

A MIKROEREK ADENILÁT CIKLÁZ AKTIVITÁSÁNAK VÁLTOZÁSA  
KISÉRLETES AGYÖDÉMÁBAN

Irta:

Ádám Géza  
biológus

Szeged  
1984

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS .....	1
2.	ANYAG ÉS MÓDSZEREK .....	14
2.1.	Kísérletes agyödéma modellek .....	14
2.1.1.	Kísérletes pneumothorax előidézése ujszülött ma- lacban .....	14
2.1.2.	Hidegödéma előidézése .....	15
2.1.3.	Agyödéma kísérletes subarachnoidealis vérzést kö- vetően .....	16
2.1.4.	Dimetil-szulfoxiddal kiváltott agyödéma .....	17
2.2.	Mikroérdu-s-fra-kió készítése agyszövetből .....	17
2.3.	Az adenilat cikláz aktivitásának meghatározása agy- ból izolált mikroerekben .....	20
2.4.	Az agy viz- és elektrolit /Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> / tartalmának meghatározása .....	21
2.5.	Evans-kék- albumin komplex extravezációjának mérése	21
3.	EREDMÉNYEK .....	22
3.1.	Normál patkányból izolált mikroerek adenilat cik- láz aktiválhatósága Ca <sup>++</sup> -calmodulinnal .....	22
3.2.	Kísérletes pneumothorax-szal együttjáró agyödéma jellemzése .....	28
3.2.1.	A hipoxia fokának és a kórkép általános lefolyá- sának jellemzése .....	28



3.2.2.	Az agyszövet viz- és elektrolit tartalmának változása .....	28
3.2.3.	Az Evans-kék- albumin komplex penetrációjának kvantitatív mérése .....	31
3.2.4.	Az agyi mikroerek adenilát cikláz aktivitásának jellemzése .....	31
3.3.	Az agyi mikroerek adenilát cikláz aktivitása vazogén típusu agyödéma modellekben .....	34
3.3.1.	Hidegödémában .....	34
3.3.2.	Subarachnoidealis vérzést követő agyödémában ...	36
3.3.3.	Dimetil-szulfoxiddal kiváltott agyödémában .....	36
4.	MEGBESZÉLÉS .....	40
4.1.	Az agyi mikroerek adenilát ciklázának $Ca^{2+}$ -cal-modulinnal történő aktiválhatóságának értékelése .....	40
4.2.	Kísérletes pneumothorax-ot kísérő változások megbeszélése .....	41
4.3.	A vazogén agyödéma modellekkel kapcsolatos eredmények értékelése .....	43
5.	ÖSSZEFOGLALÁS .....	45
6.	IRODALOM .....	47

## 1. BEVEZETÉS

Az idegrendszer zavartalan működéséhez szükséges sajátos belső környezet fenntartását a vér-agy gát végzi. Az utóbbi évtizedek vizsgálataiból kiderült, hogy ez a sajátos permeabilitási barrier egy olyan szelektíven működő membrán rendszer, amely a plexus choroideus-szal együtt szigorúan meghatározott összetételben tartja a liquort és az agyi extracelluláris folyadékot. /KROGH 1946/ A vér-agy gát ezt a feladatot két ellentétes funkcióval valósítja meg: Egyrészt korlátozza bizonyos anyagok - neurotranszmitterek, ionok, makromolekulák - vérből az agyba történő bejutását, másrészt viszont számos, az idegrendszer működéséhez nélkülözhetetlen vegyületek - glükóz, purinok, nukleotidok, egyes aminosavak - bejutását facilitált transzporttal segíti elő.

Annak ellenére, hogy már a vér-agy gát első leirói /BIELD és KRAUS 1898; LEWANDOWSKY 1900/ különös szerepet tulajdonítottak az agyi kapillárisoknak az általuk észlelt jelenségek értelmezésében, csak a hatvanas évek vége felé, REESE és KARNOVSKY /1967/, BRIGHTON és REESE /1969/ munkái nyomán vált ismertté, hogy a tulajdonképpeni vér-agy gát funkciók jelentős többsége az agyai mikroerekhez, és itt is elsősorban az endothelsejtekhez rendelhető.

Az agyai endothelsejtek számos tulajdonsága különbözik a szervezet többi, ilyen jellegű sejtjétől. Szemben más mikroerekkel,

az agyi kapillárisok endothelje zonula occludens-el kapcsolódik egymáshoz. Ez a szoros kapcsolat az anyagok széles skálája számára lehetetlenné teszi, hogy az endothelsejtek között diffúzióval az agyszövetbe jusson. Ugyanakkor az is feltűnő, hogy az agyi endothelsejtek normális körülmények között igen alacsony pinocitotikus aktivitással rendelkeznek. Ismeretes, hogy a pinocitotikus vezikulák általános, szelektivitás nélkül transzportáló képletek, a "tűskés" vezikulák pedig a fehérjetranszport szelektív strukturái. /PALADE 1960, REESE és KARNOVSKY 1967, JOÓ 1971, 1972, WESTERGAARD és mtsai 1977/ Továbbá az agyi kapillárisok keresztmetszeti képén igen magas a mitokondriumok száma is; 5 - 6-szor több figyelhető meg, mint az izom kapillárisokban. /OLDENDORF és BROWN 1975/ Ez nyilvánvalóan összefüggésben van az endothelsejtek jelentős  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP-áz aktivitásával, és a citoplazmán keresztül történő egyéb nagy energiájú transzport folyamatokkal.

Hisztokémiai vizsgálatok számos olyan enzim jelenlétét mutatták ki, amelyek nagymértékben specifikusak az agyi endothelsejtekre: alkalikus foszfatáz /EC 3.1.3.1./ / STEWARD és WILEY 1981/, pszeudokolinészteráz /EC 3.1.1.8./ /JOÓ és CSILLIK 1966/, aromás-L-aminósav dekarboxiláz /EC 4.1.1.28./ /OWMAN és ROSENGREN 1967/ és  $\gamma$ -glutamil-transzpeptidáz /EC 2.3.2.2./ /ALBERT és mtsai 1966/

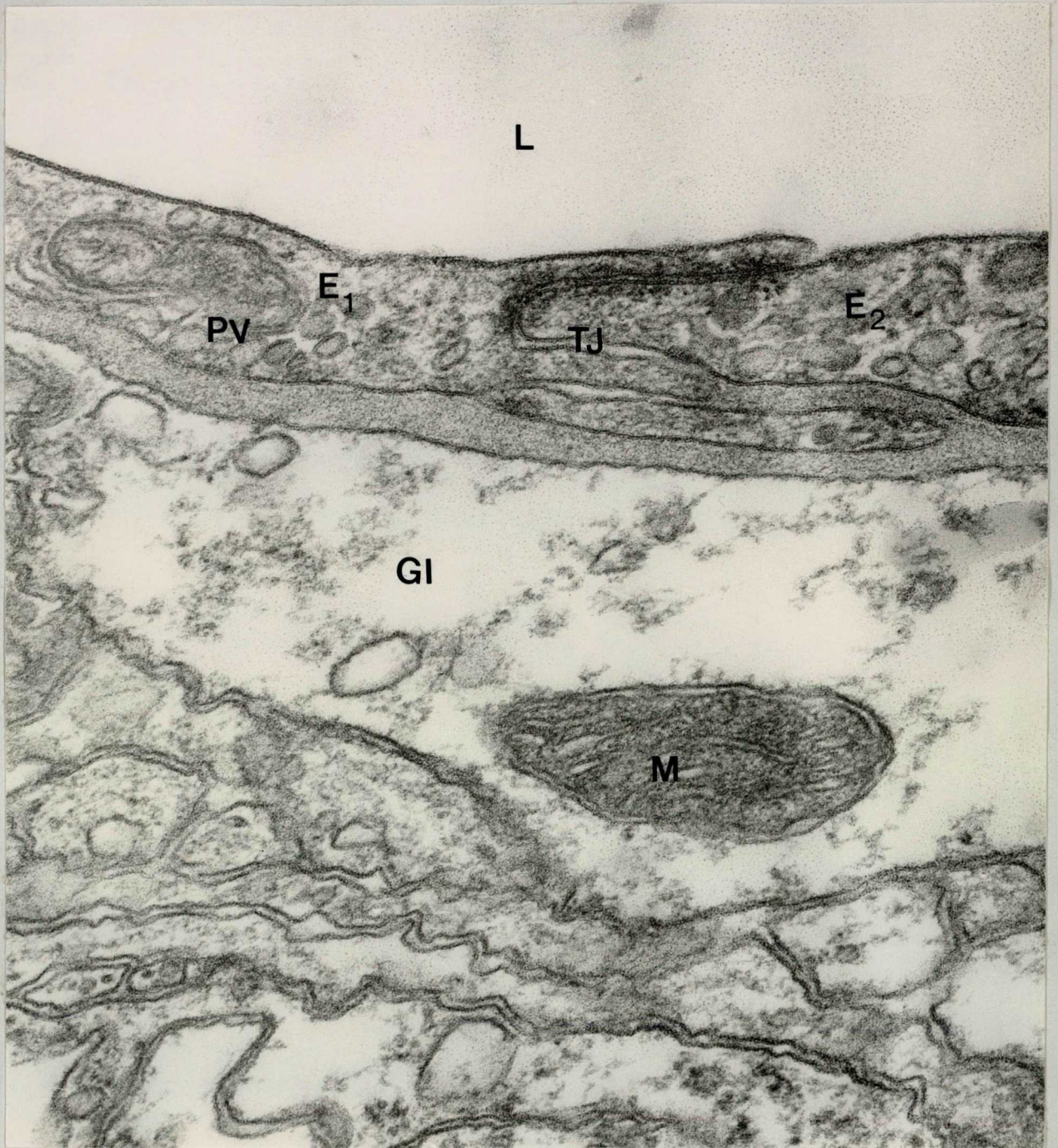
Részint nagy specifitású hisztokémiai technikával, részint különböző membrán frakcionálási eljárásokkal sikerült igazolni azt, hogy ezek az enzimek elsősorban az endothelsejtek abluminális membránjában találhatóak. /BETZ és mtsai 1980/

Az endothelsejteket kívülről folyamatos bazális membrán veszi körül, amelyen kisebb - nagyobb megszakításokkal perivaszkuláris astrocyta sejttalpak fekszenek. /1. ábra/

A bazális membrán elektronmikroszkóposan diffúz állagúnak látszik, gyakran fibrilláris elemek figyelhetők meg benne. Hisztokémiai eljárásokkal számos enzim - acetil-kolin észteráz, ATP-áz, adenilát cikláz - jelenlétét mutatták ki. /JOÓ 1975 /  
Több kísérlet utal a bazális membránnak a vér-agy gát funkció fenntartásában betöltött fontos szerepére. Ha intravetrikulárisan adott kollagenázzal /ROBERT 1977/ vagy ATP-áz inhibitorral /JOÓ 1979/ megbontják a bazális membrán integritását, akkor permeabilitás fokozódás észlelhető.

Eddigi ismereteink szerint a gliahüvely nem vesz részt a vér-agy gát transzport folyamataiban, de jelentősen befolyásolja az endothelsejtek strukturális és funkcionális tulajdonságainak a kialakulását. Közvetett bizonyítékok igazolják, hogy összefüggés van a barrier funkció létrejötté és az astrocyta nyulványok kifejlődése között. /PHELPS 1972/

Az agy extracelluláris terének kb. 99 %-át a vér-agy gát választja el az intravaszkuláris tértől. /BRIGHTMAN és BROADWELL 1976/ Bizonyos agyi régiókban - eminentia mediális, area



1. ábra

Elektronmikroszkópos felvétel nagy agykéregből. A kapillárisfal részletén kívül gliatalp és idegi nyulványok láthatók

L = a hajszálér lumene; E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> = endothelsejtek;

TJ = tight junction két endothelsejt között;

M = mitokondrium; PV = pinocitotikus vezikulák;

GL = gliatalp

nagyítás 60000-szeres

postrema, neurohipofízis, subfornikális test, plexus choroideus - a kapillárisok endothelje nem zonula occludens- szel csatlakoznak egymáshoz, hanem fenesztráltak, és ezeken a helyeken még a fehérjék is szabadon kijuthatnak az extravaszkuláris térbe. /REESE és KARNOVSKY 1976; BRADBURY 1979/

A kisebb molekulájú és lipid oldékony anyagok az agyi kapillárisokon keresztül háromféleképpen juthatnak át. /RAPOPORT 1976/

- a./ Passzív transzport, amely intercelluláris vagy membrán pórusokon keresztül történő, koncentráció - vagy elektrokémiai grádiens által létrehozott diffúzió.
- b./ Aktiv transzport, olyan energia függő anyagáramlás, amihez az energiát az ATP hidrolízise szolgáltatja.
- c./ Facilitált transzport, membrán mediált, energia-donort nem igénylő anyagáramlás /pl.: cukrok transzportja/

A makromolekulák átjutását az endothelben az ún. vezikuláris transzport biztosítja, amelynek során a citoplazma membránról lefűződő vezikulák keresztül szállítják a citoplazmán az extracellulárisan elhelyezkedő makromolekulákat /pinocitózis/. Az agyi mikroerekre jellemző alacsony vezikuláris transzport jó összhangban van azokkal az ismert tényekkel, miszerint fiziológiai körülmények között a vérből az agyszövetbe történő fehérje áramlás elhanyagolhatóan minimális.



