés

3.1 Stroke

A stroke vagy akut agyérkatasztrófa világszerte a vezető halálokok között szerepel (Roger és mtsai. 2012), és évente több millió ember szenved ennek következtében maradandó vagy átmeneti károsodást (Lopez és mtsai. 2006). Csak Magyarországon évente 45-50.000 esetet regisztrálnak, mely közül 12-15.000 végződik halállal. Itthon az elhalálozási statisztikákban a stroke, az idegrendszer működését érintő betegségek tekintetében az első, az összes halálesetet tekintve pedig a 3. helyen áll. Hazánkban átlagosan fél óránként hal meg valaki agyérkatasztrófa következményeként. Az inzultus során agyi vérellátási hiány, azaz agyi ischaemia lép fel, mely agyérelzáródás vagy intrakraniális vérzés következményeként léphet fel. Az utóbbi vérzéses forma a hemorrhagiás stroke, amely a vérzés helyétől függően lehet intracerebrális (ICH) és subarachnoidális (SAH). A magyar lakosság körében (ahogy az amerikai, illetve európai államokban is) a leggyakoribb forma az ischaemiás stroke (80%), míg ritkábban fordul elő az ICH (15%), valamint a SAH (5%) (Warlow és mtsai. 2003).

Az ischaemiás stroke során az agyi éret legtöbb esetben egy érfalról leváló plakk, illetve vérrög zárja el. A keringési elégtelenség, illetve az érelzáródás lehet rövid idejű, átmeneti, amikor nem keletkezik infarktus, és a tünetek rövid időn belül, legfeljebb 24 órán belül elmúlnak. Ez a jelenség az úgynevezett tranziens ischaemiás attack (TIA), vagy mini-stroke. A tünetek ilyenkor legtöbbször szenzoros zavarok, afázia, látótér kiesés. A TIA rendkívül nagy kockázati tényezőt jelent egy későbbi stroke bekövetkezéséhez (Sudlow 2008). A hosszantartó agyi ischaemiás állapot következményeként maradandó szöveti sérülések keletkeznek. A tünetek változóak lehetnek aszerint, hogy melyik agyi ér illetve érszakasz érintett. Későbbiekben a középső agyi artéria (MCA, Middle Cerebral Artery) központi témája lesz az értekezésnek, így ezen ér elzáródása során fellépő szimptomákat jellemzem bővebben. Az MCA az egyik legnagyobb agyi artéria és leggyakrabban érintett az agyérkatasztrófákban. Ezen ér látja el a kérgi területek nagy részét, valamint a bazális ganglionokat és több subkortikális struktúrát (1/A, B ábra). Ebben a nagy kiterjedésű artériában egy adott szakasz elzáródását követően, az érintett terület funkciójától függően sokféle tünet jelentkezhet: arcot is érintő hemiparézis, szenzoros, motoros működészavarok, látótérkiesés, szemmozgatási és hallás zavarok, olvasási, írási problémák (Phipps 1991).



1. ábra A humán középső agyi artéria (MCA) által ellátott kérgi (A), valamint további agyi erek által ellátott agyi területek (B). (Forrás: Harryson's Principles of Medicine, 17th edition nyomán módosítva)

Napjainkban -az intenzív kutatások ellenére is- csak néhány eljárás áll rendelkezésre a stroke kezeléséhez. A nagy jelentőségű prevenció, a korán elkezdett, hosszú távú rehabilitáció és műtéti eljárások mellett jelenleg csak néhány farmakológiai beavatkozási lehetőség van (Ginsberg 2009). Legáltalánosabb az ischaemiás stroke akut fázisában (3-4,5 óra) alkalmazott aszpirinkezelés, illetve rtPA-val (rekombináns szöveti plazminogén aktivátor) kiváltott trombolízis (Sudlow és Warlow 2009). Sajnálatos módon, ezen lehetőségek a rövid terápiás időablak, illetve egyéb egyedi körülmények miatt is csak az emberek 2-5%-nál alkalmazhatók (Donnan és mtsai. 2011; Hacke és mtsai. 2008). Mindemellett fontos hangsúlyozni, hogy a stroke-os esetek 70%-ban megelőzhetőek lennének az életkörülmények optimalizálásával: vérnyomás és a koleszterinszint csökkentése, túlsúly leküzdése, dohányzás abbahagyása, mértékletes alkoholfogyasztás, egészséges táplálkozás, mozgás (Lim és mtsai. 2012).

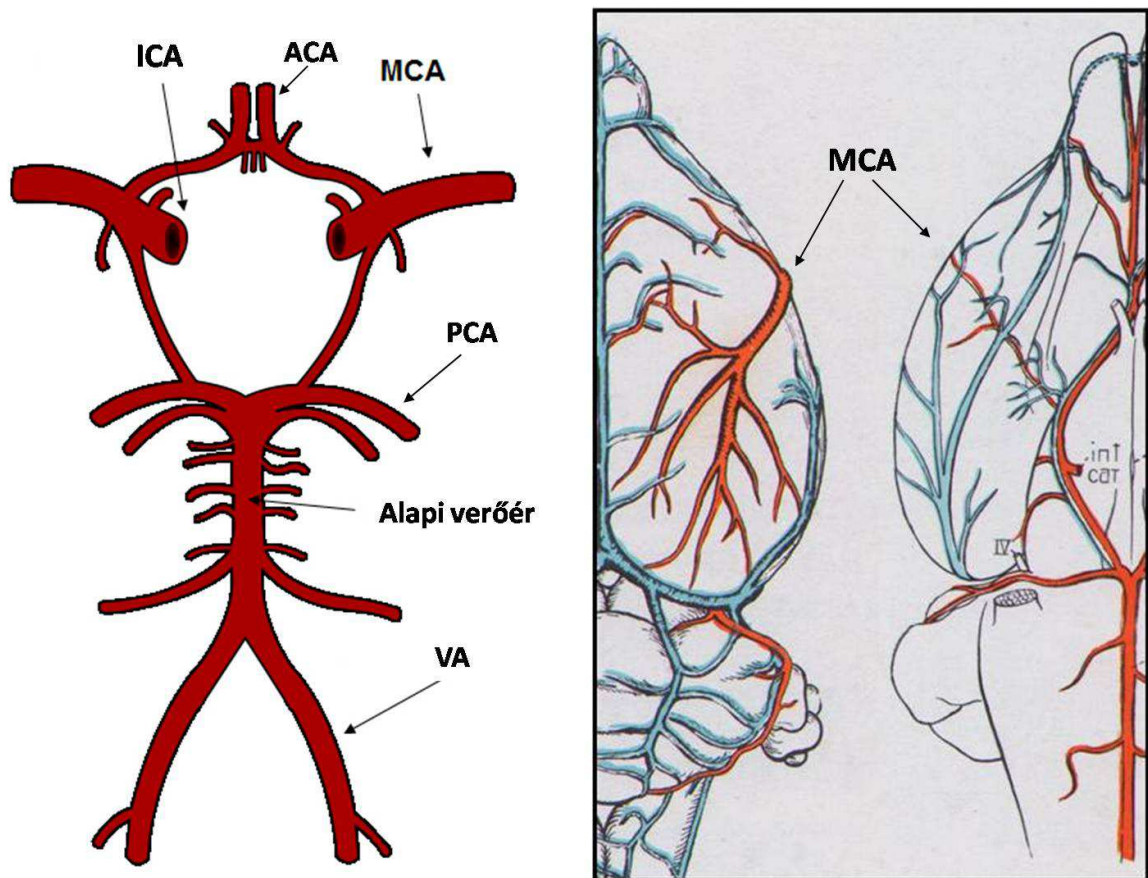
3.2 Állatkísérletes agyi ischaemiás modellek

A stroke, illetve az agyi ischaemia pathomechanizmusának alapos ismerete elengedhetetlen az új gyógyszerek és terápiás lehetőségek tervezéséhez, kifejlesztéséhez és teszteléséhez. Ezen folyamatokhoz az állatkísérletes modellek használata elengedhetetlen. A különböző modellek

segítségével jól vizsgálhatók az agyi ischaemia emberben is hasonlóan lezajló élettani és neuropathológiás folyamatai. A számos hasonlóság mellett azonban fontos különbségek is vannak, amelyek miatt az állatkísérletes eredmények klinikumba történő átültetése rendkívül nehéz és összetett feladat. A stroke kísérletes vizsgálatához számos modell áll rendelkezésre. Ezeket feloszthatjuk aszerint, hogy a stroke spontán jelentkezik, illetve valamilyen mesterséges behatással idézzük elő. Utóbbi esetben létrehozható globális és fokális agyi ischaemiás, valamint subarachnoidális (SAH) és intracerebrális hemorrhágiás (ICH) modell. A legtöbb állatkísérletes modell esetében rágcsálót (egér, patkány) használnak a hasonló agyi vaszkularizáció miatt, valamint etikai és anyagi megfontolásból. Továbbá ezen állatoknál számos, már sztenderdizált kísérleti paradigma áll rendelkezésre. A rágcsálómodellek mellett kísérleteznek nyúl, macskán, kutyán, sertésen és különféle majmokon (Bailey és mtsai. 2009).

Az agyi ischaemiás modelleket 2 fő csoportra oszthatjuk, attól függően, hogy a vérellátás hiánya a teljes agyat, illetve egy kisebb régiót érint. A globális ischaemia során vizsgálható az agyi ischaemia általános hatása a különböző régiókban, jól modellezhető a szív-megállást követő teljes vérellátási hiány, az agyi kisérbetegségek és agyérelmeszesedések okozta általános csökkent agyi perfúzió. A globális hipoperfúzió során főként a kéreg alatti fehérállomány, illetve néhány különösen érzékeny agyi terület sérül (Debette és Markus 2010). Globális ischaemiát legegyszerűbben a koponyába futó, agyat ellátó artériák elzárásával válthatjuk ki. Az agy vérellátását legnagyobb mértékben a 2 fő nyaki ütőér (CCA, Common Carotid Artery) belső ágai, az un. a belső fejverőerek (ICA, Internal Carotid Artery) biztosítják. A másik fontos bemenetet a 2 gerinc menti artéria (VA, Vertebral Artery) biztosítja. A legegyszerűbb globális hipoperfúziós állapotot a 2 érelzárásos modellel (2VO, 2 vessel occlusion) hozhatunk létre, mely során a két CCA-t szorítjuk el (Smith és mtsai. 1984). Az említett 4 artéria együttes elszorítása adja a 4VO modellt (Pulsinelli és Brierley 1979; Schmidt-Kastner és mtsai. 1989), mely során csaknem teljesen lecsökken az agyi véráramlás. A másik nagy csoportot a fokális agyi ischaemiás modellek alkotják, melyeknél az agyi vérellátási hiány csak egy adott területen jelentkezik. Ez jól modellezi az ischaemiás stroke körülményeit. Ezen modellek esetében az ischaemia kiváltását leggyakrabban a középső agyi artéria (MCA, Middle Cerebral Artery) részleges vagy teljes elzárásával idézik elő. Ezt a modellt azért is használják gyakran, mert ember esetében a legtöbb ischaemiás stroke is ehhez az érhez köthető (del Zoppo és mtsai. 1992). Dolgozatomban az MCA elzárásán alapuló technikákra fókuszálok, de emellett természetesen léteznek más agyi eret célzó technikák,

valamint több lehetőség van fokális agyi ischaemia létrehozására is (pl. diffúz fototrombózis és traumás agysérülés modellek).



2. ábra A Willis-kör anatómiája és a patkány agyfelszíni vaszkularizációja dorzális és ventrális nézetből. ACA: elülső agyi artéria, ICA: belső fejverőér, MCA: középső agyi artéria, PCA: hátsó agyi artéria, VA: gerinc menti artéria (Forrás: Wikipédia; Anatomy of the Rat, Eunice Chace Green alapján módosítva)

Az MCA szinte az ICA folytatásaként lép ki a Willis körből, és lát el különböző kortikális és szubkortikális régiókat (1. és 2. ábra). A szubkortikális területekhez futó lentikulo-striatális artériák az eredéshez közel, egészen a proximális szakasznál találhatóak (1./B ábra). Ezt követően a legtöbb esetben az MCA disztális szakasza (dMCAO) egészen a rhinális fisszúráig, illetve azon túlhaladva sem mutat nagyobb, horizontális elágazódást. A dMCA további kérgi lefutása, arborizációja nagyfokú egyedi eltérést mutathat (Rubino és Young 1988). Az MCA által ellátott kérgi területek főleg a szomatoszenzoros, motoros és különböző temporális auditoros áréak. Az MCA okklúzió (MCAO, Middle Cerebral Artery Occlusion) hatására leginkább szenzorimotoros illetve kognitív deficit alakulhat ki (Bouet és mtsai. 2007; Freret és mtsai. 2009). Az egyik első állatkísérletes modellben egy rendkívül invazív

technikát használtak fokális agyi ischaemia létrehozására: az MCA-t szemüregen keresztül (transz-orbitálisan) szorították el (Hudgins és Garcia 1970). A rágcsálók esetében széles körben alkalmazták az MCA proximális részének elzárását a járomcsont eltávolítása majd a koponya megnyitását követően (Shiraishi és Simon 1989). Az MCAO-t legtöbb esetben elkötéssel, mikroklip használatával (Buchan és mtsai. 1992), elektrokoagulációval (Tamura és mtsai. 1981), trombo-embólia létrehozásával (Kudo és mtsai. 1982; Orset és mtsai. 2007; Zhang és mtsai. 2005), valamint vasoconstrictor alkalmazásával (Macrae és mtsai. 1993) váltják ki. A nagyobb mértékű sérülés kialakításához az MCAO alatt elzárható az ipszilaterális, illetve mindkét oldali CCA is (Yanamoto és mtsai. 1998), ekkor beszélünk 3VO technikáról. Az ér valamilyen filamenttel való elkötésekor permanens okklúzió (pMCAO) jön létre, mely során nincs reperfúziós periódus. A módszer nagy előnye, hogy egyszerű és alkalmazása során nem lép fel nagy szöveti, illetve érsérülés. A mikroklip használatával tranziens MCAO (tMCAO) is kialakítható, így a reperfúzió hatása is vizsgálható. Hátrányként meg kell említeni a következményes ér-, illetve lehetséges agyszöveti sérüléseket. A trombo-embólia kísérletes kialakítására több lehetőség van. Az ICA-ba adott méretű vérrögöt fecskendezve elzárható az MCA (Kilic és mtsai. 1998). Másik lehetőség a fototrombózis létrehozása (Watson és mtsai. 1985), mely során adott hullámhosszú fényre (lézer) aggregálódó anyagot kell a keringésbe juttatni, majd a kívánt helyen megvilágítani. Az utóbbi évtizedben már lehetőség nyílt a trombus lézeres feloldása is (Yao és mtsai. 2003), így a módszer segítségével létrehozható tMCAO is. A technika hátránya, hogy az indukált trombusok a teljes okklúzió létrejötte előtt tovább haladhatnak a keringéssel, elzárva különböző távolabbi érszakaszokat, így véletlenszerű mintázatban alakíthatnak ki további léziós területeket. Továbbá az idegen festékanyag bejuttatását kísérő esetleges fiziológiai változások sem zárhatóak ki teljesen. Az MCA vasoconstrictióját ki lehet váltani különböző anyagokkal, például az endothelin-1 (ET-1) intravénás (Macrae és mtsai. 1993) és intraparenchimás alkalmazásával (Sharkey és mtsai. 1993). A módszer előnye, hogy egyszerű, kevésbé invazív, a mortalitás nagyon alacsony az öreg állatoknál is (Soleman és mtsai. 2010). Hátránya, hogy nagy dózis kell az infarktus kialakítására, egereknél önmagában nem alkalmazható, valamint az eredmények kiértékelését nehezíti, hogy az ET-1 interakcióba léphet a patológiás kaszkád kulcs molekuláival is.

Napjainkban a leginkább elterjedt módszer a filament-technikás MCAO (Koizumi és mtsai. 1986; Longa és mtsai. 1989), mely során a fej sértetlen állapotban marad, miközben egy adott vastagságú, illetve hosszúságú teflonbevonatú nylon filamentet vezetnek fel az ICA-n

keresztül egészen az MCA proximális szakaszáig. A filamentet visszahúзва lehetőség van tMCAO létrehozására is, illetve ICH modell is kialakítható, ha azt erősebben továbbvezetjük. A módszer hátránya, hogy a műtét nehezen kivitelezhető, rendkívüli módon eltérő a kiváltott, következményes agyi sérülés mértéke (Bacigaluppi és mtsai. 2010) és nagy a mortalitás.

A SAH kialakításához legtöbbször vért, illetve véralkotókat injektálnak a ciszterna magnába (Solomon és mtsai. 1985). Egy másik gyakori eljárás során különböző intrakraniális agyfelszíni ereket sértenek (Bederson és mtsai. 1995).

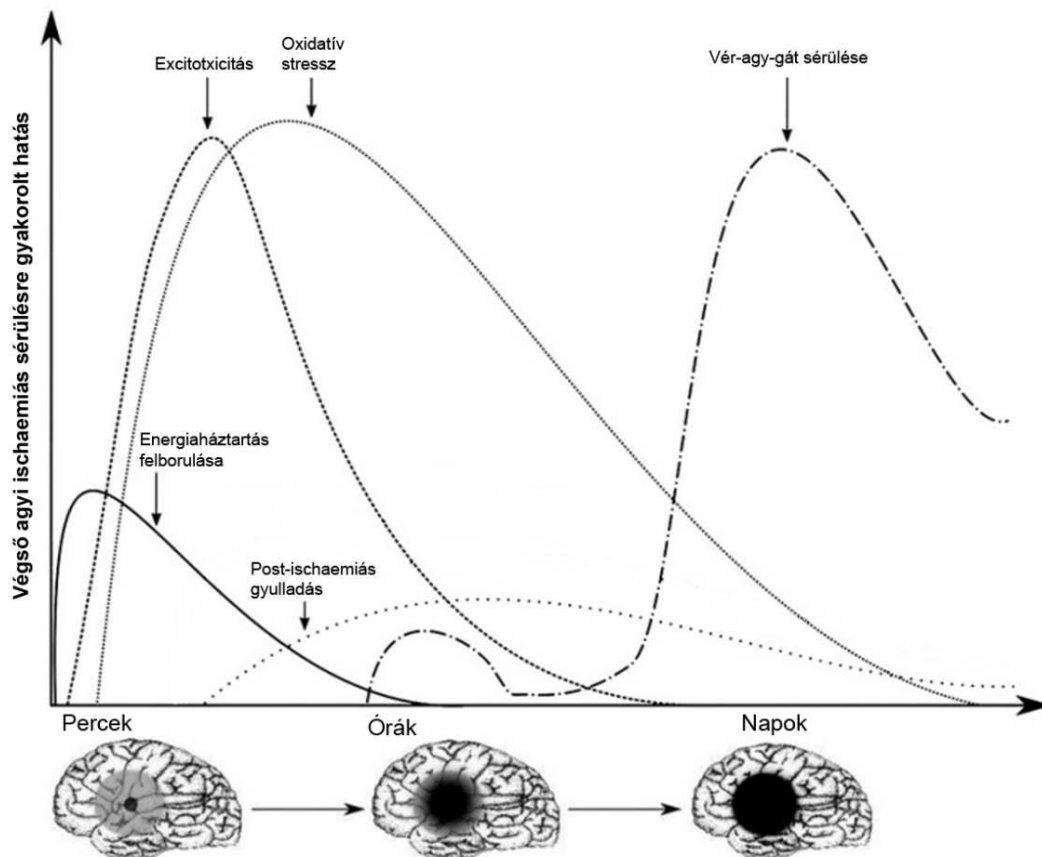
ICH modellezésénél két általánosan használt módszer terjedt el. Egyik az intraparenchimális vérinjektálás (Belayev és mtsai. 2003), a másik eljárás során kollagenáz enzimet alkalmazva roncsolják az agyi ereket határoló bazális laminát, mely következtében kialakul az intrakraniális hemorrhágia (Rosenberg és mtsai. 1990).

Az állatkísérleti modellek másik nagy csoportját alkotják a spontán stroke-modellek. A stroke-kal kapcsolatos kísérleteknél széles körben használják az SHRSP patkány törzset (Bailey és mtsai. 2011). A patkányok már 6 hetes korban emelkedett vérnyomást mutatnak, majd 12 hetesen erős hipertenzió figyelhető meg. 20 hetes korban már stroke-szerű tünetek jelentkeznek (lateralizáció, nyáladás, végtag gyengeség), és megfigyelhető a vér-agy-gát diszfunkciója is. A törzs fő jellegzetessége, hogy gyakran alakul ki spontán stroke. A SHRSP patkányok mellett rendelkezésre állnak különböző indukálható transzgenikus patkány (Collidge és mtsai. 2004), illetve egér (Iida és mtsai. 2005) törzsek, melyeknél a renin-transzgen indukálásával, valamint magas sótartalmú diétával válthatunk ki rendkívül magas vérnyomást, ami spontán agyér katasztrófákhoz vezet.

A stroke számos aspektusa vizsgálható az eddig említett állatkísérletes modellek segítségével (Krafft és mtsai. 2012), azonban még mindig vannak olyan szempontok, jelenségek, melyek a fentebb ismertített módszerekkel nem tanulmányozhatók (Xu és Pan 2013). Például nincs igazán jó modell, amellyel finoman lehet szabályozni, illetve egy adott szinten tartani az ér-okklúzió mértékét. Továbbá, a már említett TIA modellezéséhez sincs megfelelő technika, amellyel rövid idejű, átmeneti, repetitív ischaemia hozható létre. Általánosan elmondható, hogy egy MCAO modell akkor jó, ha a kivitelezés könnyű, a felmerülő költségek, illetve az eszközigény nem túl nagy, jól reprodukálható, alacsony a mortalitás, mérhető neuropathológiás változást okoz, átmeneti az okklúzió, valamint nincs nagy következményes ér sérülés (Fisher és mtsai. 2009).

3.3 Agyi ischaemia pathofiziológiája

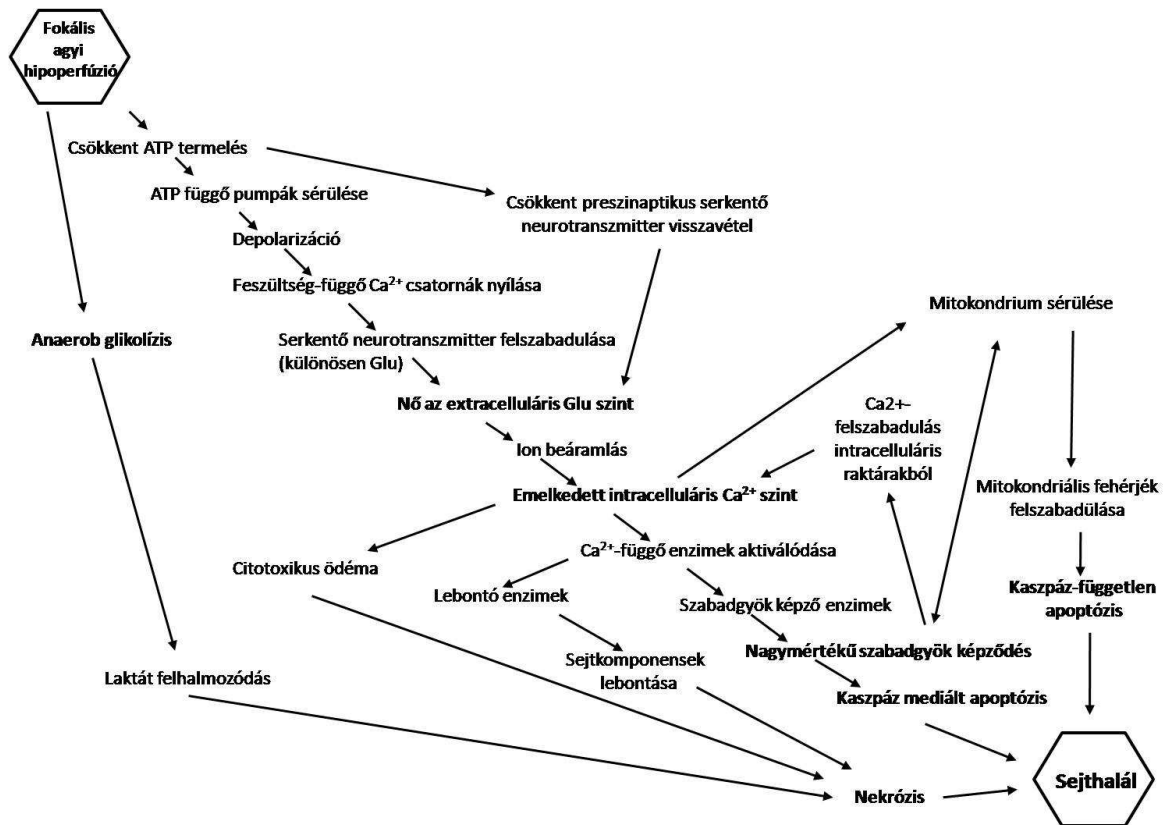
Az agyi ischaemia során beinduló összetett neurokémiai folyamatokat összefoglaló néven ischaemiás kaszkádnak nevezzük. Ezen komplex folyamatsor különböző szakaszai térben és időben egyaránt elkülönülnek. Az eseménysort összefoglalva: a csökkent agyi keringés során felborul a celluláris energiaháztartás, amelynek következtében excitotoxicitás, oxidatív stressz, vér-agy-gát diszfunkció és mikro érsérülés, továbbá a későbbiekben többféle gyulladási folyamat lép fel, ami a különböző idegi elemek (neuron, glia), valamint az endothél sejtek halálához vezethet. A kaszkád eseményeit több tényező is elindíthatja, befolyásolhatja, így a kimenetel nagyon változó lehet. A folyamatsor az ischaemiás inzultus első perceitől kezdve órákig, illetve napokig fenn állhat (3. ábra).



3. ábra A fokális ischaemiát követő patofiziológiai eseménysor időbeli lefutásának és különböző folyamatok sérülésre gyakorolt hatásának vázlata. A kép alján látható sematikus agyi ábrákon látható, hogy a core-régió (fekete) idővel kiterjed a penumbra (szürke) területére, kialakítva a nagy infarktusz területet. (Brouns és De Deyn 2009 nyomán módosítva)

A nagymértékű hipoperfúzió által érintett központi területen, melyet ischaemiás core-nak nevezünk, a különböző sejtek gyors és visszafordíthatatlan sérülést szenvednek. Erre a régióra a sejtek nekrotikus pusztulása jellemző, amelynek során többek között megfigyelhető az ion-homeosztázis teljes felborulása és különböző degradációs folyamatok (pl.: lipolízis, proteolízis) beindulása. A hipoperfúzió által kevésbé érintett területeket – ahol a funkcionális sérülés ellenére a szövet struktúráisan intakt marad – penumbra régióknak nevezzük. Itt a sejtek energiaháztartása részlegesen megtartott, így a keringés helyreállításával, illetve az ischaemiás kaszkád blokkolásával potenciálisan megmenthető a terület. A sokáig fennálló hipoperfúzió során – az idő előrehaladtával – a penumbra területén is létrejön a szövetelhalás (Fisher és Garcia 1996). Ez a másodlagos sérülés egy elhúzódó folyamat eredményeként órák, illetve napok alatt alakul ki.

Ha az ér elzáródása megszűnik (például az okklúziót előidéző trombus felszívódása, feloldódása, vagy a műtéti eltávolítása révén), akkor beszélünk reperfúzióról. Annak ellenére, hogy a reperfúziót követően helyreáll a keringés – mely elengedhetetlen a későbbi regenerációhoz (Zanette és mtsai. 1995) – az ischaemiás periódus alatt felhalmozódott szabadgyökök által indukált oxidatív stressz további sérülést idéz elő.



