

Készült:

A Szegedi Orvostudományi Egyetem
Gyógyszertani Intézetében

Igazgató:

Dr. Szekeres László egyetemi tanár

KÉTOLDALI ARTERIA CAROTIS LEKÖTÉS OKOZTA AGYISCHEMIÁS
KÁROSODÁS ÉS ANNAK BEFOLYÁSOLÁSA DEXAMETHASONNAL
SPRAGUE-DAWLEY PATKÁNYOKBAN

Irta:

Tótsaki Árpád
gyógyszerész



Szeged

1984

1952. évi

1. ...
2. ...
3. ...
4. ...

B 510



5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...
11. ...
12. ...



E 2.333

13. ...
14. ...
15. ...
16. ...
17. ...
18. ...
19. ...
20. ...



TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS	1
1.1.	A disszertáció célkitűzése	1
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1.	Az agyi ischemia patomechanizmusáról	3
2.2.	Módszerek az agyi hypoxia és ischemia kísérletes létrehozására	5
2.3.	Az ischemiában és hypoxiában alkalmazott gyógyszerkészítmények felosztása	7
3.1.	A TÉMA MEGKÖZELÍTÉSE	10
3.1.1.	Kísérleti modellek	10
3.2.1.	Vinpocetin cerebroprotektív hatása	14
3.2.2.	A barbiturátok hatása agyischemiában	15
4.	KISÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16
4.1.	Kísérleti állatok	16
4.2.	Felhasznált gyógyszerek	17
4.3.	A meghatározásokhoz szükséges anyagok	17
4.4.	Biokémiai módszerek	17
4.4.1.	Nagyenergiájú foszfátészterek és tejsav meghatározása	17
4.4.2.	A kalcium, nátrium és kálium meghatározása.	18
4.4.3.	Albumin extravazációjának mérése	19

5.	KISÉRLETI EREDMÉNYEK	20
5.1.	Az agyischemiás modell	21
5.2.	A kísérleti állatok magatartási változásai agyischemiában	23
5.3.	A vinpocetin, pentobarbital és a diazepam hatásának vizsgálata ischemiás modellen ...	26
5.4.	Kétoldali arteria carotis okkluzió követ- keztében fellépő biokémiai változások patkányagyban	31
5.5.	Dexamethason és actinomycin D kölcsönhatá- sának vizsgálata kísérletes agyischemiában.	36
5.5.1.	A kísérletek előzményei	36
5.5.2.	A makrokortin termelése és részleges tiszt- titása	39
5.5.3.	A makrokortint tartalmazó és kontroll lio- filizátumok foszfolipáz A ₂ aktivitásának meghatározása	42
5.5.4.	Dexamethason és actinomycin D hatása az ál- latok túlélésére kétoldali arteria carotis lekötés következtében fellépő agyische- miában	44
5.5.5.	Actinomycin D és dexamethason hatása az agyischemia egyes szakaszaiban fellépő agyooedemára	46
5.5.6.	Makrokortin védőhatása agyischemiában	53

6.	AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	57
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	59
8.	IRODALOM	62

1. BEVEZETÉS

1.1. A disszertáció célkitűzése

A cardio-vascularis rendszer betegségeiből származó elhalálozások világviszonylatban az első helyen állnak. Számtalan kutató foglalkozik a szív és érrendszer megbetegedéseivel, amit bizonyít az egyes részterületekkel foglalkozó publikációk igen nagy száma.

Napjainkban elengedhetetlen követelmény a kutatás szempontjából az élő szervezet fiziológiás és patológiás folyamatainak pontos megismerése, az elváltozások magyarázata, hiszen csak ezen ismeretek birtokában tudjuk a lejátszódó folyamatokat a számunkra legkedvezőbb irányba befolyásolni.

E disszertációban az ischemiás agyszövet állapotának változásairól lesz szó, melyek ismerete mind a patológiában, mind a klinikumban igen fontos. A hypoxiás agykárosodások legnagyobb része generalizált agyérsclerosis miatt kialakult keringési elégtelenség következtében kifejlődő diffúz agyi ischémia, vagy egyes nagyobb agyerek sclerotikus beszűkülése, illetve elzáródása miatt lokálisan fellépő elégtelen vérellátás következménye. A kórosan csök-

kent agyi véráramlás növelése elsősorban értágító szerekkel érhető el, s lehetséges, hogy a tartós kezelés a sziverekhez hasonlóan, elősegítheti az újraereződés folyamatát, vagyis a kollaterális keringés kialakulását. A közvetlenül ható agyértágító készítmények nagy hátránya, hogy nemcsak az agyra, hanem a perifériás keringésre is hatnak, s így vérnyomáscsökkenést okoznak, amely tovább súlyosbithatja a már kialakult ischemiás állapotot.

Biokémiai vizsgálataink során az energiatermelésben és felhasználásában fő szerepet játszó nagyenergiájú foszfátészterek szintjét vizsgáltuk normál állapotban és ischemiában különféle gyógyszeres beavatkozások hatására. Meghatároztuk az adenozin-5'-trifoszfát /ATP/, a kreatin-foszfát /CP/, valamint az anaerob anyagcsere mértékét jelző laktát /L/ szint időbeli változását. Vizsgáltuk továbbá az össz-szöveti nátrium, kálium, kalcium szintet, valamint az agy viztartalmát normál és ischemiás állapotban, valamint gyógyszeres kezelés hatására.

Az agyszöveti ischemia olyan kísérleti modelljét alkalmaztuk, amelynek segítségével a különböző hatástani csoportokba tartozó szerek effektusai összehasonlíthatók.

Munkánk fő célja a dexamethason hatásmechanizmusának megközelítése volt, hiszen e szintetikus glucocorticoidot a klinikumban terápiás beavatkozás céljából sikeresen alkalmazzák egymagában és egyéb szerekkel kombinálva az ischemiás eredetű agyödémák és az intrakraniális nyomás csökkentésére.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

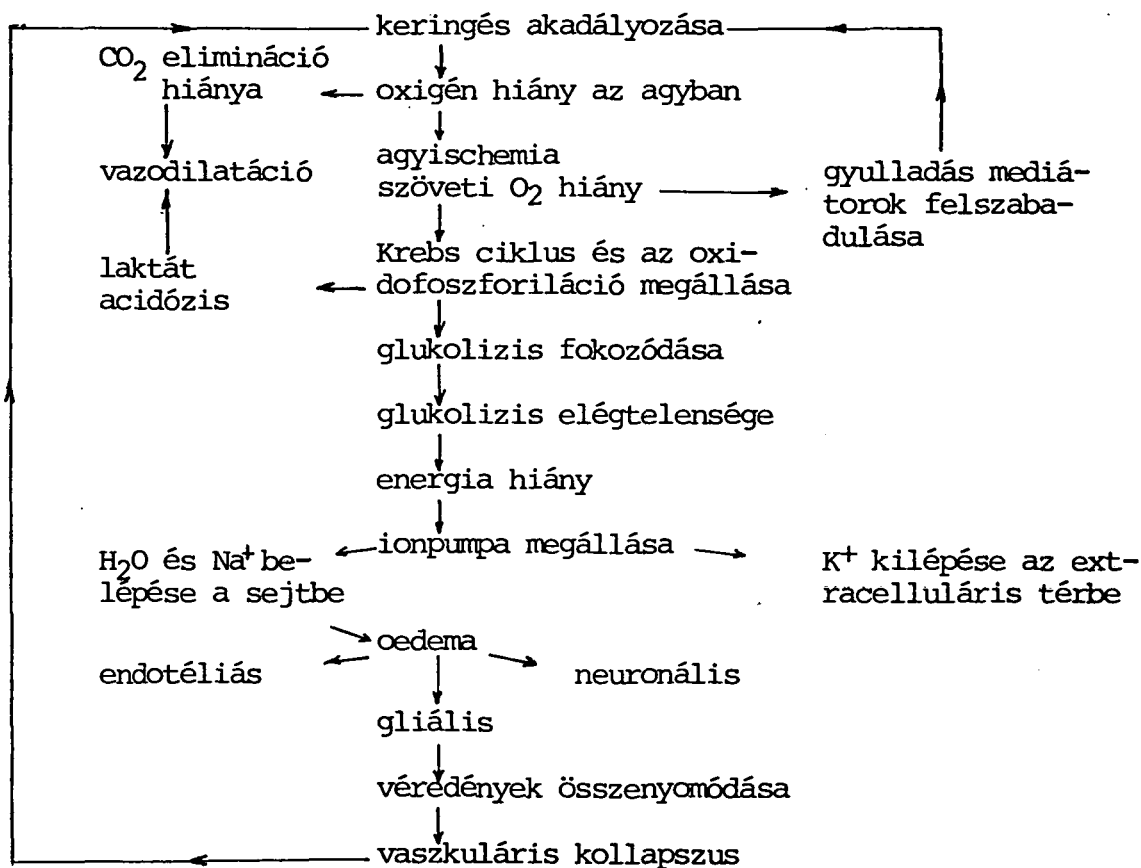
2.1. Az agyi ischemia patomechanizmusáról

Az agyischemia okai a legváltozatosabb patológias jelenségekre és sérülésekre vezethetők vissza. Valamennyi agyi ischemiás folyamatra a legkülönbélebb speciális elváltozások jellemzők, azonban számos közös vonás is megfigyelhető az eltérő eredetű, ischemiás típusu központi idegrendszeri megbetegedések sorában.