Ezek a transzport folyamatok azonban bizonyos specifikus, legtöbbször kóros körülmények között megváltozhatnak, aminek legfeltűnőbb következménye, hogy a vér-agy gát permeabilitása megnövekszik az olyan anyagokra nézve, amikre egyébként impermeabilis. A barrier funkció átmeneti vagy végleges zavarát azok a folyamatok okozzák, amelyek növelik a mikroeerek falának feszültségét, illetve közvetlenül metabolikusan károsítják azt. A kapillárisfal feszültségnövekedése vagy vazodilatációkor, vagy az erek lumenében lévő folyadék nyomásának a fokozódásakor jön létre. Így például  $\text{CO}_2$  inhaláció, illetve kémiai vagy elektromos úton előidézett görcs tevékenység, amely extrém vazodilatációhoz vezet, vér-agy gát károsodást hoz létre. /CAMERON és mtsai 1969/ Ugyanakkor a hirtelen bekövetkező vérnyomás emelkedés hasonló hatásu, a makromolekulákra nézett áteresztőképesség nagyfoku növekedése tapasztalható. /JOHANSON és mtsai 1970/ Hipertóniás oldat injektálásával kiváltott vér-agy gát kinyílás szintén a kapillárisfal feszültség változásával értelmezhető. /RAPOPORT és THOMPSON 1973/ A vér-agy gát permeabilitásának az alakulását igen körültekintően vizsgálták hipoxiában és ischaemiában. A két folyamat ugyan két eltérő patofiziológiás okra vezethető vissza - a hipoxiát csökkent oxigén tenzió, az ischaemiát csökkent vérellátás okozza - ezek a gyakorlatban együtt, ritkán elkülöníthetően jelentkeznek, s mindkettő az idegrendszer sejtjeinek gyors elhalásával jár az érintett területeken. /BROWN és BRIERLY 1972, 1973/ A hipoxiás, illetve az ischaemiás ál-

lapot önmagában még nem hoz létre vér-agy gát funkció kiesést, sőt egyes károsító tényezőkkel szemben még védőhatásu is.

/HOSSMANN és OLSSON 1971/ Ugyanakkor viszont az eredeti oxigén tenzió illetve vérellátási viszonyok normalizálása után bizonyos idővel, jelentős permeabilitást lehet észlelni. A makromolekuláris transzport fokozódás annál hamarabb jelentkezik, minél hosszabb volt a hipoxiás, ischaemiás állapot.

/ITO és mtsai 1976/ A vér-agy gát károsodásnak ez a típusa az oxidatív anyagcsere folyamatokkal függ össze, s különösen kiemelkedő szerepe van a lipid peroxidációnak. /WATSON és mtsai 1984/

A felsoroltakon kívül még számos olyan fizikai, kémiai, patológias hatás ismeretes, amelyek közvetlenül az érfalra hatva okoznak átteresztőképesség növekedést. /BRADBURY 1979/

A fenti esetekben a permeabilitás fokozódás elméletileg két uton jöhet létre: az endothelsejtek pinocitotikus aktivitásának növekedésével, vagy a sejtek közötti "tight junction"-ok megnyílása révén. Az ultrastrukturális vizsgálatok alapján az előbbi tűnik lehetségesnek. /JOÓ 1971; WESTERGAARD és mtsai 1976/ Amennyiben az átteresztőképesség növekedés hosszantartó illetve irreverzibilis, egy jellegzetes kórkép, az agyödéma jön létre. Ezzel a kifejezéssel az agyszövetben bekövetkező, tömeg növekedéssel járó, kóros folyadék szaporulatot értjük. A folyadék felhalmozódás pathomechanizmusa alapján KLATZO

/1967/ vazogén és citoxikus tipust különített el. Vazogén ödémában az agyi erek permeabilitási viszonyaiban bekövetkező patológias változások az elsődlegesek, a kóros folyadékgyülem extracellulárisan helyezkedik el. Ilyen esetekben az extracelluláris tér megnagyobbodik, pszeudoextracelluláris tárgulatok jönnek létre, továbbá a vér-agy gát makromolekuláris transzportja fokozódik, az ödémafolyadék fehérjében, szérum proteinekben gazdag /BODSCH és mtsai 1982/ A citotoxikus ödémában elsősorban az idegsejtek és a glia membrán áteresztő tulajdonságai változnak meg, s a folyadék felszaporodás szinte kizárólag intracellulárisan jön létre. A barrier funkció kezdetben intakt marad, makromolekulák fokozottabb transzportja nem figyelhető meg. Az extracelluláris tér nem tágul ki.

Mind a két típusu ödémára jellemző, hogy a szöveti elektrolitháztartás egyensulya felborul, ami elsősorban az agy nátriumion tartalmának a növekedésében, illetve káliumion tartalmának a csökkenésében nyilvánul meg. A jelenség mögött a  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -áz elégtelen működése áll. Amig azonban a citotoxikus ödéma esetén a  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -áz aktivitásának a csökkenését a mitokondriális ATP szintézis kiesése okozza /SATO és mtsai 1969/, addig a vazogén típusu ödémában az ok ismeretlen. /AVERT és mtsai 1984/

A citotoxikus ödéma előbb vagy utóbb a vér-agy gát permeabilitásának fokozódását idézi elő, ami a vazogén típus kialakulását jelenti.

kulását serkenti, így a klinikumban leggyakrabban a kétféle ödéma keveredésével találkozunk.

Csanda /1978/ szerint az orvosi gyakorlatban e két klasszikus típus mellett egy harmadik ún. ozmoláris agyödéma is előfordul. Ez, az agy mikroerek és neuronok membránjának épsége mellett kialakuló víz szaporulat, amelyet nem követ az agyszövet elektrolitháztartásának a megváltozása. A vér-agy gát ép, permeabilitás növekedés nincs. /A barrier a víz és a vérérgázok számára átjárható./ Oka plazma hipotónia.

Az elektronmikroszkópos megfigyelések során a pinocitotikus vezikulák számának a növekedését tapasztalták az agyi mikroerek endothelisejtjeiben, azokban az esetekben, amikor a vér-agy gát permeabilitása is fokozottabb volt. /JÓÓ 1971 / Hasonló esetekben jelentős fehérje transzportot is kimutattak a kapillárisokon keresztül. /WESTERNGAARD és mtsai 1977 / Azt, hogy a pinocitotikus aktivitás fokozódás összefüggésben lehet a kapillárisokban levő cAMP koncentráció emelkedésével, dibutiril-cAMP-val végzett in vivo kísérletek igazolják. /JÓÓ 1972 / A cAMP szintéziséért az adenilát cikláz enzim /EC 4.6.1.1./ felelős. Az agyi mikroerekben az enzim jelenlétét először hisztokémiai módszerekkel mutatták ki. /JÓÓ és mtsai 1975 / Az agykéregből izolált mikroereken és az ezekből készített endothel sejtenyészetekeken végzett biokémiai vizsgálatok igazolták, hogy a bennük található adenilát cikláz számos hormonnal, neurotranszmitterrel stimulálható. /KARNUSHINA és

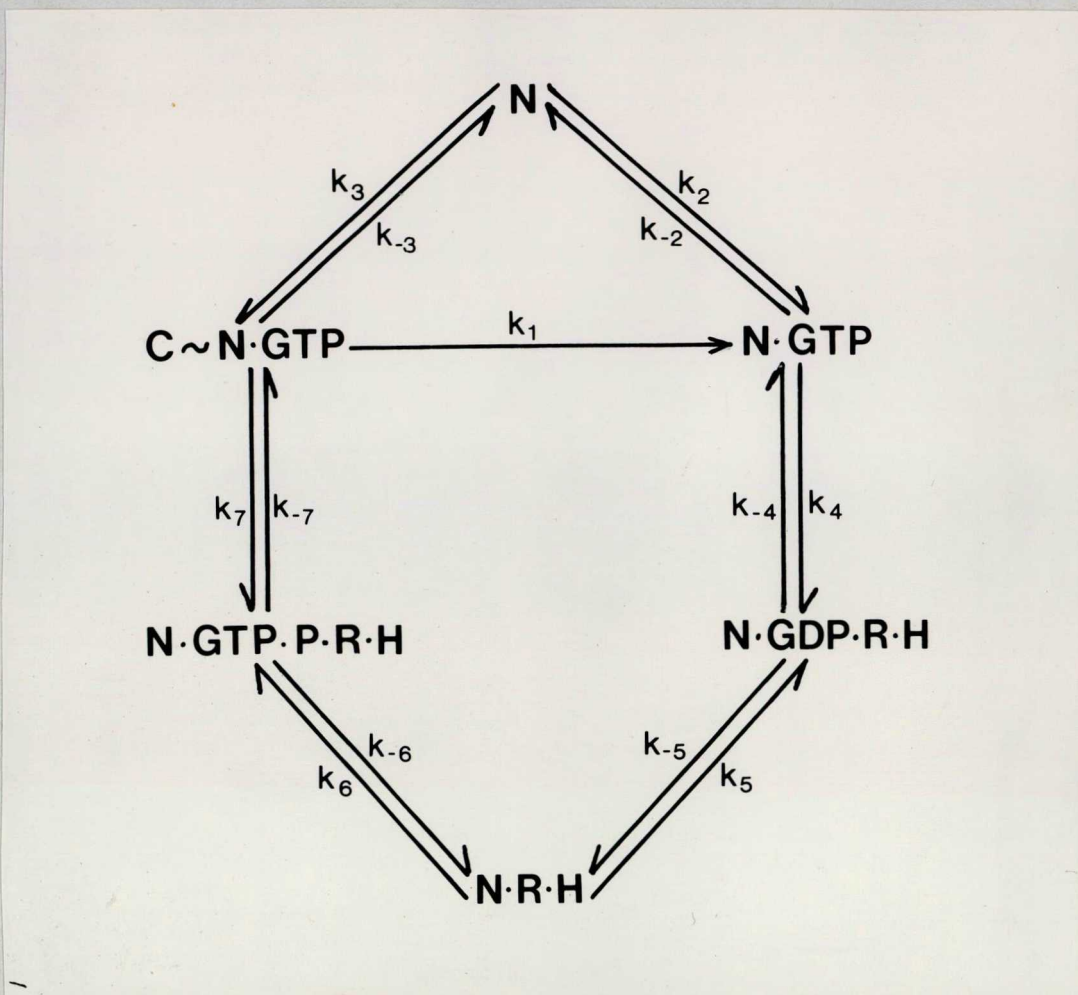


mtsai 1980, 1982, 1983 / Ezen ismeretek alapján az adenilát cikláznak fontos szerepet tulajdonítanak az agyi kapillárisok transzendotheliális transzportjának fiziológiás, illetve patológiás körülmények között történő szabályozásában.

Jól ismert tény, hogy a magasabb rendű állatok sejtjeinek adenilát cikláza membránhoz kötött enzim, aminek az aktivitása hormonális szabályozás alatt áll. A hormon érzékeny adenilát cikláz három, jól elkülöníthető komponensből áll /ROSS és GILMAN 1980 /: az adott hormon receptora, a katalitikus reakciót végző C fehérje, és a GTP/GDP érzékeny regulátor szerepet betöltő N fehérje. A cAMP szintézis során GTP-nek kell kötődnie az N fehérjéhez, ami így aktiválni képes a C fehérjét, majd a GTP GDP-re és  $P_i$ -re hidrolizál, s ezzel a C fehérje aktivitása megszűnik. Az N fehérjéhez a GTP kötődését a hormon-receptor komplex segíti elő. A hormon érzékeny adenilát cikláz működését a 2. ábra mutatja be.