4. ábra Az ischaemiás kaszkád molekuláris eseménysora. A lecsökkent agyi keringés számos lépés során végül a sejthalálhoz vezethet. (Brouns és De Deyn 2009 nyomán módosítva)

Az energiaháztartás felborulása szempontjából a legfontosabb tényezők az agyi ischaemia során a hipoxia és a hipoglikémia, melyek következtében lecsökken az adenzin trifoszfát (ATP) szintézis. ATP hiányában a sejtek ion-egyensúlyát fenntartó különböző ATP-függő ionpumpák diszfunkciója, majd a sejtek depolarizációja figyelhető meg. A depolarizáció hatására nyílnak a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák, valamint serkentő neurotranszmitter ürül az extracelluláris térbe, melynek visszavétele (ATP hiányában) ugyancsak gátolt. A fokozott intracelluláris Ca^{2+} szint, valamint serkentő neurotranszmitterek felszabadulása eredményezi az excitotoxicitást, mely a másodlagos sérülés kialakulásához vezet. Az excitotoxicitás folyamatában a glutamát (Glu) –mint legáltalánosabb serkentő neurotranszmitter- központi szerepet játszik. A Glu túlzott mértékű felszabadulását követően poszt-szinaptikus receptoraihoz (NMDA, AMPA és kainát) kötődve további Na^+ , Cl^- és Ca^{2+} beáramlást okoz (Chen és mtsai. 2008). A kezdeti, lokális sérülés kiterjedése ezen depolarizálódott sejtekhez köthető. Az emelkedett intracelluláris Ca^{2+} szint, a Ca^{2+} -függő enzimek aktiválása és a szabadgyök képződés mellett számos citoplazmatikus és sejtmagi folyamatot indít be (Choi 1995). Ezek során bekövetkezik a citoskeletális és az extracelluláris mátrix fehérjék

proteolízise, valamint többek közt a foszfolipáz A2, különböző endonukleázok, a cyclooxygenáz és különböző szabadgyök képző enzimek aktivációja. Az enzimatis degradáció és az intenzív szabadgyök képződés a sejtek nekrotikus, illetve apoptotikus úton történő pusztulásához is vezethet.

Az oxidatív stressz akkor alakul ki, ha a keletkező szabadgyökök semlegesítéséhez nem áll rendelkezésre elég endogén antioxidáns. A reaktív oxigén és nitrogén gyökök fontos mediátorok a szöveti sérülés kialakításában (Chan 2001; El Kossi és Zakhary 2000). Az agyi ischaemia során nagy mennyiségben keletkező reaktív gyökök károsíthatják a membránokat felépítő lipideket (lipidperoxidáció), fehérjéket, szénhidrátokat, valamint a DNS-t (Evans és Cooke 2004). A lipidperoxidáció során károsodik a sejt, illetve az organelumok membránja, melynek következményeként a mitokondrium citokróm C-t szabadít fel, és elindítja az apoptotikus folyamatokat (Kontos 2001; Love 1999; Nelson és mtsai. 1992).

Az agyi ischaemia során létrejövő, kevésbé reaktív szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) képződhet enzimatisusan (pl xantin oxidáz), illetve létrejöhet a mitokondriális elektrontranszport folyamatok során. A szuperoxidból jön létre a káros hidrogén peroxid (H_2O_2), majd a rendkívül reaktív hidroxil gyök ($\cdot OH$) (Beckman és Koppenol 1996). Továbbá erősen citotoxikus, a szuperoxidból és a nitrogén-monoxidból ($NO^{\cdot-}$)-ból létrejövő peroxinitrit ($ONOO^{\cdot}$) is (Iadecola 1997). A reakcióban részt vevő nitrogén-monoxidot l-argininből alakítja ki a nitrogén oxid szintáz (NOS). A NOS-nak három típusát különíthetjük el. Az I-es típus neuronokban, a III-as az endotél sejtekben általánosan expresszálódik, így az oxidatív stressz során ez a két izoforma aktiválódik. A II-es típusú, főként citokinek által indukált NOS későbbi gyulladásos válaszokban játszik szerepet. A káros hatásai mellett, az endotél sejtekben képződött nitrogén-monoxid vazodilatátor hatásával (Wei és mtsai. 1985) a keringés javításához is hozzájárul (Kontos 2001).

A szabadgyökök által aktivált extracelluláris lebontó enzimek (főként a mátrix metalloproteinázok, MMP) nagyban hozzájárulnak a vér-agy-gát sérüléséhez. Az aktiválódott MMP-9 degradálja a bazális laminát, mely során sérül az ér integritása (Kelly és mtsai. 2008). Az ischaemia során a vér-agy-gáton átjuthatnak különböző alakos elemek, illetve nagy molekulák, melyeket a víz passzívan követ, ezáltal vazogén ödémát létrehozva. Az ödéma során megnőtt intrakraniális nyomás, illetve a vér szövetbe jutása is okozhat másodlagos sérülést (del Zoppo és Hallenbeck 2000).

Ischaemia alatt, főként a szabadgyökképződés aktiválja a mikroglia és asztrocita sejteket, amely során beindulnak a post-ischaemiás gyulladásos folyamatok (Danton és Dietrich 2003). Az aktivált asztrociták számos gyulladásos faktort szekretálnak (citokineket, kemokineket),

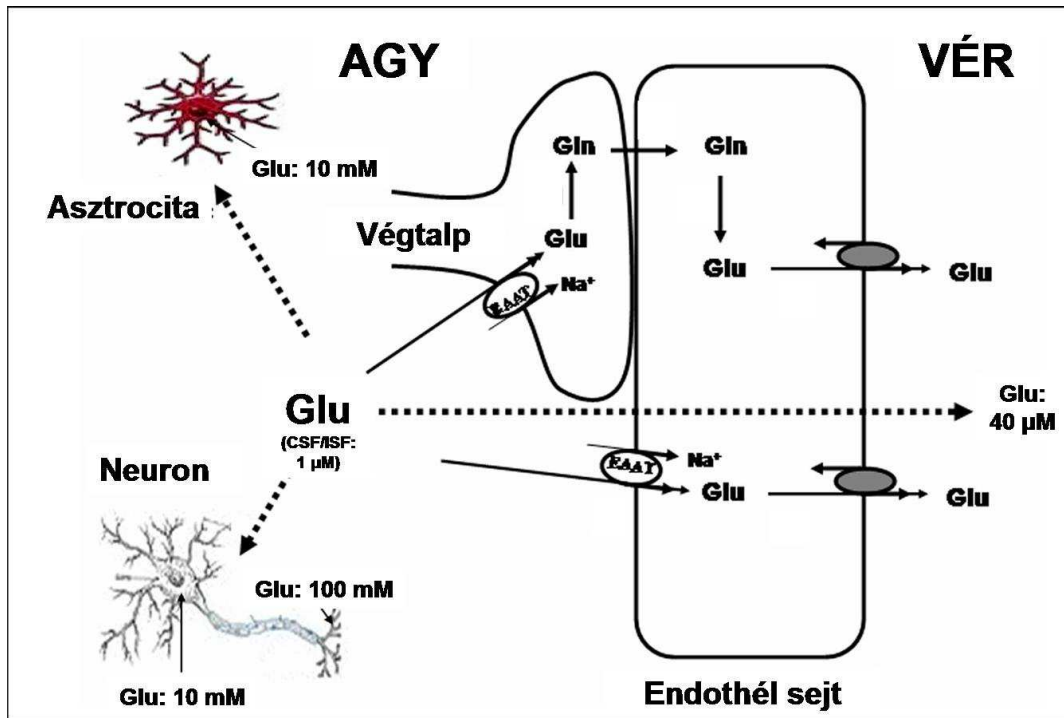
ezzel együtt részt vesznek az anti-inflammatórikus válaszokban is. A mikroglia (agyi makrofágok) főszereplők a központi idegrendszer immunreakcióiban. A mikroglia aktiváció során eltűnnek a másodlagos és harmadlagos nyúlványok és megjelenik a fagocita aktivitás. A későbbi folyamatok során, 4-6 órával az ischaemia kezdete után neutrofil granulociták, napokkal később pedig monociták tapadnak ki az érfalhoz, majd jutnak be az agyszövetbe (Morioka és mtsai. 1993; Wang és mtsai. 2007).

3.4 Glutamát scavenging

Napjainkban az ischaemiás károsodások csökkentéséhez, mérsékléséhez számos ígéretes új neuroprotektív eljárás létezik, melyek jelenleg is intenzív vizsgálatok alatt állnak (Lai és mtsai. 2014). Ezek közül az egyik kiemelkedő módszer a Glu scavenging, mely segítségével, az agyi ischaemia során felhalmozódott excitotoxikus Glu szint csökkenthető. A folyamat pontosabb megértéséhez fontos az agyi Glu homeosztázis ismerete.

3.4.1 Agyi glutamát homeosztázis

A Glu az egyik legfontosabb serkentő neurotranszmitter az agyban, ám emelkedett szintje neurotoxikus (Zauner és mtsai. 1996). Így az agyi glutamát homeosztázis rendkívül szigorú szabályzás alatt áll. Igen nagy koncentráció-különbségek vannak a különböző kompartmentekben, ami jól jelzi a hatékony transzport és pumpaműködést. A sejten belül a Glu koncentráció 10 mM, az extracelluláris térben 1-10 μ M. A szinaptikus vezikulák (100 mM) ürülése során a szinaptikus résben mintegy ezerszeresére nő a Glu szint. A glutamát a felszabadulása után pillanatok alatt visszavételre kerül főként a szinapszist körülvevő asztrocita végtalpakon keresztül. A Glu eltávolításban Na^{2+} -függő serkentő aminosav transzporterek vesznek részt (Excitatory Amino Acid Transporter, EAAT) (Danbolt 2001), melyek megtalálhatók az asztrocitákon, neuronokon és az endothél sejtek abluminális oldalán is (Teichberg és mtsai. 2009). Az asztrociták által felvett Glu-t a glutamin szintetáz átalakítja glutaminná, majd a glutamin a neutrális aminosav transzportereken keresztül is átjuthat az endothél sejtekbe, ahol transzamináció után (Glu transzamináz) ismét Glu lesz. Így a Glu közvetett úton is eljut az endothél sejtekbe. A Glu valószínűleg az endothél sejtek lumenális oldalán lévő facilitatív karriereken keresztül, passzívan kijuthat a vérbe. A vér Glu koncentrációja magasabb (40-60 μ M) (Graham és mtsai. 1995), mint az intersticiális térben, így az agyi Glu csak kis mennyiségben kerül ki a keringésbe (5. ábra).

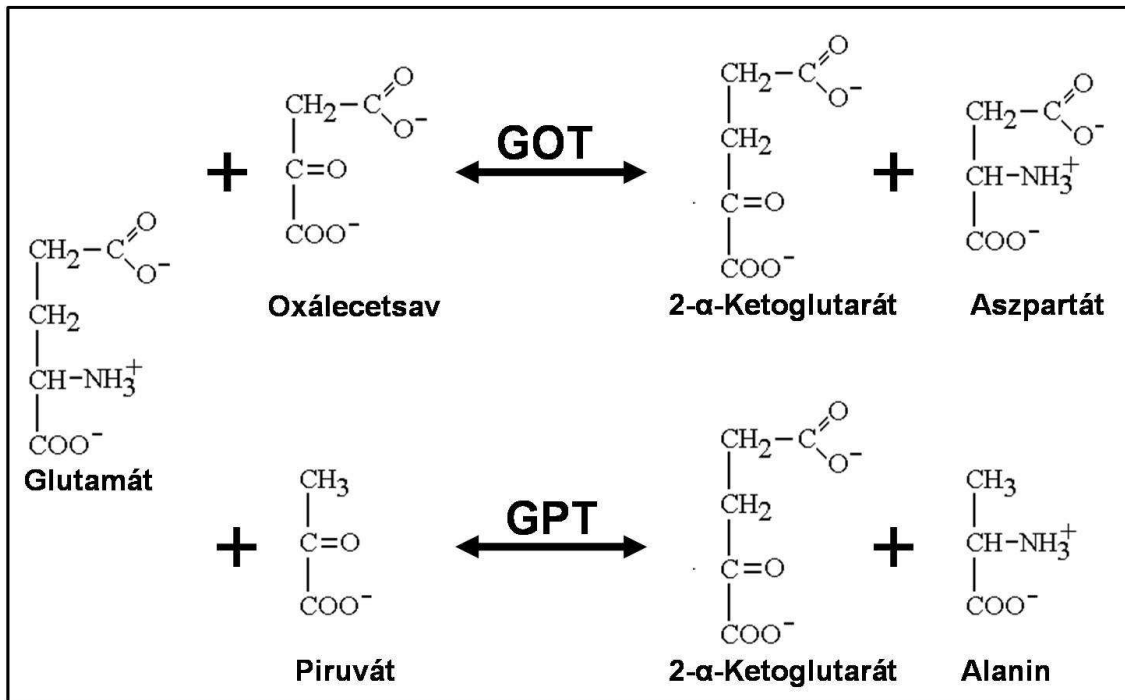


5. ábra Agyi glutamát (Glu) homeosztázis. Glu szintje a különböző kompartmentekben, folyadékterekben, valamint a lehetséges visszavételi útvonalak az intersticiális térből (szaggatott nyilak). A neuronok és asztrociták mellett az endothél sejtek is közvetlenül fel tudják venni a Glu-t, az abluminális oldalon található EAAT-k segítségével. Az agyi kapillárisok falát alkotó sejt a neutrális aminosavtranszporterekén keresztül glutamin (Gln) intermediéerként is felveszi a Glu-t, mely az endothél sejten keresztül kijut a keringésbe. (Teichberg és mtsai. 2009 nyomán módosítva)

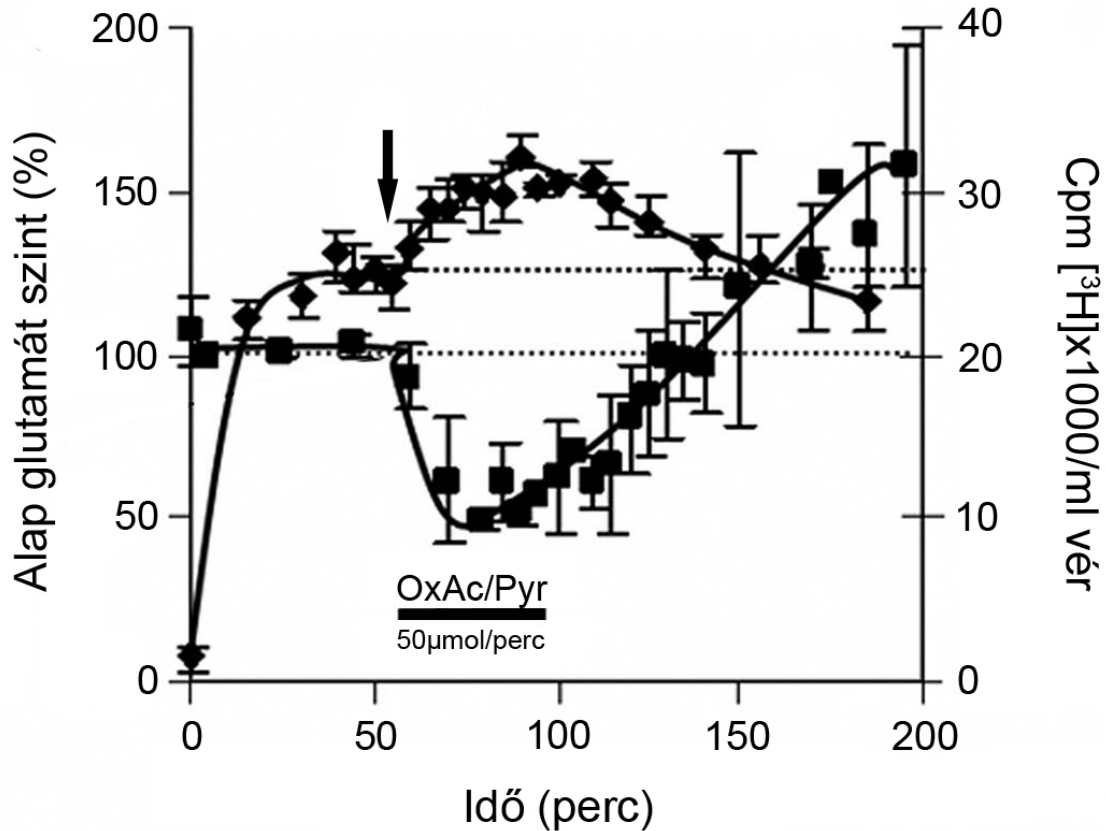
3.4.2 Glu scavenging

Különböző agyi patológiás folyamatok, valamint az agyi ischaemia során jelentősen, akár több százszorosára (~100-200 μM) is megnő az extracelluláris tér Glu koncentrációja (Stoffel és mtsai. 2002). Ennek hatására a Glu gradiens megváltozik az agyi IST és a vér között, így a Glu bejut a keringésbe, növelve koncentrációját a vérben (~300 μM) (Campos és mtsai. 2012). A Glu-scavenging során vér Glu szintjének csökkentésével fokozható az agyból vérbe történő Glu elmozdulás (Gottlieb és mtsai. 2003). A vér Glu homeosztázisában főként két, vérben lévő enzim vesz részt. Egyik a Glu-Oxálecetsav-Transzamináz (GOT), másik a Glu-Piruvát-Transzamináz (GPT). Ezen enzimek egyensúlyi reakciók során a Glu-ot oxálecetsav (OxAc), vagy piruvát kosubsztrát jelenlétében alakítják aszpartáttá (Asp) és 2- α -ketoglutaráttá (AKG) (6. ábra). Az OxAc, és/vagy piruvát (Pyr) intravénás adminisztrációjával (akár az enzimekkel együtt), a vér glutamát koncentrációja

lecsökkenthető, ezzel megerősítve az agyból a vér irányába zajló Glu-effluxot (Boyko és mtsai. 2012a; Boyko és mtsai. 2012b; Zlotnik és mtsai. 2007) (7. ábra).



6. ábra A glutamát-oxálecetsav-transzamináz (GOT) és a glutamát-piruvát-transzamináz (GPT) katalizálta enzimreakciók. A GOT egy α -amino csoport áthelyezésével alakít Glu- és OxAc-ból aszpartátot és 2- α -ketoglutarátot egy reverezibilis reakció során. A GPT reakciója során a piruvát traszaminációja során alanin jön létre. (KL saját ábrája)

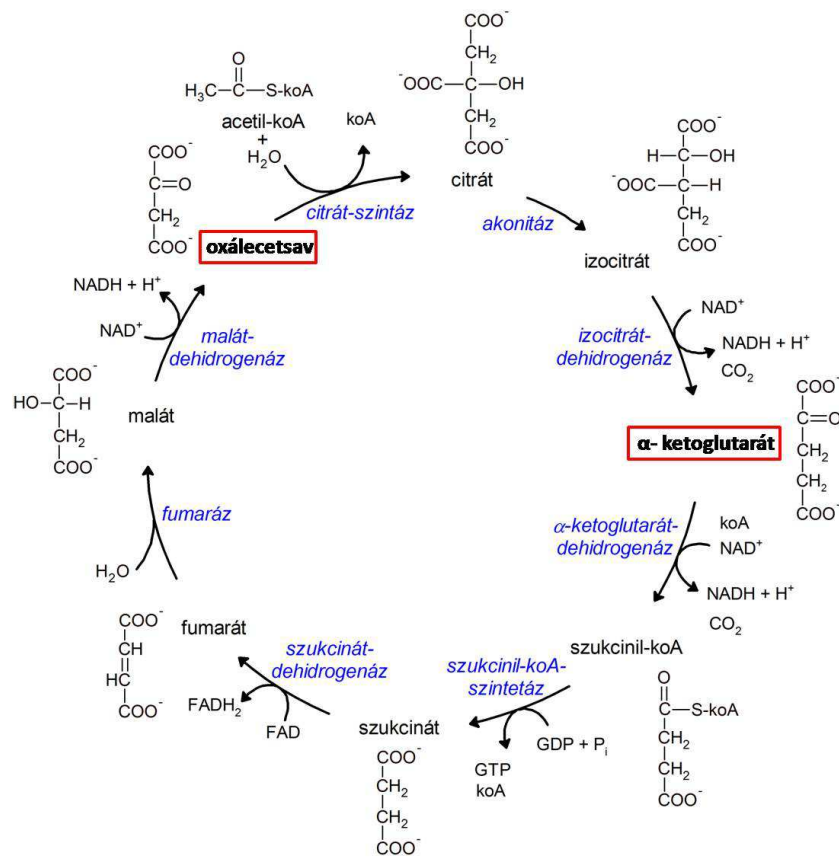


7. ábra A vér Glu szintjének és radioaktivitásának változása Glu scavengerek (OxAc, Pyr) alkalmazásakor *in vivo* patkány modellen. A laterális agykamrába injektált radioaktív (tríciált) Glu megjelent a vérben, ahol 50 perc elteltével egy adott szinten stabilizálódott az aktivitás (cpm, count per minute). A 40 perces kezelés során a vér Glu szintje (■) azonnal lecsökkent és a kontroll szint alatt maradt mintegy 90-100 percig. Ezzel együtt a scavengerek alkalmazásakor (a beadás kezdetét nyíl jelöli) megnőtt a vér aktivitása (◆). (Gottlieb és mtsai. 2003 nyomán módosítva)

A Glu-scavengerek (OxAc, GOT, piruvát, GPT) alkalmazása számos kísérletben bizonyult neuroprotektívnek. Az OxAc alkalmazásával a hippocampus CA1-es régiójában kiváltott LTP-t közel kontroll szintre lehetett visszahozni a globális ischaemiát követően (Marosi és mtsai. 2009). Fokális fototrombotikus léziót követő OxAc-kezelés csökkentette az infarktus területét, és helyreállította a kiváltott potenciálok csökkent amplitúdóit (Nagy és mtsai. 2009). Az OxAc és a piruvát jótékony hatása igazolható volt MCAO modellen is, ahol csökkent az infarktus kiterjedése, az ödéma mérete és a szenzomotoros deficit is (Boyko és mtsai. 2011; Campos és mtsai. 2011a). A SAH modellnél alkalmazott OxAc és piruvát csökkentette az agy-gerincvelői folyadék (Cerebrospinal Fluid, CSF) és a vér Glu szintjét, majd 24 órával később javult a vér-agy-gát funkció és lecsökkent az ödémás terület (Boyko és mtsai. 2012a).

3.5 Az OxAc biológiai szerepéről

Az OxAc, a szervezetben általánosan előforduló 4 szénatomos dikarbonsav, mely számos metabolikus folyamatban vesz részt. α -ketosavként az antioxidáns védelem része, mely során nem enzimatis dekarboxiláció útján alakít H_2O_2 -ból szén-dioxidot és vizet ($\text{R-CO COOH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{R-COOH} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$). Gerinceseknél az OxAc fontos köztitermék a glükoneogenezisben, a Szent-Györgyi–Krebs ciklusban, az urea ciklusban, az aminosav anyagcserében, valamint anaplerotikus reakciókban. A citrát kör során a malát dehidrogenáz enzim L-malátból és NAD^+ -ból alakít OxAc-ot (NADH és H^+ mellett), ami a citrát szintáz katalizálta reakció során acetyl-CoA jelenlétében alakul citráttá (8. ábra). Az OxAc elengedhetetlen résztvevője a ciklusnak, és ebből kifolyólag fontos az elektrontranszportlánc során bekövetkező ATP szintézishez. Az urea ciklusban és az aminosav metabolizmusban az OxAc transzamináció során keletkezik, melyet az intracelluláris GOT enzim katalizál.



8. ábra Szent-Györgyi–Krebs ciklus. Ez a ciklus minden élő sejtben megtalálható, alapvető anyagcsere-folyamat, mely során 2 C atom CO_2 -dá oxidálódik, miközben az energia különböző molekulákban reaktározódik (GTP, NADH, FADH_2). Az így tárolt energia segítségével szintetizálódik az ATP a terminális oxidáció során. Az ábrán a nyilak mellett található az adott reakciót katalizáló enzim neve. (forrás: Wikipédia alapján módosítva)

Szerteágazó metabolikus tulajdonságainak köszönhetően az OxAc kezelést több modellen is vizsgálták. A táptalajhoz kevert OxAc megnövelte a *Caenorhabditis elegans* élethosszát (Williams és mtsai. 2009). Az OxAc (és több α -ketosav is, pl.: piruvát, AKG) nagymértékben növelte a sejtek túlélését neuronális sejt tenyészetben H_2O_2 okozta (Desagher és mtsai. 1997), valamint a lipidperoxidációkor létrejövő tiobarbiturát reaktív rendszerhez köthető stressz során (Puntel és mtsai. 2005). A neurotoxikus kainát által kiváltott agyi epileptiform aktivitás és következményes mitokondriális DNS sérülés csökkenthető volt AKG és OxAc kezeléssel *in vivo* és *in vitro* körülmények között is (Yamamoto és Mohanan 2003).

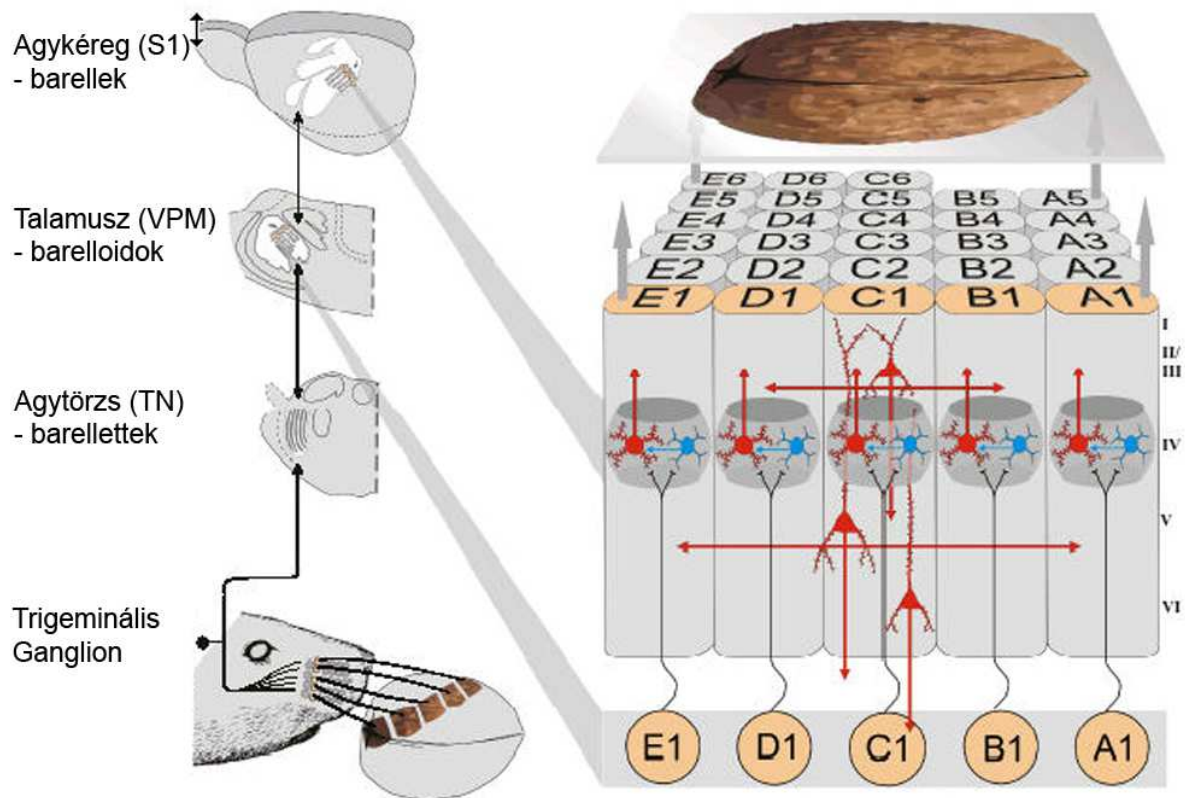
3. 6 A bajusszőr-érzékelés anatómiai és funkcionális hátterének áttekintése

Kísérleteim során az agyi ischaemia következményeit és a különböző neuroprotektív beavatkozások hatását a patkány szomatoszenzoros rendszerén is vizsgáltam. Indokoltnak tűnik ezen rendszer szerveződésének és működésének rövid áttekintése.

A föld alatt élő rágcsálóknál a legfőbb érzékelés a bajusszőr rendszerhez köthető. A bajusszőrök (vibrissza, whisker) elmozdulását és mozdítását egy rendkívül érzékeny és komplex rendszer dolgozza fel és irányítja, mely magasfokú szerveződést és rendezettséget mutat. Emiatt ez a rendszer a primáta, illetve macska látórendszere mellett az egyik elsőszámú modell a szenzoros érzékelés vizsgálatához (Brecht 2007; Kanold és Luhmann 2010).