A változások közül a jelentősebbek a következők: a Krebs-ciklus működése megszűnik, s csökken a nagyenergiájú foszfátészterek szintje. E fontos energia forrás csak igen kis mennyiségben pótlódik az anaerob glukolizis folyamán. Ugyanakkor oxigén hiányban a tejsav felhalmozódik, és acidózis fejlődik ki. A vérellátás zavara miatt helyi vagy globális agyödéma jön létre, amely a rendellenes só és víz

mozgásból származik. Ennek következménye az intrakraniális nyomás fokozódása, amely további patológias folyamatokat indít el /Rossignol és mtsai, 1980/.

Az ischemia számos gyulladás mediátor felszabadítását indukálja mind az agyban, mind a szervezet egyéb szöveteiben, amelyek közül jelenleg a vérlemezékben és az érfal endotél sejtjei által termelt arachidonsav metabolitok állnak az érdeklődés középpontjában /Moncada és mtsai, 1983, Gryglewski és mtsai, 1983, Quintana és mtsai, 1983/. A központi idegrendszer ischemiája során kifejlődő változásokat az 1. ábra mutatja.



1. ábra Az agyischemia patomechanizmusa

Az 1. ábra jól szemlélteti, hogy számos lehetőség kínálkozik az agyi ischemiás változások mérséklésére, illetve megszüntetésére. A központi idegrendszer vérellátásának zavara számos magatartásbeli változást is előidéz. Károsodnak az érző és mozgató valamint a megismerő funkciók, amelyek jól megfigyelhetők a kísérleti állatok viselkedésén /Levy és mtsai 1976, Djuricic és mtsai 1983/.

2.2. Módszerek az agyi hypoxia és ischemia kísérletes létrehozására

Rossignol és mtsai /1980/ szerint a hypoxia és ischemia modellezésére használt állatkísérleti módszereket négy fő kategóriába sorolhatjuk.

Az első csoportba tartozik az oxigén parciális nyomásának csökkentésével előidézett hypoxia, amely hosszantartó fennállás esetén ischemiás állapotot is előidézhet /Thurston és mtsai 1969, Duffy és mtsai 1972, Lewis és mtsai 1973, Hansen és mtsai 1978, Domanska-Janik és mtsai 1982/.

A második csoportba azok a kísérleti modellek sorolhatók, melyekben az agyszövet vérellátási zavarát dekapitációval /Yatsu és mtsai 1972/, véreztetési shockkal /Nilsson és mtsai 1971, Salford

és mtsai 1972/, vagy érelzárással idézik elő. Vérez-
tetéses shockban a hasi aorta átmetszésével a vér-
nyomás csökkenését, s így az agyi perfuziós nyomás
csökkenését hozzák létre. Az ily módon kialakított
ischemia azonban nemcsak a központi idegrendszerre,
hanem az egész szervezetre kiterjed.

Az érelzáródásos agyischemia állatkísérletes
modelljét elsősorban az arteria cerebri media /Diaz
és mtsai 1980, Matsuoka és mtsai 1981, Awad és mtsai
1983/, vagy az arteria carotis occlusiójával idézik
elő /Siesjö és mtsai 1974, Tamaki és mtsai 1980,
Lespinasse és mtsai 1982/.

A harmadik csoportba az egyes vegyszerekkel
és gyógyszerekkel előidézett hypoxiás és ischemiás
állapotok sorolhatók /Yatsu és mtsai 1972/. Ide tar-
tozik a citokróm enzimrendszert bénító kálium cianid.

Az ischemiás modellek negyedik csoportjába
tartoznak egyéb kísérleti eljárások, mint amilyen
pl. az izolált és perfundált agy /Geiger és Magnes
1947, Harper és mtsai 1972/, melynek előnye, hogy
kiiktatjuk a hormonális és reflexes szabályozást, s
így lehetővé válik a vizsgált szer direkt központi
idegrendszerre gyakorolt hatásának tanulmányozása.

Ugyancsak ebbe a csoportba sorolhatjuk az
ischemia és hypoxia kombinációjával előidézett állat-

kísérletes modelleket, melyek lényege az, hogy valamely nagyér leszorításával csökkent keringést hoznak létre, s a kísérleti állatokat még mesterségesen csökkentett oxigéntenzióju sátorba is elhelyezik /Levine és mtsai 1960, Van Reempts 1983/.

2.3. Az ischemiában és hypoxiában alkalmazott gyógyszerkészítmények felosztása

Éppugy, mint ahogyan az agyischemia és hypoxia kísérletes létrehozására alkalmazott állatkísérletes modellek osztályozhatók, csoportokba sorolhatók az ezen kórképekben alkalmazott gyógyszerek is. Osztályozásuk szintén nehéz feladat, s elsősorban hatásmechanizmusuk alapján történik.

Az első kategóriába tartoznak azok a készítmények, amelyek fokozzák a vér oxigén szállítását, elsősorban az agy ereinek tágítása révén. Értágulat előidézhető közvetlenül az ér simaizom elemeire hatva, vagy pedig a vegetatív idegrendszer befolyásolásán keresztül. Napjainkban a leginkább alkalmazott készítmények a papaverin, a vincamin, a dihydroergotoxin, a nicergolin, a cinnarizin és a bencyclán. Ezen készítmények adagolására azonban vigyázni kell, hiszen fennáll az ugynevezett "steal effect",

amelynek lényege az, hogy az ép területek ereinek tágulata kifejezettebb, mint az ischemiás területeken fellépő vazodilatáció, s így a vér a kisebb ellenállású helyeken, azaz az ép területeken áramlik át, s a keringési zavar súlyosbodhat.

A második csoportba tartozó szerek hatásukat úgy fejtik ki, hogy csökkentik az agy oxigénigényét. Ezek közül a legfontosabbak a barbiturátok. Protektív hatásuk az állatkísérletek alapján teljesen nyilvánvaló /Wilhjelm és mtsai 1971, Nilsson és mtsai 1971, Yatsu és mtsai 1974, Nemato és mtsai 1971/. Elsősorban a fokális ischemia által okozott sérülések esetén fejtik ki hatásukat. Hatásmechanizmusukat annak tulajdonítják, hogy a hexokináz gátlása révén korlátozzák a glukolizist, s így megakadályozzák a tejsav akkumulációját. A barbiturátok 50 %-al képesek csökkenteni a cerebrális oxigénfogyasztást /Siesjö és mtsai 1973, 1974, Smith és mtsai 1974/.

Az anxiolitikumok csoportjába tartozó diazepam szintén képes csökkenteni ischemiában és hipobárikus asphyxiában a központi idegrendszer oxigénfogyasztását, s így meghosszabbítja a kísérleti állatok túlélési idejét. Ebbe a csoportba tartoznak még egyes antikonvulzív szerek, bár ezek hatásmechanizmusa

nem tisztázott.