/ROSS és GILMAN 1980 /

Az emlős állatok szöveteiben hormon nélkül is mérhető bizonyos un. alap aktivitás, mert a  $k_{-2}$  értéke nem nulla, s így lehetővé válik az N fehérjéhez kötött GDP disszociációja, majd újabb GTP megkötéssel a C fehérje aktiválása. Pulyka vörös vérsejtjeiben a  $k_{-2}$  értéke gyakorlatilag nulla, így az N fehérjén a GDP-GTP csere csak a receptor-hormon komplex /R • H/ segítségével mehet végbe. Az R • H komplexnek az N fehérjéhez történő kötődése energetikailag kedvezőbb utat biztosít az N • GDP disszociálásához, majd az újabb



2. ábra

GTP molekula megkötéséhez. Ezután regenerálódott  $N \cdot GTP$  komplex újból képes aktiválni a C fehérjét. Meggyőző bizonyítékok vannak amellet, hogy az N fehérjén kívül létezik egy ugyancsak GTP/GDP érzékeny ún.  $N_1$  fehérje is, ami gátló regulátor funkciót tölt be. /CODINAT és mtsai 1984 /

Az idegszövet adenilát ciklázának egyik megkülönböztető sajáttsága, hogy a C fehérjét az N fehérjén kívül  $Ca^{2+}$  - calmodulinnal is lehet aktiválni. Ez a hatás független az N • GTP komplextől. Tisztított alegységekkel végzett vizsgálatokban a két fehérje egyidejű jelenléte additív módon aktiválta a cAMP szintézist. /SALTER és mtsai 1981/ Még nem bizonyított, hogy az adenilát cikláz ezen formája az idegrendszeren belül milyen típusu sejtekhez rendelhető.

Mivel számos közvetett bizonyíték hangsúlyozza az adenilát cikláz szerepét az agyi kapillárisok transzendotheliális transzportjának szabályozásában, egyetemi doktori értekezésem tárgyául olyan kísérleti rendszert választottam, melyekben a kapillárisok permeabilitása jelentősen fokozódott. Nevezetesen, azt tanulmányoztam, miként változik meg a mikroerek adenilát cikláz aktivitása különböző agyödéma modellekben. Mostanában közölt megfigyelések szerint /DUX és mtsai 1984 / az agyi kapillárisok áteresztő képességének növekedése során egy gyors, korai kalciumion felvétel van az endothelsejtekben, ami hatással lehet a sejtek adenilát cikláz aktivitására is. Mivel korábban már bizonyították azt, hogy az agyszövetben található adenilát cikláz hormonoktól függetlenül is stimulálható  $Ca^{2+}$ -calmodulinnal, vizsgálataim egy részében arra kerestem a választ, hogy ez a hatás érvényesül-e az agyi endothelsejtek cikláz rend-

szerében is.

Tanulmányozni kívántam továbbá az adenilát cikláz aktivitásának az alakulását az agyödéma citotoxikus illetve vazogén típusaiban. Citotoxikus ödéma létrehozására olyan hipoxiás modellt választottam, amelyben az ischaemia hatásával kevésbé kell számolni, s erre a kísérletes pneumothorax ígérkezett a legalkalmasabbnak. Annak igazolására, hogy ebben az esetben kell-e valóban vér-agy gát károsodással számolnunk, megnéztem hogyan változik az agyszövet víz- és elektrolit tartalma, illetve megfigyelhető-e makromolekuláris transzport. Ezek után azt vizsgáltam meg, hogy tapasztalható-e különbség az adenilát cikláz aktivitásának a kinetikájában a hipoxiás állapot kritikus stádiumában illetve vezet követően a hipoxia megszüntetése után három órával. Ischaemiás állapotban, melyet a kétoldali artéria carotis communis lekötése révén idéztünk elő, a vér-agy gát károsodás csökkenthető illetve kivédhető volt dexamethazon előkezeléssel. /TÓSAKI és mtsai 1984 / Feleletet kerestem arra, hogy a hipoxiás modell esetén ez a preventív hatás tapasztalható-e. A vazogén agyödémának számos modellje létezik, de mivel ezekben egyéb hatásokkal is számolni kell, ezért vizsgálataim során több típuson dolgoztam. Választ kerestem arra, hogy az általam választott körülmények között a mikroerekben keresztül történő makromolekuláris transzport megfi-



gyelhető-e, és ez befolyásolható-e dexamethazonos előkezeléssel. Megvizsgáltam továbbá az adenil cikláz aktivitásának az alakulását.

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZEREK

### 2.1. Kisérletes agyödéma modellek

#### 2.1.1. Kisérletes pneumothorax előidézése újszülött malacban.

Kisérletes bilateriális pneumothoraxot újszülött /3-6 óra-ja született/ malacokon hoztuk létre ketamin-hidrokloriddal /10 mg/kg testsúly/ végzett altatásban. A vérnyomás, az artériás vérgázok és a vér sav-bázis egyensúlyának a mérésére a hátukon fekvő állatok egyik köldökartérián keresztül katótert vezettünk fel a középthoracalis tájáig. A testhőmérsékletet /38 - 39 °C / lámpával történő melegítéssel tartottuk fenn. Helyi érzéstelenítés mellett mellkascsövet helyeztünk mindkét oldalon a mellhártyaüregbe, a negyedik bordaközi területen. Egy kétliteres ballonon keresztül a mellkascsövet egy légtartályhoz csatlakoztattuk, amelyből jövő állandó nyomású levegő árammal idéztük elő a pneumothoraxot. A nyomást Ambu PEEP szeleppel szabályoztuk, és manométerrel ellenőriztük. A cardiovascularis komplikációk elkerülése végett a nyomást fokozatosan emeltük + 0,05 kPa-ról + 0,3 kPa-ra. Az állatok klinikai állapota a pneumothorax kifejlődésével párhuzamosan fokozatosan rosszabbodott. A kritikus /premor-

tális/szakaszt bradycardia/ a szivfrekvencia 40/perc/, ziháló légzés, hipotenzió / a középartériás nyomás 2kPa/ és súlyos acidózis / pH 7,00 / jellemezte. A kísérleti állatok egyik csoportját ebben a kritikus állapotban a katéteren keresztül, a jobb pitvar megnyitása mellett, Krebs-Ringer oldattal /500 ml, pH= 7,4 /perfundáltuk, majd az eltávolított agyából mikroérduz frakciót állítottunk elő. Az agy viz- és elektrolit tartalmának meghatározásakor az állatokat szintén a katéteren keresztül, KCl oldattal / 2mM/kg testsúly/ öltük meg.

Az állatok másik csoportjánál a kritikus stádiumban megszüntettük a kísérletes pneumothoraxot, és ezt követően három óra múlva az előző csoporttal megegyező vizsgálatokat végeztük el.

A kontroll állatcsoportot is a leirtak szerint kezeltük, azaz a különbséggel, hogy a mellhártyaüregbe nem juttattunk levegőt.

### 2.1.2. Hidegödéma előidézése

A vazogén ödéma egyik legalaposabban tanulmányozott modellje, az igen alacsony hőmérséklet lokális alkalmazásával kiváltott vér-agy gát károsodás. Éter narkózisban a kísérleti állatokon /PVG/C patkánytörzs/ a koponya középvonalán, nyílirányu metszéssel tettük szabaddá a koponya csontot. A jobb féltékére 5 mm átmérőjű, folyékony nitrogénben lehűtött /kb. - 190 °C-os/ fémrudat helyeztünk, amit 30 másodperc után tá-

volítottunk el. Az alacsony hőmérséklet hatására az agyszövetben, a rudnak megfelelő helyen és kiterjedésben, sejtpusztulás jön létre, amely körül növekvő területű ödéma fejlődik ki.

### 2.1.3. Agyödéma kísérletes subarachnoidealis vérzést követően

A klinikai esetek egy jelentős részében agyödéma subarachnoidealis vérzést követően jön létre. A folyamat kísérletes modellezésére két lehetőség kínálkozik, valamelyik nagy agyalapi artéria megsértése, vagy pedig saját vérnek liquor térbe történő adása. Saját vér adásával létrehozott subarachnoidealis vérzést patkányokon DÓCZI és mtsai /1983/ írták le. A subarachnoidealis vérzést felnőtt Wistar patkányokon éter altatásban hoztuk létre. A him és nőstény állatok súlya 200-350 g között volt. A vért a fark disztális végének bemetszésével nyertük, alvadás gátlót nem alkalmaztunk. A saját vérnek a liquor térbe történő bejuttatását a következő módon végeztük: A koponya középvonalán nyíl irányu bőrmetszést ejtettünk, a periosteum leválasztása után 1 mm átmérőjű lyukat furtunk a jobb félteke koponyacsontján /a corona varrattól 2 mm-re kaudálisan és a szagittális varrattól 2 mm-re laterálisan / úgy, hogy a duramater ne sérüljön meg. A lyukat ezután csontviasszal szorosan zártuk. Ezt követően a subarachnoidealis tér ferde irányu, intra-



kraniálisan kb. 0,5 mm-re beterjedő punkcióját/25/5 tüvel/végeztük el, majd 200 ml vért fecskendeztünk be. A csontviasz a vér kifolyását megakadályozta. A bőrt ezután kapocscsal zártuk.

#### 2.1.4. Dimetil-szulfoxiddal kiváltott agyödéma

BROADWELL és mtsai /1982/ nyomán PVG/C patkánytörzsön dimetil-szulfoxiddal /DMSO/ a vér-agy gát jelentős permeabilitás fokozódását hoztuk létre az Evans-kék-albumin komplexre nézve. A kísérleti állatok intravénásan és azt követően azonnal intraperitoneálisan kapták a DMSO-ot /mindkét esetben 3 g/kg testsúly./ Jelentősebb áteresztőképesség növekedést csak akkor értünk el, amikor az i.v. és i.p. adás között 1 percnél több idő nem telt el. A makromolekuláris transzport vizsgálatokban az Evans-kék festéket az i.v. DMSO kezeléssel egyidejűleg juttattuk az érrendszerbe.

#### 2.2 Mikroérdu-s-fra-kció készítése agyszövetből

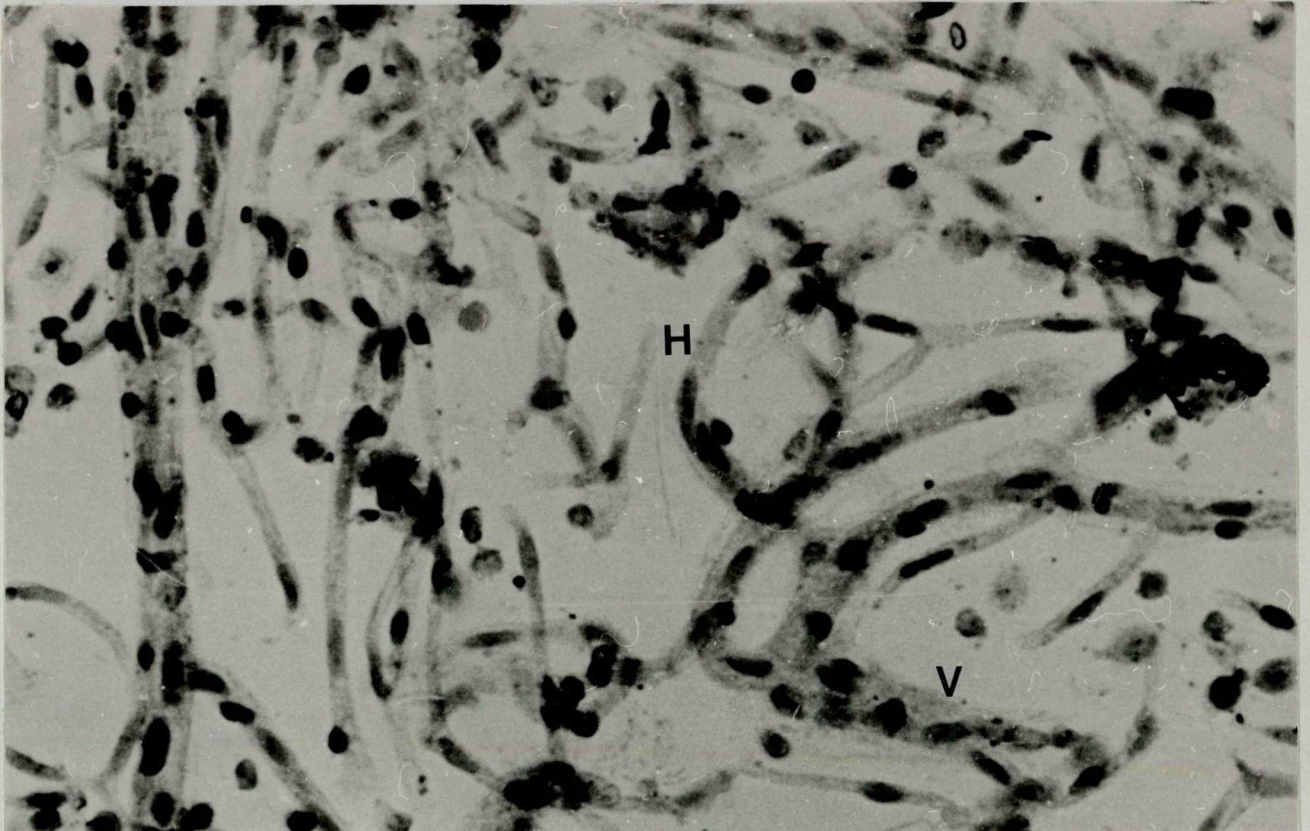
Vérmentes, agyi kapillárisokban gazdag fra-kció készítése a következők szerint történt /JOÓ és KARNUSHINA 1973/:

A kapillárisok lumenéből a vért a balkamrán keresztül az

aorta ascendesbe vezetett kanül segítségével Krebs-Ringer oldattal /pH= 7,4/ történő atmoszással távolítottuk el. Kapilláris izolálás céljára a lágú agyhártyától és a fehér állománytól mentes agykérget használtuk fel, amit 0,25 M-os szacharóz oldatban zsiletpengével apró darabokra felvagdaltunk. A 0,25 M-os szacharóz oldatban a glianyulványok megduzzadnak, ami megkönnyíti a mikroerek elválasztását a neuropiltól. Ezt követően az agyszövet homogenizálása  $333\mu\text{m}$  pórus méretű nylon szitán való átpréseléssel történt. Ezt a lépést  $110\mu\text{m}$  méretű szitával is megismételtük. A tisztítás és a homogenizálás  $4^{\circ}\text{C}$ -on történt.