A bajusszőrök elmozdulását érzékelik a primer afferensekhez tartozó különböző érzékelőreceptorok, ilyen a Merkel korong, valamint a lándzsás- (lanceolate) és körkörös idegvégződések (Ebara és mtsai. 2002). Az inger a trigeminális ganglionban (TG, Gasser dúc) lévő pszeudounipoláris sejt perifériás, majd centrális axonján jut el az agytörzsbe. Agytörzsi trigeminális magcsoportot (TN) a nucleus principalis (PrV), valamint a 3 spinális mag (oralis, interpolaris, caudalis) alkotja. A magokban hisztológiailag különböző területeket különíthetünk el, ezek az úgynevezett barrelettek, melyek a bajusszőrtüszők térbeli elhelyezkedésének megfelelő szomatotópiát mutatják. Ezekben a magokban lévő sejtek kapcsolatban vannak egy-, illetve több vibrisszával (mono-, és multi-whisker sejtek). A vibrisszából jövő jel első feldolgozása itt történik. A magok közötti kapcsolatrendszer rendkívül szerteágazó (Jacquin és mtsai. 1990), egymás között leginkább GABAerg gátló projekciók vannak (Furuta és mtsai. 2008), de a magok feed-forward és feed-back kapcsolatban vannak a felszállópálya magasabb szintjeivel is, mint a primer szomatoszenzoros kéreg, illetve a primer motoros kéreg (Furuta és mtsai. 2010). Az agytörzsi magokból az információ –eddig ismereteink szerint- 4 különböző felszálló pályán halad

tovább a thalamuszba. Két lemniszkális, és az extralemniszkális útvonal a nukleusz ventrális poszteromediálisba (VPM), míg a paralemniszkális pálya a poszterior nukleusz középső részéhez (POm) fut. Az utóbbi primer szomatoszenzoros magok kapcsolatban állnak motoros és szenzoros kérgi területekkel. A VPM-ben is megfigyelhető a szomatotópiás rend. Itt az adott vibrissához tartozó területet barreloid-nak nevezzük. A VPM-ből, az információ eljut a primer szomatoszenzoros kéreg (S1) barelljeibe, illetve szeptális területeire. Ehhez a neuraxishoz és főként a kérgi barrelekhez köthető az adott vibrissából jövő információ feldolgozás (9. ábra). A hengeres struktúra kiterjed mind a 6 kérgi rétegre, de az elhatárolást kialakító celluláris részek (dendritek, VPM afferensek) főként a 4. rétegben figyelhetők meg. Az S1 funkcionális kapcsolatrendszere összetett, a különböző mikrohálózatok réteg szerint elkülönült projekciókkal rendelkeznek (Helmstaedter és mtsai. 2007). Az S1 esetén a talamortikális (serkentő) projekciók főleg a 4. rétegbe lévő tüskés sejtekre, valamint a 2/3 és az 5B rétegi piramissejtekre érkeznek (Feldmeyer és mtsai. 2013). A barrelhez kötött integratív funkciók még nem tisztázottak teljesen, valamint a rendszerhez köthető kognitív folyamatok asszociatív feldolgozása sem ismert részleteiben.

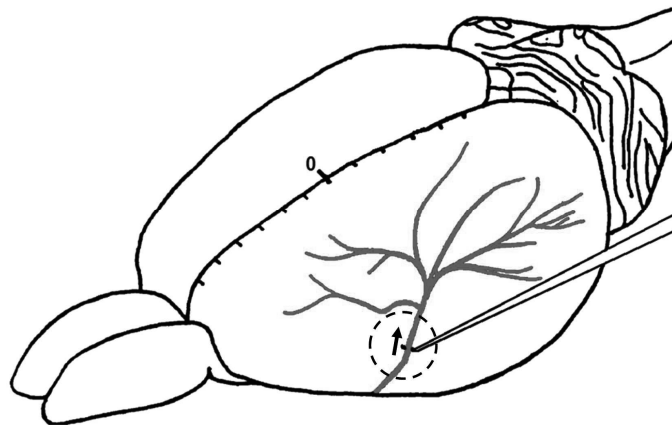


9. ábra A patkány bajusszőr érzékeléséhez köthető felszálló pálya sematikus ábrázolása. A bajusszőrök elmozdulását érzékelő pseudounipoláris neuronok sejttestje a trigeminális ganglionban (Gasser dúc) található. Az ingerület ezen sejtek perifériás, majd centrális axonján keresztül jut a KIR-be, közvetlenül az agytörzsi trigeminális magokhoz. A különböző idegi struktúrákban megfigyelhető, az 1 bajusszőrtől jövő információk feldolgozását végző sejtek funkcionális csoportokat alkotnak, melyek elhelyezkedése a bajusszőrök elrendeződési mintáját követi (szomatotópia). Az csoportokat agytörzsi magoknál baretteknek, a thalamuszban barelloidoknak, az agykéregben barelleknek nevezzük. Az ábrán látható a thalamuszból felszálló projekció, mely különböző kérgi serkentő (piros) és gátló sejtekhez fut. Amellett, hogy a barellek különálló funkcionális egységek, intenzív kapcsolatban állnak a szomszédos területekkel. (Dirk Schubert és Jochen Staiger alapján módosítva)

4. Célkitűzések

Célkitűzés 1 - Fokális ischaemia modell kialakítása és vizagálata

Doktori munkám során elsőként célul tűztük ki egy saját ötleten alapuló új fokális ischaemiás modell kialakítását és vizsgálatát. A célkitűzés szerint egy kitüntetett agyi eret (MCA) a felszíntől elemelve okozhatunk átmeneti perfúzió csökkenést. A műtéti és technikai eljárások megvalósítása után, modellünk jellemzéséhez többféle módszerrel kívántuk vizsgálni a különböző hosszúságú ischaemiás periódusok hatását.



10. ábra Az ér megemelésével kiváltott MCAO sematikus ábrázolása. 0 jelöli a Bregma pontját, és szaggatott kör jelöli a megnyitni kívánt koponyaszakaszt. (KL saját ábrája)

A kísérletek során vizsgáltuk, hogy

- jelentkezik-e az ér emelésekor fellépő közvetlen fizikai behatás során makroszkópos szöveti, illetve érsérülés?
- a módszerrel létrehozhatunk-e több, rövidebb idejű, repetitív ischaemiás periódust?
- az ischaemia okozta változások detektálhatók-e valós időben különböző elektrofiziológiai módszerekkel?
- a létrehozott agyi ischaemia hatása vizsgálható-e különböző hisztológiai módszerekkel? Ha igen, ezekhez milyen túlélési idő szükséges?
- a már karakterizált modellünkön vizsgálható-e neuromodulátoros, neuroprotektív farmakonok hatása? Értekezésemben azokat a kísérleteket részletezem, melyben -a laborunk által korábban már alkalmazott- OxAc hatását tanulmányoztuk.

Célkitűzés 2 - Az OxAc hatásának vizsgálata *in vitro* körülmények között

Glu scavenger hatása mellett – általános anyagcsere intermedierként – többféle metabolikus folyamatban is részt vesz, így alkalmazása során többféle hatást is kifejthet. Kísérletsorozatunkban célul tűztük ki az OxAc non-scavenger hatásának vizsgálatát fizioiógias és ischaemiás körülmények között *in vitro* kísérleti elrendezésben.

A kísérletek során alábbi felvetésekre akartunk választ kapni:

- az OxAc különböző koncentrációkban alkalmazva megváltoztatja-e a kiváltott idegi aktivitást (hippocampális fEPSP)?
- az OxAc globális ischaemiás körülmények között kifejti-e neuroprotektív hatást, mely nem köthető a Glu scavenger tulajdonságaihoz?

Célkitűzés 3 - Az OxAc hatásának tanulmányozása intakt állaton

Kísérleteink során célul tűztük ki az OxAc hatásának vizsgálatát a szomatoszenzoros kérgi kiváltott potenciálokra intakt állatokon fizioiógias körülmények között.

A mérésorozatban a következő kérdésekre akartunk választ kapni:

- megváltoztatja-e az OxAc a szomatoszenzoros kérgi kiváltott potenciálokat?
- ha változást tapasztalunk, akkor mi az OxAc legkisebb hatékony dózisa?
- a tapasztalt hatás közvetlen összefüggésben van-e az OxAc hatására lecsökkenő vér glutamát szintjével?

5. Anyagok és módszerek

5.1 Felhasznált állatok

Kísérleteinkhez 200-300 g tömegű hím Wistar patkányokat használtunk, amelyeket szabványos ketrecben, külön erre a célra kialakított állatházban tartottunk. Az állatok számára 12-12 órás világos illetve sötét periódus volt biztosítva 22 ± 1 °C-os hőmérséklet mellett. Az állatoknak korlátlan hozzáférése volt vízhez és táplálékhoz (CRLT/N rágcsálótáp).

Munkánk során minden esetben a Magyar Egészségügyi Bizottság által elfogadott állatgondozással kapcsolatos protokoll (1998), az Európai Közösségek Tanácsának 1986. november 24-i rendelete (86/609/EEC), valamint a laboratóriumi állatok gondozásával kapcsolatos alapelvek (NIH Publikáció No. 85-23) szerint jártunk el.

5.2 Ischaemiás modell kialakítása

Az állat altatásához intraperitoneális injektálással 65 mg/ttkg Na-pentobarbitál oldatot (Nembutal) adtuk be, majd az alvás mélységét fenntartó dózissal (40 mg/ttkg) biztosítottuk. Helyi érzéstelenítéshez 10 mg/ml lidocaine hydrchloride-oldatot használtunk. A megfelelő alvási állapot elérésekor az állatot sztereotaxiás készülékben rögzítettük. A fejbőrön függőleges bemetszést ejtettünk a bal oldali szem és külső fül között, majd a rágóizom tompa preparálása után a járomcsont felett láthatóvá vált a koponya temporális felszíne. Ezen a területen, fogászati fúró segítségével egy 2-3 mm átmérőjű szakaszt tártunk fel. Fúrás közben jéghideg fiziológias sóoldattal hűtöttük és tisztítottuk a koponyát. A csont eltávolítása után láthatóvá vált az MCA első felszíni elágazás előtti szakasza, ahol az ér átmérője mintegy 300 μm . Ezután megnyitottuk a kemény, majd a lágy agyhártyát, és mikromanipulátorok segítségével egy mikro-sebészeti kampót (microsurgery hook) helyeztünk óvatosan az ér alá. Az MCA elzárását az ér megemeléseivel váltottuk ki. Az agyfelszíntől való 1100-1200 μm -es távolságban az ér kifehéredett és a perfúzió lecsökkent. Az adott hosszúságú ischaemiás periódus után az érszakaszt visszaengedtük, és eltávolítottuk a hajlított végű eszközt. A perfúzió csökkenését és a véráramlás megindulását operáló mikroszkóp alatt ellenőriztük. A dMCAO-t követően visszahelyeztük a kemény agyhártyát, majd orvosi cérnával összevarrtuk a rágóizmot és a bőrt. A fertőződés elkerülése érdekében streptomycine-t és betadine-t használtunk.

A különböző kísérleti csoportoknál 2 x 15, 30, 45 és 60 perces ischaemiás periódusokat alkalmaztunk.

5.3 *In vivo* elektrofiziológiai vizsgálatok

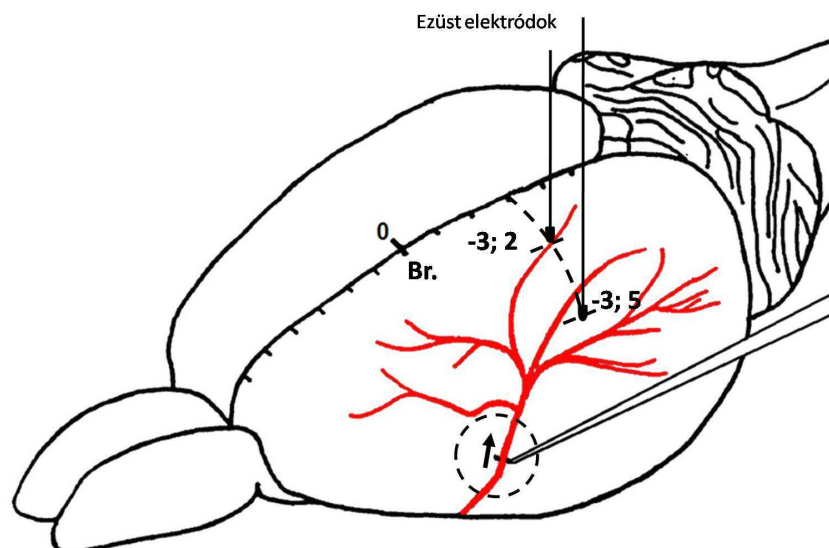
5.3.1 EEG elvezetés

A fokális ischaemiás modell vizsgálata során végeztünk EEG-elvezetéseket. Az altatott állat megtisztított koponyafelszínéről (Br -3 mm, antero-laterálisan 2mm) gömbfejű ezüst elektródával elektroencefalogramot (EEG) regisztráltunk (mintavételi frekvencia: 1024 Hz, erősítés 1000x; Experimetria NeuroSys szoftver, Experimetria Ltd. Hungary). Az EEG teljesítmény spektrum analízist a MATLAB programmal EEGLab toolbox segítségével végeztük (Delorme és Makeig 2004). Az elvezetett jeleket 2-20 Hz-es frekvencia tartományra szűrtük, a további elemzést ebben a tartományban végeztük.

5.3.2 Szomatoszenzoros kérgi kiváltott potenciálok (SEP) elvezetése

A fokális ischaemiás kísérletek esetén az altatószer Nembutal volt, míg a többi *in vivo* mérésnél a hosszú idejű elvezetés miatt stabil, irreverzibilis alvást biztosító uretánt alkalmaztunk. Helyi érzéstelenítést ezen kísérleteknél is 10 mg/ml lidocaine hydrochloride-oldattal biztosítottuk. A megfelelő altatás és érzéstelenítés után tracheakanült helyeztünk az állat légcsövébe. A procedúra során hosszanti vágást ejtettünk a nyaki tájékon, majd a nyálmirigyek és a légcső izmainak tompa preparálását követően egy apró bemetszéssel keresztül vezettük be, és rögzítettük a tracheakanült. A különböző anyagok intravénás beadásához steril injekciós tűt helyeztünk az egyik laterális farokvénába.

Ezután az állatot rögzítettük a sztereotaxiás készülékbe, eltávolítottuk a fejbőrt, és megtisztítottuk a baloldali parietális koponyaszakaszt. A Bregmától (a sutura sagitalis és a sutura coronalis találkozási pontja) 3mm-re caudálisan, 5mm-re antero-laterálisan kijelöltük az elvezetés helyét (itt várható a punctum maximum, azaz a szenzoros kérgen lévő azon aktivált terület, ahol legnagyobb a kiváltott potenciálok amplitúdója). Sztereomikroszkóp alatt, fogászati fúró segítségével távolítottuk el a koponyacsontot az adott területen, vigyázva, hogy a kemény agyhártya (dura mater) ne sérüljön.



11. ábra Az *in vivo* kísérleti elrendezés sematikus ábrázolása. Az EEG elvezetéshez használt koordináták: Br. -3; 2. A SEP estében a Br. -3; 5-ös koordinátáról vezetünk, legtöbbször ebben a pontban volt a legnagyobb az amplitúdó (punctum maximum). Mindkét elvezetési pont az MCA által ellátott területen helyezkedik el. (KL saját ábrája)

Az előkészítő műtét után 25-30 percet pihentettük az állatot, majd ismét rögzítettük a befogóban. Az ingerlő elektródákat (bipoláris tüelektródák) a jobb oldali bajuszpárnán, a C4-es és a D4-es bajuszszőr follikulusába szúrtuk. A bajuszszőrök 5 sorban helyezkednek el. A számok az egyes sorokban lévő follikulusokat jelölik az állat fültövétől rostrálisan. Az ingerlést 0,1 Hz-s frekvenciájú, 0,2 ms-os jelszélességű és 3,4-4V-os amplitúdójú négyszög árammal hajtottuk végre (Experimetria, EXP-ST 01). Az ingerlés elindítása után további fél órát vártunk, hogy az állat agyi aktivitása stabilizálódjon. A gömbfejű ezüst elvezető elektródot óvatosan a kéregre helyeztük, és megkerestük azt a helyet, ahol legnagyobb a jel amplitúdója (punctum maximum). Az amplitúdókat a negatív (N1) és a pozitív (P1) csúcs között (peak to peak) regisztráltuk (14. ábra). Az elvezetés során (Experimetria, Intrasy software) felül- és aluláteresztő szűrőket használtunk, 1000-szeres erősítés (TEKTRONIX) és 1024 Hz-es mintavételezési frekvencia mellett.

A mérések során minden kísérlet esetében 30 perc kontroll szakaszt vettünk fel, majd az ischaemiás periódust, illetve az adott anyag beadását követően folytattuk a regisztrálást.

Alkalmazott anyagok: A beadott oldatok végtérfogata 1 ml volt, semleges pH mellett ($7,41 \pm 0,05$). A beadáshoz mikroinjekciós pumpát használtunk (CTA 1000), az injektálás

sebessége 66,7 $\mu\text{l}/\text{perc}$ (15 $\text{perc}/1\text{ ml}$) illetve 33,3 $\mu\text{l}/\text{perc}$ volt (30 $\text{perc}/1\text{ ml}$) volt. A különböző *in vivo* kísérletsorozatokban alkalmazott anyagok és dózisek az alábbiak voltak:

1, OxAc hatása az ischaemiás modellen:

- Fiziológiás sóoldat
- Oxálecetsav, 3,5 mg/100 g

2, OxAc dózishatása intakt állaton

- Fiziológiás sóoldat
- Oxálecetsav, 1,25 mg/100 g
- Oxálecetsav, 2,5 mg/100 g
- Oxálecetsav, 5 mg/100 g

3, OxAc + KG hatása intakt állaton

- Fiziológiás sóoldat
- Oxálecetsav, 3,5 mg/100 g
- 2- α -Ketoglutarát, 3,87 mg/100 g
- Oxálecetsav, 3,5 mg/50 g + 2- α -Ketoglutarát: 3,87 mg/50 g

5.4 *In vitro* ischaemia és elektrofiziológia

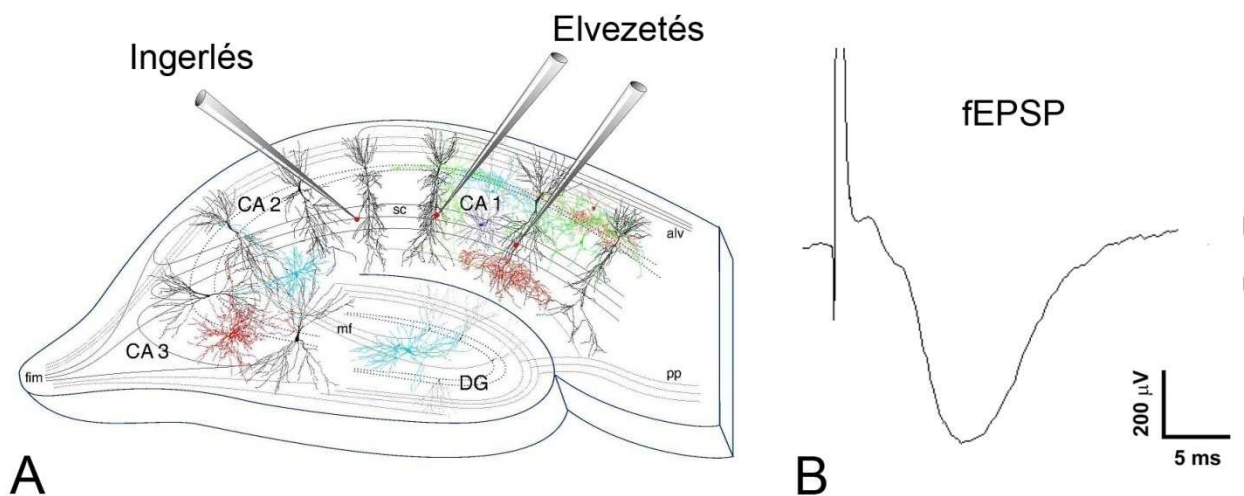
5.4.1 Túlélő agyszelet preparátum készítése

A patkányokat i.p. uretán (1.3 g/ttk) injekcióval elaltattuk. A kívánt mélységű alvás elérése után az állatokat dekapitáltuk, és a sutura saggitalis és coronalis mentén megnyitottuk a koponyát. Szike segítségével koronális síkban kimetszettük a hippocampust tartalmazó régiót, majd ezt követően jéghideg (1-4 °C), oxigenáltatott, alacsony Ca^{2+} tartalmú mesterséges agygerincvelői folyadékban (artificial CerebroSpinal Fluid, aCSF) 350 μm vastag szeleteket készítettünk a vibratóm segítségével (Leica VT1200S). A metsző aCSF összetevői mM-ban megadva: 130 NaCl; 3,5 KCl; 1 NaH_2PO_4 ; 24 NaHCO_3 ; 1 CaCl_2 ; 3 MgSO_4 és 10 D-glükóz, melyet karbogénnel (95% O_2 , 5% CO_2) telítettünk a szeletek zavartalan oxigén-ellátása érdekében. Az agyszeleteket egy óráig inkubáltuk ACSF-ben 30 °C-on, ezt követően 17 ± 2 °C-on tartottuk a mérés megkezdéséig. Az inkubáláshoz illetve regisztráláshoz természetesen

oxigenált normál aCSF oldatot használunk, melyben a CaCl_2 és MgSO_4 koncentrációja 3, illetve 1,5 mM.

5.4.2 fEPSP regisztrálása

Az elektrofiziológiai méréseket Haas típusú interface regisztráló kamrában végeztük. Ennél az elrendezésnél a szeletek az átfolyó aCSF, valamint a fölötté kialakuló oxigéndús párás közeg határán helyezkednek el. Kísérleteinkben az *in vitro* ischaemia, valamint az alkalmazott anyagok hatását kiváltott, serkentő posztszinaptikus mezőpotenciálok (Excitatory PostSynaptic Potential, fEPSP) segítségével vizsgáltuk a hippocampusz CA1-es régiójában. Méréseinket szobahőmérsékleten végeztük, az aCSF perfúziójának sebessége 2,5-3 ml/perc volt. Az ingerlést bipoláris koncentrikus fémelektrodával végeztük állandó áramerősség mellett, mely során stimuláltuk (frekvencia: 0,05 Hz; jelszélesség: 300 μs) a stratum radiatum rétegében futó Schaffer-kollaterálisokat a CA2/CA1-es régió területén. Az elvezetésnél 2 darab 1,5-2 m Ω ellenállású üvegapillárist szúrtunk a CA1 es régió stratum radiatum rétegébe (itt találhatóak a piramissejtek apikális dendritjei), ahonnan elvezettük a kiváltott mezőpotenciálokat (12/A. ábra).



12. ábra Az *in vitro* mérések kísérleti elrendezése a koronális hippocampális agyszeleten (A). (<http://www.stanford.edu/group/maciverlab/hippocampal.html> nyomán módosítva)

Reprezentatív kép egy regisztrált fEPSP-ről (B). (KL saját felvétele)

A mérések első lépéseként meghatároztuk a szükséges ingerlési áramerősséget (az fEPSP maximális amplitúdójának 60-70%-a (általában 40-60 μA)). A kísérletekben elsősorban a

fEPSP-k (12./B ábra) amplitúdóját, valamint meredekségét (slope) vizsgáltuk. A mérések során 10 perc kontroll periódus felvétele után 50 percig regisztráltunk.

5.4.3 OGD kialakítása, alkalmazott anyagok

Az *in vitro* ischaemiás állapotot az oxigén, glükóz deprivációs modell (OGD) segítségével idéztük elő. Az OGD alatt az oxigén helyett nitrogént, valamint szacharóz alapú nitrogénált aCSF-es használunk, mely modellezi az agyi ischaemia alatt fenn álló hipoxiás és hipoglikémiás állapotot. Méréseinknél - előzetes kísérletek alapján meghatározott- 15 perc hosszúságú OGD-t alkalmaztunk. A vizsgálatok során az OxAc-ot az aCSF-ben, illetve az OGD oldatban (nitrogénált, glükózmentes aCSF) feloldva alkalmaztuk. A kísérletek alatt felhasznált oldatokat minden esetben 7.3-7.4-es pH-ra állítottuk be. A kísérleti csoportokat a következőképp határoztuk meg:

- Kontroll: 60 perc követés
- OxAc: 10 perc kontroll, 50 perc OxAc (1 mM; 0,1 mM) rámosás
- OGD: 10 perc kontroll, 15 perc OGD, 35 perc követés
- OGD-OxAc: 10 perc kontroll, 15 perc OGD + OxAc (1 mM; 0,1 mM) rámosás, 35 perc követés

5.5 Szövettani vizsgálatok

5.5.1 TTC festés

A 2 x 15 perces dMCAO-t követően 1 nap túlélési idő után az állatokat altatott állapotban dekapitáltuk, majd az agyat kivéve, vibratóm (Campden Instruments, Egyesült Királyság) segítségével 500 µm vastagságú koronális szeleteket készítettünk. A metszést jéghideg mesterséges cerebrospinális (artificial cerebrospinal fluid, aCSF) folyadékban végeztük. A szeleteket szobahőmérsékleten, 15 percig 1%-os TTC (2, 3, 5-trifeniltetrazolium klorid) oldatban inkubáltuk. A digitális képek elkészítéséhez nagy felbontású scannert (Mustek BearPaw 2448CU Pro II) használunk. A TTC egy szintelen alternatív elektronakceptor molekula, mely sejttanyagcsere működéshez szükséges dehidrogenáz enzim-aktivitás következtében redukálódik vörös színű formazánná.

5.5.2 Fluoro Jade C festés

A dMCAO-t követően 1 nap - a 30 perces ischaemiás csoport esetében 5 nap - túlélési idő után vizsgáltuk a Fluoro Jade C jelölődést. Az állatokat uretánnal altattuk, aztán a mellkast felnyitva jéghideg foszfát pufferrel (PB), majd 4%-os paraformaldehiddel transzkardiálisan perfundáltuk. Az agyat eltávolítottuk, majd egy napon keresztül utófixáltuk. Vibratóm (Leica VT1200S) segítségével 20 µm-es koronális szeleteket készítettünk, melyeket 2%-os zselatinózott tárgylemezre húztunk fel. A metszeteket szárítás után, szobahőmérsékleten leszálló alkoholsorral rehidráltuk, 10 percig 0,06%-os kálium-permanganát oldatban, 20 percig 0,004%-os FJC festőoldatban inkubáltuk. Mosás és szárítás után a metszeteket xilol bázisú fedőanyaggal fedtük (Fluoromount-GTM SouthernBiotech, Serva).

5.5.3 Immunhisztokémia

A szabadon úszó szeleteket 0.1 M PB-ben mostuk, majd az endogén Fc receptorokat 10%-os normál szamar szérumban (NDS) blokkoltuk. Az antitesteket (S100, CD11b) 0,1 M PB, 2% NDS, 0,4% Tx100 és 0,01% Na-Azid tartalmú oldatban vettük fel. A metszeteket az elsődleges antitestben 4 °C-on 24 óráig, a megfelelő másodlagos antitestben (Jackson Immunoresearch) szobahőmérsékleten 2 óráig inkubáltuk. Mosást követően a szeleteket fent már említett módon rögzítettük a tárgylemezre.

5.5.4 Kvantitatív elemzés

A 2 x 15 perc dMCAO, valamint ebben a paradigmában tesztelt OxAc esetében számszerűsítettük a FJC jelölődés eredményét a szomatoszenzoros területen. Roszto-kaudális síkban 4 mm hosszan (Br. -2 mm-től -6 mm-ig) elemeztünk ki minden tizedik 20 µm-es szeletet (21./A ábra). A szeleteket fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus Bx51) vizsgáltuk. A sejtszámoláshoz minden szelet esetén az ipszilaterális féltekén két 500 µm oldalhosszúságú négyzetet jelöltünk ki a korpusz kallózum magasságában. A manuális sejtszámolást 3 személy párhuzamosan, „vakon” végezte.

5.6 Statisztikai analízis

Az ischaemiás modell vizsgálata során az EEG és a kiváltott potenciálok adatainak analízisét „General Linear Model\Repeated measures” modellben végeztük (PASW Statistics 18 data

analysis package, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). EEG esetén a teljesítmény spektrumot 1 Hz-es intervallumokra bontottuk fel (2-20 Hz). Az egyes frekvenciákhoz tartozó teljesítményt egyedi adatként kezeltük. A kiváltott potenciálok elemzéséhez a normalizált amplitúdó értékeket használtuk. Az oszlop- és vonaldiagrammokon az átlagot és a hozzá tartozó szórást tüntettük föl.

Az intakt állatokon végzett *in vivo* elvezetések, valamint az OxAc-kezelt és a kontroll ischaemiás csoport normalizált amplitúdóértékeit nem-parametrikus „Related-Samples Friedman’s Two-Way Analysis of Variance by Ranks” modellel hasonlítottuk össze (IBM SPSS Statistics version 20).

A FJC pozitív sejtek mennyiségi összehasonlításánál kevert lineáris modellt használtunk. Az analízis során a Poisson hibaeloszlást, az állatok random hatását és a kezelések fix hatását építettük be (IBM SPSS Statistics version 20). A vonaldiagrammokon az átlagot és a hozzá tartozó szórást ábrázoltuk, míg a box-diagrammokon az adatok mediánját, az interkvartilis tartományt és a szélső értékeket jelöltük.

Az *in vitro* kísérletek során elvezett fEPSPk normalizált amplitúdó- és slope-értékeinek statisztikai analíziséhez Mann-Whitney U-tesztet használtunk (IBM SPSS Statistics version 20). A vonaldiagrammokon az átlagot és a hozzá tartozó szórást tüntettük föl.