A harmadik nagy csoportba sorolhatjuk az ugynevezett "energia mobilizátorokat", amelyek közé a piracetam, a nicergolin, az aminophyllin, továbbá az első csoportban már említett vinpocetin és dihydroergotoxin tartozik /Yasuda és mtsai 1978/. Ezek a készítmények az energia mobilizálása során kimerithetik a szervezetet, és rosszabbithatják a már fennálló ischemiás és hypoxiás állapotot. Alkalmazásuk a terápiában nem mindenfajta központi idegrendszeri keringési zavarban ajánlott.

Önálló csoportot képviselnek a glukokortikoidok. Cooper és mtsai /1979/ a dexamethason előnyös hatását figyelték meg fejsérülések következtében kifejlődő agyoedemában. Hanid és mtsai /1980/ leírták ezen hormonkészítmény előnyös tulajdonságait az intrakraniális nyomásfokozódás csökkentésére. Állatkísérletes tanulmányt folytattak Clasen és mtsai /1979/ Rhesus macacus majmokon, s megállapították, hogy a dexamethason csökkenti az agy lokális hűtésekor létrejövő agyoedemát.

Ishimitsu és mtsai /1980/ kísérletes agyoedemában összehasonlították a különböző glukokortikoidok védő hatását patkányon. Okamatsu és mtsai /1982/ pedig macskán vizsgálták a dexamethason protektív

hatását akut cerebrális ischemiában. Bartko és mtsai /1972/ a dexamethason védő hatását irták le macskán az arteria cerebri media occlusiojával kiváltott agyischemiában.

3.1. A TÉMA MEGKÖZELITÉSE

3.1.1. Kísérleti modellek

A kísérleteinkhez olyan módszert igyekeztünk választani, amely egyszerű, kevésbé műszerigényes, s reprodukálható eredményeket biztosít.

Az experimentális agyischemia létrehozására, a már korábban felsorolt módszerek közül a kétoldali arteria carotis communis elzáródása következtében fellépő, agyi keringészavar során létrejött változásokat tanulmányoztuk.

Ezen módszert némi eltéréssel az intézetünkben már korábban alkalmazták patkányban Basharahil, Takáts és mtsai /1979/, akik a lekötést az ér átvágásával kombinálták pentobarbitál anesztéziában. Biokémiai vizsgálataik során a vinpocetin és pentobarbitál kezelést követően védőhatást mutattak ki /Basharahil, 1980/. Csete és mtsai /1981/ végeztek bilaterális arteria carotis okkluziót, s azt tapasztal-

talták, hogy a papaverin és a CH-102 volt a leghatásosabb a vizsgált szerek közül.

Az általunk alkalmazott módszernek számos előnye van. Amellett, hogy egyszerű, nem hoz létre 100 %-os mortalitást, s így egy készítmény védő, vagy patológias állapotot súlyosbító hatása jól tanulmányozható. Az általunk alkalmazott módszert előnyben részesítettük, a kissé durva 100 %-os mortalitást okozó dekapitációval, továbbá a véreztetési shockkal /Nilsson és mtsai, 1971/ szemben, hiszen ezen esetekben a változások rendkívül gyorsak, s néhány másodperces időeltérés is jelentősen befolyásolhatja az eredmények reprodukálhatóságát.

Az arteria carotis okkluziót a kis állatok közül elsősorban Mongol gerbilen és patkányon alkalmazzák, de más egér-törzsön is végeztek hasonló tanulmányokat.

A gerbil már unilaterális arteria carotis communis lekötésre is jellemző módon reagál /Deriu és mtsai, 1979/, de a mortalitás közel 100 %-os, viszont néhány állatnál csak napok múlva következik be.

Ezen a modellen Harrison és mtsai /1981/ megállapították, hogy az 5-hydroxy-tryptamin koncentrációja megnő az agyban, amit összefüggésbe hozták a beavatkozás morbiditásával. Ezt alátámasztja, hogy

5-hydroxy-tryptamin antagonistákkal jelentős mértékben csökkentették a mortalitást.

Kétoldali arteria carotis communis lekötést is végeztek gerbilen /Levine és mtsai 1980, Jarrott és mtsai 1980/, s azt tapasztalták, hogy az elhullás 100 %-os, és időben sem nem túl elhuzódó. Vizsgálták a methylprednisolon, az atropin és az amfetamin hatását, s azt tapasztalták, hogy valamennyi szer meghosszabbította a túlélési időt.

Patkányokon unilaterális carotis okkluziót Johansson és mtsai /1978/ hajtottak végre, és az albumin extravazációját vizsgálták.

Macmillan és mtsai /1980/ ugyancsak egyoldali lekötést végeztek, de az állatokat még csökkentett oxigéntenzióju sátorban is elhelyezték, s mérték a kreatin-foszfát, az adenozin-trifoszfát, és a tejsav változását az idő függvényében. Az okkluziót később megszüntették, s vizsgálták a makroerg foszfátok és a laktát koncentrációjának a normalizálódását a reperfúziós periódus során. Ugyancsak ez a kutatócsoport foglalkozott patkányok bilaterális okkluziójával, 30 Hgmm-es parciális oxigéntenzióju levegősátorba helyezve a kísérleti állatokat, s fél óra múlva mérték az előbb említett paramétereket.

Nakatomi és mtsai /1981/ ugyancsak a metaboli-

tok változásait tanulmányozták normotenzív és hypertenzív patkányokon kétoldali arteria carotis okkluziót követően, s vizsgálták az ATP, a tejsav koncentrációját és a pH változását a leköttéstől számítva egy, három és öt óra múlva. Megállapították, hogy a magas vérnyomású kísérleti állatok agyszövetében hamarabb normalizálódtak az előbb említett biokémiai paraméterek, mint normotenzív patkányok esetén.

Okoda és mtsai /1981/ hasonló kísérleti körülmények között az agykeringést vizsgálták hyper- és normotenzív patkányokban kétoldali arteria carotis okkluzió hatására. Azt tapasztalták, hogy magas vérnyomású patkányok esetén már egy órával a leköttést követően szignifikánsan nagyobb mértékű az agykeringés, mint a normotenzív állatokban.

Lespinase és mtsai /1982/ Long Evans patkányokban egyidejűleg végezték el a kétoldali arteria carotis communis leköttését, s azt találták, hogy a mortalitás 100 %-os volt. Abban az esetben ha a két artéria leköttése között négy nap telt el, a kísérleti állatoknak csak 50 %-a hullott el, míg ha az időintervallumot a két okkluzió között 8-9 napra növelték, akkor a túlélés 100 %-os volt. Ezt az eredményt a kollaterális keringés kialakulásával magyarázták. Mikrogömbös technikával azt is megállapí-

tották, hogy patkányokban az arteria carotisok a két agyféltekét látják el, míg az arteria vertebra-
lisok az agytörzs és a kisagy területeinek a keringéséért a felelősek.

Kísérleteink során az általunk kialakított kísérletes módszer helyességének igazolására alkalmaztuk az agyi értágító vinpocetin, valamint az oxigénigényt csökkentő pentobarbital és diazepam cerebroprotektív hatását, s ezt követően tértünk rá a dexamethason hatásmechanizmusának megközelítésére.

3.2.1. Vinpocetin cerebroprotektív hatása

Az eredeti magyar készítményt először a télizöld meténgből /Vinca minor/ izolálták.

A vinpocetin specifikusan tágítja a cerebrális véredényeket. Javítja az oxigén felhasználását és az agy toleranciáját hypoxiával szemben. Kissé csökkenti a vérnyomást, továbbá az agyi erek rezisztenciáját, valamint a teljes perifériális ellenállást. Hatása azonban az agyerekre kifejezettebb, mint a periférián. A vinpocetin irodalmi adatok szerint 40 %-al emeli a cerebrális véráramlást, gátolja a trombocita aggregációt és a trombociták kitapadását az érfalhoz. A keringésre gyakorolt hatása az intravénás adás után néhány percen belül kifejlődik.



A szer azon tulajdonságánál fogva, hogy növeli a vérellátást, elősegíti az oxigén felhasználását az agysejtekben, s lehetővé teszi az energetikai feltételek javítását, amely terápiásan rendkívül értékes a cerebrovascularis megbetegedésekben.

3.2.2. A barbiturátok hatása agyischemiában

A barbiturátok állatkísérletekben szintén hatékonynak bizonyultak a cerebrális anoxiával és ischemiával szemben, s e hatás a túlélési idő meghosszabbodásában is jelentkezik /Cohen és mtsai, 1973/.