A homogenizátumot a kiindulási anyag nedves súlyának megfelelő térfogat 10-szeresére hígítottuk, s ezután Janecky K 24 centrifugával  $4^{\circ}\text{C}$ -on /10 perc, 1500 Xg/ centrifugáltuk. A felülusztót leöntöttük, az üledéket a kiindulási térfogatnak megfelelő mennyiségben újból szuszpendáltuk, majd az előzővel megegyező módon centrifugáltuk. Az üledéket néhány ml 0,25 M-os szacharóz oldatban szuszpendáltuk, majd 3 lépésű /1,5 M, 1,3 M, 1,0 M/ szacharóz gradiensre rétegeztük, és Beckman L 2 65 K /30 perc, 58000 Xg,  $4^{\circ}\text{C}$ / tovább szeparáltuk. Az így nyert üledék - a kis százalékban előforduló sejtmagoktól és nagyobb erektől eltekintve - kizárólag csak

kapillárisokból állt. /3. ábra/ További vizsgálatainkhoz ezt használtuk fel mint mikroér-dus-frakciót.



3. ábra

Fénymikroszkópos részlet a mikroér-frakcióból 1 %-os  
toludin festés után

V = venula ; H = hajszálér ;

nagyítás 550-szeres

2.3. Adenilát cikláz aktivitás meghatározása agyból izolált mikroereken

A mikroérdu-s-frakció adenilát cikláz aktivitását KANOF /1977/ alapján határoztuk meg. A homogenizáló oldat 2 mM Tris-t, 2 mM EGTA-t tartalmazott, sa pH-ját 7,8 -ra almasavval állítottuk be. Ettől való eltérést az adott esetekben feltüntettük. Az inkubálást 100 mM Tris-almasav pufferben /pH = 7,8/ végeztük, ami 2 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 0,1 mM GTP-t, 1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin-t tartalmazott. Az ATP és az EGTA koncentrációja az egyes kísérleteknél közölt módon alakult. Az enzim reakciót 50 l mikroér homogenizátummal indítottuk, majd 96 °C-ra történő melegítéssel /10 perc/ állítottuk le. Az inkubálás 30 °C-on történt. A termelődött cAMP mennyiségi meghatározása marhaszibvből izolált cAMP függő protein kináz regulátor alegységéhez /Sigma Chem. Co./, <sup>3</sup>H-cAMP jelenlétében, történő kötődés mérésével történt. A kötőfehérjét /250 egység/ 65 ml 50 mM Tris-4 mM EDTA pufferben oldottuk fel, ami 2 % BSA-t tartalmazott. Az egyes minták 10 000 dpm <sup>3</sup>H-cAMP-t tartalmaztak. Az inkubálás 2-4 °C-on 2-16 óráig történt. A kötött és nem kötött cAMP-t 2 % BSA-t tartalmazó 50 mM Tris- 4 mM EDTA pufferben szuszpendált 2 %-os aktiv szénnel választottuk el. A mintákat 20 másodpercig rázattuk, majd 12 000 rpm-el 2 percig centrifugáltuk. A felülszó / 200 μl/ radioaktivitását folyadék szcintillációs spektrofotométerrel mértük meg. Minden egyes kísérlet so-

rán a kalibrációs görbét 0,5-16 pmol cAMP koncentráció között vettük fel.

#### 2.4. Az agy viz-, elektrolit /Na<sup>+</sup> és K<sup>+</sup>/ tartalmának meghatározása

A teljes agy eltávolítása után megmértük annak nedves súlyát, majd 110 °C-on súlyállandóságig szárítottuk. Ennek lemérése után nyertük a száraz súlyt. Ezekből az adatokból az agyszövet százalékos vıztartalmát a következı képlet alapján adtuk meg: 100 X /nedves súly- száraz súly/: nedves súly.

Az elektrolit meghatározásához a szárított szövetet 550 °C-on 20 órán keresztül hamvasztottuk, s az így nyert mintát 5 ml 3 M-os salétromsavban feloldottuk, majd ionmentes vızzel tızszeresére higitottuk. A nátriumot 330,3 nm-en, a káliumot 404,4 nm-en mértük meg Perking-Elmer 306-os atomabszorpciós spektrofotométerrel.

#### 2.5. Evans-kék - albumin komplex extravazációjának mérése

A vér-agy gát makromolekuláris transzportjának tanulmányozásának egyik legrégebb módja az Evans-kék festék intravénás alkalmazása. A keringésbe juttatott festék szorosan kötődik a szérum fehérjékhez, elsősorban az albuminhoz, s a vér-agy gát károsodáskor a fehérje- festék komplex együtt jut be az agyszövetbe. Az Evans-kék mennyisége RÖSSNER és TEMPEL /1966/



eljárásával meghatározható, ami közvetve tükrözi a makromolekuláris transzport mértékét.

Vizsgálataink során a festéket 100 mg/kg testsúly dózisban alkalmaztuk, amit az állatok két órával a perfuzió előtt kaptak. Az intravaszkuláris festék eltávolításához a mellkast megnyitottuk, majd a bal szívkamrán keresztül az aorta ascendesbe vezetett kanül segítségével az agyakat 0,9 %-os NaCl oldattal perfundáltuk, addig amíg a jobb pitvarból kifolyó oldat festékmentes nem lett. A teljes agy eltávolítása után lemértük a nedves súlyt, majd az agyakat 5 ml 50 %-os triklór-ecetsavban homogenizáltuk, s ezt követően 10 000 rpm-el 10 percig centrifugáltuk. A felüluszó festék koncentrációját 615 nm hullámhosszon határoztuk meg Unicam SP 1800 típusu spektrofotométerrel.

### 3. EREDMÉNYEK

#### 3.1. Normál patkány agyból izolált mikroerek adenilát ciklázának aktiválhatósága $Ca^{++}$ -calmodulinnal

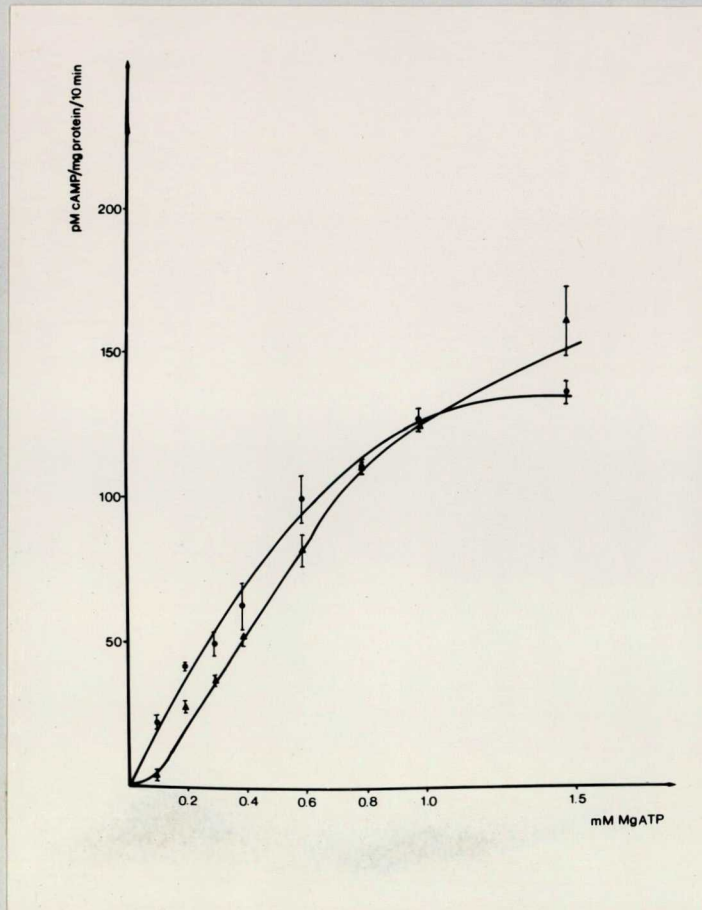
Az agyi mikroerek adenilát cikláz aktivitásának kinetikája során az aktuális szubsztrát koncentrációt a MgATP disszociációs állandójából  $/5,0 \times 10^{-5} M/$  számítottuk ki.  $/0,0975 mM$  és  $1,4625 mM$  között változott/. A szabad ATP elhanyagolható mennyiségben volt jelen  $/12,5-37,5 \mu M/$ .

A 4. ábra az adenilát cikláz aktivitásának alakulását mutatja  $1 mM$  EGTA jelenlétében illetve anélkül. Az inkubáló elegy-

be külön kalciumionokat nem tettünk, mivel az általunk használt  $MgCl_2$   $CaCl_2$  szennyezettsége abba a tartományba esett, / $0,3\mu M$ / ami maximálisan stimulálja az adenilát ciklázát. / $5 \times 10^{-5} M$ -os illetve ennél nagyobb  $Ca^{2+}$  koncentráció gátló hatása az adenilát cikláz aktivitására Kanof és mtsai 1977/ Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az 1 mM-nyi EGTA jelenlétében az alacsonyabb szubsztrát koncentrációnál csökkent az aktivitás, míg magasabb szubsztrát koncentrációnál azonos, illetve kissé emelkedett volt. A  $K_M$  érték számszerű változásának a mértékét nem tudtuk meghatározni, mivel az aktivitás nem követte a Michaelis-Menten kinetikát.

Kanof és mtsai /1977/ megfigyelték, hogy az EGTA gátló hatása elmarad, ha a homogenizátumot alaposan átmoszák. Vizsgálataink során mi is megnéztük, hogyan alakul az agyi mikroerek adenilát ciklázának alapaktivitása, ha 2 mM Tris-almasav pufferrel /pH 7,8/ háromszor átmoszuk a preparátumot. Eredményeinket az 5. ábrán foglaltuk össze. A mikroérdufrakcióból készített homogenizátum a fenti pufferben történő többszöri átmosása után az alapaktivitás jelentős csökkenését figyeltük meg. A maximális sebesség mintegy a felére csökkent, de ugyanakkor a szubsztrát iránti affinitás csökkenése is tapasztalható volt.