Minden esetben a $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) és a $P < 0,001$ (***) értéket tekintettük szignifikáns különbségnek.

6. Kísérletekben való részvétel

Az OGD-s mérések jelentős részét Kocsis Kitti, az EEG kiértékelését Németh Kornél és Dr. Gellért Levente végezte. Az *in vivo* ischaemiás kísérleteknél az 5 nap túlélési idejű csoportnál az immunhisztokémiai eljárásokat Herédi Judit és Dr. Gellért Levente végezte. Az *in vivo* anyaghatás vizsgálatokban részt vett Benkő Erzsébet is.

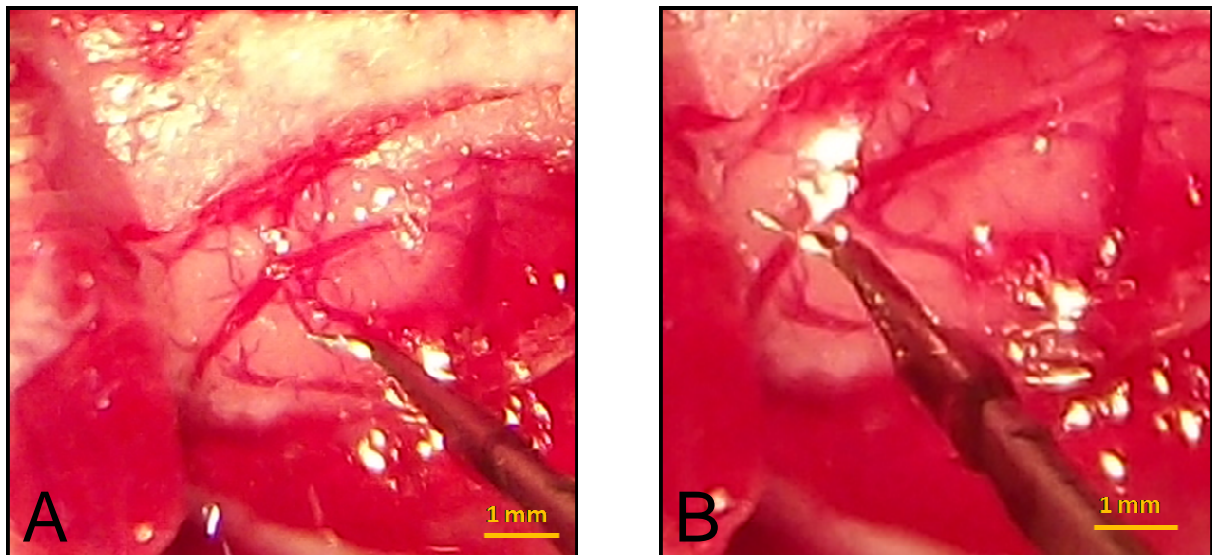
7 Eredmények

7.1 Fokális ischaemia modell kialakítása, vizsgálata

Az első kísérleti paradigmánkban 2 x 15 perces ischaemiás periódust alakítottunk ki, 30 perces köztes reperfúziós szakasszal. A kísérletek során teszteltük az ischaemiás modell kialakítása során fellépő makroszkópos sérüléseket, az ér emelésének, okklúziójának megismételhetőségét, és ennek az EEG-re, valamint a szomatoszenzoros kiváltott potenciálokra gyakorolt hatását.

7.1.1 Modell kialakítása

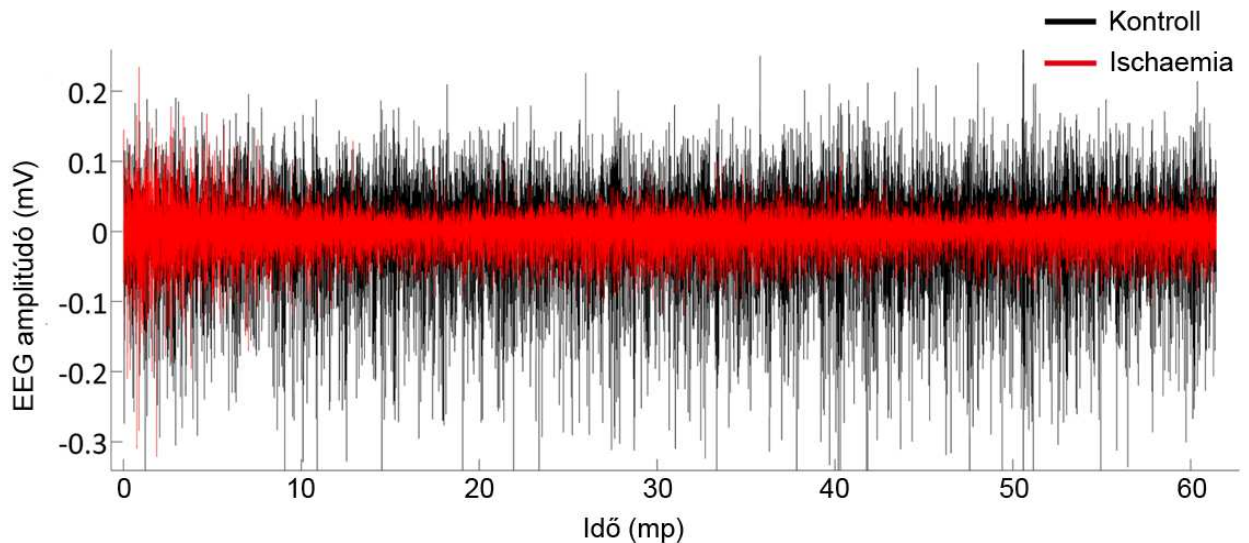
Az MCA feltárása után a mikrosebészeti kampó ér alá helyezése, valamint az ér emelése során nem jelentkezett szemmel látható vérzés, illetve egyéb szöveti sérülés (13. ábra). A 2 x 15 perces csoportnál az első ischaemiás periódus után az ér visszaengedését követően eltávolítottuk a kampót, tehát a második okklúzió könnyű kivitelezhetősége jól mutatja az időben távolabbi okklúzió(k) kiválthatóságának potenciális lehetőségét. A kísérletek végén az adott agyi terület intakt állapotban maradt. A kísérletsorozathoz felhasznált összes állat esetén (minden csoportot beleértve) több mint 96%-os túlélési arány volt megfigyelhető.



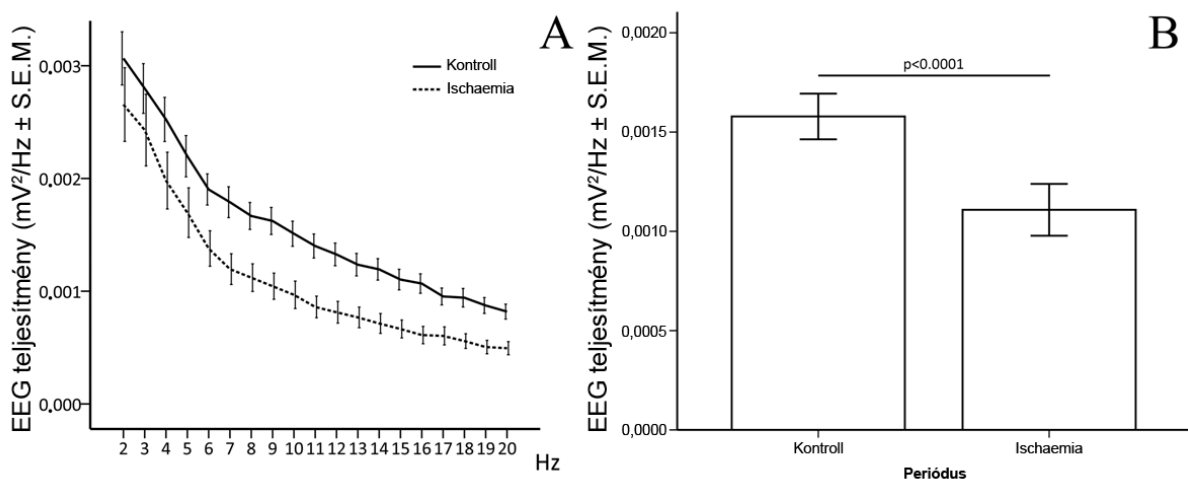
13. ábra A koponya megnyitását követően jól látható az MCA első elágazás előtti szakasza (A), valamint az ér alá helyezett fém eszköz (B) . Az okklúziós folyamat során nem jelentkezett vérzés, illetve szemmel látható sérülés. (KL saját felvétele)

7.1.2 EEG

Az EEG elvezetések során a kontroll szakaszban és az ischaemiás szakasz 5-15. perce között regisztráltunk 10-10 percet. Az EEG regisztrátumon szabad szemmel is jól látható az ischaemiás periódus alatti amplitúdó-csökkenés (14. ábra). Az EEG teljesítményspektrum spektrumanalízis során egyértelmű (szignifikáns) különbség a 2-20 Hz-es frekvenciatartományban jelentkezett (15. ábra).



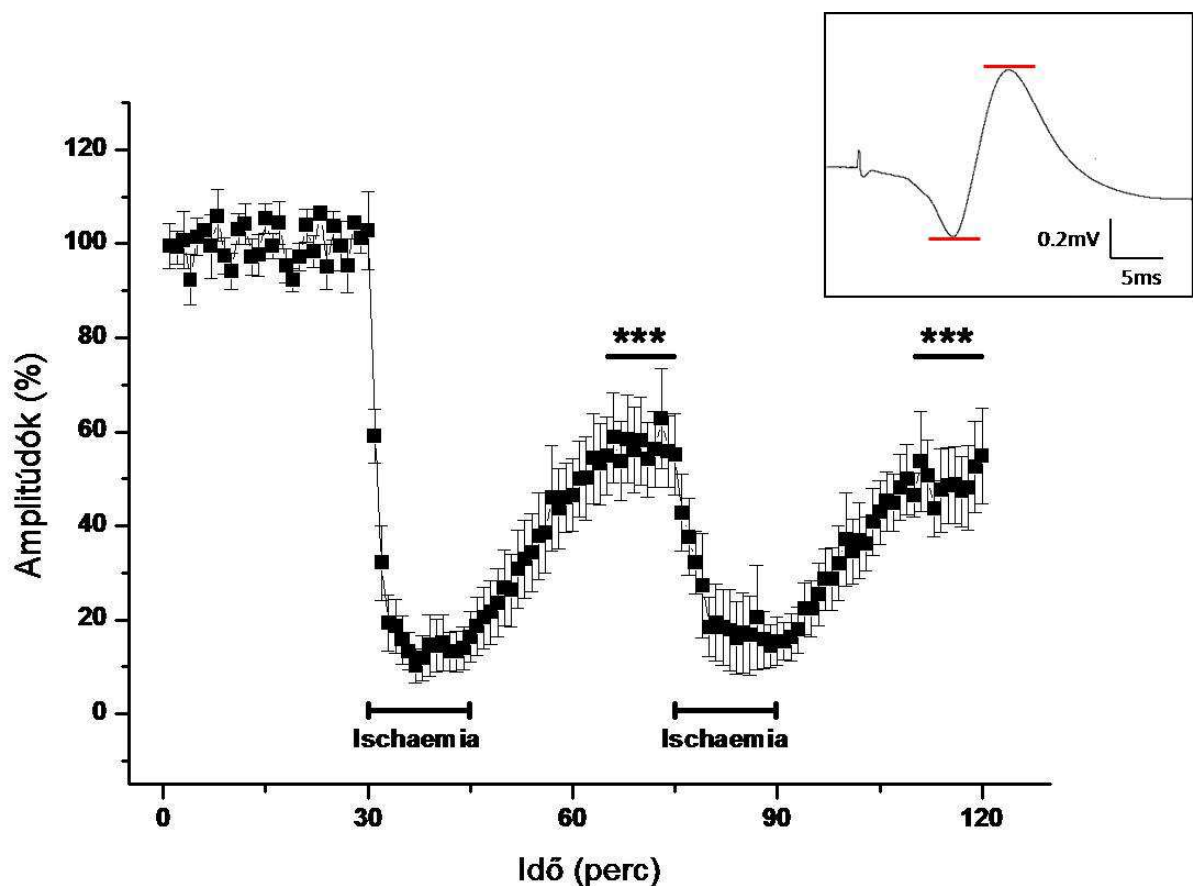
14. ábra EEG a kontroll és ischaemiás periódus alatt. Az egymásra illesztett egyperces kontroll (fekete), illetve ischaemiás (piros) EEG regisztrátumok jól mutatják a dMCAO előtti és alatti agykérgi aktivitás megváltozását. Az ábrán megfigyelhető, hogy az ischaemia hatására jelentősen lecsökkentek az amplitúdók. (Gellert és mtsai. 2013 nyomán módosítva)



15. ábra A regisztrált EEG teljesítmény spektrumának változása az ischaemia hatására. A vonal ábrán (A) látható az ischaemia alatti teljesítmény csökkenés a 2-20 Hz-es tartományban. Az összesített teljesítmény spektrum értékek szignifikáns különbséget mutattak (B). (Gellert és mtsai. 2013 nyomán módosítva)

7.1.3. Szomatoszenzoros kiváltott potenciálok

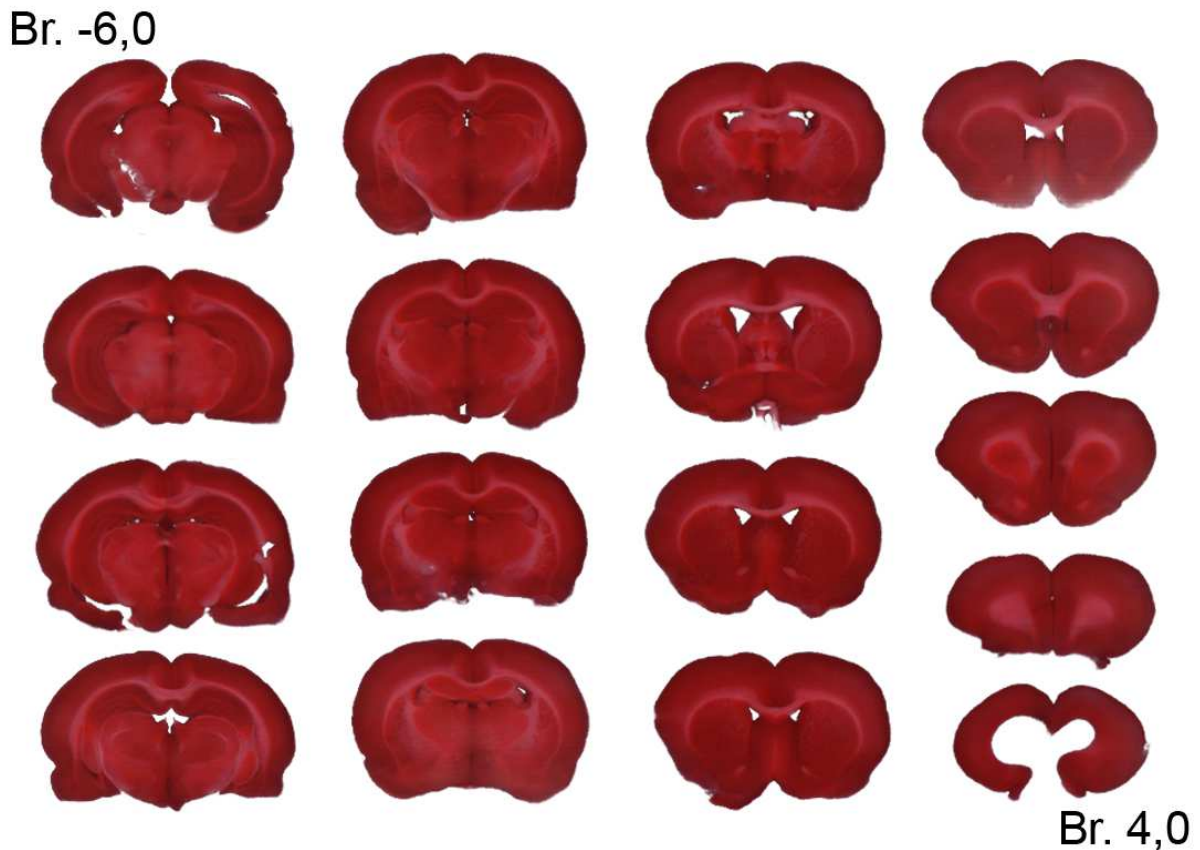
A szomatoszenzoros kiváltott potenciálokra jól követhető volt az agyi ischaemia hatása (16. ábra). A 30 perces kontroll szakasz során regisztrált jelek amplitúdói nem változtak. A dMCAO kialakítása után azonnali amplitúdó-csökkenést tapasztaltunk, majd 3-4 perc elteltével beállt egy stabil 10-15%-os szint. A reperfúzió során az amplitúdók növekedni kezdtek, azonban az 50-60%-os érték elérését követően további emelkedést nem tapasztaltunk, az amplitúdók ezen a szinten stabilizálódtak. A második ischaemiás periódus során hasonló változás jelentkezett, mind az okklúzió hatására bekövetkező amplitúdó-csökkenésben, mind pedig a reperfúziót követő részleges regenerációban. A statisztikai analízis során a 30 perces kontroll szakaszt a reperfúziós periódusok utolsó 10 percével vetettük össze. Mindkét esetben szignifikáns különbséget tapasztaltunk.



16. ábra 2 x 15 perc ischaemia hatása a szomatoszenzoros kérgi kiváltott potenciálokra. Az ábrán látható, hogy az ischaemia hatására lecsökkentek az amplitúdók, melyek a reperfúziós periódusok végére sem közelítik meg a kontroll szakaszban regisztrált értékeket. A reperfúziós szakasz utolsó 10 perca szignifikáns különbséget mutatott a kontroll szakaszhoz képest. A jobb felső képen egy reprezentatív SEP látható, melyen a párhuzamos vonalak mutatják a regisztrált amplitúdót. N=8, \pm S.E.M., ***p<0.001

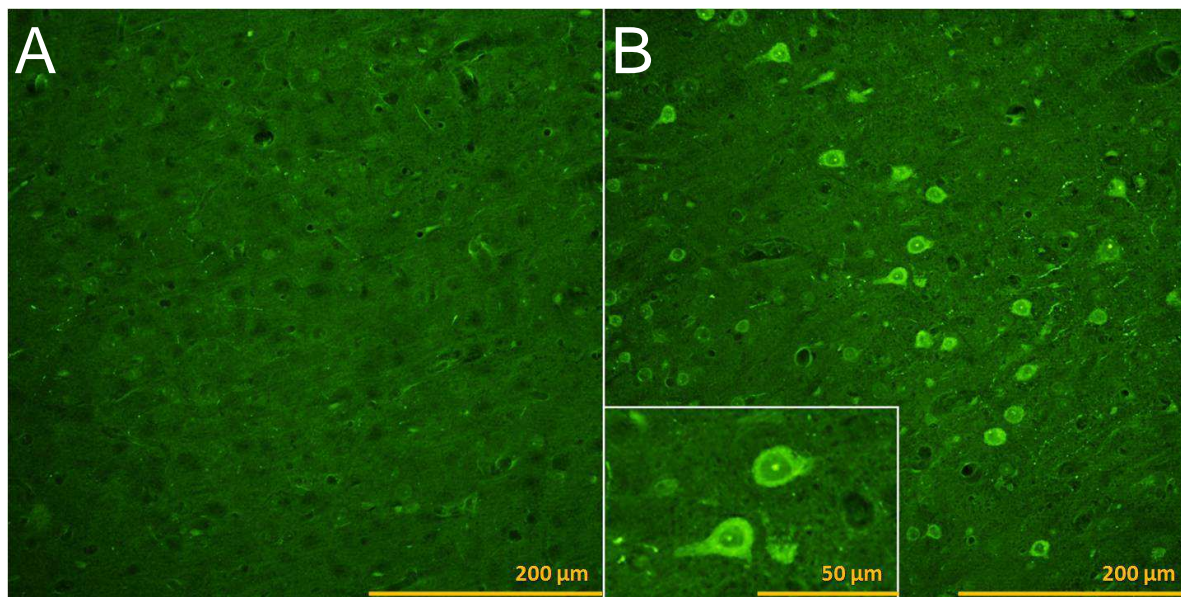
7.1.4 Hisztológiai eredmények

A 2 x 15 perces csoportnál vizsgáltuk a következményes makroszkópos szöveti változásokat 1 nap túlélési idő esetén. Elsőként TTC festést alkalmaztunk, mellyel jól megfigyelhető az esetleges nagymértékű, kiterjedt szöveti pusztulás (a sérült területeken nem következik be színreakció). A festés során egyik állat esetében sem tapasztaltunk detektálható szöveti károsodást (17. ábra).



17.ábra TTC-vel festett koronális agyszeletek a 2 x 15 perces kísérleti elrendezésénél, az MCA által ellátott területekről (Br. -6,0 - 4,0) 1 nap túlélési időt követően. A szeleteken nem látható sem kérgi, sem más területeken szöveti sérülés, melyet a szöveti enzimaktivitáson alapuló színreakció hiánya mutatna.

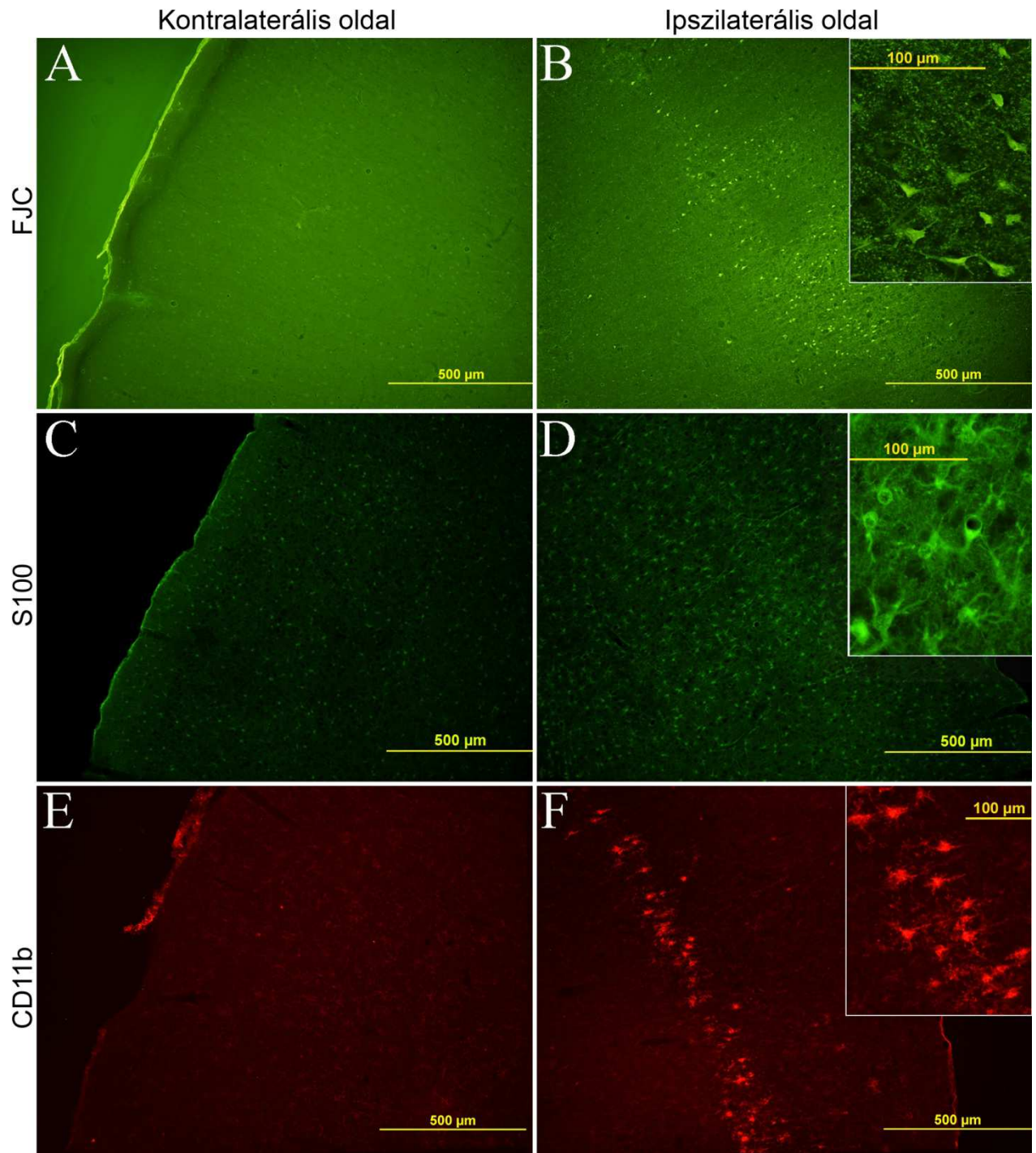
Ugyanezen csoportnál a finomabb változások érzékelésére is alkalmas Fluoro Jade C festést is alkalmaztunk, annak érdekében, hogy az esetlegesen degenerálódott sejteket (főleg neuronális elemeket) detektáljuk. A festés eredményként intenzív FJC jelölődést tapasztaltunk a dMCAO-val megegyező oldalon (18./B ábra). Ezzel szemben a kontralaterális féltekén nem láttunk FJC pozitív sejteket (18./A).



18. ábra Reprezentatív mikroszkópos felvétel patkány szomatoszenzoros területéről. A 2 x 15 perces ischaemiás inzultust követően 1 nappal intenzív FJC jelölődést tapasztaltunk (B), ellentétben a kontralaterális (intakt) féltekével (A).

A kísérletsorozat következő lépésében vizsgáltuk a hisztológiai változásokat a 30, 45 és 60 perces ischaemiás periódust követően. Ezen csoportok esetén nem tapasztaltunk FJC jelölődést.

Az ischaemia hatásának hosszabb távú követéséhez további kísérleteket végeztünk 30 perces dmCAO esetén, ezúttal 1 nap helyett 5 napos túlélési időt alkalmazva. Ezen csoportban a FJC mellett S100 és CD11b immunjelölést is használtunk. Az S100 főként asztrocitákat, míg a CD11b a reaktív mikrogliaikat jelöli. A kísérletsorozatban az állatok felénél tapasztaltunk jelölődést. Ezen csoportnál a FJC festéssel, valamint az immunjelölésekkel az ischaemiás féltekén kimutatható volt a neuronális degeneráció (19./ B ábra), és az aktivált asztrocita és mikroglia sejtek megjelenése (19./ D, F ábra). Az intenzív ipszilaterális FJC jelölődés esetén az ellentétes féltekén nem volt FJC pozitív sejt (19./A ábra). Megnövekedett számban találtunk S100+ asztrocitákat az ipszilaterális oldalon (19./D ábra). Ezen asztrociták megváltozott morfológiát mutattak: a sejttestek megduzzadtak, nyúlványaik elvékonyodtak, továbbá a szómák területén kis vakuolumok voltak megfigyelhetőek. A kontralaterális oldalon normális mennyiségű S100 pozitív asztrocita volt látható (19./C ábra). A CD11b + mikrogliaik jelentős csoportját találtuk az ipszilaterális területen, melyek jól mutatták az aktivált morfológiát (19./F ábra). Szómájuk megnőtt, valamint nem volt megfigyelhető nyúlványaiknál a másodlagos és harmadlagos elágazás. Az ellentétes oldalon halványan jelölődtek a normál, nyugalmi állapotú mikroglia sejtek (19./E ábra).