Wilhjelm és Arnfold /1965/ kimutatták, hogy anesztetikumok, mint a thiopental, halothan és a cyclopropan, jelentős mértékben növelik az egerek toleranciáját a kísérleti uton létrehozott hypoxiával szemben. Hasonló megállapításra jutott Bielicki és Krieglstein /1976/, akik izolált patkányagy metabolikus változásait vizsgálták thiopental kezelés hatására.

Egyes szerzők /Smith és mtsai, 1974/ arra a következtetésre jutottak, hogy a barbiturátok védő hatása agyischemiában valószínűleg a cerebrális véráramlás és az intrakraniális nyomás csökkentése

miatt, s nem pedig a biokémiai változások következményeként jön létre. Számos szerző kísérleti adatai azonban azt bizonyítják, hogy az anesztetikumok hatásukat elsősorban a biokémiai metabolikus változások befolyásolása révén fejtik ki. A szerzők legnagyobb része az utóbbi megállapításban látja a barbiturátok hatásmechanizmusának magyarázatát. Gatfield és mtsai /1966/ megfigyelték, hogy az anesztetikumok emelik a glukóz és a glikogén szintjét az agyszövetben, s így lassulnak a biokémiai változások a dekapitációval létrehozott kísérletes ischemia során.

4. KISÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez Sprague-Dawley CFY törzsű 180-230 g súlyu 10-14 hetes nőstény patkányokat használtunk. Élelmük kereskedelmi forgalomban lévő patkánytáp, ivóvizük csapviz volt. Him patkányokat azért nem használtunk a kísérletek során, mert sokkal kevésbé bizonyultak érzékenynek az általunk kidolgozott agyischemiát kiváltó beavatkozásra, mint a nőstények.

4.2. Felhasznált gyógyszerek

Diazepam, Seduxen^R /Kőbányai Gyógyszerárugyár/;
pentobarbital, Nembutal^R /Serva/;
vinpocetin, Cavinton^R /Kőbányai Gyógyszerárugyár/;
dexamethasone, Oradexon^R /Organon, Oss/;
actinomycin D, /Merck, Sharpe and Dohme/.

4.3. A meghatározásokhoz szükséges anyagok

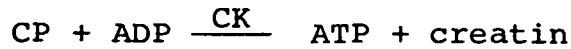
ATP TEST-COMBINATION, /Boehringer Mannheim/;
creatin-kinase /CK/, /Boehringer Mannheim/;
lactate dehydrogenase, /Reanal/;
nicotin-adenin-dinucleotid, /Reanal/;
Az analizisekhez használt egyéb reagensek analitikai tisztaságuak voltak.

4.4. Biokémiai módszerek

4.4.1. Nagyenergiájú foszfátészterek és tejsav meghatározása

Az ATP meghatározását Boehringer "Test Combination" alkalmazásával enzimátikus uton /Dennemann, 1961/ végeztük. A CP szintet pedig CK enzim segítsé-

gével határoztuk meg a következő egyenlet alapján:



Ezen meghatározás, amelyet Takáts és mtsai /1974/ állítottak be, sokkal könnyebbnek és pontosabbnak bizonyult, mint Wollenberger módszere /1960/.

A tejsav koncentrációt szintén enzimátikus módszerrel mértük tejsav-dehydrogenáz segítségével Hohorst szerint /1965/.

4.4.2. A kalcium, nátrium és kálium meghatározása

A teljes agy eltávolítása után megmértük annak nedves súlyát. Ezt követően 40 órán keresztül 110 C^o-on sulyállandóságig szárítottuk, s lemérés után kaptuk a száraz súlyt. Ebből a két adatból számoltuk ki az agyszövet viztartalmát, amelyet %-ban adtuk meg. Ezt követően a szárított szövetet hamvasztottuk 550 C^o-on 20 órán keresztül, majd az így kapott mintát feloldottuk 5 ml 3 M salétromsavban /Merck, Suprapur^R/, és tiszteresére higitottuk ionmentes vízzel. A nátriumot 330,3 nm, a káliumot 404,4 nm, a kalciumot 422,7 nm hullámhosszon porlasztott levegő-acetilén gázáram lángjában Perking-Elmer 306-os atomabszorpciós spektrofotométerrel mértük /Dóczi és mtsai, 1982/.

4.4.3. Albumin extravazációjának mérése

Az Evans-kék festék /Sigma/ igen erősen kötődik a plazmafehérjékhez, elsősorban az albuminhoz, ezért alkalmaztuk a fehérjék extravazációjának meghatározásához, mint ahogyan azt Rössner és Tempel /1966/ leírta.

Az általunk alkalmazott eljárás a következő volt. A festéket 100 mg/kg /2 %-os/ dózisban intravénásan adtuk két órával a várható tünetek megjelenése előtt, ezt követően az állatokon mellkasnyitást végeztünk enyhe aether anesztéziában, majd eltávolítottuk az intravaszkulárisan elhelyezkedő festéket a következő módon: polietilén kanült vezettünk az aortába a bal szívkamrán keresztül, s izotóniás nátrium klorid oldattal perfundáltuk az állatokat addig, amíg a jobb pitvarban megjelenő folyadék el nem szintelenedett. Ezt követően a koponyát felnyitottuk, s a teljes agyat eltávolítottuk, mértük a nedves súlyát, majd 1 ml 50 %-os triklórecetsavat adtunk az agyszövethez a festék szabaddá tétele céljából, s a kapott mintát 1000 g-vel fél órán keresztül centrifugáltuk. A felüluszónak a festék koncentrációját 615 nm hullámhosszon határoztuk meg Unicam SP 1800-as ultra-viola spektrofotométerrel. Az értékeket $\mu\text{g/g}$ nedves súlyban fejeztük ki.

5. KISÉRLETI EREDMÉNYEK

5.1. Az agyischemiás modell

Kezdeti kísérleteink során pentobarbital aneszteziában /45 mg/kg/ egyoldali arteria carotis communis lekötést végeztünk, s azt tapasztaltuk, hogy körülbelül 2-3 órás ébredési periódus után az állatok viszonylag megfelelő fizikai állapotban voltak, s elhullás még egy hét múlva sem következett be. Ugyanezt tapasztaltuk abban az esetben is, ha narkotikumként pentobarbital helyett aethert alkalmaztunk. Ekkor azonban az ébredés a műtét után 3-5 perccen belül bekövetkezett.

A következő lépésként ismét pentobarbitált alkalmaztunk altatóként az előbb említett dózisban, s egyoldali arteria carotis communis lekötést végeztünk, a másik arteriát kipreparáltuk és laza hurkot helyeztünk rá, s a lekötés csak egy nappal később éber állaton történt. Ebben az esetben 20-30 %-os elhullást tapasztaltunk 180-230 g-os nőstény patkányokon. Meg kell említeni, hogy ezt a kísérletsorozatot aether narkózisban is elvégeztük, s az elhullás aránya ugyanolyan volt.

Az előbb említett kísérletek elvégzése után

a célból, hogy növeljük az elhullást, aether narkózisban egyidejűleg végeztük el mindkétoldali arteria carotis communis lekötését. Ekkor azt találtuk, hogy az állatok közel 70 %-a hullott el. Természetesen az egyidejű mindkétoldali okkluziót 45 mg/kg pentobarbital aneszteziában is végrehajtottuk, s ahhoz a megállapításhoz jutottunk, hogy az állatok 90 %-a még az altató hatás ideje alatt kb. 1 órán belül elpusztult. Abban az esetben viszont, ha a patkányokat csak 30 mg/kg pentobarbitállal altattuk el, valamennyi állat felébredt az aneszteziából, s jóval később is csak mintegy 30 % körüli elhullás jött létre.

Ezen adatok alapján, a kísérleteink elvégzésére az aether narkózist, és az egyidejű bilaterális arteria carotis okkluziót tartottuk a legmegfelelőbbnek, hiszen ilyen körülmények között közel 70 %-os elhullási arányt kaptunk, mely igen jó valamely gyógyszer előnyös, illetve hátrányos tulajdonságainak megítélésére. Kísérleteink során a kezeletlen /kontroll/ csoport értékeit az így kapott adatok szolgáltatták.

Az eddig leirt eredményeket az I. táblázatban foglaljuk össze.