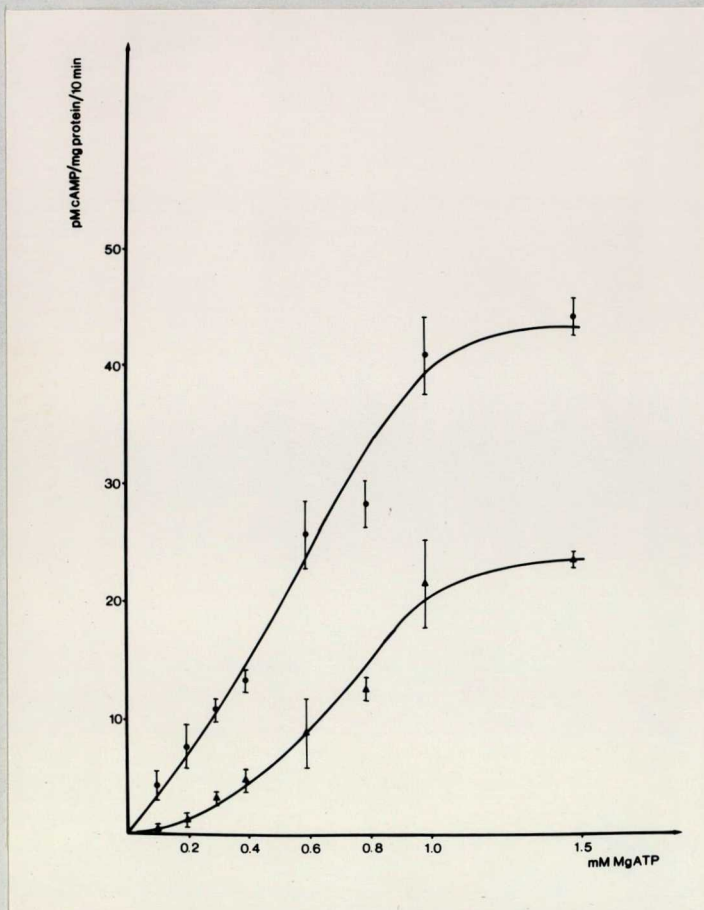
A következők során az így mosott preparátumhoz marhaagyból izolált calmodulint adtunk /Sigma/ és 3 g/ml-es koncentrációban az aktivitás fokozódását tapasztaltuk. / 6. ábra/



4. ábra

#### EGTA hatása az adenilát cikláz alapaktivitására

A mikroérdu-s-frakciót 2 mM TRIS-almasav pufferben /pH 7,8/ homogenizáltuk. Az inkubálást 100 mM TRIS-almasav pufferben végeztük 10 percig, 30 °C-on, 2 mM Mg<sup>2+</sup>, 0,1 mM GTP és 1 mM 3-isobutyl-1-methylxantin jelenlétében EGTA nélkül /●/ 1 mM EGTA hozzáadásával /▲/ Az értékek az átlagot ± standard deviációt tüntetik fel.



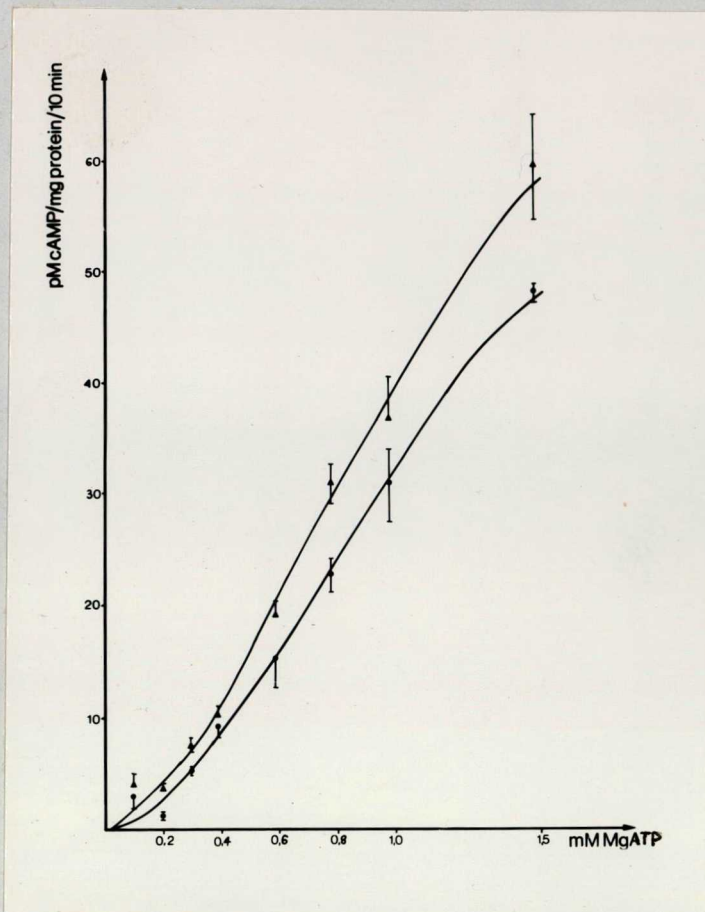
5. ábra

TRIS-almasav pufferrel történő mosás hatása az adenilát cikláz alap aktivitására.

A mikroérdu-s-frakciót 2 mM TRIS-almasav pufferben /pH 7,8/ homogenizáltuk, majd 12500Xg-vel 2 percig centrifugáltuk.

Az üledéket ugyanebben a pufferben szuszpendáltuk, s újból az előzővel megegyező módon centrifugáltuk. Ezt a lépést kétszer ismételtük meg. Az üledéket a fenti pufferben szuszpendáltuk. A reakció 30 °C-on, 10 percig 100 mM TRIS-almasav pufferben /pH 7,8/ ment végbe, 2 mM Mg<sup>2+</sup>, 0,1 mM GTP és 1 mM 3-isobutyl-1-methylxantin jelenlétében

TRIS-almasav pufferrel mosott/▲/illetve nem mosott frakció/●/ Az értékek átlagot + standard deviációt tüntetik fel

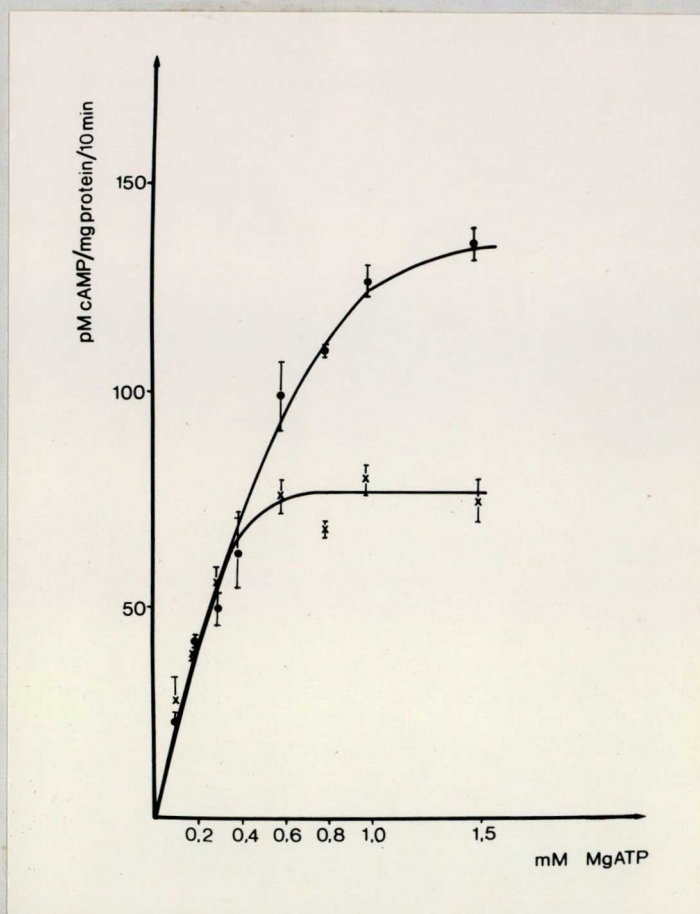


6. ábra

Calmodulin hatása TRIS-almasav pufferrel mosott frakció adenilát cikláz alapaktivitására

A mikroérdu-s-frakciót a 4. ábránál leírtak szerint homogenizáltuk, majd mostuk. A reakciót 3 g/ml koncentrációju calmodulin /Sigma/ jelenlétében /▲/ illetve anélkül /●/ végeztük el 30 °C-on, 10 percig 100 mM TRIS-almasav pufferben /pH 7,8/, ami 2 mM Mg<sup>2+</sup>-t, 0,1 mM GTP-t és 1 mM 3-isobutyl-1-methylxantin-t tartalmazott. Az értékek átlagot ± standard deviációt jelölnek.

Megnéztük a calmodulin hatását felfüggesztő vegyület, a trifluoperazin hatását is /7. ábra/. 100 M trifluoperazin hatására a maximális sebesség csökkenését figyeltük meg, a szubsztrát iránti affinitás növekedésével egyidejűleg.



7. ábra

Trifluoperazin hatása az adenilát cikláz alapaktivitására  
A mikroérdus-frakciót 2 mM TRIS-almasav pufferben /pH 7,8/  
homogenizáltuk. A reakciót 100 M Trifluoperazin jelenlété-  
ben /●/ illetve anélkül /x/ végeztük 30 °C-on, 10 percig  
100 mM TRIS-almasav puffer /pH 7,8/ oldatban, ami 2 mM  
Mg<sup>2+</sup>-t, 0,1 mM GTP-t és 1 mM 3-isobutyl-1-methylxantint  
tartalmazott.

Az értékek átlagot<sub>±</sub>standard deviációt jelölnek.

### 3.2. Kisérletes pneumotorax-al együttjáró agyödéma jellemzése

#### 3.2.1. A hipoxia fokának és a kórkép általános lefolyásának jellemzése

A kísérletes pneumothorax létrehozását követően a leszálló aortában mért oxigén parciális nyomása fokozatosan csökken /I. táblázat/, a széndioxid parciális nyomása viszont emelkedett. A vér pH-ja, a standard bikarbonát érték csökkent, s a kritikus szakaszban voltak a legalacsonyabbak. A légzés rendellenes volt. A vérnyomás kezdetben emelkedett volt /maximum 100 hgmm/, majd ezt tartós hipotenzió követte. Azokban az állatokban, amelyeknél a kritikus fázist követően megszüntettük a pneumothoraxot, ezek az értékek fokozatosan normalizálódtak, a vér pH-ja, a standard bikarbonát, a széndioxid parciális nyomása a kiindulási értéket vették fel, az oxigén parciális nyomása viszont kissé alacsonyabb volt.

#### 3.2.2. Az agyszövet viz- és elektrolit tartalmának alakulása

Az agykéreg viktartalmának a fokozódását lehetett megfigyelni a kritikus fázisban /II. táblázat/, ami a pneumothoraxot követő 3. óra után még nagyobb értéket vett föl. A mélypon-ton a nátriumion tartalom szintén emelkedett, a káliumion tartalomban viszont nem volt változás.

I. táblázat Artériás vérgáz értékek, sav-bázis egyensúly és a vérnyomás alakulása kísérletes pneumothorax során

Kísérleti csoportok	pH	Standard bikar- bonát /mM/l /	Az oxigén parci- ális nyomása /P <sub>O<sub>2</sub></sub> / /kPa/	A széndioxid parciális nyomása /P <sub>CO<sub>2</sub></sub> / /kPa/	Közép artériás nyomás /kPa/
Kontroll	7,45±0,02	26,2±4,0	10,1±1,0	5,1±0,7	9,7±0,9
Pneumothorax kritikus szakasza	7,05±0,13 <sub>a</sub>	18,8±4,3 <sub>a</sub>	3,5±0,7 <sub>b</sub>	12,7±3,6 <sub>a</sub>	8,0±1,6
Kritikus szakasz után 3 órával	/i/ 7,04±0,13 <sub>a</sub> /ii/ 7,47±0,05	/i/ 17,8±5,3 <sub>a</sub> /ii/ 28,1±4,9	/i/ 3,1±1,3 <sub>b</sub> /ii/ 6,9±1,0	/i/ 13,1±4,5 <sub>a</sub> /ii/ 5,3±1,0	/i/ 6,8±1,1 <sub>a</sub> /ii/ 9,6±0,5

átlag±standard deviáció

n= 10

a= a kontrolltól szignifikánsan különbözik p<0,01

b= a kontrolltól szignifikánsan különbözik p<0,001

i= kritikus szakaszban; ii= kritikus szakasz után 3 órával



II. táblázat Az agykéreg viz-, nátriumion és káliumion tartalmának alakulása kísérletes pneumothoraxban

Kísérleti csoportok	Viztartalom %	Nátriumion koncentráció /mmol/kg száraz tömeg/	Káliumion koncentráció /mmol/kg száraz tömeg/
Kontroll	83,78 <sub>±</sub> 0,28	410,±35,45	534,7 <sub>±</sub> 49,2
Pneumothorax kritikus szakasza	84,73 <sub>±</sub> 0,17 <sub>a</sub>	481,7 <sub>±</sub> 75,7 <sub>c</sub>	528,6 <sub>±</sub> 62,0
Pneumothorax után 3 órával	85,55 <sub>±</sub> 0,41 <sub>b</sub>	-	-