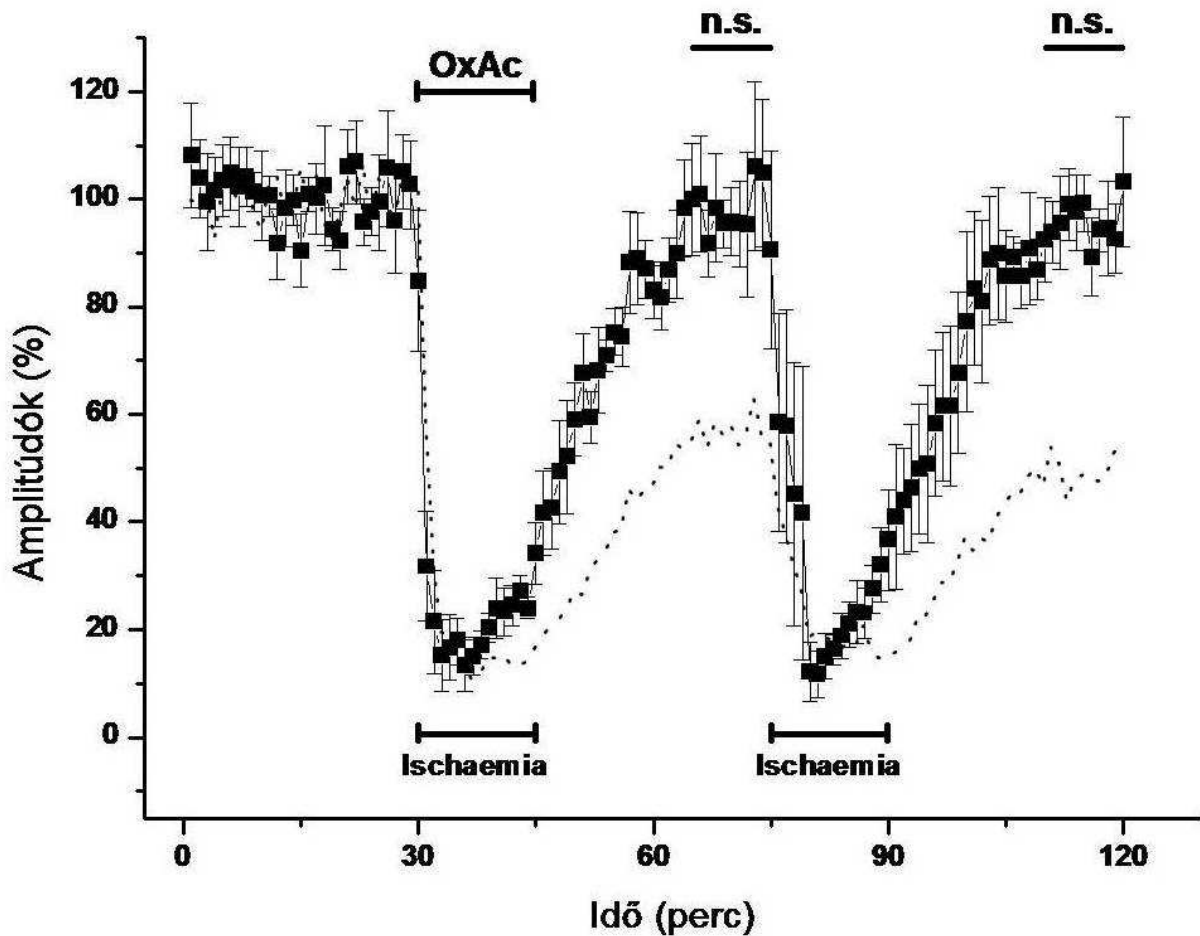
19. ábra Reprezentatív mikroszkópos felvételek szomatoszenzoros kérgi területekről 30 perc MCAO-t követően 5 nap túlélési idő után. A FJ-C-vel (A, B) festettük a degenerálódó neuronokat, valamint immunjelölést (S100, CD11b) alkalmaztunk a reaktív asztrociták (C, D) és mikroglia (E, F) kimutatásához. B: Az ipszilaterális oldalon nagyszámú FJ-C+ neuron jelzi a kiterjedt neurodegenerációt. D: Az S100+ aktivált asztrocitákra jellemző hipertróf, vakuolizált sejttest és a nyúlványok megvastagodása is megfigyelhető. F: A mikroglia szintén aktivált fenotípust mutatnak, valamint látható a megnagyobbodott sejttest, és a visszahúzódtott másodlagos és harmadlagos nyúlványok.

7.2 OxAc hatása a fokális ischaemiában

A korábbiakban leírt és több aspektusból is megvizsgált fokális ischaemiás modellen, 2 x 15 ischaemiás periódust alkalmazva vizsgáltuk az OxAc hatását a kiváltott potenciálokra, valamint a következményes agyi sejt degradációra.

7.2.1 Elektrofiziológiai eredmények

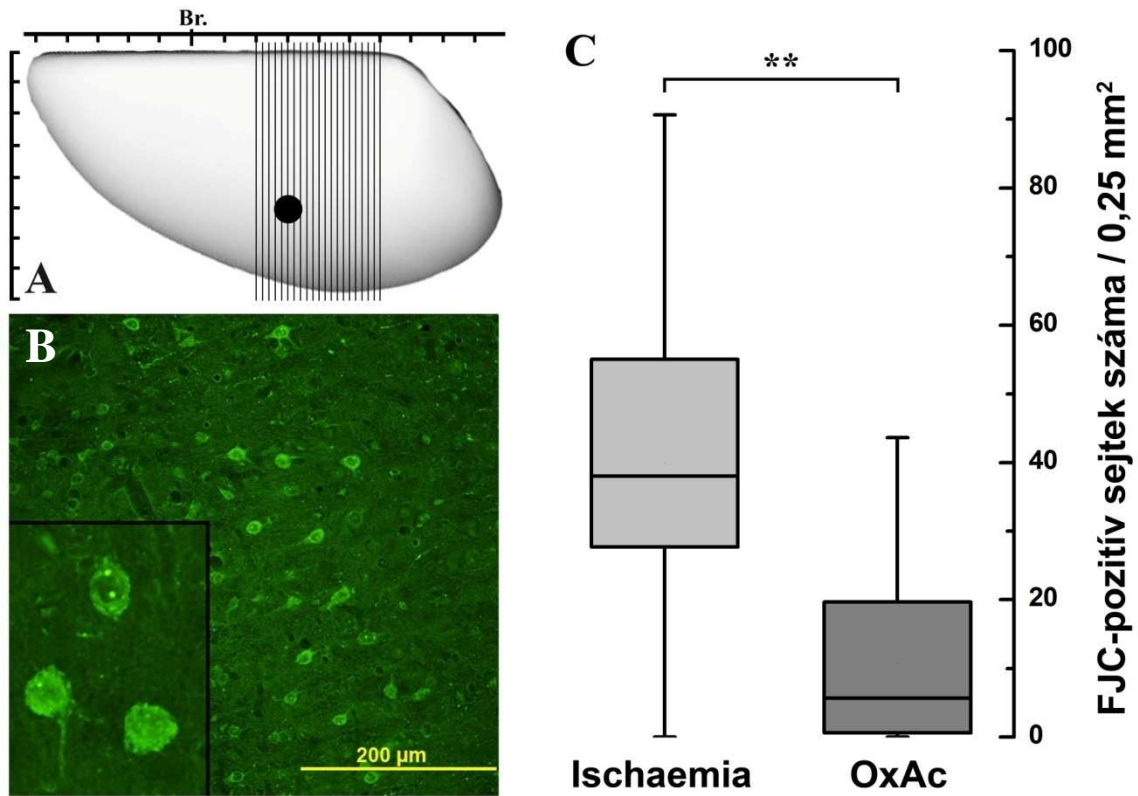
A 30 perces kontroll szakasz regisztrálását követően az OxAc beadását az első ischaemiás inzultus 15 perces ideje alatt végeztük (3,5 mg/100 g OxAc, 1 ml, 0.66 µl/perc, pH 7,41). A dMCAO hatására azonnal lecsökkentek a kiváltott potenciálok amplitúdói, azonban a kontroll csoporttal ellentétben már az ischaemia alatt növekedést mutattak (20. ábra). Már az éremelés 5. percétől megfigyelhető volt ez a növekvő tendencia, mely során a reperfúziós periódus utolsó 10-15 percében az amplitúdók elérték a kontroll szintet, és ezek az értékek stabilizálódtak. A második okklúzió hatására bekövetkezett amplitúdó-csökkenést szinte azonnal követte egy határozott emelkedés, melynek eredményeként az ischaemiás inzultus utolsó percére az amplitúdók elérték a kontroll szint 32%-át. A reperfúziós periódus alatt a kiváltott potenciálok amplitúdói egy dinamikus növekedést követően ismét elérték a kontroll szintet. A statisztikai analízisben összevetett 30 perces kontroll szakasz és a reperfúziós szakaszok utolsó 10 perce nem mutatott szignifikáns különbséget.



20. ábra OxAc és a 2 x 15 perc ischaemia hatása a szomatoszenzoros kérgi kiváltott válaszokra. Az OxAc (3,5 mg/100 g) i.v. adminisztrációja az első ischaemiás periódus alatt történt. Az ischaemiás kontroll csoport normalizált és átlagolt amplitúdóértékeit jelzi a szaggatott vonal (16. ábra). Az ábrán megfigyelhető, hogy az OxAc hatására – kontroll csoportnál tapasztaltakkal szemben – az amplitúdók már az ischaemiás periódus alatt növekedést mutattak, majd rövidesen elérték a kontroll szintet. A reperfúziós szakaszok utolsó 10 perce nem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll periódushoz képest. N=5, ± S.E.M.; n.s.= $p>0,05$

7.2.2 Hisztológiai eredmények

1 nap túlélést követően a dMCAO-val megegyező oldalon intenzív FJC jelölődés jelentkezett (21./B ábra). A Bregmához viszonyítva -2 és -6 koordináták között (21./A), adott kérgi területen a sejtszámolást elvégezve szignifikáns különbséget tapasztaltunk a két kísérletes csoport között. A sejtszámok mediánja a két okklúziós perióduson átesett, kezeletlen kontroll csoport esetén 38, míg az azonos ischaemiás inzultusban részesülő OxAc kezelt csoportnál 6 volt (21./C). Ez az eredmény mutatja, hogy az elektrofiziológiai elvezetések során tapasztalt OxAc hatására végbemenő pozitív változások párhuzamba vonhatók a degenerálódott, FJC+ sejtek csökkent mennyiségével.



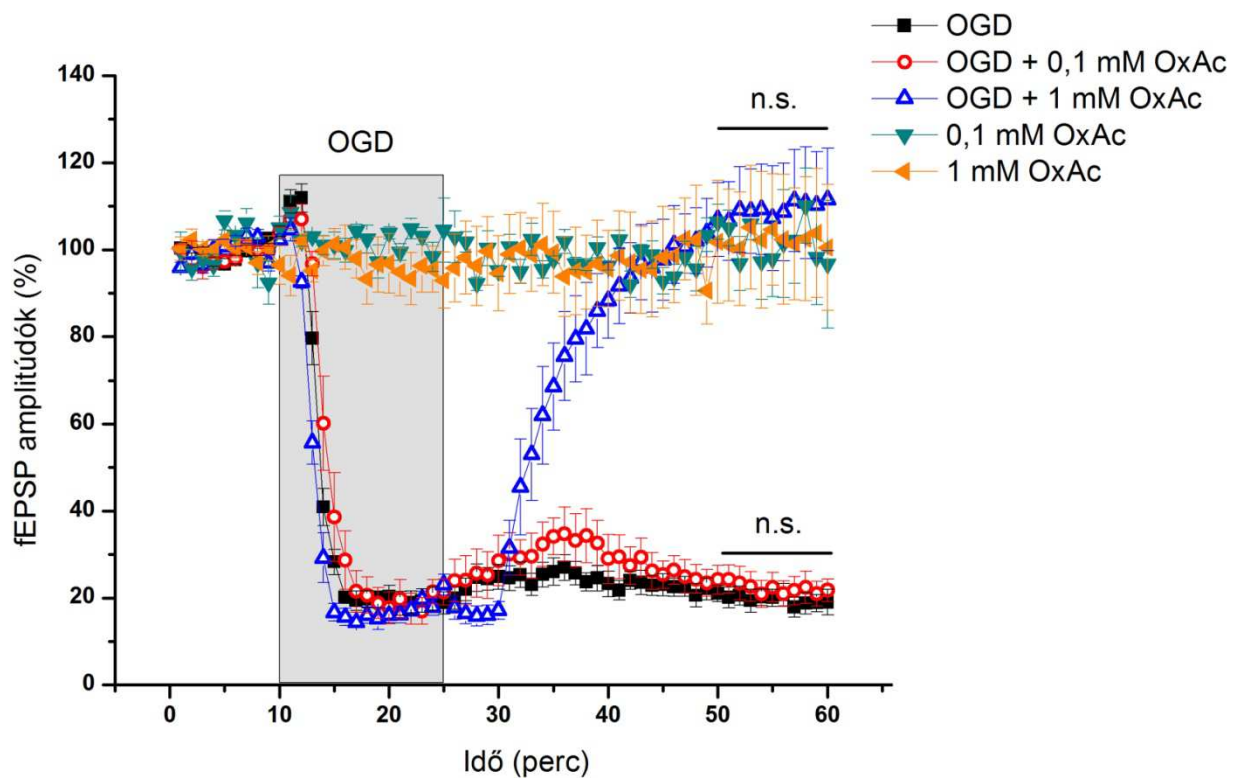
21. ábra A kísérletsorozat hisztológiai eredményei. Az A-panelen látható a metszetek helye (párhuzamos vonalak) a vizsgált tartományban (Br. -2,0 - -6,0). A fekete kör jelzi a kiváltott potenciálok elvezetési helyét. B: reprezentatív mikroszkópos felvétel a jelölődött FJC+ sejtekről. C: FJC pozitív sejtek száma a vizsgált területen. A 2 x 15 perces ischaemia hatására kialakuló FJC+ neuronok száma az OxAc alkalmazása mellett szignifikáns mértékben lecsökkent. ** $p < 0,01$, F: 21,18; df: 1; mediánok: 38, 6

7.3 Az OxAc hatása *in vitro* modellen

A következő kísérletsorozatunkban *in vitro* kísérleti elrendezésben tanulmányoztuk az OxAc hatását fiziológiás és ischaemiás (OGD) körülmények között. Ezen méréseknél az idegi aktivitás vizsgálatához kiváltott, hippocampális fEPSP-eket vezettünk el, majd analizáltuk a kiváltott fEPSP-k amplitúdóit (22. ábra) és meredekségét (slope) (23. ábra). Ezen paraméterek információt adnak a neuronpopuláció fiziológiai állapotáról, így a jel (fEPSP) kialakítása során létrejövő szinaptikus áttevődés hatékonyságáról is.

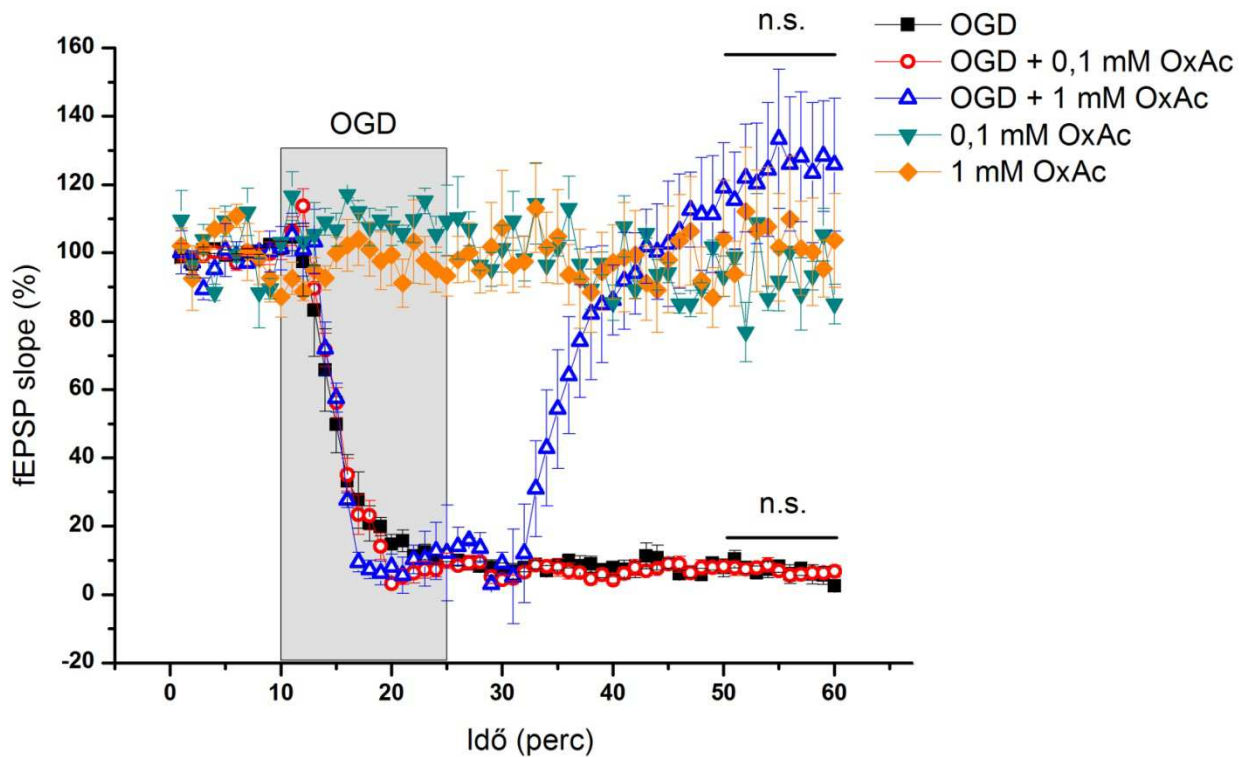
A méréseink során egy 10 perces kontroll szakasz felvételét követően 15 perces OGD-t alkalmaztunk, ezt követően pedig további 35 percen keresztül követtük a regisztrált jelek amplitúdójának és meredekségének változását. Az OGD-s periódus elején a fEPSP-k amplitúdóit egy enyhe emelkedés jellemezte, amely az ischaemiás inzultus során bekövetkező fokozott mértékű Glu felszabadulásnak, valamint az általa indukált excitotoxicitásnak tulajdonítható. A regisztrált jelek meredekségében ez a változás kevésbé volt kifejezett. Ezt követően az OGD 3. percétől nagymértékű csökkenést mutattak a fEPSP-k amplitúdója (és meredekségei), majd az ischemia 6. percére teljesen meg is szűntek. A 15 perces OGD leteltét követően ismét oxigenáltatott normál aCSF-et perfundáltunk a szeletre – csakúgy, mint a kontroll periódus alatt – azonban ennek hatására sem tértek vissza a fEPSP-k. Tehát a szeleteknél alkalmazott ischemia hatására a szinaptikus transzmisszió sérült, melynek háttérében a sejtek apoptotikus és nekrotikus pusztulása egyaránt állhat. A rendszerben tesztelt, potenciálisan protektív hatást kifejtő anyagoknál a fEPSP-k OGD-t követő újbóli megjelenését várjuk.

Kísérleteink során az OxAc hatását egy alacsonyabb, valamint egy magasabb dózis esetén is megvizsgáltuk. A 0.1 mM-os koncentrációban alkalmazott OxAc esetén az OGD hatására az inzultus 3. percében csökkenni kezdtek az amplitúdók és a meredekség, majd néhány perc elteltével teljesen megszűntek. Az OGD-t követő regeneráció a regisztrátumok mintegy felénél volt csupán megfigyelhető (60%). Ezen eseteknél az OGD végét követően 5 perccel jelentek meg a fEPSP-k, a jelenség azonban kevesebb, mint 10 percig állt fenn, ezután ismét egy amplitúdó-csökkenés volt megfigyelhető, mely végül a fEPSP-k teljes eltűnését eredményezte.



22.ábra Az OGD, valamint az alkalmazott OxAc hatása a kiváltott fEPSP-k amplitúdóira. A 15 perces OGD (szürke terület) következtében az fEPSP-k tartósan eltűntek. Az 0,1 mM OxAc hatására átmenetileg megjelentek a jelek, de kontroll szint közelébe csak az 1 mM-os OxAc dózis alkalmazása mellett tértek vissza. Normál körülmények között egyik OxAc koncentráció esetén sem tapasztaltunk változást az fEPSP-k vizsgált paramétereiben. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget ■ és ● között, valamint △, ▼ és ▲ között az utolsó 10 percben. N= 9, 5, 4, 4, 6; ± S.E.M.; n.s.= $p>0.05$

Az 1 mM-os koncentrációjú OxAc hatásosnak bizonyult az OGD-vel szemben, ugyanis a 15 perces inzultus után 5 perc elteltével a fEPSP-k amplitúdóinak (és slope-jainak) dinamikus növekedése volt megfigyelhető. Ennek eredményeként az OGD-t követő 20 percen belül kontroll szintre tértek vissza a regisztrált értékek. Ezután egy enyhe mértékű növekedést is tapasztaltunk, majd a regisztráció utolsó 10 percére az amplitúdók $109.38 \pm 0.52\%$ -os, míg a slope-ok $124.69 \pm 1.55\%$ -os értékeken stabilizálódtak. Annak érdekében, hogy az OxAc kontroll fEPSP-kre gyakorolt esetleges hatását kizárjuk, a hatóanyagot a következő kísérleti csoportjainkban egy 10 perces kontroll szakasz felvételét követően 50 percen át mostuk a hippocampális agyszeletekre. Mindkét dózis esetén azt tapasztaltuk, hogy az OxAc tartós jelenléte ellenére sem változnak a fEPSP-k regisztrált értékei a kontroll szakaszhoz képest.

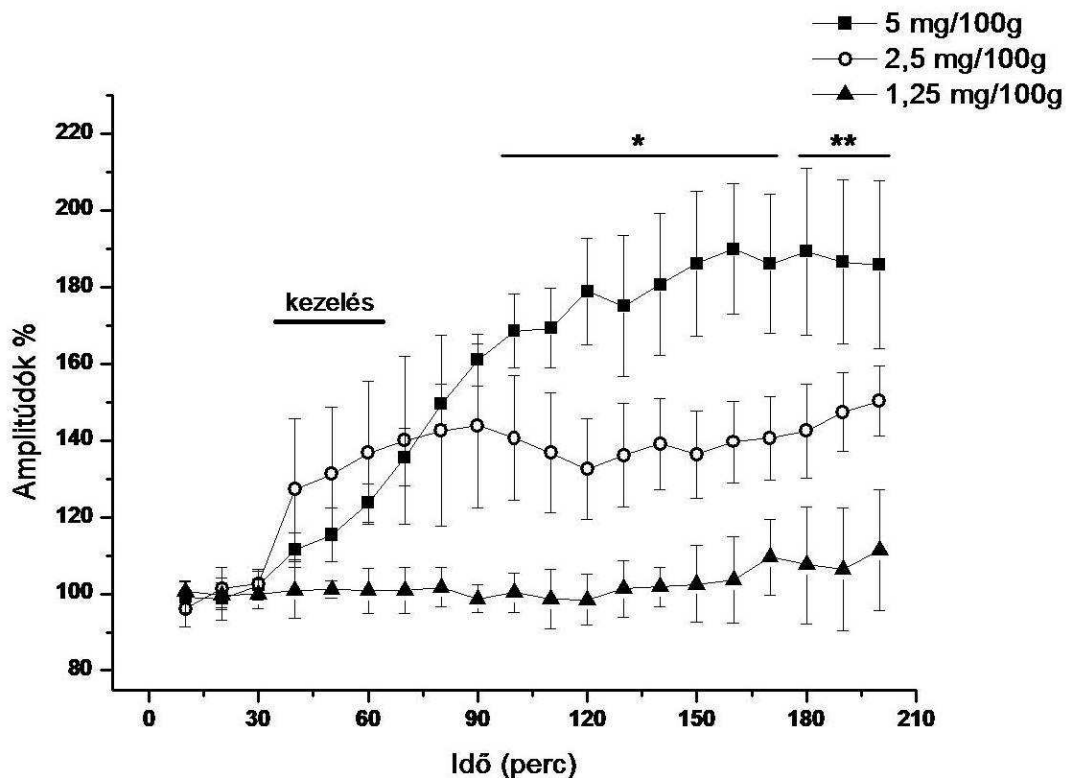


23. ábra Az OGD, valamint az alkalmazott OxAc hatása a kiváltott fEPSP-k meredekségére. Az OGD hatására (szürke terület) az fEPSP-k eltűntek, a meredekség a jelek hiányában teljesen lecsökkent. Hasonló hatást figyeltünk meg az 0,1 mM OxAc alkalmazásakor is, ám az 1 mM-os OxAc dózis esetén az fEPSP-k meredeksége kontroll szint közelébe tért vissza. A normál körülmények között alkalmazott OxAc dózisok nem voltak hatással a kiváltott fEPSP-k meredekségére. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget ■ és ● között, valamint △, ▼ és ◀ között az utolsó 10 percben. N= 9, 5, 4, 4, 6; ± S.E.M.; n.s.= $p>0.05$

7.4 Az OxAc hatása a szomatoszenzoros kiváltott potenciálokra intakt állaton

7.4.1 OxAc dózis hatás-vizsgálata

Annak érdekében, hogy az OxAc SEP-ekre gyakorolt hatását vizsgáljuk, a kísérletek során 30 perc kontroll szakasz felvétele után végeztük az intravénás anyagbeadáást (30 perc), majd 2,5-3 órán át regisztráltunk az amplitúdókat. A kontroll csoportnál, ahol azonos térfogatú fizioiógias sóoldatot alkalmaztunk, az elvezetések során nem tapasztaltunk változást az amplitúdókban. Az OxAc beadásánál 5 mg/100 g-os kezdeti dózist állapítottunk meg. A kísérletek során a beadást követően azonnal megindult egy markáns amplitúdó növekedés (24. ábra). A beadástól számított 1 óra múlva az értékek elérték egy 180-190%-os plató fázist. Ezen dózist felezve (2,5 mg/100 g) már kisebb mértékű növekedést tapasztaltunk, az amplitúdók már a kezelés végét követően 140%-on stabilizálódtak. A 1,25 mg/100 g-os dózissnál a kezelés hatására nem tapasztaltunk növekvő tendenciát, az amplitúdók stabilan 100% körüli értéken maradtak, hasonlóan a kontroll csoporthoz. A 2,5 mg/100 g, valamint az 5 mg/100 g-os csoportok esetén szignifikáns különbség volt tapasztalható a kontroll szakaszhoz képest.