I. táblázat Az agyischemiás kísérleti modell és a mortalitás összefüggése

Altatás módja	Okkluzió tipusa	A két okkluzió között eltelt t /h/	n	Elhullás n	Elhullás %
Pentobarbital 45 mg/kg	unilateralis	-	30	0	0
45 mg/kg	bilateralis	-	30	36	87
45 mg/kg	bilateralis	24	30	8	27
30 mg/kg	bilateralis	-	30	11	37
Aether	unilateralis	-	30	0	0
Aether	bilateralis	-	30	20	67
Aether	bilateralis	24	30	9	30

A táblázatból kitűnik, hogy a pentobarbital 45 mg/kg dózisban, egyidejűleg végrehajtott kétoldali okkluzió esetén, már egy órán belül az állatok közel 90 %-nak elhullásához vezetett. A kísérletes ischémiát a pentobarbital tehát ilyen dózisban, feltehetően a nyulvelőt deprimáló hatása miatt súlyosbította.

A szemléltetett adatokból az is megállapítható, hogyha 24 óra telik el a kétoldali okkluzió között, akkor az elhullás mérséklődik akár aether, akár pentobarbital narkózisban. Az így kapott eredményt azzal magyaráztuk, hogy egy nap alatt jelentős mértékben növekedett a kollaterális keringés.

A fenti eredmények alapján választottuk ki a kísérleteink elvégzéséhez legmegfelelőbb módszert, azaz az aether altatásban egyidejűleg elvégzett kétoldali arteria carotis communis lekötést.

5.2. A kísérleti állatok magatartási változásai agyischemiában

A kísérleteink során megfigyeltük, hogy az arteria carotis communisok lekötését követően az állatok átlagban 8-9 órás periódus után pusztultak el.

Megvizsgáltuk azt is, hogy ezen periódus alatt a patkányok magatartásában milyen változások következnek be. Megállapítottuk, hogy a lekötést követően 8-9 órás időintervallum alatt jellemző tünetek jelentek meg. Ezeket a következő csoportokba soroltuk.

I. A fej jellemző mozgása, mely abban nyilvánult meg, hogy a patkányok fejükkel turkáló mozgást végeztek az alomban.

II. Teljes mozgásinkoordináció zavara, melyben jellemző a periódikusan jelentkező görcsös állapot. Végül az állatok tónusos görcsrohamot kaptak. Az utóbbi néhány másodperc után megszűnt, s a folyamat néhány perc után ismétlődött.

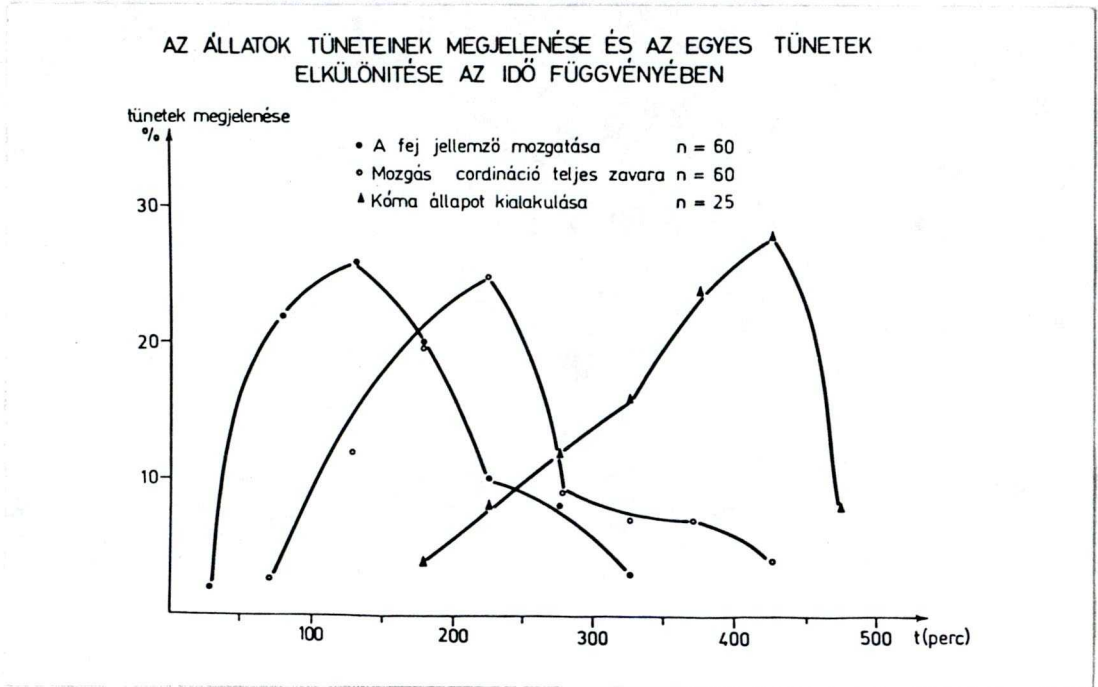
III. Kómás periódus, melyben az állatok mozgása gyakorlatilag megszűnt, légzésük felületes és szabálytalan volt.

IV. Az állatok elhullása, melyet a légzés megállása jelzett.

Meg kell említenünk, hogy a nőstény patkányok jelentős része a II. periódusban elpusztul, s a harmadik tünetcsoport megjelenése csak a kísérleti állatok 30-35 %-án volt tapasztalható.

Az itt feltüntetett 2. ábra az állatok tüneteinek a megjelenését és az egyes tünetek elkülönítését szemlélteti az idő függvényében.

A Gauss-görbék segítségével a tünetek %-os eloszlását tüntettük fel az idő függvényében /görbe alatti terület/, amelyekből megállapítottuk, hogy az állatok első tünete 65 %-os valószínűséggel a 75. és 175. perc között, míg a második 45 %-os valószínűséggel a 175. és 250. perc között, a harmadik tünetcsoport pedig 50 %-os valószínűséggel a 350-450 perc közötti időintervallumban jelent meg. Az ezzel



2. ábra

kapcsolatos konkrét számszerű adatokat, vagyis az átlagot és az S.E. értékeit a II. táblázatban tüntettük fel.

II. táblázat Az agyischemiás tünetek megjelenésének időbeli változása

Az ischémiára jellemző stádiumok	I.	II.	III.	IV.
A tünetek megjelenése t /perc/	147 \pm 5,8	236 \pm 18	370 \pm 31	512 \pm 39

Meg kell jegyeznünk, hogy azokon a carotis lekött kezeletlen állatokon, amelyeken az első tünet-

csoport a lekötést követő 3 és fél órán belül nem mutatkozott, a többi tünet sem volt észlelhető, s az állatok még a lekötést követő 1 hét múlva is életben maradtak. Mindehhez hozzá kell tennünk azt is, hogyha az első tünet megjelent az állatokon, az biztos volt, hogy ezek a kétoldali okkluziót nem élték túl, s a folyamat végighaladt az ischemia egyre súlyosbodó további periódusain, s végül a kísérleti patkányok elhullásához vezetett.

5.3. A vinpocetin, pentobarbital és a diazepam hatásának vizsgálata ischemiás modellen

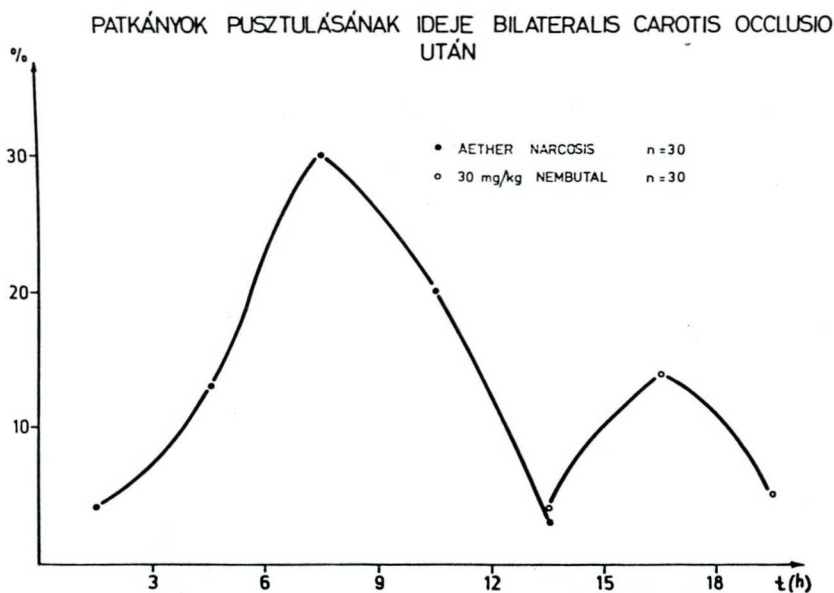
Említettük már az irodalmi összefoglaló ismertetésénél, hogy a különböző hatástani csoportokba tartozó vinpocetin, pentobarbital és diazepam hatásossáknak bizonyultak az agyischemia egyes formáiban.