átlag<sub>±</sub> standard deviáció

n= 5

a= a kontrolltól szignifikánsan különbözik p<0,01

b= a kontrolltól szignifikánsan különbözik p<0,001

c= a kontrolltól szignifikánsan különbözik p<0,05

III. táblázat Evans-kék-albumin komplex extravazációjának mértéke kísérletes pneumothorax során az agykéregben

Kontroll	Pneumothorax kritikus szakasza	A kritikus szakasz után 3 órával	Dexamethasonos elő- kezelés
0,17 <sub>±</sub> 0,07	0,17 <sub>±</sub> 0,07	0,78 <sub>±</sub> 0,36 <sub>a</sub>	0,18 <sub>±</sub> 0,12 <sub>b</sub>

átlag<sub>±</sub>standard deviáció

n= 5

a= a kontrolltól szignifikánsan különbözik p<0,01

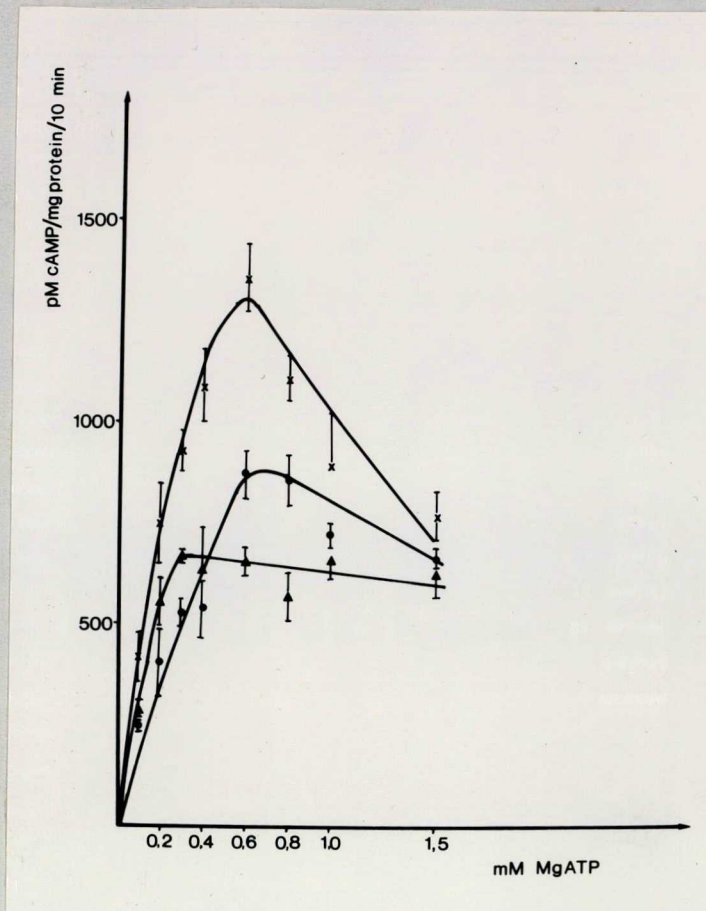
b= a kontrolltól szignifikánsan különbözik p<0,05

### 3.2.3. Az Evans-kék-albumin komplex penetrációjának kvantitatív változása

A kritikus szakaszban mért Evans-kék festék tartalom nem mutatott lényeges változást a kontroll állatokhoz képest, viszont a pneumothoraxot követő harmadik órában szignifikánsan emelkedett volt. /III. táblázat/

### 3.2.4. Az agyi mikroerek adenilát cikláz aktivitásának alakulása

A 8. ábrán az adenilát cikláz aktivitásának alakulása figyelhető meg kísérletes pneumothorax kritikus szakaszában, illetve vezet követően három órával később. A kontroll állatok adenilát ciklázának kinetikai paraméterei a Hanes-féle ábrázolás alapján  $K_M=0,42$ ,  $V_{max.}=1300$  pMcAMP/ mg fehérje /10 perc adódott /9. ábra/. A kritikus periódusban a szubsztrát iránti fokozódás volt tapasztalható  $/K_M=0,27/$ , míg a maximális sebesség csökkent  $/V_{max.}=1180$  pMcAMP/mg fehérje/ 10 perc/. A kritikus periódus után 3 órával a szubsztrát iránti affinitás csökkent ugyan, de a kontroll értékhez képest nagyobb volt  $/K_M=0,37/$ , a maximális sebesség viszont jelentősen emelkedett  $/V_{max.}=2200$  pM cAMP/mg fehérje /10 perc /, ami az adenilát cikláz aktivitásának fokozódására utal.

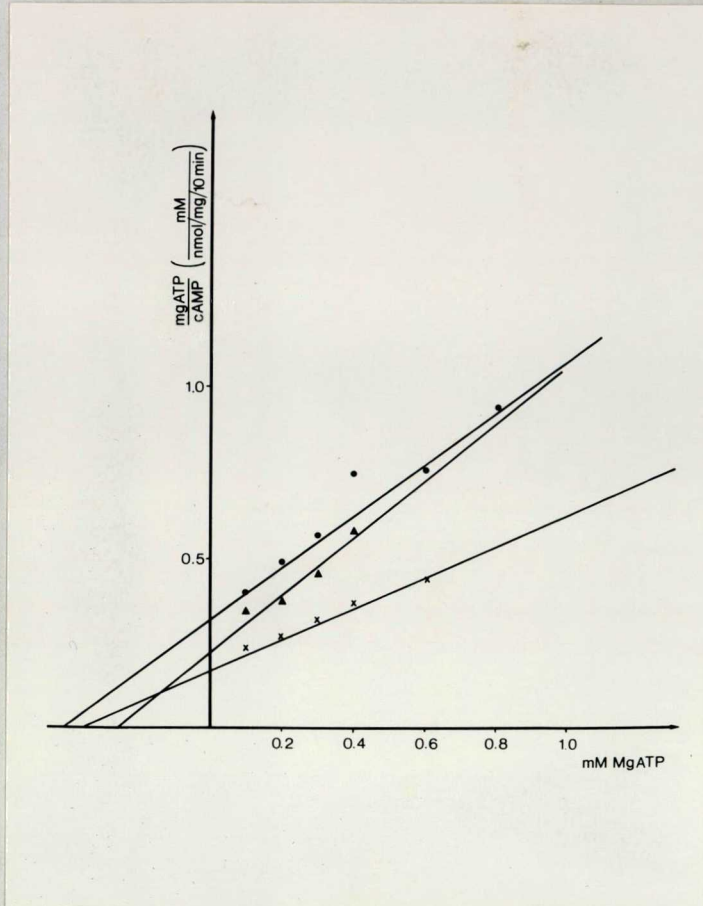


7. ábra

Adenilát cikláz alapaktivitásának alakulása kísérletes pneumothoraxban

A mikroérdu-s-frakciót 2mM TRIS-almasav, 2mM EGTA pufferben /pH 7,8/ homogenizáltuk. A reakciót 30 °C-on, 10 percig 100mM TRIS-almasav pufferben /pH 7,8/ végeztük 10mM Mg<sup>2+</sup>, 0,1mM GTP, 0,6 mM EGTA és 1mM 3-isobutyl-1-methylxantin jelenlétében. A MgAPT szubsztrát koncentrációja 0,09-1,49 mM között változott. A jelek a kontroll /●/, a kritikus szakaszban levő /▲/ és a kritikus szakasz után 3 órával /×/ vizsgált állatok mikroérdu-s-frakciójának adenilát cikláz aktivitását tüntetik fel. Az értékek átlagot+standard deviációt jelölnek.





8. ábra

Adenilát cikláz alapaktivitásának alakulása kísérletes pneumothoraxban, Hanes-féle ábrázolás

A jelek a 7. ábránál leirtaknak felelnek meg.

### 3.3 Az agyi mikroerek adenilát cikláz aktivitása vazogén típusu agyödéma modellekben

#### 3.3.1. Hidegödémában

A IV. táblázatban egy vér-agy gát marker, az Evans-kék alkalmazásával nyert kantitativ vizsgálataink adatait foglaltuk össze. Három órával a 30 másodperces hideg kezelés után jelentős festék-albumin komplex extravazáció volt megfigyelhető. A kontroll kísérleti csoport hideg kezelésben nem részesült, de az Evans-kék-albumin komplex ugyanannyi ideig keringett az érrendszerükben, mint a hideg kezelésen átesett csoport esetében. Dexamethasonnal végzett terápiás beavatkozások során azt tapasztaltuk, hogy szemben a hipoxiás modellel, ahol az előkezelés kivédte a vér-agy gát károsodást, a hideg ödéma modellben ez teljesen eredménytelen volt, sőt az extravazáció mértéke némiképp fokozódott.

Ugyanebben a stádiumban néztük meg a mikroerek adenilát ciklázának aktivitását. V. táblázat/ A hideg kezelés után 3 órával preparáltuk a kapillárisokat. Az adenilát cikláz aktivitást telítési szubsztrát koncentrációjánál / 1 mM MgATP / 0,6 mM EGTA jelenlétében határoztuk meg. A kezelt féltekékben /jobb/ aktivitás csökkenés volt kimutatható, ugyanakkor a hideg kezelésnek alá nem vetett /bal/ féltekében az aktivitás még alacsonyabbnak bizonyult.

IV. táblázat Evans-kék-albumin komplex extravazációja hideg-ödémában, illetve ezt megelőző Dexamethasonnal történő előkezelés után

---

Evans-kék mennyisége $\mu\text{g/g}$ nedves agysuly/		
Kontroll	3 órával a hideg kezelés után	Dexamethasonos előkezelés
2,1 $\pm$ 0,2	27,8 $\pm$ 1,7 <sub>a</sub>	38,5 $\pm$ 4,4 <sub>a;b</sub>

---

átlag  $\pm$  standard deviáció n=5

a= a kontrolltól szignifikánsan különbözik  $p < 0,001$

b= a hideg ödémás csoporttól szignifikánsan különbözi  $p < 0,02$

V. táblázat Az adenilát cikláz alapaktivitásának alakulása 3 órás hideg ödémában

---

Kontroll	Kezelt oldal	Kezeletlen oldal
/pM cAMP/mg fehérje/10 perc/		
123,2 $\pm$ 6,1	89,2 $\pm$ 5,2 <sub>a</sub>	64,6 $\pm$ 4,1 <sub>a</sub>

---

átlag  $\pm$  standard deviáció n=3

a= a kontrolltól szignifikánsan különbözik  $p < 0,05$

### 3.3.2. Szubarachnoidális vérzést követő ödémában

A szubarachnoidális vérzés után kialakuló ödéma jellemző értékeit a VI. táblázatban foglaltuk össze. 3 órával a szubarachnoidális vérzés létrehozása után az agyszövet viz- és nátrium tartalmának a növekedését figyeltük meg, míg a kálium tartalomban nem következett be szignifikáns változás.

Ugyanebben az időpontban jelentős Evans-kék-albumin komplex extravazációt mértünk. A vérzés létrehozása előtt 5 órával adott Dexamethason / 2 mg/kg testsúly/ nem csökkentette a vér-agy gát károsodás mértékét. /VII.táblázat/ Az adenilát cikláz aktivitása, amit a hidegödémánál ismertetett körülmények között határoztunk meg, a kezelt /jobb/ és kezeletlen /bal/ félteke esetében egyaránt alacsonyabb volt. /VIII.táblázat/

### 3.3.3. Dimetil-szulfoxiddal kiváltott ödémában

3 órával a dimetil-szulfoxid intravénás és intraperitoneális alkalmazása után a makromolekuláris transzport fokozódását tapasztaltuk, amit a Dexamethasonos előkezelés nem befolyásolt. /IX. táblázat/

Egy korábbi időpontban megvizsgálva a mikroerek adenilát cikláz aktivitása /1 mM MgATP, 0,6 mM EGTA jelenlétében/ szignifikánsan kisebb volt a kontroll állatokéhoz képest. /X. táblázat/

VI. táblázat Az agyszövet viz-, nátrium és kálium tartalmának alakulása 3 órával a szubarachnoideális vérzés létrehozása után

Kísérleti csoportok	Állatok száma	Viztartalom / % /		Ion koncentráció /mmol/kg száraz tömeg/			
		azonos oldali	ellen oldali	Nátrium		Kálium	
		azonos oldali	ellen oldali	azonos oldali	ellen oldali	azonos oldali	ellen oldali
Kontroll	10	78,1 <sub>±</sub> 0,3		210 <sub>±</sub> 4		423 <sub>±</sub> 6	
Álmütött	10	78,2 <sub>±</sub> 0,2	78,1 <sub>±</sub> 0,3	208 <sub>±</sub> 8	210 <sub>±</sub> 5	427 <sub>±</sub> 8	428 <sub>±</sub> 9
3 órás sub-arachnoideális vérzés	12	79,4 <sub>±</sub> 0,3 <sub>a</sub>	79,2 <sub>±</sub> 0,3 <sub>a</sub>	230 <sub>±</sub> 4 <sub>a</sub>	231 <sub>±</sub> 7	418 <sub>±</sub> 5	420 <sub>±</sub> 4