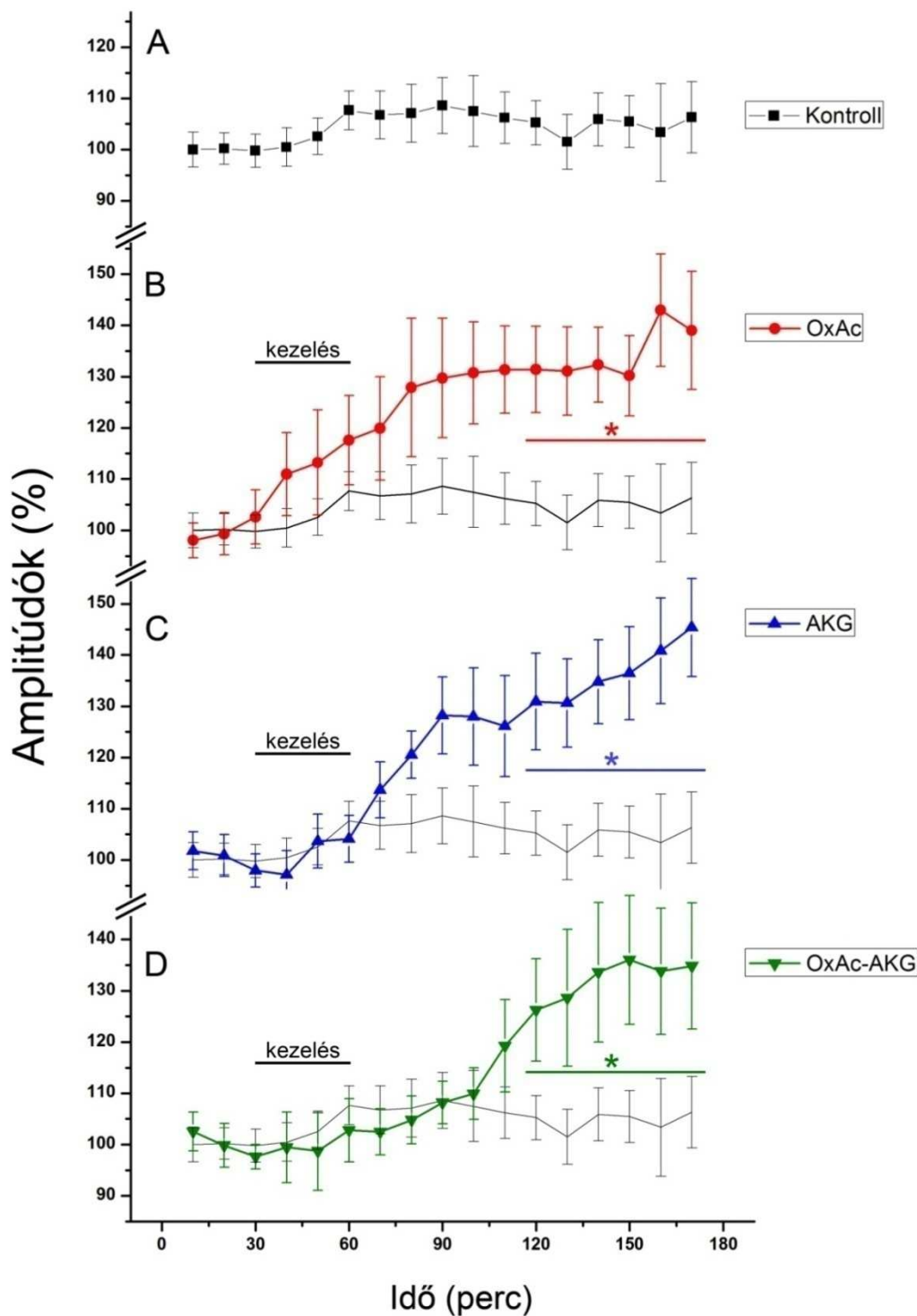


24. ábra OxAc hatása a szomatoszenzoros kiváltott potenciálokra. Az 5 és 2,5 mg/100 g –os OxAc dózis az intravénás beadást követően jelentős mértékben növelte a SEP-ek amplitúdóit, míg az 1,25 mg/100 g esetén nem tapasztaltunk amplitúdóváltozást. N=5, 5, 5; \pm S.E.M.; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ \blacktriangle és \blacksquare között. (Nagy és mtsai. 2010 nyomán módosítva)

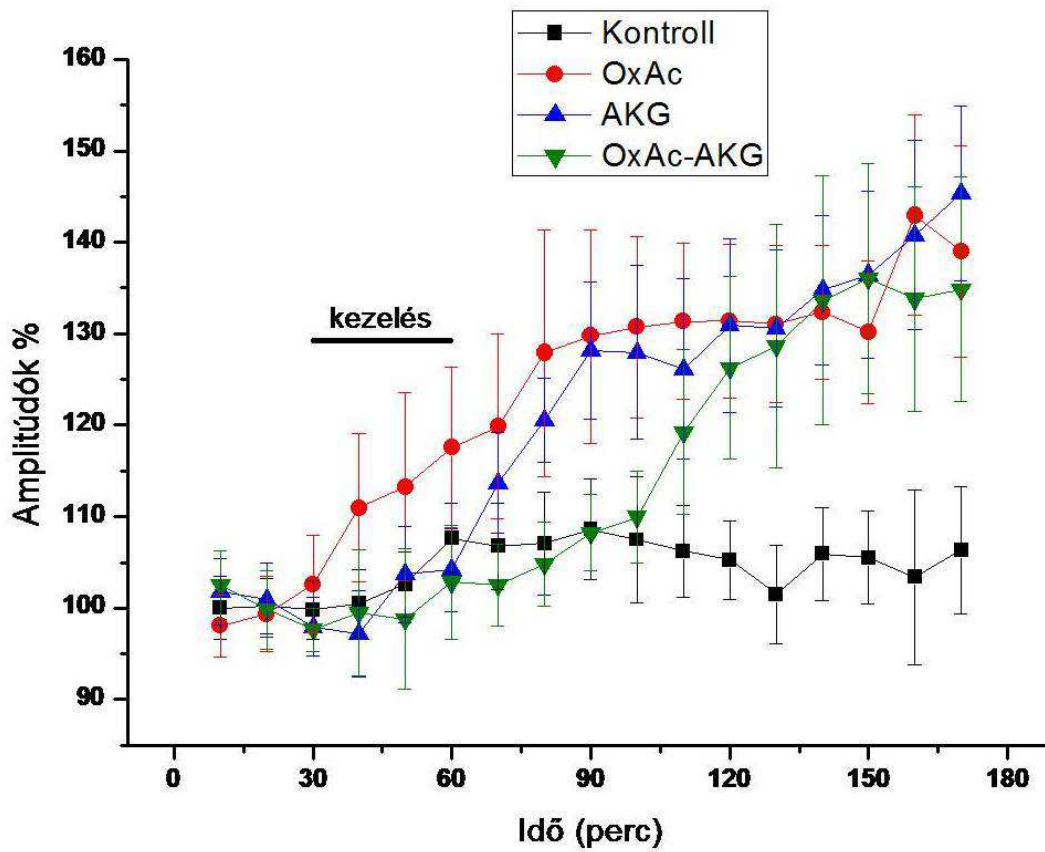
7.4.2 OxAc és a 2- α -ketoglutarát hatása a kiváltott potenciálokra

A következő kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy a tapasztalt amplitúdó-növekedés összefügg-e az OxAc Glu scavenger hatására lecsökkent vérben lévő Glu mennyiséggel. Mivel ez a hatás a GOT által katalizált egyensúlyi reakció befolyásolásán alapszik, egy másik termékkel megfordítható ez a folyamat. Az enzimreakció során $\text{Glu} + \text{OxAc} \leftrightarrow \text{AKG} + \text{Asp}$ átalakulás megy végbe. Amellett, hogy AKG (az OxAc-cal ellentétben) növeli a vér Glu szintjét, metabolikus szerepét tekintve hasonló az OxAc-hoz. A kísérletekben alkalmazott AKG tehát közvetett bizonyítékot adhat az amplitúdó-növekedés háttérében húzódó folyamatokra.

A dózis-hatás görbe, valamint új irodalmi adatok alapján (Campos és mtsai. 2011a) a 3,5 mg/100 g-os OxAc dózist, továbbá ezzel ekvimoláris (3,87 mg/100 g) AKG dózist használtunk (25. ábra). Első lépésben az OxAc hatását vizsgáltuk, mely az előző kísérletsorozathoz hasonlóan azonnal növelni kezdte a kiváltott potenciálok amplitúdóját. 1,5 órával a beadást követően az amplitúdók mintegy 130-135%-os szinten stabilizálódtak. Az AKG az OxAc-hoz hasonlóan az amplitúdók növekedését idézte elő, melyek ez esetben is a beadás után 1-1,5 órával elérték a 130-135%-os szintet. Az OxAc és az AKG együttes alkalmazása is hasonló eredményt hozott. A kiváltott válaszok amplitúdói másfél óra elteltével elérték egy stabil, 135%-os szintet. A statisztikai analízisek során a kontroll periódusban regisztrált amplitúdó értékeket vetettük össze a kezelt csoportok 90. perc után regisztrált értékeivel. Ennek eredményeként mindhárom kezelt csoport esetén mutatkozott szignifikáns különbség a 90. percet követően.



25. ábra Az OxAc, az AKG, valamint 1:1 arányú keverékük hatása a szomatoszenzoros kérgi kiváltott potenciálokra. Az A-panelen láthatók a fizioiógias sóoldattal kezelt kontroll csoport normalizált amplitúdóértékei, melyek a jobb áttekinthetőség kedvéért a többi panelen (B, C és D) is halványan fel vannak tüntetve. A 3,5 mg/100 g OxAc, valamint az ekvimoláris mennyiségű 3,87 mg/100 g AKG hatására a kezelést követően szinte rögtön megkezdődött az amplitúdónövekedés (B, C), míg keverékük esetén ez hatás időben kicsit később jelentkezett. Az emelkedett amplitúdók, és a kontroll szakasz között szignifikáns eltérést tapasztaltunk 1 órával a beadást követően. N=5, 5, 5, 4 ± S.E.M.; *p<0,05.



26. ábra A 25. ábra összesített verziója. Látható, hogy az anyagbeadás következményeként az amplitúdók kissé eltérő tendenciával, de a regisztráció végére minden esetben 30-40%-os növekedést mutattak. 1 órával a beadást követően már egységesen 130-140%-os szint figyelhető meg. N=5, 5, 5, 4 ± S.E.M.

8. Diszkusszió

8.1. A fokális ischaemiás modell vizsgálata

A stroke és a különböző cerebro-vaszkuláris megbetegedések világszerte előkelő helyet foglalnak el a halálozási statisztikákban. A magas mortalitási arány mellett a túlélők rehabilitációja is nagy anyagi terhet jelent a társadalom számára. Az intenzív stroke-kutatás mellett sem ismertek részleteiben az agyér-katasztrófák háttérében húzódozó pathomechanizmusok. Ennek vizsgálatához nyújtanak segítséget a különböző állatmodellek. Napjainkban számos ilyen állatkísérletes modell áll rendelkezésre a stroke és más agyi ischaemiás állapotok vizsgálatához (Canazza és mtsai. 2014). A sokféle modell ellenére sem nyílik lehetőségünk minden vonatkozó jelenség, patológiás állapot feltérképezésére. Ebből kifolyólag elengedhetetlen további modellek létrehozása. Az elmúlt évben is több új megközelítés és módszer került leírásra (Kasahara és mtsai. 2013; Morancho és mtsai. 2012), mely szintén jól tükrözi ezek szükségességét és jelentőségét a stroke kutatás területén.

Az általunk kialakított modellnél a legfontosabb előnyös vonások között említhetjük azt, hogy a műtéti eljárás kivitelezése egyszerű és jól reprodukálható volt. Az állatok magas túlélési aránya jelzi, hogy ezen metodika jól alkalmazható akár öreg állatokon is, mely sok szempontból tükrözi a humán stroke epidemiológiáját (Soleman és mtsai. 2010). Az ér emelésével kiváltott okklúzió mértéke finoman szabályozható a mikromanipulátorok segítségével, így a módszerrel egyedülálló módon könnyen adott szintre állítható a perfúzió. Mivel egyszerűen és sérülésmentesen váltható ki több, tetszőleges hosszúságú ischaemiás periódus, a modell segítségével jól modellezhető a TIA jelensége, és tanulmányozhatók a következményes fiziológias változások.

A modellünk tesztelésére irányuló kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az ischaemia hatására jelentős mértékben megváltozott az EEG teljesítmény spektruma és a különböző hullámkomponensek aránya. A trigeminális rendszer ingerlésével kiváltott potenciálok amplitúdói szinte azonnal teljesen lecsökkentek az ischaemais periódus alatt. Az inzultus nyomában fellépő funkcionális károsodást jelzi, hogy a reperfúziós időszak alatt az amplitúdók nem érték el a kontroll szintet. A jelentős változás azt is jól mutatja, hogy szomatoszenzoros kérgi területek közül az MCAO-ra egyik legérzékenyebb struktúra a barrel kéreg (Sakatani és mtsai. 1990). Vizsgálataink során az MCA emelésének hatása jól követhető volt a spontán és a kiváltott agykérgi aktivitás megváltozásán keresztül.

Az elektrofiziológiai vizsgálatokat követően az agyi ischaemia során kialakuló esetleges szöveti elváltozásokat, károsodásokat hisztológiai metodikákkal is nyomon követtük. Az 1

nap túlélést követően vizsgált 2 x 15 perc MCAO hatása nem volt kimutatható TTC festéssel. Ez azt jelzi, hogy az elektrofiziológiailag detektált funkcionális változások nem vezettek nagymértékű szövetelhaláshoz. Ennek ellenére a FJC festés során – mellyel a degenerálódó neuronok detektálhatók – intenzív jelölődést tapasztaltunk az ipszilaterális oldalon. Ez mutatja, hogy az ischaemia következményeként finomszerkezeti változások mégis történnek. Nem várt jelenség volt, hogy a 30, 45 és 60 perces MCAO-t követően 1 nap után nem volt kimutatható FJC jelölődés. Mindazonáltal, hogy a festék kémiai szerkezete ismert és használata széles körben elterjedt, a kötődésének pontos mechanizmusa részleteiben még nem ismert (Schmued és mtsai. 1997). Mivel az FJC rendkívül szelektíven festi a degenerálódó neuronokat, így feltehetően a patológiás folyamatokban megjelenő molekulák festődhetnek meg. 3 teória létezik a FJC kötési célpontjait illetően. 1) Poliamin-teória: a festék a különböző poliaminokhoz kötődik, mint a putreszcin, cadaverin, spermadin, hisztamin (Schmued és Hopkins 2000). 2) Membrán-teória: a festék különböző töltéssel rendelkező membrán alkotókhoz köt, úgymint a foszfatidil-kolin vagy a foszfatidil-szerin. 3) Citoplazma teória: a festék valamely megváltozott (dekarboxilált, defoszforilált, proteolitikusan hasított) citoskeletális fehérjéhez köt, úgymint a neurofilament vagy a mikrotubulus (Schmued és mtsai. 2005). Kísérleti elrendezésünknel valószínűleg az ismételt ischaemia-reperfúzió hatására eltérő folyamatok is beindultak, melyben érintettek FJC festéket kötő molekulák is. Ez adhat magyarázatot arra, hogy az ismételt, 2 x 15 perces ischaemia károsító hatása megmutatkozott a FJC festésben 1 nap után, míg a 30, 45 és 60 perces inzultusé nem.

A modellünkben előidézett ischaemia későbbi, elhúzódó károsító folyamatait is vizsgáltuk a 30 perces MCAO esetén, 5 nap túlélést követően. A kísérletsorozatban az állatok felénél tapasztaltunk jelölődést, ami valószínűleg az egyedek közötti változó ischaemiával szembeni toleranciához köthető. A jelölődést mutató csoportnál a degenerálódó neuronok mellett megnövekedett mennyiségű S100 pozitív asztrocita, valamint aktivált mikroglia sejt volt látható az érintett szomatoszenzoros kérgi területeken.

Az általunk felállított kísérletes metodika több aspektusból is alkalmasnak bizonyult az ischaemia modellezésére (pl.: a detektálható funkcionális és struktúrális sérülés, a kísérletek reprodukálhatósága vagy az elhanyagolható mortalitás tekintetében). Ezért a kísérletek következő fázisában ezen MCAO modell segítségével vizsgáltuk az OxAc, mint Glu scavenger potenciális neuroprotektív hatását. Az OxAc intravénás alkalmazása révén – egy, a vérben megvalósuló enzimreakció következményeként –, szinte másodpercek alatt megkezdődik a Glu scavenging (Gottlieb és mtsai. 2003), tehát az agyban az ischaemia során

feleslegben felhalmozódott Glu-nak a vér irányába történő „elszívása”. Méréseinknél az állatok kerinkésébe juttatott OxAc hatása azonnal tükröződött a kiváltott potenciálok változásában. Szemben a kontroll csoporttal, ez esetben már az ischaemia alatt megfigyelhető volt az amplitúdók növekedése, majd az MCAO-t követően egy-két perc elteltével teljesen rendeződött az agykérgi aktivitás, és az amplitúdók kontroll szintre tértek vissza. Az új ischaemiás modell kialakítása során az MCAO csak a kérgi területeket érinti, így a kiváltott potenciálokon keresztül nyomon követhető funkcionális deficit főként a barrel kérgi elemekhez köthető. Ezen kérgi terület kifejezetten érzékeny az agyi ischaemiára, mely látható volt a kontroll csoportnál, ahol az MCAO-t követően az amplitúdók nem érték el a kontroll szintet. Az OxAc hatása mögött feltehetően a gyors Glu scavenging áll, mely hatására a kisebb mértékű Glu excitotoxicitás mellett a sejtek meg tudják őrizni funkciójukat.

Az OxAc kezelésnek alávetett csoport esetén is elvégeztük a hisztológiai analízist. A 2 x 15 perces kísérleti elrendezésnél 1 nap túlélést követően ez esetben is intenzív FJC festődést tapasztaltunk, azonban az is megfigyelhető volt, hogy az OxAc hatására jelentős mértékben csökkent a FJC pozitív sejtek száma. FJC festődést csak ennél a kísérletes elrendezésnél tapasztaltunk, de minthogy a jelölődés megfigyelhető volt az ischaemiás kontroll és a kezelt csoportnál is, ezért a jelölődött sejtek számának csökkenése az OxAc-hoz köthető neuroprotektív hatásnak tulajdonítható.

8.2 OxAc hatása *in vitro* modellen

Ebben a kísérletsorozatban az OxAc hatását vizsgáltuk a túlélő agyszeleten kiváltott hippokampális fEPSP-kre fiziológias és ischaemiás körülmények között. A CA1-es régióból elvezetett fEPSP-ken keresztül tanulmányoztuk a Schaffer-kollaterálisok és a CA1-es piramis sejtek közötti glutamáterg szinaptikus transzmissziót, mely közvetlenül utal a sejtek funkcionális állapotára. Méréseink során oxigén és glükóz megvonásával (OGD) idéztük elő az ischaemiás állapotot az agyszeletekben. Ennél a széleskörben használt modellenél jól vizsgálható az agyi ischaemia következtében fellépő Glu excitotoxicitás, és a további szövetkárosító folyamatok, valamint az ezen patológiás folyamatokat befolyásoló különböző farmakonok hatása is. Az OGD modell használatával az OxAc Glu scavenger hatásától függetlenül, szelektíven tudtuk tanulmányozni a molekula metabolikus hatását.

Annak érdekében, hogy az OxAc normál körülmények mellett, fEPSP-kre gyakorolt esetleges hatását vizsgáljuk 50 percen keresztül a hippokampális szeletekre mostuk aCSF-ben oldva. Kísérleti eredményeint azt mutatták, hogy egyik alkalmazott koncentrációban (0.1, 1 mM)

sem volt hatással a kiváltott fEPSP-kre. Az OGD-s kísérletek esetén az ischaemiás inzultus első perceiben megfigyelhető kismértékű amplitúdó-növekedés után az fEPSP-k eltűntek, és a 15 perces ischaemiás periódus után sem jelentek meg. A kezdeti amplitúdónövekedés a Glu excitációhoz és a sejtek depolarizálódásához köthető, míg a kiváltott elektromos jelek hosszan tartó eltűnése jelzi az ischaemiás folyamatok következtében kialakuló tartós funkcionális károsodást. A 0,1 mM OxAc hatására az OGD-t követően átmenetileg megjelentek az fEPSP-k. Ez a jelenség azonban csak rövid ideig állt fenn, majd a regisztrált jelek ismét csökkenni kezdtek, majd pedig véglegesen eltűntek. Az 1 mM-os koncentráció – mely önmagában szintén nem volt hatással a kiváltott aktivitásra – alkalmazásával az fEPSP-k kontroll szintre tértek vissza az OGD periódust követően, ami jól mutatja az OxAc-hoz köthető neuroprotektív hatást. Az OxAc több szinten, metabolikus és antioxidáns úton fejtheti ki jótékony hatását. A különböző endogén metabolitok, Szent-Györgyi–Krebs intermedierek alkalmazása különböző agyi patológiás folyamatban már több kísérletes elrendezésben is neuroprotektívnek bizonyult. Homogenizált agyszövetnél az alkalmazott OxAc, citromsav, borostyánkősav és almasav is hatékonyan csökkentette a kvinolénsavval, vassal és malonsavval kiváltott reaktív gyökképződést (Puntel és mtsai. 2005; Puntel és mtsai. 2007). Az intraperitoneálisan alkalmazott OxAc és AKG csökkentette a kainsavval kiváltott epileptiform aktivitást, valamint jelentősen redukálta a mitokondriális DNS sérülést (Yamamoto és Mohanan 2003). A Pyr neuroprotektív hatású volt striatális neuronkultúrán alkalmazott H₂O₂ indukált károsodással szemben (Desagher és mtsai. 1997). Az OxAc kedvező hatása több szinten érvényesülhet: antioxidáns tulajdonsága mellett részt vesz több metabolikus folyamatban, mellyel hozzájárul az energiaháztartás helyreállításához. Az OxAc az acetyl-coenzim-A-val reakcióba lépve (citrát szintáz katalizálta enzimreakció) jut be a Szent-Györgyi–Krebs ciklusba, ami végeredményben az ATP szintéziséhez vezet. Ez a molekula nélkülözhetetlen a ciklus működéséhez továbbá a terminális oxidációhoz, tehát összességében a biológiai oxidáció folyamatához. Mivel az ischaemia pathomechanizmusában kulcsfontosságú szerepe van a mitokondriális diszfunkciónak – mely által a sejtek energiaellátása zavart szenved (Sas és mtsai. 2007) –, így érthető, hogy az OxAc antioxidáns és energiametabolizmust javító hatása nem elhanyagolható ezen sejtorganellumok működése szempontjából. Továbbá, az OxAc részt vesz az aminosav metabolizmusban, az urea ciklusban és a glükogenezisben is. Ez utóbbi folyamatban a Pyr-karboxiláz, valamint a foszfoenolpiruvát-karboxikináz enzimek szubsztrátjaként szerepel.

Az *in vitro* ischaemiás kísérleteink során kapott eredményeink is bizonyítják az OxAc jótékony hatását az ischaemia következményeként fellépő agyi károsodásokkal szemben. Az OxAc metabolikus és antioxidáns tulajdonságai minden bizonnyal egyaránt hozzájárulhatnak a Glu scavengerként alkalmazott OxAc neuroprotektív hatásához. Az OxAc *in vivo* és *in vitro* ischaemiás modellben való vizsgálata során kapott eredmények egyértelműen mutatják, hogy a hatóanyag protektív volt az inzultussal szemben.

8.3 OxAc és Ketoglutarát hatása a szomatoszenzoros kiváltott potenciálokra

Következő kísérletsorozatunkban a megválaszolendő kérdés az volt, hogy az OxAc i.v. alkalmazása során megváltozik-e, és ha igen, milyen módon az altatott állat agyi neuronális aktivitása? Előzetes elképzelésünk szerint azt vártuk, hogy a vér lecsökkent Glu koncentrációja negatív hatással lesz az általános agyi aktivitásra, ami a szomatoszenzoros kiváltott potenciálok amplitúdó-csökkenését eredményezheti. Ezzel szemben az OxAc dózisfüggő módon növelte a regisztrált amplitúdókat. Ez a hatás a hatóanyag beadása után 10-20 perc elteltével jelentkezett, és 1, 1-5 órát követően stabilizálódott az adott, akár 180%-os szinten. Az általunk intravénásan alkalmazott koncentrációk (1,25; 2,5 és 5 mg/100 g) több kísérletsorozatban is neuroprotektívnek bizonyultak. A 1,25 mg/100 g OxAc redukálta a fototrombotikus lézió méretét és a degenerálódó neuronok számát (Nagy és mtsai. 2009), míg más kísérleteknél ez a dózis önmagában nem csökkentette a vér Glu koncentrációját, valamint nem volt megfigyelhető hatása a patológiás folyamatokra sem (Campos és mtsai. 2011a). Saját méréseink során ez a koncentráció nem befolyásolta a SEP-k amplitúdóját. A 2 mg/100 g-os, illetve ennél nagyobb dózisok számos vizsgálatban neuroprotektív hatásúnak bizonyultak (Boyko és mtsai. 2012a; Campos és mtsai. 2011a; Zlotnik és mtsai. 2007). Kísérleteinkben az OxAc nagyobb dózisban alkalmazva (2,5 és 5 mg/100 g) jelentős mértékben növelte a SEP-ek amplitúdóit. Ezen jelenség magyarázata nem tűnik egyszerűnek és számos kérdést vet fel. A kéregről elvezetett SEP-et több – különböző szinten elhelyezkedő – idegi elem együttesen alakítja ki, így az amplitúdó-növekedés háttérében húzódó konkrét neuronális változások nehezen azonosíthatók. Emellett azonban kísérletesen vizsgálható, hogy a vér glutamát koncentrációjának változása összefüggésben áll-e a SEP-ek amplitúdó-növekedésével. Ismert tény, hogy az intravénásan alkalmazott OxAc jelentősen lecsökkenti a vér Glu koncentrációját (Gottlieb és mtsai. 2003). Ha ugyanilyen körülmények között OxAc helyett AKG-t alkalmazunk, akkor a GOT és GPT enzimreakció segítségével csökkentés helyett növelhetjük a vér Glu koncentrációját. Kísérleteink során az ekvimoláris

koncentrációjú AKG, valamint az fele-fele arányú OxAc-AKG keverék, az OxAc-hoz hasonlóan megnövelte a SEP-ek amplitúdóit. A növekvő tendencia rendkívül hasonló volt a különböző kezelt csoportoknál, 1 órával a kezelést követően minden esetben szignifikáns különbséget tapasztaltunk a kontroll periódushoz képest. Ezen eredmény azt sugallja, hogy valószínűleg nem a vér Glu szint változása áll a SEP-ek amplitúdónövekedésének hátterében. Az i.v. injektálás során a keringésbe juttatott molekulák összetett változást okozhatnak a GOT és GPT enzim termékeinek (AKG, Glu, OxAc, Asp és Pyr) arányában és koncentrációjában. Feltételezhetően ezen anyagok fiziológiai hatásai eredményezik a tapasztalt változást. A molekulák széles hatásspektrummal rendelkeznek, így a jelenség pontos magyarázata sem egyszerű.

Elsőként felmerülhet, hogy a tapasztalt amplitúdó-növekedés az injektálást követően feleslegben lévő általános anyagcsere intermedierek valamilyen metabolikus hatásához köthető. Az alkalmazott molekulák ugyanis, serkentetik a sejtek általános anyagcseréjét, közvetlenül a Szent-Györgyi–Krebs cikluson keresztül, illetve az anaplerotikus reakciók során átalakulhatnak más, éppen hiányban lévő metabolittá. Az OxAc metabolikus és antioxidáns (nem Glu scavenger) hatásai révén, valamint az OxAc kémiai szerkezetével és biológiai szerepével párhuzamba hozható AKG már több kísérletben bizonyult neuroprotektívnek (Desagher és mtsai. 1997; Puntel és mtsai. 2007; Yamamoto és Mohanan 2003). A globális agyi ischaemia hatására beinduló neuronális, illetve gliális degeneráció csökkenthető volt az állatok ivóvizében oldott AKG-val (Kovalenko és mtsai. 2011). Hasonló kísérleti elrendezésben, hasonló koncentrációjú OxAc-t alkalmazva (ivóvízben oldva) a kezelés szignifikáns mértékben csökkentette az implantált glióma növekedését és méretét (Ruban és mtsai. 2012). Utóbbi kísérletnél a szerzők a pozitív hatást a Glu scavenging-hez kötötték. A lehetséges metabolikus hatás ellen szólhat az *in vitro* kísérleteinkben kapott eredmény is, mely során az 50 percig alkalmazott 0,1 és 1 mM OxAc nem volt hatással a kiváltott fEPSP-ekre. Amellett, hogy az ivóvízbe kevert, illetve i.v. alkalmazott OxAc (illetve az AKG is) kedvező metabolikus úton kifejtett hatással is bír, nehéz közvetlen magyarázatot adni a saját kísérleteinknél tapasztalt amplitúdónövekedés hátterében húzódó mechanizmusra. Másik fontos szempont lehet az, hogy a GOT és GPT enzimreakciók során nagymértékben változó koncentrációjú köztitermékek között van neurotransmitter, illetve neuromodulátoros tulajdonságú is. A Glu, mint az egyik legfontosabb serkentő neurotransmitter szélesebb spektrumú hatással lehet a KIR működésére. Megváltozott koncentrációja a vérben befolyásolhatja a glutamáterg transzmissziót, továbbá eltolhatja az agyi általános serkentő-gátló egyensúlyt (Foster és Kemp 2006) a gátló (GABAerg) szinaptikus transzmisszió

közvetlen szabályozásával (Farazifard és Wu 2010; Kullmann és Semyanov 2002). A Glu mellett fontos hatása lehet még az Asp-nak is, ami nagy affinitással kötődik az NMDA receptorokhoz (Chen és mtsai. 2005). Ezek mellett további számos magyarázat felmerülhet, például a szervezet egészére kiható esetleges szisztémás hatás. Jelenleg nem tudunk egyértelmű és közvetlen magyarázatot adni erre a különösen jól reprodukálható jelenségre, így a felmerülő számos lehetséges magyarázat megerősítéséhez további kísérletek szükségesek. A pontos hatásmechanizmus hiányában is, összességében kijelenthetjük, hogy az alkalmazott OxAc és AKG hatására nagymértékű változás történt egy fontos érzőrendszerben, mely utalhat a Glu scavenging eddig nem ismert esetleges mellékhatására is, ami hozzájárul ezen neuroprotektív stratégiával kapcsolatos ismereteink bővítéséhez.

8.4 Az OxAc és a Glu scavenging alkalmazhatósága

A Glu a legfontosabb serkentő neurotranszmitter az emlős agyban (Zhou és Danbolt 2014), emellett hosszan tartó magas szintje az ISF-ben erősen citotoxikus (Rothman 1984). Ezt a jelenséget nevezzük excitotoxicitásnak, mely számos pathológiás folyamatban megfigyelhető. Ilyen például a traumás agysérülés, az agyi ischaemia, a sclerosis multiplex, az epilepszia és az Alzheimer kór (Gillissen és mtsai. 2002; Leibowitz és mtsai. 2012). Az ISF Glu homeosztázisát különböző transzporterek és intracelluláris enzimek szabályozzák (Danbolt 2001). Az EAAT-k jelen vannak az asztrociták (EAAT 1, 2) (Lehre és mtsai. 1995), a posztzinaptikus neuronok (EAAT 3) (Conti és mtsai. 1998) és az endothél sejtek (EAAT 1, 2, 3) (Helms és mtsai. 2012; O'Kane és mtsai. 1999; Roberts és mtsai. 2014) plazmamembránjában. Az endothél sejteken lévő EAAT-k működése révén valósul meg az agy és a vér közötti Glu transzport. Ischaemiás körülmények között sérül az EAAT funkció, ugyanis közvetett összefüggés van a pumpaműködés és az ATP szint között. Az EAAT-k működése során a Glu mellett három Na^+ és egy H^+ jut be, valamint egy K^+ ion jut ki a sejtől a plazmamembránon keresztül. Ez a transzportfolyamat szoros összefüggésben van a Na/K pumpával (Rose és mtsai. 2009). A lecsökkent ATP szint következtében kialakuló depolarizáció esetén megfigyelhető az EAAT-k inverz működése (Nicholls és Attwell 1990), mely tovább növelheti az ISF Glu koncentrációját. Az endothél sejtek membránpotenciálja jobban megtartott, így lehetséges a nagymennyiségű Glu felvétele, majd a vérbe juttatása (Teichberg és mtsai. 2009). Az endothél sejtek luminális oldalán a Glu transzport végbemegy, azonban jelenleg nincs egyértelmű bizonyíték arra, hogy ez milyen módon valósul meg (Cederberg-Helms és mtsai. 2014). A Glu scavengerek az agy \rightarrow vér irányú Glu elmozdulást

erősítik fel a vér Glu szintjének egyidejű lecsökkentésével. Több molekula, illetve enzim áll rendelkezésre, hogy ezt a hatást kiváltsuk, melyek közül az egyik leghatékonyabb az általunk is használt OxAc.