Kísérleteink során az említett gyógyszerek hatásosságát a kísérleti állatok túlélése alapján próbáltuk ki az általunk kialakított agyischemiás modellen.

Vizsgálataink során először az agykeringés javítása céljából a számos előnyös tulajdonsággal rendelkező vinpocetint próbáltuk ki. 1, 2, 4 és 8 mg/kg dózisban adtuk a kísérleti állatoknak szubkután, fél

órával a műtét végrehajtása előtt. Azt tapasztaltuk, hogy a vinpocetin a túlélési időt nem hosszabbította meg, és az állatok túlélési arányát sem javította.

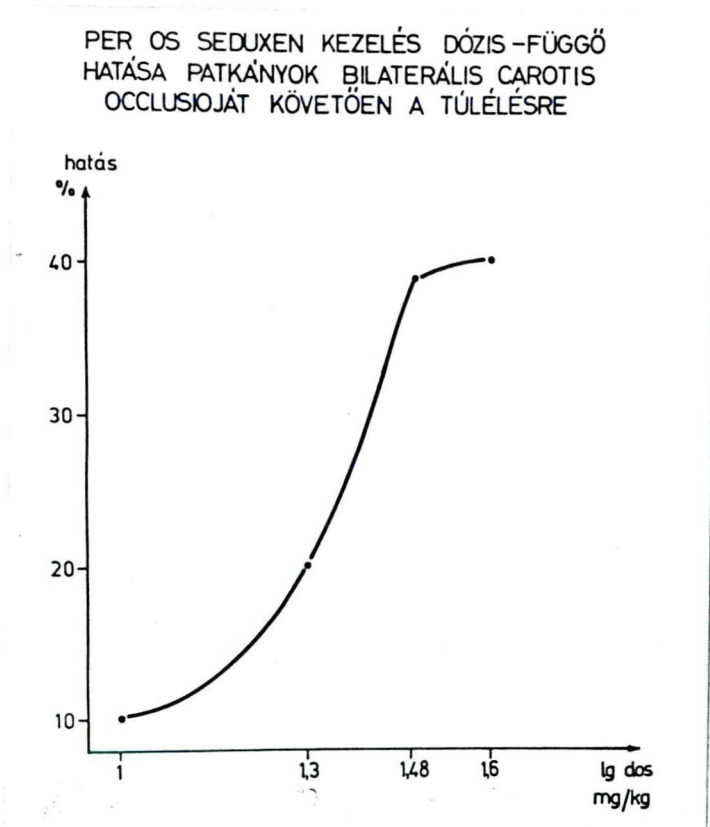
A következő kísérletsorozatunkban az agyische-miában védő hatást mutató pentobarbitalt próbáltuk ki. Már említettük, hogy 45 mg/kg pentobarbitallal kiváltott narkózis esetén a carotis occlusio következtében a patkányok 90 %-a már az anesztezia időtartama alatt elhullott. 15 mg/kg-os dózisban a szer hatástalannak bizonyult. A védőhatású adagot 30 mg/kg-ban találtuk meg. Ennek beadása után elhullás nem következett be az altatás időtartama alatt, s a túlélési idő és a túlélési arány is jelentősen megnőtt. Az így kapott eredményt mutatja a 3. ábra.



3. ábra

A Gauss-görbék területeinek aránya jól szemlélteti a készítmény védőhatását. Ugyanakkor az ábrából az is leolvasható, hogy az elhullási idő is megnyúlt. A kapott eredményekből az is megállapítható, hogy a pentobarbital terápiás hatásszélessége rendkívül kicsi, hiszen nagyobb dózisban /45 mg/kg/, nyultvelődeprimáló hatása miatt, még inkább súlyosította az egyébként is leromlott keringést.

A diazepam kezelés eredményét dózis-hatás összefüggésében a 4. ábrán tüntettük fel, a számszerű értékeket pedig a III. táblázat mutatja. A gyógyszert



4. ábra

rossz vizoldékonysága miatt per os, 1 %-os metilcellulóz szuszpenzióban alkalmaztuk 10, 20, 30 és 40 mg/kg adagban fél órával a bilateralis arteria carotis okkluzió előtt.

A diazepam még igen nagy adagban sem idézte elő a kísérleti állatok elhullását a műtétet követő egy órán belül, mint ahogyan ezt a pentobarbital esetében tapasztaltuk. Ezért tudtunk felvenni dózis-hatás-összefüggést diazepam kezelés során. A koordináta rendszer vízszintes tengelyén a dózisok logaritmusát, a függőlegesen pedig a hatást tüntettük fel. Hatás alatt a túlélést értjük a kezeletlen /kontroll/ csoporthoz viszonyítva /az utóbbi értéket 100 %-nak vettük/.

Az elvégzett kísérletek alapján megállapítottuk, hogy az agy oxigénigényét csökkentő szerek /pentobarbital, diazepam/ az általunk alkalmazott modellen a túlélést fokozták, a vinpocetin viszont hatástalan volt. A III. táblázat az eredményeket összefoglalva mutatja be, s igazolja a módszer alkalmazhatóságát cerebroprotektív szerek hatásának tanulmányozására.

Az elhullást a χ^2 próbával, az első tünet megjelenésének időpontját pedig kétmintás Student t-teszttel számoltuk ki a kontroll értékhez viszonyítva.

III. táblázat Vinpocetin, diazepam és pentobarbital hatása
cerebrális ischémiában

Kísérleti csoportok	n	Elhullás n	Elhullás %	Gátlás %	Az első tünet megjelenése /perc/ átlag _± SE
Kontroll	30	21	70	-	142 _± 6,4
Diazepam 10 mg/kg	30	19	63	+10	140 _± 7,7
20 mg/kg	30	17	56	+20	158 _± 5,3
30 mg/kg	30	*** 13	43	+38	189 _± 9,7**
40 mg/kg	30	*** 12	40	+43	184 _± 6,1**
Pentobarbital 30 mg/kg	30	*** 11	37	+47	208 _± 9,2***
Vinpocetin 1 mg/kg	30	23	77	-10	136 _± 9,1
2 mg/kg	30	19	63	+10	152 _± 8,3
4 mg/kg	30	21	70	+ 0	147 _± 5,7
8 mg/kg	30	23	77	-10	132 _± 7,5