átlag <sub>±</sub> standard deviáció

a= szignifikáns a kontrollhoz viszonyítva  $p < 0,05$



VII. táblázat Evans-kék-albumin komplex extravazációja 3 órás szubarachnoidális vérzésben, illetve ezt megelőző Dexamethasonnal történő előkezelés után

Kontroll	Evans-kék mennyisége $\mu\text{g/g}$ nedves agysuly/ 3 órás szubarachnoidális vérzés	Dexamethasonos előkezelés
2,3 $\pm$ 0,3	13,5 $\pm$ 2,0 <sub>a</sub>	14,3 $\pm$ 1,3 <sub>a</sub>

átlag  $\pm$  standard deviáció n= 5

a= a kontrolltól szignifikánsan különbözik p < 0,001

VIII. táblázat Az adenilát cikláz alapaktivitásának alakulása szubarachnoidális vérzésben

Kontroll	Kezelt oldal / pM cAMP/mg fehérje/10 perc/	Kezeletlen oldal
120,0 $\pm$ 9,1	82,8 $\pm$ 6,3 <sub>a</sub>	79,2 $\pm$ 5,7 <sub>a</sub>

átlag  $\pm$  standard deviáció n= 3

a= a kontrolltól szignifikánsan különbözik p < 0,05



IX. táblázat Evans-kék-albumin komplex extravazációja 3 órás DMSO ödémában, illetve ezt megelőző Dexamethasonnal történő előkezelés után

---

Kontroll	Evans-kék mennyisége / $\mu$ g/g nedves agysuly/ 3 órás DMSO ödéma	Dexamethasonos előkezelés
1,3 $\pm$ 0,15	6,4 $\pm$ 0,7 <sub>a</sub>	6,6 $\pm$ 1,3 <sub>a</sub>

---

átlag  $\pm$  standard deviáció n= 4

a = a kontrolltól szignifikánsan különbözik p < 0,001

X. táblázat Az adenilát cikláz alapaktivitásának alakulása 40 perces DMSO ödémában

---

Kontroll	DMSO ödéma
/pM cAMP/mg fehérje/10 perc/	
64,4 $\pm$ 3,8	28,6 $\pm$ 1,7 <sub>a</sub>

---

átlag + standard deviáció n = 3

a = a kontrolltól szignifikánsan különbözik p < 0,001

#### 4. MEGBESZÉLÉS

##### 4.1. Az agyi mikroerek adenilát ciklázának $Ca^{2+}$ -calmodulinnal történő aktiválhatóságának értékelése

Először BRADHAM és mtsai /1970/ irták le, hogy az agyi adenilát cikláz alap és guanozin-5- $\beta$ - $\gamma$ imino/ trifoszfát stimulált aktivitása 20-30 %-kal csökkenthető EGTA-val, ami kalciumionok hozzáadásával megfordítható.

BROSTOM és mtsai /1975/ illetve CHEUNG és mtsai /1975/ mutatták ki, hogy a  $Ca^{2+}$  ezt a hatását calmodulinon keresztül érvényesíti. Mivel az agykéregben sokféle típusu sejt található, nem ismeretes az, vajon az adenilát cikláznak a calmodulinnal aktiválható és attól független formája különböző vagy ugyanazon sejtekben fordul-e elő.

Vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy az agykéregből izolált mikroerek adenilát cikláz szintén gátolható EGTA-val. A kalciumionok aktiváló hatása a preparátum szolubilis elemein keresztül történhet, mivel a homogenizátum alapos mosása szintén csökkenti az alapaktivitást. Ha az így mosott preparátumhoz marhaagyból izolált calmodulint adtunk, a kalciumionok aktiváló hatása újból megfigyelhető volt.

Ezen vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy az agyai kapillárisokban az adenilát cikláz  $Ca^{2+}$ -calmodulinnal stimulálható for-

mája is előfordul. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy az aktivitás egy calmodulin antagonistával, a trifluoperazinnal csökkenthető.

Mivel a magasabb rendű állatok esetében a  $Ca^{2+}$ -calmodulinnal stimulálható adenilát cikláz csak az idegszövetben irták le /BROSTROM és mtsai 1975, BRADHAM és mtsai 1970, CHEUNG és mtsai 1975, SALTER és mtsai 1981/ elképzelhető, hogy ez a jelenség a többi szövet kapillárisainál nem figyelhető meg.

A vér-agy gát funkció fenntartásában fontos szerep jut a mikroerek adenilát ciklázának, ugyanakkor bizonyos barrier károsodások során /DUX és mtsai 1984/ kalciumion beáramlás tapasztalható, ami hormon jelenléte nélkül is képes aktiválni az adenilát cikláz, és ezzel makromolekuláris transzport fokozódását idézheti elő, ami a későbbiek során agyödéma kialakulásához vezethet.

Arra vonatkozóan, hogy az agyi mikroerek adenilát cikláz aktivitásának ezen sajátossága összefüggésben van-e a hajszálerek különleges permeabilitási viszonyaival, további vizsgálatok elvégzésére látszik indokoltnak.

#### 4.2. Kísérletes pneumothoraxot kísérő változások megbeszélése

Az általunk alkalmazott kísérletes pneumothorax a hipoxia által előidézett vér-agy gát károsodás és ezzel együttjáró ödéma olyan modellje, amely lehetővé teszi, hogy kizárólag a hipoxia

hatását nézzük a vér-agy gát funkcióra, mivel ischaemiás állapotban nem kell számolni.

Az egyéb ischaemiás-hipoxiás modellekhez hasonlóan, a csökkent oxigén ellátás ideje alatt makromolekuláris transzport fokozódást nem tapasztaltunk, habár az agyszövet viz- és nátriumion tartalmának növekedése már ekkor is megfigyelhető volt. A káliumion tartalom változás nem számottevő. Ezek a tények a pneumothorax által kiváltott ödéma citotoxikus eredetére utalnak. A pneumothorax megszüntetése után, a többi citotoxikus agyödéma modellel megegyezően, a makromolekuláris transzport is fokozódik, az agykéreg viztartalma tovább fokozódik. Szemben a vazogén típusu agyödémákkal, a Dexamethasonnal, egy glükokortikoid hormon származék, a makromolekuláris permeabilitás fokozódás kivédhető illetve mérsékelhető.

Elektrommikroszkópos vizsgálatok a kísérletes pneumothoraxot kísérő agyödémában a pinocitotikus tevékenység fokozódását mutatták ki. /TEMESVÁRI és mtsai 1984/. Mivel az endothelsejtek pinocitozisa és az adenilát cikláz aktivitása között szoros összefüggés van, fontosnak találtuk, hogy megnézzük ennek alakulását a hipoxia által létrehozott citotoxikus ödémában. Az enzim kinetikáját tanulmányozva azt tapasztaltuk, hogy a kritikus szakasz során az aktivitásban nagy változások nincsenek, a szubsztrát iránti affinitás fokozódás figyelhető meg. A kritikus periódusban a pneumothoraxot megszüntetve, s ezt követően három óra után az adenilát cikláz aktivitásának je-

lentős fokozódása tapasztalható, a  $V_{max}$  szignifikánsan emelkedik. Ez összhangban van azzal, hogy ekkor élénk makromolekuláris transzportot, kifejezett ödémás állapotot lehet megfigyelni. Kísérleteink az adenilát cikláz alapvető fontosságára hívják fel a figyelmet a pneumothorax-szal kiváltott hipoxia okozta citotoxikus agyödéma kialakulásában.

#### 4.3. A vazogén agyödéma modellekkel kapcsolatos eredmények értékelése

Vizsgálataink során három vazogén típusu agyödéma modellt tanulmányoztunk. Amint az eredményeinkből is kitűnt, egyik esetben sem tapasztaltunk emelkedést a mikroerek adenilát cikláz aktivitásában. Ez a negatív eredmény látszólag ellentmond annak a feltételezésnek, hogy a mikroerek adenilát cikláz aktivitása a megnövekedett permeabilitással egyidejűleg fokozódik.

Az eredmények interpretációja során azonban számos metodikai jellegű kérdést is tekintetbe kell venni. Ezek közül elsőként kell kiemelni, hogy mindhárom vazogén agyödéma modell meglehetősen durva, olykor irreverzibilis változást okoz. Így pl. a hidegödéma és a subarachnoideális vérzés esetében súlyos szövetelhalás is létrejön, amely ha meghaladja az erek szempontjából reaktívnak tekinthető zóna nagyságát, természetesen az enzimaktivitás csökkenését eredményezheti. A szövetelhalás

következtében a kezelt agyterület vérellátása is zavart szenved, ami kedvez az ischaemias-hipoxias állapot kialakulásának, így tiszta vazogén típusu agyödéma csak a kezelést követő, viszonylag rövid ideig áll fenn. Joggal feltételezhető, hogy ilyen súlyos esetekben az erek fala is lényeges patológiai károsodást szenved, amely az érfal rupturáját is eredményezheti. A subarachnoidealis vérzés esetében még a beadott saját vér maradványai is zavarhatják a biokémiai méréseket.

Az általunk kidolgozott szubarachnoidealis vérzést követő ödéma kezdeti szakaszában a vér-agy gát permeabilitása szintén nő, s az ödéma létrejöttét az agy viz- és elektrolit háztartásában bekövetkező változások is jelezték.

Feltételezhető, hogy a subarachnoidealis vérzésben az erek mechanikus károsodása eredményezi elsősorban a vér-agy gát permeabilitás zavarát, s emiatt - valamint a nagyfoku szövetelhalás miatt - nem tudtunk az adenilát cikláz aktivitásában emelkedést kimutatni.

A dimetil-szulfoxiddal kiváltott agyödémát BROADWELL és mtsai /1982/ jellemezték, mi csak a fokozottabb makromolekuláris transzport létét bizonyítottuk az általunk meghatározott körülmények között. A modell előnye, hogy a vér-agy gát károsodás a luminalis oldal irányából történik, gyakorlatilag az egész vér-agy gát rendszert érinti, szövetelha-

lás nem tapasztalható és a permeabilitás fokozódás reverzibilis. Ugyanakkor az adenilát cikláz aktivitásának a csökkenése jól magyarázható azzal a ténnyel, hogy a hatás eléréséhez szükséges dózisonk általános citotoxikus hatása van. Ezek a körülmények miatt erősen vitatható, hogy a használt módszerek milyen mértékben is modellezik a valós agyödémákat.

Az adenilát cikláz mérések negativitása, valamint a Dexamethason előkezelés eredménytelensége arra utalnak, hogy a vizsgált modellek - annak ellenére, hogy az irodalomban széles körben használatosak - nem alkalmasak valójában finom molekuláris elemzések elvégzésére.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kimutattuk, hogy az agyi mikroerekben az adenilát cikláz  $Ca^{2+}$ -calmodulinnal aktiválható formája is előfordul, ami lehetővé teszi, hogy különböző hormonok jelenléte nélkül, elsősorban patológiás esetekben bekövetkező intracelluláris kalciumion szint emelkedés révén, emelkedjen a cAMP mennyisége az endothelsejten belül.

A kísérletes pneumothorax útján kiváltott citotoxikus agyödéma hipoxiás modelljében a kísérleti körülmények finom szabályozásával szelektív vér-agy gát károsodás hozható létre. A mikroerek makromolekuláris transzport fokozódásán



kívül egyéb patológiás jelenségek nem léptek föl, így lehetővé vált az agyödéma mechanizmusának szelektív tanulmányozása. Ebben a modellben az agyödéma kialakulásával párhuzamosan az adenilát cikláz rendszer is aktiválódott, aminek szerepe lehet a makromolekuláris transzport fokozódásában.

A vazogén eredetű agyödéma modellek - hidegödéma, subarachnoidealis vérzést követő ödéma, dimetil-szulfoxiddal kiváltott ödéma - durva beavatkozást jelentenek az agy anyagcseréjébe, a kialakuló vér-agy gát károsodás biokémiaailag nehezen különíthető el az általános toxikus hatástól. Ezért ezek a modellek nem alkalmasak az adenilát cikláznak az agyödéma patomechanizmusában betöltött szerepének tisztázására.

Számos kísérleti tény szól amellett, hogy az adenilát cikláz aktív szerepet játszhat a vér-agy gát permeabilitásának szabályozásában, ami a rendszert befolyásoló vegyületek kutatását teszi indokolttá, annak érdekében, hogy eredményesebb agyödéma kezelést lehessen a klinikukban végrehajtani.