Az OxAc nagyon széles hatásspektrumú molekula, mely alkalmazásával egyesíthető a metabolikus és Glu scavenger hatás is. Nem véletlen, hogy az utóbbi években egyre több tanulmány jelenik meg ebben a témakörben (Boyko és mtsai. 2014). Az OxAc neuroprotektívnek bizonyult kísérletes traumás agysérülés (Zlotnik és mtsai. 2009; Zlotnik és mtsai. 2007), stroke (Campos és mtsai. 2011a; Nagy és mtsai. 2009) és SAH (Boyko és mtsai. 2012a) modelleken is. Az OxAc csökkentette az indukált epilepszia következtében apoptotizáló sejtek számát a hippocampális CA1-es régióban (Carvalho és mtsai. 2011), valamint csökkentette az organikus foszfát toxikus hatását (Ruban és mtsai. 2014). Klinikai vizsgálatok során összefüggést találtak a vér GOT és Glu koncentrációja és a migrén megjelenése között (Campos és mtsai. 2013). A migrénes pácienseknél alacsonyabb a GOT aktivitás és magasabb a vér Glu szintje. Ezen összefüggés szintén megfigyelhető a stroke utáni kedvező, illetve rossz kimenetel kapcsán (Campos és mtsai. 2011b). A pozitív kimenetelű stroke-os páciensek vér Glu szintje alacsonyabb, míg GOT aktivitása szignifikánsan magasabb volt. Ezen megfigyelések rámutatnak arra, hogy a vér Glu szintje illetve a GOT enzim kiemelten fontos tényező a különböző patológiás folyamatokban. A Glu scavenging további előnye, hogy a hatás a perifériás kezelés ellenére csak lokálisan érvényesül, azon a területen ahol megváltozott a IST Glu koncentrációja. Hátrányos szempontként merülhet föl, hogy az OxAc effektív dózisa ember esetén túl nagy lenne, ám ez jelentősen csökkenthető a rekombináns GOT alkalmazásával (Teichberg 2011). A Glu scavenging alkalmazhatóságával kapcsolatban fontos tény, hogy embernél a vér Glu homeosztázia során – már a cirkadián ritmusban- megfigyelhető akár 50% változás is (Tsai és Huang 2000), valamint a plazma GOT szintje is többszörösére nőhet meg patológiás folyamatok nélkül is.

Az új neuroprotektív megközelítések és stratégiák vizsgálata rendkívül fontos a különböző neurodegeneratív betegségek és elváltozások kapcsán. A stroke-kal kapcsolatos intenzív kutatások eredményeként már számos – állatkísérletekben neuroprotektívnek bizonyuló- hatóanyag került a klinikai fázisba, ám ennek ellenére a kísérleti gyógyszerek, szinte kivétel nélkül mind elbuktak valamelyik fázisban (Ginsberg 2009). Az eddigi kísérleteket tekintve a Glu scavenging, valamint az OxAc hatása nagyon ígéretesnek tűnik. Az eljárás iránti egyre bővülő tudományos ismeretanyag és a fokozódó figyelem jelzi a módszer kiemelten nagy potenciális relevanciáját (Boyko és mtsai. 2014; Campos és mtsai. 2012; Teichberg 2011).

Remélhetőleg a preklinikai vizsgálatok (állatkísérletek) minél hamarabb közelebb visznek bennünket ahhoz, hogy megszülessen az a protokoll, melyben az OxAc alkalmazásával számos betegség kezelésében, gyógyításában érhetünk el jelentős eredményeket.

9. Következtetések

Munkánk során egy új fokális ischaemiás modellt teszteltünk, valamint vizsgáltuk az OxAc hatásait többféle kísérleti elrendezésben

Célkitűzés 1

A kapott eredmények alapján kijelenthetjük, hogy

- az ischaemiás modell alkalmazásánál, a fizikai behatás következtében nem jelentkezett makroszkópos szöveti, illetve érsérülés.
- a módszerrel egyszerűen létrehozható repetitív ischaemia-reperfúziós periódus, így alkalmas a TIA modellezésére is.
- a modellünk segítségével létrehozott dMCAO hatása könnyen detektálható volt elektrofiziológiai módszerekkel.
- a különböző hosszúságú ischaemiás periódusok hatása többféle hisztológiai eljárással is nyomonkövethető volt.
- modellünk alkalmasnak bizonyult neuromodulátoros, neuroprotektív farmakonok hatásának tesztelésére is. Segítségével vizsgálható volt az OxAc, mint Glu scavenger neuroprotektív hatása.

Célkitűzés 2

A kapott eredmények alapján kijelenthetjük, hogy

- az OxAc különböző dózisaiban normál (nem ischaemiás) körülmények között nem befolyásolták a hippocampusban kiváltott fEPSP-eket.
- a metabolikus és antioxidáns hatásával az OxAc, 1 mM-os dózisban alkalmazva neuroprotektívnek bizonyult a globális ischaemiával szemben.

Célkitűzés 3

A kapott eredmények alapján kijelenthetjük, hogy

- az OxAc dózisfüggő módon növelte a szomatoszenzoros potenciálok amplitúdóit.
- a 2,5 mg/100 g volt a legkisebb OxAc dózis, mely hatására növekedő tendenciát mutattak az amplitúdók.
- ez a hatás valószínűleg nincs közvetlen összefüggésben a vér Glu szintjének csökkenésével.

Kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy kidolgoztunk egy új, egyszerűen kivitelezhető és jól reprodukálható fokális ischaemiás modellt, melynek alkalmazásával lehetőségünk van a perfúzió pontos szabályzására, illetve adott szintre való belállítására. Modellünk alkalmazásával újabb bizonyítékot adtunk a Glu scavenging és az OxAc neuroprotektív hatására. *In vitro* kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy az OxAc, metabolikus és antioxidáns tulajdonságai révén neuroprotektívnek bizonyult a globális ischaemiával szemben. Végül kijelenthetjük, hogy az intravénásan alkalmazott OxAc jelentősen befolyásolta a szomatoszenzoros kiváltott válaszokat, ami jelzi a Glu scavenging mellett jelentkező további hatások vizsgálatának szükségességét.

10. Összefoglaló

Napjainkban az ischaemiás stroke-hoz és más agyér-katasztrófákhoz köthető halálesetek előkelő helyet foglalnak el a halálozási statisztikákban. Mivel jelenleg nem áll rendelkezésre széles körben alkalmazható beavatkozási lehetőség, emiatt a stroke-kal kapcsolatos kutatások kiemelten fontosak. Az elégtelen agyi keringés, illetve vérellátási hiány következményeként számos káros folyamat indul be, melyek végeredményben agyi sérüléshez vezetnek. Az ischaemia alatt fellépő oxigén- és tápanyaghiány következtében felborul a sejtek energiaháztartása, és beindulnak az ischaemiás kaskád-folyamatok. A csökkent ATP szint miatt a sejtek depolarizálódnak, és sérül az ionháztartás. A megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció végül a sejtek halálához vezet. A depolarizáció hatására fokozott neurotranszmitter felszabadulás figyelhető meg, mely nagymértékben hozzájárul a másodlagos sérülések kialakításához. A glutamát (Glu) – mint az egyik legfontosabb serkentő neurotranszmitter – megemelkedett szintje rendkívül káros. Az ekkor fellépő, általa mediált folyamatokat hívjuk Glu excitotoxicitásnak. A Glu szintjének csökkentése kivédheti, mérsékelheti a másodlagos károsodásokat, így ez alapjául szolgál számos neuroprotektív stratégiának. Ennek ellenére a legtöbb ilyen jellegű farmakológiai beavatkozás sikertelennek bizonyult a klinikai gyakorlatban. Az egyik ígéretes metodika a Glu scavenging, mely során az emelkedett agyi Glu szint csökkenthető a Glu agyból vérbe történő transzportjának megerősítésével, melyet a vér Glu szintjének csökkentésével idézhetünk elő. A Glu szint csökkentéséhez felhasználhatjuk a vérben lévő GOT enzim (Glu-Oxálecetsav-Transzamináz) által katalizált egyensúlyi enzimreakciót, mely során Glu és oxálecetsav (OxAc) alakul aszpartáttá és 2- α -ketoglutaráttá (AKG). Az OxAc, intravénás adminisztrációjával az egyensúly eltolható és a vér glutamát koncentrációja lecsökkenthető, ezzel megerősítve az agyból a vér irányába zajló Glu-effluxot. Ez a technika már több állatkísérletben bizonyult neuroprotektívnek, azonban a pontos mechanizmus, illetve az OxAc-hoz köthető további hatások részleteiben nem ismertek teljesen. Az új neuroprotektív kezelések és terápiák kialakításához szükséges az ischaemiás folyamatok alaposabb megismerése, melyhez elengedhetetlen a különböző állatkísérletes modellek alkalmazása. Ezen modellek segítségével több aspektusból vizsgálhatók az agyi ischaemia különböző folyamatai, valamint a lehetséges neuroprotektív farmakonok hatása is. A stroke kutatáshoz számos különböző állatmodell áll rendelkezésre, ám még mindig vannak olyan vizsgálati szempontok, melyekhez nincs ideális kísérleti állatmodell.

Munkánk során kialakítottunk egy saját ötleten alapuló új fokális agyi ischaemiás modellt, mely során egy hajlított végű érsebészeti eszközzel, mikromanipulátorok segítségével emeljük meg a középső agyi artériát (MCA), így létrehozva az ér elzárását. Továbbiakban ezen metodikát alkalmazva vizsgáltuk a létrehozott ischaemiás állapotok hatását elektrofiziológiai és hisztológiai technikákkal, valamint modellünkön tanulmányoztuk az OxAc Glu scavenger hatását. A kialakított agyi ischaemia hatása elektrofiziológiai módszerekkel könnyen detektálható volt. Az ischaemiás periódus alatt, az MCA által ellátott kérgi szomatoszenzoros területről elvezetett EEG teljesítmény spektruma jelentősen eltért a kontroll szakaszban regisztrált értékektől, valamint a perifériás ingerléssel kiváltott szomatoszenzoros kérgi potenciálok amplitúdó-csökkenésén is jól nyomonkövethető volt az ischaemia hatása. Az első kísérletes elrendezésben 2 x 15 perces ischaemiás, valamint 30 perc köztes reperfúziós periódust alkalmaztunk. Az MCA elzárásakor a kiváltott potenciálok amplitúdói gyors csökkenő tendenciát követően eltűntek, majd a reperfúzió során ismét megjelentek, de a regisztráció végéig nem tértek vissza kontroll szintre, és mintegy 60%-os értéken stabilizálódtak. A mérések után, 1 nap túlélési időt követően TTC és Fluoro Jade C (FJC) festést végeztünk makroszkópos, illetve a finomszerkezeti sérülések kimutatásához. A TTC festés során nem volt kimutatható szöveti sérülés, míg a degenerálódó neuronokat festő FJC esetén intenzív jelölődést tapasztaltunk az érintett kortikális területeken. További kísérletekben vizsgáltuk a 30, 45 és 60 perces ischaemia hatására bekövetkező hisztológiai változásokat. 1 nap túlélési idő mellett azonban nem tapasztaltunk FJC jelölődést egyik csoportnál sem. 30 perces ischaemia hosszabb távú hatását vizsgáltuk 5 nap túlélési időt követően is. A kísérletsorozatban az állatok felénél tapasztaltunk jelölődést. Ezen csoportnál a FJC festéssel, valamint az immunjelöléssel az ischaemiás féltekén kimutatható volt a neuronális degeneráció és az aktivált asztrocita és mikroglia sejtek megjelenése. Az OxAc Glu scavenger hatását a 2 x 15 perces kísérleti paradigmában vizsgáltuk. Az első ischaemiás inzultus alatt alkalmazott OxAc hatására a kiváltott potenciálok már az MCA elzárása alatt növekedést mutattak, majd rövidesen kontroll szintre tértek vissza. 1 nap túlélési időt követően tapasztaltunk FJC jelölődést, azonban a degenerálódó sejtek száma kevesebb volt, mint az ischaemiás kontroll csoport esetében.

Következő kísérletsorozatunkban az OxAc metabolikus és antioxidáns hatását vizsgáltuk a túlélő agyszeleten kiváltott hippocampális fEPSP-kre fiziológias és ischaemiás körülmények között. Méréseink során oxigén és glükóz megvonásával (OGD) idéztük elő az ischaemiás állapotot az agyszeletekben. Az mesterséges agy-gerincvelői folyadékban (aCSF) oldott OxAc egyik alkalmazott koncentráció (0.1 és 1 mM) esetén sem gyakorolt hatást normál

körülmények között az fEPSP-kre. Az OGD-s kísérletek esetén, az ischaemiás inzultus első perceiben megfigyelhető kismértékű amplitúdó-növekedés után az fEPSP-k eltűntek, és a 15 perces ischaemiás periódus után sem jelentek meg. A 0,1 mM OxAc hatására az OGD-t követően átmenetileg megjelentek az fEPSP-k, de rövid időn belül eltűntek. Az 1 mM-os koncentráció alkalmazásával az fEPSP-k gyors, növekedő tendencia mellett kontroll szintre tértek vissza az OGD periódust követően.

A harmadik kísérletsorozatunkban vizsgáltuk az OxAc szomatoszenzoros kérgi kiváltott potenciálokra gyakorolt hatását. Az intakt állatokon történő méréseink során első lépésben az OxAc-ot intravénásan, különböző – *in vivo* kísérletekben neuroprotektív hatást mutató – koncentrációban alkalmaztuk, mely során dózfüggő amplitúdónövekedést tapasztaltunk. A legnagyobb, 5 mg/100 g-os dózis esetén 1 órával a beadást követően mintegy 180%-os növekedést tapasztaltunk, míg a legkisebb, 1,25 mg/100 g-os dózis nem volt hatással a kiváltott potenciálokra. Következő méréseinkben az OxAc mellett – a vér Glu szintjét növelő, OxAc Glu scavenger hatásával ellentétes – AKG hatását is vizsgáltuk. Az ekvimoláris koncentrációban alkalmazott AKG, illetve az fele-fele arányú OxAc-AKG keverék is hasonló módon és mértékben növelte a kiváltott potenciálok amplitúdóit.

Összegezve elmondható, hogy az általunk kialakított modell esetén a műtéti eljárás kivitelezése egyszerű, jól reprodukálható és elhanyagolható a mortalitás. Az ischaemia hatására bekövetkező funkcionális és struktúrális sérülések is nyomonkövethetők különböző vizsgálati módszerekkel is. A modell alkalmasnak bizonyult OxAc hatásának vizsgálatánál is, mely során újabb bizonyítékot kaptunk a Glu scavenging neuroprotektív hatásáról. Az ér emelésével kiváltott okklúzió mértéke finoman szabályozható a mikromanipulátorok segítségével, így egyedülálló módon a perfúzió adott szintre beállítható, valamint egyszerűen és sérülésmentesen váltható ki több, tetszőleges hosszúságú ischaemiás periódus. A modell segítségével jól modellezhető a TIA jelensége. *In vitro* kísérleteinkben tapasztalt eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az OxAc 0,1, illetve 1 mM koncentrációban alkalmazva nincs hatással a kiváltott fEPSP-kre, ám az 1 mM OxAc ischaemiás körülmények között jelentős neuroprotektív hatással bír az antioxidáns és metabolikus tulajdonságai révén. Az *in vivo* méréseinknél az OxAc mellett az AKG, valamint a keverékük is növelte a kiváltott potenciálok amplitúdóit, ebből kifolyólag valószínűleg a hatás nincs összefüggésben a vér Glu szintjének változásával. Jelenleg sajnos nem áll rendelkezésünkre magyarázat a háttérben húzódó folyamatokra, de fontos megállapítani azt, hogy a különböző állatkísérletes stroke modellekben neuroprotektív OxAc dózis jelentős hatással volt fiziológiás körülmények között

egy fontos szomatoszenzoros rendszerre. Számos kísérletes bizonyíték alapján a Glu scavenging, valamint az OxAc hatása nagyon ígéretesnek tűnik. Az eljárás iránti egyre bővülő tudományos ismeretanyag és a fokozódó figyelem jelzi a módszer és a molekula kiemelten nagy potenciálját az esetleges jövőbeli klinikai alkalmazásban.

11. Summary

Cerebrovascular diseases and stroke currently occupy a prominent place worldwide in the statistics of causes of death. At present, there is no generally available possibility to prevent the harmful effects of brain ischemia, and the study of stroke and experimental investigations in this scientific field are therefore highly important. During brain ischemia, the reduced level of perfusion induces the heterogeneous chemical processes of the ischemic cascade. In this cascade, the hypoxic and hypoglycemic state leads to cellular bioenergetic failure, membrane depolarization, a high intracellular Ca^{2+} level, excitotoxicity and oxidative stress. These processes finally result in the death of cells and tissue damage. The elevated level of glutamate (Glu), the main excitatory neurotransmitter in the mammalian brain, has an especially important role in excitotoxicity, which is strongly connected to the secondary tissue damage. A decrease of the Glu level in the interstitial space can therefore be neuroprotective. One of the promising neuroprotective strategies, based on a decrease of the excess brain Glu concentration, is Glu scavenging. Briefly, this involves activation of blood-resident Glu-oxaloacetate transaminase (GOT), which results in a lowering of the blood Glu level by the transamination of Glu and oxaloacetate (OxAc) into 2- α -ketoglutarate (AKG) and aspartate, with an accelerated efflux of the excess brain Glu into the blood. The intravenous administration of OxAc, as GOT cosubstrate, can therefore decrease the blood Glu level. Glu scavenging with the use of OxAc has proved to be neuroprotective in numerous studies, but the details of the underlying mechanisms are not yet clearly understood.

In order to develop novel neuroprotective treatments and therapies, investigations of the pathomechanisms of ischemia are essential. The use of animal models provides an opportunity to study the various processes from several aspects and to test potential neuroprotective pharmacons. Despite the numerous available experimental stroke models, however, certain aspects can not be investigated with these methods.

In our first series of experiments, we tested a novel focal ischemic model based on occlusion of the middle cerebral artery (MCAO), performed by lifting the vessel with a microsurgery hook with the aid of micromanipulators. The consequences of MCAO were then investigated with electrophysiological and histological methods, and we thereafter examined the effects of OxAc.

The functional changes were readily detectable in the cortical fields supplied by the MCA: the power spectra of the recorded EEG samples and the amplitudes of the cortical somatosensory evoked responses (SERs) from the control and ischemic period differed significantly. In the first group, we applied 2×15 -min ischemic episodes interrupted by a 30-min reperfusion. The amplitudes of the SERs decreased immediately at the beginning of the ischemic period, and then soon disappeared. Reperfusion resulted in the appearance and a gradual increase in amplitude of the SERs, although the amplitudes never regained the control level, attaining only around 60% of it. After a survival time of 1 day, following of the 2×15 -min MCAO, there was no detectable tissue damage with the use of TTC, but well-outlined Fluoro Jade C (FJC)-positive degenerating neurons were seen throughout the ipsilateral somatosensory cortex. After a 30-, 45- or 60-min ischemic period, no FJC staining positivity was observed. In another series of experiments with a 5-day survival period, we examined the changes resulting from 30-min MCAO. FJC-positive labeling was observed in half of the animals, and S100+ and CD11b+ immunohistochemically labeled reactive astrocytes and activated microglia cells were also detected in these animals. The Glu-scavenging effect of OxAc was examined in the 2×15 -min experimental paradigm in the MCAO model. When OxAc was applied in the first ischemic period, the decreased amplitudes of the SERs began to recover even during the ischemia, and finally reached the control level. After a survival time of 1 day, the OxAc treatment proved to be protective against the focal cerebral ischemia, since it led to fewer FJC-labeled cells in the same area as compared with the ischemic control group.

In *in vitro* experiments, we investigated the possible metabolic and antioxidant effects of OxAc on hippocampal field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) under physiological and ischemic conditions evoked by oxygen-glucose-deprivation (OGD). OxAc at 0.1 or 1 mM in artificial cerebrospinal fluid caused no changes in the fEPSPs during the recording period. The fEPSP amplitudes slightly increased, but then started to decrease and finally disappeared during and after the OGD. The application of 0.1 mM OxAc resulted in short transient increases in amplitudes of the fEPSPs, but they had again disappeared at the end of the recording period. 1 mM OxAc, however, increased the fEPSPs, which finally reached the control levels of fEPSP amplitudes and slopes.

In our final experiments we, examined the possible effects of OxAc on the SERs under normal (non-ischemic) conditions. The applied doses of OxAc (1.25, 2.5 and 5 mg/100 g) had earlier proved neuroprotective in other *in vivo* studies. In contrast with our expectation, OxAc administration (i.v.) resulted in an increase in the amplitude of the SERs, this phenomenon demonstrating definite time and dose dependences. OxAc at 1.25 mg/100 g had no effect on

the SERs, but the highest dose (5 mg/100 g) of OxAc increased the amplitudes to 180–200% of the control level. In the AKG was applied i.v.; this molecule has an opposite effect on the blood Glu level (a decreasing effect), but its metabolic and antioxidant properties are similar. Administration of equimolar AKG and also a 1:1 OxAc-AKG mixture resulted in the increases in the SER amplitudes, in a similar manner as in the OxAc group.

To summarize, this simple model involving lifting of the distal MCA is highly reproducible for the induction of short-lasting, focal transient cortical ischemia in the rat. The early functional and later structural consequences of the brain ischemia following MCAO can be readily observed and examined. OxAc proved to be neuroprotective. These results clearly demonstrate the effect of OxAc as a Glu scavenger, and the value of this ischemic model for the investigation of different neuroactive pharmacological agents. This new method offers an easy way to study the effects of transient ischemic attacks with precise regulation of the blood flow, and to set the required level of perfusion. In our *in vitro* experiments, 0.1 and 1 mM OxAc had no effect on the evoked hippocampal fEPSPs under normal conditions, whereas 1 mM OxAc was neuroprotective against the harmful effects of the 15-min OGD via its metabolic and antioxidant action. In our last *in vivo* experiments, OxAc and AKG increased the amplitudes of the SERs. This result suggests that this phenomenon is not based on the changes in blood Glu level. At present, we cannot specify the underlying mechanisms. Further investigations are required to elucidate these processes. However, it may be concluded that OxAc doses provide many beneficial effects and neuroprotection can influence the important somatosensory system under normal conditions. Many promising studies have suggested the advantages of the effects of Glu scavengers, and especially OxAc, which strengthens the view that it may potentially be applied as a novel neuroprotective agent for the treatment of ischemic stroke patients in the future.

12. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm Dr. Toldi József Professzor Úrnak, hogy megtisztelt bizalmával és biztosította az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszéken a tudományos munkához szükséges feltételeket. Továbbá köszönöm a szakmai és erkölcsi tanácsait, a végtelen türelmét, valamint a mindenkori pozitív, segítőkész hozzáállását.

Köszönöm Dr. Farkas Tamásnak, hogy bármikor fordulhattam hozzá tudományos problémáimmal. Kiemelten köszönöm Kocsis KITTINEK a kísérletekben nyújtott, igen nagy segítséget, és a közreműködést valamennyi tudományos munkámban. Köszönöm Dr. Gellért Leventének a rendkívül hasznos szakmai és baráti tanácsait. Köszönöm Dr. Marosi Máténak, Dr. Nagy Dávidnak, Dr. Fuzik Jánosnak, Varga Dánielnek, Oláh Gáspárnak, Herédi Juditnak, valamint a csoport többi régi és jelenlegi tagjának mindennemű segítséget, a baráti légkört és a sok emlékezetes pillanatot. Köszönettel tartozom a tanszék valamennyi munkatársának, különösen Veketyné Váradi Margónak a rengeteg segítségért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek, testvéreimnek és barátaimnak, hogy végig támogattak, bíztattak és átsegítették számos nehéz helyzetben.