A szignifikancia mértéke a kontroll értékhez viszonyítva

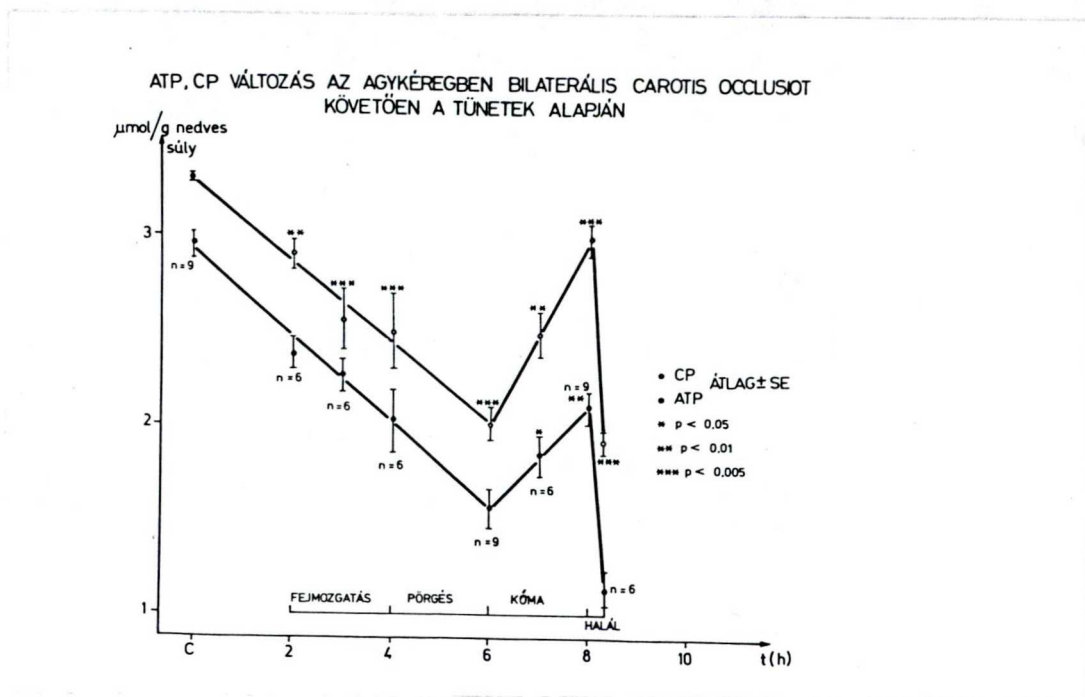
** p<0,01, *** p<0,001

5.4. Kétoldali arteria carotis occlusio következtében fellépő biokémiai változások patkányagyban

Munkánk bevezető részében említettük, hogy tanulmányozni kívántunk egyes biokémiai változásokat kétoldali arteria carotis communis lekötés után a kísérleti állatok agyszövetében. Ezen kísérletsorozatunkban megvizsgáltuk azt, hogy miként változik az energia raktározásban fontos szerepet betöltő ATP, a CP, valamint az anaerob anyagcsere mértékét jelző L szintje a kísérleti állatokon megjelent magatartási változások során. Ugyancsak ezen periódusok folyamán mértük az agyszövet víztartalmát, továbbá a közben végbemenő ionkoncentrációk változását, valamint a plazma albumin extravazációját.

Az 5. ábrán tüntettük fel az ATP és a CP szintjét $\mu\text{mol/g}$ nedves súlyban kifejezve kétoldali arteria carotis communis okkluziót követően az idő függvényében. Az abszcisszán ábrázoltuk az agyischemia egyes fázisait is. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért ezeket a periódusokat átlagosan két órásaknak vettük, hiszen közel állnak ehhez az értékhez /lásd II.táblázat/.

A görbék kiindulási pontjai az álműtött patkányok paramétereinek értékeit mutatják. Az így nyert



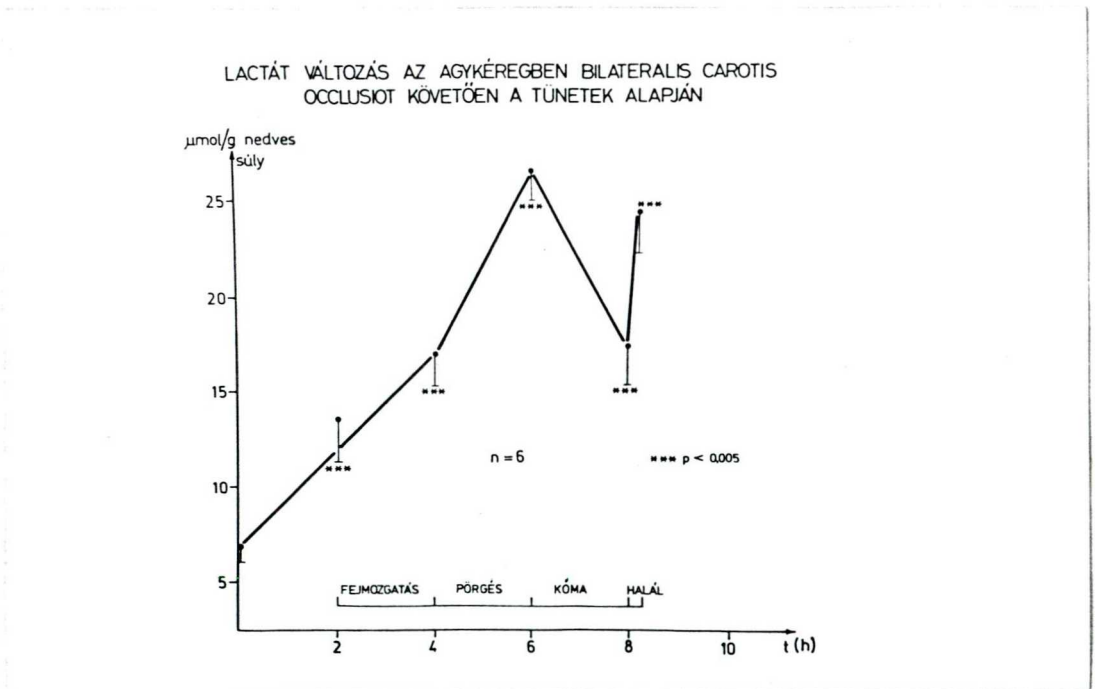
5. ábra

adatokhoz úgy jutottunk, hogy az állatokat aetherrel altattuk, majd a műtét során mindkét arteria carotis communis csak érintettük, s két órával az ébredést követően elvégeztük a minták analizisét. Az ábrán a szignifikancia mértékét is feltüntettük, melyet kétmintás Student t-teszt alapján számoltunk. Az adatokat az álműtött patkányok értékeihez viszonyítottuk. Az ábráról leolvasható, hogy egészen a kómás állapot kezdetéig szignifikánsan csökkent a makroerg foszfátok szintje, majd az ezt követő kómás állapotban az ATP tartalom megnőtt, s a CP szint pedig majdnem elérte a kiindulási értéket. A kóma idején az energe-



tikai állapot átmeneti javulása után az állatok hirtelen elhullottak, s ekkor a makroerg foszfátok szintje az összes addig mért érték alá zuhant. Az ugynevezett "helyreállási periódus" során a szignifikancia értékeit a kómás állapot kezdetén mért adatokhoz viszonyítottuk.

Hasonló folyamat volt megfigyelhető a L koncentrációjának változásában az ischemiás periódusok során. A 6. ábrán tüntettük fel a L szint változásait a megjelenő tünetek és az idő függvényében.



6. ábra

A változás folyamata hasonló ahhoz, mint amit az előző, 5. ábrán már láttunk, de azzal teljesen ellentétes irányú. A kómás állapotban szintén megfigyel-

hető az agyszövet a tejsav koncentrációjának normalizálódása éppugy, mint ahogyan ezt az ATP és CP szintek esetén tapasztaltuk. Ezen jelenség magyarázatát pontosan nem ismerjük, de feltételezzük, hogy ez az átmeneti javulás a szervezet ismeretlen védekező reakciójának tulajdonítható.

A IV. táblázatban feltüntettük az agyszövet viztartalmát $\%$, a nátrium, kálium és kalcium koncentrációt mmol/kg száraz súly/, valamint az Evans-kék extravazációjának változását $\mu\text{g/g}$ nedves súly/, kétoldali arteria carotis communis okkluziót követően az ischemia egyes fázisaiban.

Az így kapott adatokból megállapítottuk, hogy az agyszövet viztartalma már az ischemia első fázisában szignifikánsan emelkedett a kontroll értékhez képest, a második periódusban e változás tovább fokozódott, s maximális értékét a harmadik periódusban érte el.