6. IRODALOM

ALBERT, Z.; ORLOWSKI, M.; RUZUADLO, Z.; ORLOWSKI, J. /1966/

Studies on  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity and its histochemical localization in the central nervous system of man and different animal species

Acta Histochem. /JENA/ 25 312-320

AVERET, N.; RIGOLET, M. and COHADON, F. /1984/ Modification of synaptosomal  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  ATP-ase activity during vasogenic edema in the rabbit

J. Neurochem. 42 275-277.

BETZ, A. L.; FIRTH, J. A.; GOLDSTEIN, G. W. /1980/ Polarity of blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells

Brain Res. 192 17-28.

BIDL, A. and KRAUS, R. /1898/ Über einer bisher unbekannte toxische Wirkung der Gallensäuren auf das Zentralnervensystem

Zentralblatt inn Med., 19 1185-200

BODSCH, W.; HÜRTER, T. and HOSSMAN, K. - A. /1982/ Immunohistochemical method for quantitative evaluation of vasogenic brain edema following cold injuries of rat brain

Brain Res. 249 111-121.

BRADBURY, M. W. B. /1979/ The concept of a Blood-Brain Barrier

JOHN WILEY and SONS New York pp. 137-213.

- BRADHAM, L.S.; HOLT, D.A. and SIMS, M. /1970/ The effect of  $Ca^{2+}$  on the adenyl cyclase of calf brain  
Biochim. Biophys. Acta 201 250-260.
- BRIGHTMAN, M.W., REESE, T.S. /1969/ Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain  
J. Cell. Biol., 40 648-677.
- BRIGHTMAN, M.W.; BROADWELL, R.D. /1976/ The morphological approach to the study of normal and abnormal brain permeability, in LEVI G., Battistini L., Lajtha A. /eds/:  
Adv. exp. Med. Biol. New York Plenum Press 69.
- BROADWELL, R.D.; SALCMAN, M.; KAPLAN, R.S. /1982/ Morphologic effect of dimethyl sulfoxid on the blood-brain barrier  
Science 217 164-166.
- BROSTOM, C.O.; HUANG, Y.C.; BRECKENRIDGE, B.M. and WOLFF, D.J. /1975/ Identification of a calcium-binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 64-68.
- BROWN, A.W. and BIERLY, J.B. /1972/ Anoxic-ischemic cell change in rat brain. Light-microscopic and fine structural observation.  
J. Neurol. Sci. 16 59-84.
- BROWN, A.W. and BRIERLY, J.B. /1973/ The earliest alteration in rat neurones and astrocytes after anoxia-ischaemia  
Acta Neuropath, 23 9-22.

- CAMERON, I.R.; DAVSON, H. and SEGAL, M.B. /1969/ The effect of hipercapnia on the blood-brain barrier to sucrose in the rabbit  
Yale J.Biol.Med. 42 241-7
- CHEUNG, W.Y.; BRADHAN, L.S.; LYNCH, T.J.; LIN, Y.M. and TALLANT, E.A. /1975/ Protein activator of cyclic 3 : 5 nucleotide phosphodiesterase of bovine or rat brain also activates its adenylate cyclase  
Biochem.Biophys.Res.Comm. 66 1055-1062.
- CODINAT, J.; HILDEBRANT, J.D.; SECUEA, R.D.; BIRNBAUMER, M.; BRYAN, J.; MANDARK, C.H.R.; IYENGAR, R. and BIRNBAUMER, L. /1984/  $N_s$  and  $N_i$ , the stimulatory and inhibitory regulatory components of adenylal cyclase  
J.Biol.Chem. 259 5871-5886.
- CSANDA, E. /1978/ Az agy-ödéma és kezelésének időszerü kérdései  
Orvosi Hetilap 119 2983-2993.
- DÓCZI, T.; JOÓ, F.; ÁDÁM, G.; BOZOKY, B.; SZERDAHELYI, P. /1983/ Experimental subarachnoid haemorrhage in rat: changes in the blood-brain barrier permeability  
Acta Neuropath. /közlésre benyújtva/
- DUX, E., MIES, G., HOSSMANN, K.-A., SIKLÓS, L.; Cytochemical localization of calcium in hippocampus following brief ischemia of gerbil brain. /Előkészületben/

- EISENBERG, H.M.; BARHOW, C.F. and LORENZO, A.V. /1970/ Effect of dexamethasone on altered brain vascular permeability  
Arch. Neurol. 23 18-22.
- HOSSMANN, K.-A. and OLSSON, Y. /1971/ Influence of ischemia on the passage of protein tracers across capillaries in certain blood-brain barriers injuries  
Acta neuropath. 18 113-122.
- ITO, U.; GO, K.G.; WALKER, I.T.; SPATZ, M. and KLATZO, I. /1976/ Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils III. Behaviour of the blood-brain barrier  
Acta Neuropath. 34 1-6.
- JOHANSON, B.; LI, C.-I.; OLSON, Y. and KLATZO, I. /1970/ The effect of acute arterial hypertension on the blood-brain to protein tracers  
Acta Neuropath. 16 117-24.
- JOÓ, F.; CSILLIK, B. /1966/ Topographical correlation between haematoencephalic barrier and cholinesterase activity in brain capillaries  
Exp. Brain Res. 1 147-151.
- JOÓ, F. /1971/ Increased production of coated vesicles in the brain capillaries during enhanced permeability of the blood-brain barrier  
Br. J. Exp. Pathol. 52 646-649.



- JOÓ, F. /1972/ Effect of  $N^6O^2$ -dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on the pinocytosis of brain capillaries of mice  
Experientia 28 1470
- JOÓ, F. and KARNUSHINA, I. L. /1973/ A procedure for the isolation of capillaries from rat brain  
Cytobios 8 41-48.
- JOÓ, F.; TÓTH, I. and JANCsó, G. /1975/ Brain adenylate cyclase: its common occurrence in the capillaries and astrocytes  
Naturwissenschaften 8 397.
- JOÓ, F. /1975/ Néhány enzim jelentősége az agyi kapillárisok permeabilitásának szabályozásában  
Kandidátusi értekezés.
- JOÓ, F. /1979/ The role of adenosine triphosphatase in the maintenance of molecular organization of the basal lamina in the brain capillaries  
Frontiers in Matrix Biology Ed.: A.M. ROBERT, R. BANIFACE L. ROBERT and S. KARGER, New York 166-182
- KANOF, P. D.; HEGSTRAND, L. R. and GREENGARD, P. /1977/ Biochemical characterization of histamine-sensitive adenylate cyclase in mammalian brain  
Arch. Biochem. Biophys. 182 321-334.
- KARNUSHINA, I. L.; PALACIOS, J. M.; BARBIN, G.; DUX, E.; JOÓ, F. and SCHWARTZ, J. C. /1980/ Studies on a capillary-rich fraction isolated from brain: Histaminic components and

characterization of the histamine receptors linked to  
adenylate cyclase

J.Neurochem. 34 1201-1208.

KARNUSHINA, I.L.; SPATZ, M. and BEMBRY, J. /1982/ Cerebral en-  
dothelial cell culture I. The presence of  $\alpha_2$  and  $\beta_2$   
adrenergic receptors linked to adenylyate **cyclase activity**  
Life Science 30 849-858.

KARNUSHINA, I.L.; SPATZ, M. and BEMBRY, J. /1983/ Cerebral en-  
dothelial cell culture II. Adenylyate cyclase response to  
prostaglandins and their interaction with the adrenergic  
system

Life Science 32 1427-1435.

KLATZO, I. /1967/ Neuropathological aspects of brain edema  
J.Neuropath. 26 1-13.

KROGH, A. /1946/ The active and passive exchanges of inorganic  
ions through the surface of living membranes generally  
Proc. Roy. Soc. B. 133 140-200.

LEWANDOWSKY, M. /1900/ Zur Lehre de Cerebrospinal flusseigkeit  
Z.Klin.Med. 40 480-94.

OLDENDORF, W.H.; BROWN, W.J. /1975/ Grater number of capillary  
endothelial mitochondria in brain than in muscle  
Proc.Soc. Exp.Biol.Med. 149 736-738.

OWMAN, C.; ROSENGREEN, E. /1967/ Dopamine formation in brain  
capillaries an enzymic blood-brain barrier mechanism  
J.Neurochem. 14 547-550.

- PALADE, G.E. /1960/ Transport in quanta across the endothelium of blood capillaries  
Anat.Rec. 136 254-260.
- PHILS, C.H. /1972/ The development of gliavascular relationship in the rat spinal cord. An electron microscopic study  
Z.Zellforsch 128 555-563.
- RAPOPORT, S.I. and THOMPSON, H.K. /1973/ Osmotic opening of the blood-brain barrier in the monkey without associated neurological deficit  
Science 180 971.
- RAPOPORT, S.I. /1976/ Blood-brain barrier in physiology and medicine  
Raven Press, New York
- REESE, T.S. and KARVOVSKY, M.J. /1967/ Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase  
J. Cell. Biol. 34 207-17.
- ROBERT, A.M.; GODEU, G.; MISKULIN, M.; MOATI, F. /1977/ Mechanism of action of collagenase on the permeability of the blood-brain barrier  
Neurochemical Research 2 449-455.
- ROSS, E.M. and GILMAN, A.G. /1980/ Biochemical properties of hormon-sensitive adenylate cyclase  
Ann.Rev.Biochem. 49 533-564.



SALTER, R.S.; KRINKS, M.H.; KLEE, C.B. and NEER, E.J. /1981/  
Calmodulin activates the isolated catalytic unit of  
brain adenylate cyclase  
J. Biol. Chem. 256 9830-9833.

SATO, K.; YAMAGUCHI, M.; MULLASANS, S.; EVANS, J.P. and ISHII, S.  
/1969/ Brain Edema:  
A study of biochemical and structural alteration  
Arch. Neurol. /Paris/ 21 413-424.

STEWART, P.A.; WILEY, M.J. /1981/ Developing nervous tissue  
induces formation of blood-brain barrier characteristic  
in invading endothelial cells:  
A study using quail chick translocations shimeras  
Dev. Biol. 84 183-192.

TEMESVÁRI, P.; HENCZ, P.; JOÓ, F.; ECK, E.; SZERDAHELYI, P. and  
BODA, D. / 198 / Modulation of the blood brain barrier  
permeability in neonatal cytotoxic brain edema:  
Laboratory and morphological findings obtained on  
newborn piglets with experimental pneumothorax  
Biol. Neonat. 46 198-208.

TEMESVÁRI, P.; JOÓ, F.; KOLTAI, M.; ECK, E.; ÁDÁM, G.; SIKLÓS, L.  
and BODA, D. /1984/ Cerebroprotective effect of dexamethasone  
by increasing the tolerance to hypoxia and  
preventing brain oedema in newborn piglets with experimental  
pneumothorax  
Neuroscience Letters 49 87-92.

TÓSAKI,Á.; KOLTAI,M.; JOÓ.F.; ÁDÁM,G.; SZERDAHELYI,P.;

LEPRÁN,I.; SZEKERES,L. /1984/ Requirement of de novo  
protein synthesis for cerebroprotectiv effect of  
dexamethasone in rats

Stroke /közlés alatt/

WATSON,B.D.; BURTO,R.; GOLDBERY,W.J.; SANTISO,M.; YOSHIDA,S.

and GINSBERY,M.D. /1984/ Lipid peroxidation in vivo in-  
duced by reversible global ischemia in rat brain

J.Neurochem. 42 268-274.

WESTERGAARD,E.; GO,G.; KLATZO,I. and SPATZ,M. /1976/ Increased

permeability of cerebral vessels to horseradish peroxidase  
induced by ischemia in Mongolian gerbils

Acta Neuropath. 35 307-25.

WESTERGAARD,E.; van DEUS,B.; BRONSTEDT,H.Z. /1977/ Increased

vesicular transport of horseradish peroxidase across  
central endothelium, evoked by acute hypertension

Acta Neuropathol. 37 141-152.

## Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Joó Ferenc tudományos főmunkatársnak, az MTA SzBK Biofizikai Intézetének Molekuláris Neurobiológiai Csoportjának vezetőjének, hogy tudományos vezetésével, hasznos tanácsaival segített értekezésem kidolgozásában.

Megköszönöm Dr. Fehér Ottó egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette számomra, hogy tudományos munkám során szorosán együttműködjem az előbbi említett csoporttal.

Köszönettel tartozom Temesvári Péter tanársegédnek és Dóczi Tamás adjunktusnak, hogy tevékeny részt vállaltak számos kísérleti kérdés kidolgozásában.

Szeretném megköszönni Gazdagh Gabriellának és Szerletics Máriának, hogy odaadóan segítettek laboratóriumi munkám során.