13. Irodalomjegyzék

1. Bacigaluppi M, Comi G, Hermann DM (2010) Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. *The open neurology journal* 4:34-38. doi:10.2174/1874205X01004020034
2. Bailey EL, McCulloch J, Sudlow C, Wardlaw JM (2009) Potential animal models of lacunar stroke: a systematic review. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40 (6):e451-458. doi:10.1161/STROKEAHA.108.528430
3. Bailey EL, Smith C, Sudlow CL, Wardlaw JM (2011) Is the spontaneously hypertensive stroke prone rat a pertinent model of sub cortical ischemic stroke? A systematic review. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 6 (5):434-444. doi:10.1111/j.1747-4949.2011.00659.x
4. Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American journal of physiology* 271 (5 Pt 1):C1424-1437
5. Bederson JB, Germano IM, Guarino L (1995) Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 26 (6):1086-1091; discussion 1091-1082
6. Belayev L, Saul I, Curbelo K, Busto R, Belayev A, Zhang Y, Riyamongkol P, Zhao W, Ginsberg MD (2003) Experimental intracerebral hemorrhage in the mouse: histological, behavioral, and hemodynamic characterization of a double-injection model. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 34 (9):2221-2227. doi:10.1161/01.STR.0000088061.06656.1E
7. Bouet V, Freret T, Toutain J, Divoux D, Boulouard M, Schumann-Bard P (2007) Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Experimental neurology* 203 (2):555-567. doi:10.1016/j.expneurol.2006.09.006
8. Boyko M, Gruenbaum SE, Gruenbaum BF, Shapira Y, Zlotnik A (2014) Brain to blood glutamate scavenging as a novel therapeutic modality: a review. *Journal of neural transmission* 121 (8):971-979. doi:10.1007/s00702-014-1181-7
9. Boyko M, Melamed I, Gruenbaum BF, Gruenbaum SE, Ohayon S, Leibowitz A, Brotfain E, Shapira Y, Zlotnik A (2012a) The effect of blood glutamate scavengers oxaloacetate and pyruvate on neurological outcome in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 9 (3):649-657. doi:10.1007/s13311-012-0129-6
10. Boyko M, Stepensky D, Gruenbaum BF, Gruenbaum SE, Melamed I, Ohayon S, Glazer M, Shapira Y, Zlotnik A (2012b) Pharmacokinetics of glutamate-oxaloacetate transaminase and glutamate-pyruvate transaminase and their blood glutamate-lowering activity in naive rats. *Neurochemical research* 37 (10):2198-2205. doi:10.1007/s11064-012-0843-9

11. Boyko M, Zlotnik A, Gruenbaum BF, Gruenbaum SE, Ohayon S, Kuts R, Melamed I, Regev A, Shapira Y, Teichberg VI (2011) Pyruvate's blood glutamate scavenging activity contributes to the spectrum of its neuroprotective mechanisms in a rat model of stroke. *The European journal of neuroscience* 34 (9):1432-1441. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07864.x
12. Brecht M (2007) Barrel cortex and whisker-mediated behaviors. *Current opinion in neurobiology* 17 (4):408-416. doi:10.1016/j.conb.2007.07.008
13. Brouns R, De Deyn PP (2009) The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical neurology and neurosurgery* 111 (6):483-495. doi:10.1016/j.clineuro.2009.04.001
14. Buchan AM, Xue D, Slivka A (1992) A new model of temporary focal neocortical ischemia in the rat. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 23 (2):273-279
15. Campos F, Sobrino T, Perez-Mato M, Rodriguez-Osorio X, Leira R, Blanco M, Mirelman D, Castillo J (2013) Glutamate oxaloacetate transaminase: a new key in the dysregulation of glutamate in migraine patients. *Cephalalgia : an international journal of headache* 33 (14):1148-1154. doi:10.1177/0333102413487444
16. Campos F, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Argibay B, Agulla J, Perez-Mato M, Rodriguez-Gonzalez R, Brea D, Castillo J (2011a) Neuroprotection by glutamate oxaloacetate transaminase in ischemic stroke: an experimental study. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31 (6):1378-1386. doi:10.1038/jcbfm.2011.3
17. Campos F, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Castellanos M, Blanco M, Rodriguez-Yanez M, Serena J, Leira R, Castillo J (2011b) High blood glutamate oxaloacetate transaminase levels are associated with good functional outcome in acute ischemic stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31 (6):1387-1393. doi:10.1038/jcbfm.2011.4
18. Campos F, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Castillo J (2012) Oxaloacetate: a novel neuroprotective for acute ischemic stroke. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44 (2):262-265. doi:10.1016/j.biocel.2011.11.003
19. Canazza A, Minati L, Boffano C, Parati E, Binks S (2014) Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies. *Frontiers in neurology* 5:19. doi:10.3389/fneur.2014.00019
20. Carvalho AS, Torres LB, Persike DS, Fernandes MJ, Amado D, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Cavalheiro EA, da Silva AV (2011) Neuroprotective effect of pyruvate and oxaloacetate during pilocarpine induced status epilepticus in rats. *Neurochemistry international* 58 (3):385-390. doi:10.1016/j.neuint.2010.12.014
21. Cederberg-Helms HC, Uhd-Nielsen C, Brodin B (2014) Glutamate Efflux at the Blood-Brain Barrier: Cellular Mechanisms and Potential Clinical Relevance. *Archives of medical research*. doi:10.1016/j.arcmed.2014.11.004

22. Chan PH (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21 (1):2-14. doi:10.1097/00004647-200101000-00002
23. Chen M, Lu TJ, Chen XJ, Zhou Y, Chen Q, Feng XY, Xu L, Duan WH, Xiong ZQ (2008) Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39 (11):3042-3048. doi:10.1161/STROKEAHA.108.521898
24. Chen PE, Geballe MT, Stansfeld PJ, Johnston AR, Yuan H, Jacob AL, Snyder JP, Traynelis SF, Wyllie DJ (2005) Structural features of the glutamate binding site in recombinant NR1/NR2A N-methyl-D-aspartate receptors determined by site-directed mutagenesis and molecular modeling. *Molecular pharmacology* 67 (5):1470-1484. doi:10.1124/mol.104.008185
25. Choi DW (1995) Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends in neurosciences* 18 (2):58-60
26. Collidge TA, Lammie GA, Fleming S, Mullins JJ (2004) The role of the renin-angiotensin system in malignant vascular injury affecting the systemic and cerebral circulations. *Progress in biophysics and molecular biology* 84 (2-3):301-319. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2003.11.003
27. Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Rothstein JD, Melone M (1998) EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cerebral cortex* 8 (2):108-116
28. Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Progress in neurobiology* 65 (1):1-105
29. Danton GH, Dietrich WD (2003) Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62 (2):127-136
30. DeBette S, Markus HS (2010) The clinical importance of white matter hyperintensities on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *Bmj* 341:c3666. doi:10.1136/bmj.c3666
31. del Zoppo GJ, Hallenbeck JM (2000) Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thrombosis research* 98 (3):73-81
32. del Zoppo GJ, Poeck K, Pessin MS, Wolpert SM, Furlan AJ, Ferbert A, Alberts MJ, Zivin JA, Wechsler L, Busse O, et al. (1992) Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke. *Annals of neurology* 32 (1):78-86. doi:10.1002/ana.410320113
33. Delorme A, Makeig S (2004) EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. *Journal of neuroscience methods* 134 (1):9-21. doi:10.1016/j.jneumeth.2003.10.009
34. Desagher S, Glowinski J, Premont J (1997) Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (23):9060-9067

35. Donnan GA, Davis SM, Parsons MW, Ma H, Dewey HM, Howells DW (2011) How to make better use of thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Nature reviews Neurology* 7 (7):400-409. doi:10.1038/nrneurol.2011.89
36. Ebara S, Kumamoto K, Matsuura T, Mazurkiewicz JE, Rice FL (2002) Similarities and differences in the innervation of mystacial vibrissal follicle-sinus complexes in the rat and cat: a confocal microscopic study. *The Journal of comparative neurology* 449 (2):103-119. doi:10.1002/cne.10277
37. El Kossi MM, Zakhary MM (2000) Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 31 (8):1889-1892
38. Evans MD, Cooke MS (2004) Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26 (5):533-542. doi:10.1002/bies.20027
39. Farazifard R, Wu SH (2010) Metabotropic glutamate receptors modulate glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the central nucleus of the inferior colliculus. *Brain research* 1325:28-40. doi:10.1016/j.brainres.2010.02.021
40. Feldmeyer D, Brecht M, Helmchen F, Petersen CC, Poulet JF, Staiger JF, Luhmann HJ, Schwarz C (2013) Barrel cortex function. *Progress in neurobiology* 103:3-27. doi:10.1016/j.pneurobio.2012.11.002
41. Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH, Group S (2009) Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40 (6):2244-2250. doi:10.1161/STROKEAHA.108.541128
42. Fisher M, Garcia JH (1996) Evolving stroke and the ischemic penumbra. *Neurology* 47 (4):884-888
43. Foster AC, Kemp JA (2006) Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Current opinion in pharmacology* 6 (1):7-17. doi:10.1016/j.coph.2005.11.005
44. Freret T, Bouet V, Leconte C, Roussel S, Chazalviel L, Divoux D, Schumann-Bard P, Boulouard M (2009) Behavioral deficits after distal focal cerebral ischemia in mice: Usefulness of adhesive removal test. *Behavioral neuroscience* 123 (1):224-230. doi:10.1037/a0014157
45. Furuta T, Timofeeva E, Nakamura K, Okamoto-Furuta K, Togo M, Kaneko T, Deschenes M (2008) Inhibitory gating of vibrissal inputs in the brainstem. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (8):1789-1797. doi:10.1523/JNEUROSCI.4627-07.2008
46. Furuta T, Urbain N, Kaneko T, Deschenes M (2010) Corticofugal control of vibrissa-sensitive neurons in the interpolaris nucleus of the trigeminal complex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (5):1832-1838. doi:10.1523/JNEUROSCI.4274-09.2010
47. Gellert L, Knapp L, Nemeth K, Heredi J, Varga D, Olah G, Kocsis K, Menyhart A, Kis Z, Farkas T, Vecsei L, Toldi J (2013) Post-ischemic treatment with L-

- kynurenine sulfate exacerbates neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience* 247:95-101. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.04.063
48. Gillessen T, Budd SL, Lipton SA (2002) Excitatory amino acid neurotoxicity. *Advances in experimental medicine and biology* 513:3-40
 49. Ginsberg MD (2009) Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synaptic overview. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40 (3 Suppl):S111-114. doi:10.1161/STROKEAHA.108.528877
 50. Gottlieb M, Wang Y, Teichberg VI (2003) Blood-mediated scavenging of cerebrospinal fluid glutamate. *Journal of neurochemistry* 87 (1):119-126
 51. Graham TE, Turcotte LP, Kiens B, Richter EA (1995) Training and muscle ammonia and amino acid metabolism in humans during prolonged exercise. *Journal of applied physiology* 78 (2):725-735
 52. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D, Investigators E (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *The New England journal of medicine* 359 (13):1317-1329. doi:10.1056/NEJMoA0804656
 53. Helms HC, Madelung R, Waagepetersen HS, Nielsen CU, Brodin B (2012) In vitro evidence for the brain glutamate efflux hypothesis: brain endothelial cells cocultured with astrocytes display a polarized brain-to-blood transport of glutamate. *Glia* 60 (6):882-893. doi:10.1002/glia.22321
 54. Helmstaedter M, de Kock CP, Feldmeyer D, Bruno RM, Sakmann B (2007) Reconstruction of an average cortical column in silico. *Brain research reviews* 55 (2):193-203. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.07.011
 55. Hudgins WR, Garcia JH (1970) Transorbital approach to the middle cerebral artery of the squirrel monkey: a technique for experimental cerebral infarction applicable to ultrastructural studies. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1 (2):107-111
 56. Iadecola C (1997) Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends in neurosciences* 20 (3):132-139
 57. Iida S, Baumbach GL, Lavoie JL, Faraci FM, Sigmund CD, Heistad DD (2005) Spontaneous stroke in a genetic model of hypertension in mice. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 36 (6):1253-1258. doi:10.1161/01.str.0000167694.58419.a2
 58. Jacquin MF, Chiaia NL, Haring JH, Rhoades RW (1990) Intersubnuclear connections within the rat trigeminal brainstem complex. *Somatosensory & motor research* 7 (4):399-420
 59. Kanold PO, Luhmann HJ (2010) The subplate and early cortical circuits. *Annual review of neuroscience* 33:23-48. doi:10.1146/annurev-neuro-060909-153244

60. Kasahara Y, Ihara M, Nakagomi T, Momota Y, Stern DM, Matsuyama T, Taguchi A (2013) A highly reproducible model of cerebral ischemia/reperfusion with extended survival in CB-17 mice. *Neuroscience research* 76 (3):163-168. doi:10.1016/j.neures.2013.04.001
61. Kelly PJ, Morrow JD, Ning M, Koroshetz W, Lo EH, Terry E, Milne GL, Hubbard J, Lee H, Stevenson E, Lederer M, Furie KL (2008) Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke: the Biomarker Evaluation for Antioxidant Therapies in Stroke (BEAT-Stroke) study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39 (1):100-104. doi:10.1161/STROKEAHA.107.488189
62. Kilic E, Hermann DM, Hossmann KA (1998) A reproducible model of thromboembolic stroke in mice. *Neuroreport* 9 (13):2967-2970
63. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G (1986) Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn Stroke J* 8:1-8. doi:10.3995/jstroke.8.1
64. Kontos HA (2001) Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 32 (11):2712-2716
65. Kovalenko TN, Ushakova GA, Osadchenko I, Skibo GG, Pierzynowski SG (2011) The neuroprotective effect of 2-oxoglutarate in the experimental ischemia of hippocampus. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 62 (2):239-246
66. Krafft PR, Bailey EL, Lekic T, Rolland WB, Altay O, Tang J, Wardlaw JM, Zhang JH, Sudlow CL (2012) Etiology of stroke and choice of models. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 7 (5):398-406. doi:10.1111/j.1747-4949.2012.00838.x
67. Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, Fukunaga N (1982) An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 13 (4):505-508
68. Kullmann DM, Semyanov A (2002) Glutamatergic modulation of GABAergic signaling among hippocampal interneurons: novel mechanisms regulating hippocampal excitability. *Epilepsia* 43 Suppl 5:174-178
69. Lai TW, Zhang S, Wang YT (2014) Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in neurobiology* 115:157-188. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.11.006
70. Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15 (3 Pt 1):1835-1853
71. Leibowitz A, Boyko M, Shapira Y, Zlotnik A (2012) Blood glutamate scavenging: insight into neuroprotection. *International journal of molecular sciences* 13 (8):10041-10066. doi:10.3390/ijms130810041

72. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, Amann M, Anderson HR, Andrews KG, Aryee M, Atkinson C, Bacchus LJ, Bahalim AN, Balakrishnan K, Balmes J, Barker-Collo S, Baxter A, Bell ML, Blore JD, Blyth F, Bonner C, Borges G, Bourne R, Boussinesq M, Brauer M, Brooks P, Bruce NG, Brunekreef B, Bryan-Hancock C, Bucello C, Buchbinder R, Bull F, Burnett RT, Byers TE, Calabria B, Carapetis J, Carnahan E, Chafe Z, Charlson F, Chen H, Chen JS, Cheng AT, Child JC, Cohen A, Colson KE, Cowie BC, Darby S, Darling S, Davis A, Degenhardt L, Dentener F, Des Jarlais DC, Devries K, Dherani M, Ding EL, Dorsey ER, Driscoll T, Edmond K, Ali SE, Engell RE, Erwin PJ, Fahimi S, Falder G, Farzadfar F, Ferrari A, Finucane MM, Flaxman S, Fowkes FG, Freedman G, Freeman MK, Gakidou E, Ghosh S, Giovannucci E, Gmel G, Graham K, Grainger R, Grant B, Gunnell D, Gutierrez HR, Hall W, Hoek HW, Hogan A, Hosgood HD, 3rd, Hoy D, Hu H, Hubbell BJ, Hutchings SJ, Ibeanusi SE, Jacklyn GL, Jasrasaria R, Jonas JB, Kan H, Kanis JA, Kassebaum N, Kawakami N, Khang YH, Khatibzadeh S, Khoo JP, Kok C, Laden F, Lalloo R, Lan Q, Lathlean T, Leasher JL, Leigh J, Li Y, Lin JK, Lipshultz SE, London S, Lozano R, Lu Y, Mak J, Malekzadeh R, Mallinger L, Marcenes W, March L, Marks R, Martin R, McGale P, McGrath J, Mehta S, Mensah GA, Merriman TR, Micha R, Michaud C, Mishra V, Mohd Hanafiah K, Mokdad AA, Morawska L, Mozaffarian D, Murphy T, Naghavi M, Neal B, Nelson PK, Nolla JM, Norman R, Olives C, Omer SB, Orchard J, Osborne R, Ostro B, Page A, Pandey KD, Parry CD, Passmore E, Patra J, Pearce N, Pelizzari PM, Petzold M, Phillips MR, Pope D, Pope CA, 3rd, Powles J, Rao M, Razavi H, Rehfuss EA, Rehm JT, Ritz B, Rivara FP, Roberts T, Robinson C, Rodriguez-Portales JA, Romieu I, Room R, Rosenfeld LC, Roy A, Rushton L, Salomon JA, Sampson U, Sanchez-Riera L, Sanman E, Sapkota A, Seedat S, Shi P, Shield K, Shivakoti R, Singh GM, Sleet DA, Smith E, Smith KR, Stapelberg NJ, Steenland K, Stockl H, Stovner LJ, Straif K, Straney L, Thurston GD, Tran JH, Van Dingenen R, van Donkelaar A, Veerman JL, Vijayakumar L, Weintraub R, Weissman MM, White RA, Whiteford H, Wiersma ST, Wilkinson JD, Williams HC, Williams W, Wilson N, Woolf AD, Yip P, Zielinski JM, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M, AlMazroa MA, Memish ZA (2012) A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380 (9859):2224-2260. doi:10.1016/S0140-6736(12)61766-8
73. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 20 (1):84-91
74. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ (2006) Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 367 (9524):1747-1757. doi:10.1016/S0140-6736(06)68770-9
75. Love S (1999) Oxidative stress in brain ischemia. *Brain pathology* 9 (1):119-131
76. Macrae IM, Robinson MJ, Graham DI, Reid JL, McCulloch J (1993) Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 13 (2):276-284. doi:10.1038/jcbfm.1993.34

77. Marosi M, Fuzik J, Nagy D, Rakos G, Kis Z, Vecsei L, Toldi J, Ruban-Matuzani A, Teichberg VI, Farkas T (2009) Oxaloacetate restores the long-term potentiation impaired in rat hippocampus CA1 region by 2-vessel occlusion. *European journal of pharmacology* 604 (1-3):51-57. doi:10.1016/j.ejphar.2008.12.022
78. Morancho A, Garcia-Bonilla L, Barcelo V, Giralt D, Campos-Martorell M, Garcia S, Montaner J, Rosell A (2012) A new method for focal transient cerebral ischaemia by distal compression of the middle cerebral artery. *Neuropathology and applied neurobiology* 38 (6):617-627. doi:10.1111/j.1365-2990.2012.01252.x
79. Morioka T, Kalehua AN, Streit WJ (1993) Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. *The Journal of comparative neurology* 327 (1):123-132. doi:10.1002/cne.903270110
80. Nagy D, Knapp L, Marosi M, Farkas T, Kis Z, Vecsei L, Teichberg VI, Toldi J (2010) Effects of blood glutamate scavenging on cortical evoked potentials. *Cellular and molecular neurobiology* 30 (7):1101-1106. doi:10.1007/s10571-010-9542-8
81. Nagy D, Marosi M, Kis Z, Farkas T, Rakos G, Vecsei L, Teichberg VI, Toldi J (2009) Oxaloacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked responses after photothrombotic focal ischemia in the rat cortex. *Cellular and molecular neurobiology* 29 (6-7):827-835. doi:10.1007/s10571-009-9364-8
82. Nelson CW, Wei EP, Povlishock JT, Kontos HA, Moskowitz MA (1992) Oxygen radicals in cerebral ischemia. *The American journal of physiology* 263 (5 Pt 2):H1356-1362
83. Nicholls D, Attwell D (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends in pharmacological sciences* 11 (11):462-468
84. O'Kane RL, Martinez-Lopez I, DeJoseph MR, Vina JR, Hawkins RA (1999) Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *The Journal of biological chemistry* 274 (45):31891-31895
85. Orset C, Macrez R, Young AR, Panthou D, Angles-Cano E, Maubert E, Agin V, Vivien D (2007) Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38 (10):2771-2778. doi:10.1161/STROKEAHA.107.487520
86. Phipps MA (1991) Assessment of neurologic deficits in stroke. Acute-care and rehabilitation implications. *The Nursing clinics of North America* 26 (4):957-970
87. Pulsinelli WA, Brierley JB (1979) A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 10 (3):267-272
88. Puntel RL, Nogueira CW, Rocha JB (2005) Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in rat brain in vitro. *Neurochemical research* 30 (2):225-235

89. Puntel RL, Roos DH, Grotto D, Garcia SC, Nogueira CW, Rocha JB (2007) Antioxidant properties of Krebs cycle intermediates against malonate pro-oxidant activity in vitro: a comparative study using the colorimetric method and HPLC analysis to determine malondialdehyde in rat brain homogenates. *Life sciences* 81 (1):51-62. doi:10.1016/j.lfs.2007.04.023
90. Roberts RC, Roche JK, McCullumsmith RE (2014) Localization of excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 in human postmortem cortex: a light and electron microscopic study. *Neuroscience* 277:522-540. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.07.019
91. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB, American Heart Association Statistics C, Stroke Statistics S (2012) Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 125 (1):e2-e220. doi:10.1161/CIR.0b013e31823ac046
92. Rose EM, Koo JC, Antflick JE, Ahmed SM, Angers S, Hampson DR (2009) Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (25):8143-8155. doi:10.1523/JNEUROSCI.1081-09.2009
93. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M (1990) Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 21 (5):801-807
94. Rothman S (1984) Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 4 (7):1884-1891
95. Ruban A, Berkutzki T, Cooper I, Mohar B, Teichberg VI (2012) Blood glutamate scavengers prolong the survival of rats and mice with brain-implanted gliomas. *Investigational new drugs* 30 (6):2226-2235. doi:10.1007/s10637-012-9799-5
96. Ruban A, Mohar B, Jona G, Teichberg VI (2014) Blood glutamate scavenging as a novel neuroprotective treatment for paraoxon intoxication. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34 (2):221-227. doi:10.1038/jcbfm.2013.186
97. Rubino GJ, Young W (1988) Ischemic cortical lesions after permanent occlusion of individual middle cerebral artery branches in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 19 (7):870-877
98. Sakatani K, Iizuka H, Young W (1990) Somatosensory evoked potentials in rat cerebral cortex before and after middle cerebral artery occlusion. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 21 (1):124-132

99. Sas K, Robotka H, Toldi J, Vecsei L (2007) Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders; *J Neurol Sci*, 257 (1–2):221–239
100. Schmidt-Kastner R, Paschen W, Ophoff BG, Hossmann KA (1989) A modified four-vessel occlusion model for inducing incomplete forebrain ischemia in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 20 (7):938-946
101. Schmued LC, Albertson C, Slikker W, Jr. (1997) Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain research* 751 (1):37-46
102. Schmued LC, Hopkins KJ (2000) Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain research* 874 (2):123-130
103. Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L (2005) Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain research* 1035 (1):24-31. doi:10.1016/j.brainres.2004.11.054
104. Sharkey J, Ritchie IM, Kelly PA (1993) Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 13 (5):865-871. doi:10.1038/jcbfm.1993.108
105. Shiraishi K, Simon RP (1989) A model of proximal middle cerebral artery occlusion in rat. *Journal of neuroscience methods* 30 (2):169-174
106. Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, Siesjo BK (1984) Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta neurologica Scandinavica* 69 (6):385-401
107. Soleman S, Yip P, Leasure JL, Moon L (2010) Sustained sensorimotor impairments after endothelin-1 induced focal cerebral ischemia (stroke) in aged rats. *Experimental neurology* 222 (1):13-24. doi:10.1016/j.expneurol.2009.11.007
108. Solomon RA, Antunes JL, Chen RY, Bland L, Chien S (1985) Decrease in cerebral blood flow in rats after experimental subarachnoid hemorrhage: a new animal model. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 16 (1):58-64
109. Stoffel M, Plesnila N, Eriskat J, Furst M, Baethmann A (2002) Release of excitatory amino acids in the penumbra of a focal cortical necrosis. *Journal of neurotrauma* 19 (4):467-477. doi:10.1089/08977150252932415
110. Sudlow C (2008) Preventing further vascular events after a stroke or transient ischaemic attack: an update on medical management. *Practical neurology* 8 (3):141-157. doi:10.1136/jnnp.2008.148064
111. Sudlow C, Warlow C (2009) Getting the priorities right for stroke care. *Bmj* 338:b2083. doi:10.1136/bmj.b2083

112. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981) Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1 (1):53-60. doi:10.1038/jcbfm.1981.6
113. Teichberg VI (2011) GOT to rid the body of excess glutamate. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31 (6):1376-1377. doi:10.1038/jcbfm.2011.46
114. Teichberg VI, Cohen-Kashi-Malina K, Cooper I, Zlotnik A (2009) Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies. *Neuroscience* 158 (1):301-308. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.02.075
115. Tsai PJ, Huang PC (2000) Circadian variations in plasma and erythrocyte glutamate concentrations in adult men consuming a diet with and without added monosodium glutamate. *The Journal of nutrition* 130 (4S Suppl):1002S-1004S
116. Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007) The inflammatory response in stroke. *Journal of neuroimmunology* 184 (1-2):53-68. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.11.014
117. Warlow C, Sudlow C, Dennis M, Wardlaw J, Sandercock P (2003) Stroke. *Lancet* 362 (9391):1211-1224. doi:10.1016/S0140-6736(03)14544-8
118. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD (1985) Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Annals of neurology* 17 (5):497-504. doi:10.1002/ana.410170513
119. Wei EP, Kontos HA, Christman CW, DeWitt DS, Povlishock JT (1985) Superoxide generation and reversal of acetylcholine-induced cerebral arteriolar dilation after acute hypertension. *Circulation research* 57 (5):781-787
120. Williams DS, Cash A, Hamadani L, Diemer T (2009) Oxaloacetate supplementation increases lifespan in *Caenorhabditis elegans* through an AMPK/FOXO-dependent pathway. *Aging cell* 8 (6):765-768. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00527.x
121. Xu SY, Pan SY (2013) The failure of animal models of neuroprotection in acute ischemic stroke to translate to clinical efficacy. *Medical science monitor basic research* 19:37-45
122. Yamamoto HA, Mohanan PV (2003) Effect of alpha-ketoglutarate and oxaloacetate on brain mitochondrial DNA damage and seizures induced by kainic acid in mice. *Toxicology letters* 143 (2):115-122
123. Yanamoto H, Nagata I, Hashimoto N, Kikuchi H (1998) Three-vessel occlusion using a micro-clip for the proximal left middle cerebral artery produces a reliable neocortical infarct in rats. *Brain research Brain research protocols* 3 (2):209-220

124. Yao H, Sugimori H, Fukuda K, Takada J, Ooboshi H, Kitazono T, Ibayashi S, Iida M (2003) Photothrombotic middle cerebral artery occlusion and reperfusion laser system in spontaneously hypertensive rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 34 (11):2716-2721. doi:10.1161/01.STR.0000094730.38343.73
125. Zanette EM, Roberti C, Mancini G, Pozzilli C, Bragoni M, Toni D (1995) Spontaneous middle cerebral artery reperfusion in ischemic stroke. A follow-up study with transcranial Doppler. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 26 (3):430-433
126. Zauner A, Bullock R, Kuta AJ, Woodward J, Young HF (1996) Glutamate release and cerebral blood flow after severe human head injury. *Acta neurochirurgica Supplement* 67:40-44
127. Zhang ZG, Zhang L, Ding G, Jiang Q, Zhang RL, Zhang X, Gan WB, Chopp M (2005) A model of mini-embolic stroke offers measurements of the neurovascular unit response in the living mouse. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 36 (12):2701-2704. doi:10.1161/01.STR.0000190007.18897.e3
128. Zhou Y, Danbolt NC (2014) Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of neural transmission* 121 (8):799-817. doi:10.1007/s00702-014-1180-8
129. Zlotnik A, Gruenbaum SE, Artru AA, Rozet I, Dubilet M, Tkachov S, Brotfain E, Klin Y, Shapira Y, Teichberg VI (2009) The neuroprotective effects of oxaloacetate in closed head injury in rats is mediated by its blood glutamate scavenging activity: evidence from the use of maleate. *Journal of neurosurgical anesthesiology* 21 (3):235-241. doi:10.1097/ANA.0b013e3181a2bf0b
130. Zlotnik A, Gurevich B, Tkachov S, Maoz I, Shapira Y, Teichberg VI (2007) Brain neuroprotection by scavenging blood glutamate. *Experimental neurology* 203 (1):213-220. doi:10.1016/j.expneurol.2006.08.021

14. Tudományos közlemények listája

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Cellular and Molecular Neurobiology (2015 Jan;35(1):17-22. doi: 10.1007/s10571-014-0064-7)

IF.: 2,201

Neuroprotective effect of oxaloacetate in focal brain ischemic model in the rat

Knapp L, Gellért L, Kocsis K, Kis Z, Farkas T, Vécsei L and Toldi J

Neuropathology and Applied Neurobiology (2014 Aug;40(5):603-9.

doi:10.1111/nan.12069.)

IF.: 4,970

A simple novel technique to induce short-lasting local brain ischaemia in the rat.

Knapp L, Gellért L, Herédi J, Kocsis K, Oláh G, Fuzik J, Kis Z, Vécsei L, Toldi J and Farkas T

Neuroscience (2013 Sep 5;247:95-101. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.04.063.)

IF.: 3,327

Post-ischemic treatment with L-kynurenine sulfate exacerbates neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion

L Gellért, **L Knapp**, K Németh, J Herédi, D Varga, G Oláh, K Kocsis, Á Menyhárt, Z Kis, T Farkas, L Vécsei, J Toldi

Cellular and Molecular Neurobiology (2010 Oct;30(7):1101-6. doi: 10.1007/s10571-010-9542-8.)

IF.: 2,423

Effects of Blood Glutamate Scavenging on Cortical Evoked Potentials.

Nagy D, **Knapp L**, Farkas T, Kis Z, Vécsei L, Teichberg VI, Toldi J.

Egyéb publikációk

Journal of Neural Transmission (Epub ahead of print) (DOI 10.1007/s00702-014-1343-7)

IF.: 2,871

Acetyl-L-carnitine and oxaloacetate in post-treatment against LTP impairment in a rat ischemia model. An in vitro electrophysiological study.

Kocsis K, **Knapp L**, Mészáros J, Kis Z, Farkas T, Vécsei L and Toldi J

Neuroscience (2014 Jun 6;269:265-72. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.03.055.)

IF.: 3,327

Acetyl-L-carnitine normalizes the impaired LTP and spine density in a rat model of global ischaemia

Kocsis K, **Knapp L**, Gellért L, Oláh G, Kis Z, Takakuwa H, Iwamori N, Ono E, Toldi J and Farkas T

Neuroscience Letters. (2013 Oct 11;553:138-41. doi: 10.1016/j.neulet.2013.08.028.)

IF.: 2,055

Paradox effects of kynurenines on LTP induction in the Wistar rat. An in vivo study
Demeter I, Nagy K, Farkas T, Kis Z, Kocsis K, **Knapp L**, Gellert L, Fülöp F, Vecsei L, Toldi J

Drug design and development (2013 Sep 16;7:981-7. doi: 10.2147/DDDT.S44496.)

IF.:3,026

Influence of endogenous and synthetic NMDA receptor antagonists on cortical spreading depression and related blood-brain barrier permeability changes
G Oláh, J Herédi, Á Menyhárt, Z Czinege, D Nagy, J Fuzik, K Kocsis, **L Knapp**, E Krucsó, L Gellért, Z Kis, T Farkas, F Fülöp, Á Párdutz, J Tajti, L Vecsei, J Toldi

Neuroscience (2013 Jan 3;228:371-81. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.042.)

IF.: 3,327

Fundamental interstrain differences in cortical activity between Wistar and Sprague-Dawley rats during global ischemia
Fuzik J, Gellért L, Oláh G, Herédi J, Kocsis K, **Knapp L**, Nagy D, Kincses T, Kis Z, Farkas T, Toldi J.