Az említett ionok analizise során ahhoz az eredményhez jutottunk, hogy a nátrium koncentrációja már az első fázisban szignifikáns mértékben emelkedett, s az ischemia fokának súlyosbodásával ez az érték tovább nőtt. Az idegsejtek kálium tartalma viszont csak a második periódustól csökkent szignifikáns mértékben, míg a kalcium akkumuláció csak az

IV. táblázat Kétoldali arteria carotis okkluzió hatása a patkányagy viz,
nátrium, kálium, kalcium és Evans-kék tartalmára

Mért paraméterek	Álmütött csoportok	Az ischemia stádiumai		
		I.	II.	III.
Az agy vız tartalma / % /	78,8 ± 0,42	80,3 ± 0,18*	81,3 ± 0,23***	81,6 ± 0,27***
Nátrium tartalom mmol/kg száraz suly	200,0 ± 4,1	240,8 ± 7,4***	278,7 ± 7,5***	297,0 ± 7,3***
Kálium tartalom mmol/kg száraz suly	420,7 ± 12,8	394,7 ± 6,6	343,1 ± 11,0***	323,0 ± 14,8***
Kalcium tartalom mmol/kg száraz suly	2,73 ± 0,13	2,85 ± 0,16	3,12 ± 0,13	4,62 ± 0,54***
Evans-kék cc. µg/g nedves suly	1,79 ± 0,24	2,05 ± 0,30	7,53 ± 0,67***	7,62 ± 0,36***

A szignifikancia értékét az azonos sorban lévő álmütött patkányok adataihoz képest adtuk meg, s a kétmintás Student t-teszttel számoltuk;

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$;

Minden adat átlag ± SE; n = 6

ischemia harmadik fázisában fokozódott ugrásszerűen a kontroll értékekhez viszonyítva.

Az irodalomban a víz és ionok változását a citotoxikus agyödema jelének tekintik, amelyet egy vazogén fázis követ.

A táblázat szemlélteti azokat az adatokat is, melyek a vazogén agyödema kezdeti szakaszát mutatják. Az eredményekből arra a megállapításra jutottunk, hogy az ödema vazogén fázisa az agyischemia második fázisában jön létre, amely során az érpályából az extravascularis térbe áramlik az Evans-kékkel jelzett albumin.

5.5. Dexamethason és actinomycin D kölcsönhatásának vizsgálata kísérletes agyischemiában

5.5.1. A kísérletek előzményei

Kísérleteink során megfigyeltük, hogyha a leköttést követő első tünet megjelenésekor feloldottuk a bilateralis carotis okkluziót, s egy hét elmúltával ismét elvégeztük a két verőér leszorítását, akkor a patkányok magatartásában változás nem volt megfigyelhető, s az állatok túléltek a műtéti beavatkozást.

Megvizsgáltuk a dexamethason hatását agyischemiás modellünkön. A glukokortikoidok vizsgálatát felvetette az a tény is, hogy számos szerző a különböző agyi keringészavarok során kifejlődő kórképek legnagyobb részében hatásosnak találta a dexamethason terápiát mind az állatkísérletes /Clasen és mtsai 1979, Isimitsu és mtsai 1979, Okamatsu és mtsai 1982/, mind a humán vizsgálatok során /Cooper és mtsai 1979, Hanid és mtsai 1980/.

Intézetünkben Leprán és mtsai /1981, 1982/ által patkányokon kidolgozott kísérletes akut szivinfarktus modellen vizsgálták a dexamethason előkezelés hatását. Megállapították, hogy a szintetikus glukokortikoid védőhatást fejt ki a kísérletes szivinfarktus során megjelenő aritmiákkal szemben, s megnöveli az állatok túlélési arányát. Leprán és mtsai /1982/ azt is megfigyelték, hogy actinomycin D képes felfüggeszteni a glukokortikoid védő hatását. A glukokortikoidok védőhatását miokardiális infarktusban elsőként Spath és mtsai /1974/ mutatták ki.

A glukokortikoidok az RNS szintézisre kifejtett hatás révén megváltoztatják a fehérjeszintézis menetét és de novo olyan proteinek szintetizálódnak, amelyek foszfolipáz A₂ /PLA₂/ gátló hatásuak, s megakadályozzák a foszfolipidekből történő arachidon-

sav felszabadulást /Flower és Blackwell 1979, Hirata és mtsai 1980/.

A glukokortikoidok hatására képződő polipeptidket izolálták tengeri malac tüdőből /Flower és Blackwell, 1979/, továbbá patkány peritoneális fehérvérsejtjeiből /Di Rosa és Persico 1979, Blackwell és mtsai 1980/, s makrokortinnak, más szerzők nyul leukocitákból állították elő, s lipomodulinnak nevezték el /Hirata és mtsai, 1980/.

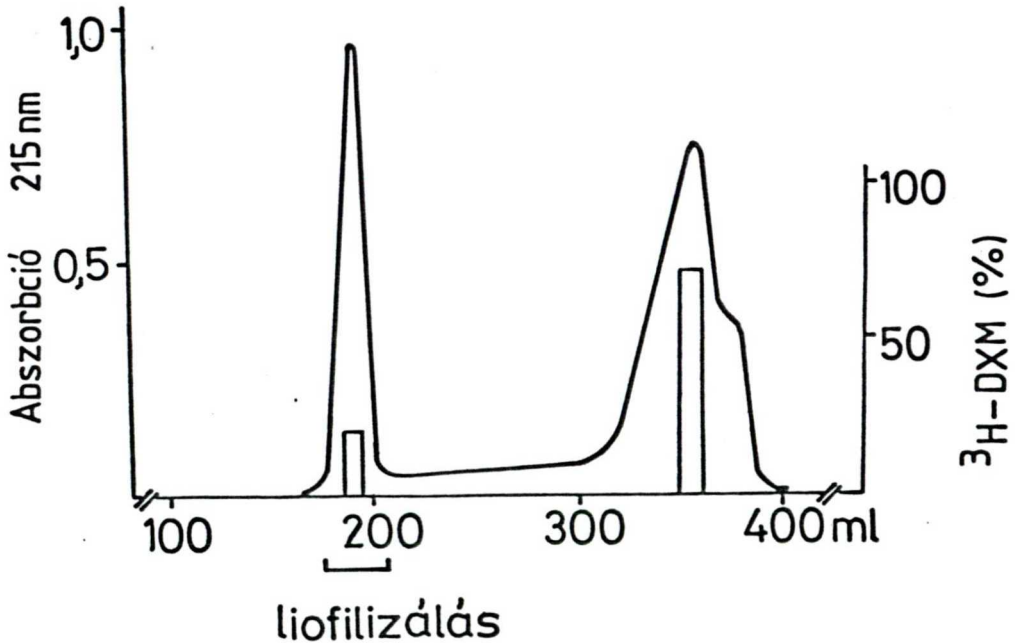
Az aktinomycin D azon tulajdonságánál fogva, hogy a DNS-ben lévő guanozin csoporthoz kötődve /Gellert és mtsai, 1965/ megakadályozza a hirtívő RNS képződését, képes felfüggeszteni a glukokortikoidok hatását. Az aktinomycin D hatása mind prokardiotákban /Hurwitz és mtsai 1962, Kahan és Hurwitz 1963/, mind magasabbrendűek sejtjeiben lejátszódik /Reich és mtsai, 1962/, s egy órán belül csaknem teljes mértékben megakadályozza a messenger RNS képződését /Franklin, 1963/. Hatása igen specifikus, csak nagyobb adagjai gátolják a protein szintézist. Ez a hatás másodlagos, s hosszabb idő elteltével fejlődik ki /Honig és Rabinowicz, 1965/.

5.5.2. A makrokortin termelése és részleges tisztítása

Kísérleteink elvégzéséhez a makrokortint Koltai és mtsai /1983/ szerint izoláltuk patkányok peritoneális sejtjeiből a következő módon.

A preparáláshoz 220-230 g súlyu nőstény patkányokat használtunk. A peritoneum üregét heparinózott Krebs oldattal mostuk, amely tartalmazott 1 mg/ml koncentrációban bovin-szérum albumint /Di Rosa és Persico, 1979/. A sejtszuszpenziót 50 patkányból nyertük, 50 g-vel centrifugáltuk és összegyűjtöttük. Az így nyert szuszpenzió milliliterenként 10^7 sejtet tartalmazott, és 25 ml-es mintákat dexamethason jelenlétében, illetve anélkül $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 90 percen keresztül inkubáltuk. A fölüluszót $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk addig, amíg nem használtuk fel. A makrokortin részleges tisztítását Blackwell és mtsai /1980/ szerint hajtottuk végre. A felüluszót, amelyet a kezeltlen és a dexamethasonnal kezelt sejtekből kaptunk, gélfiltrációnak vetettük alá Szefadex G-25-el feltöltött üvegoszlopon keresztül. Az eluáló medium pH 7,5-re beállított 0,1 %-os ammonium-bikarbonát volt. Az átáramoltatási sebesség 0,8 ml/perc volt. 4 ml-es frakciókat gyűjtöttünk, melyek abszorpcióját

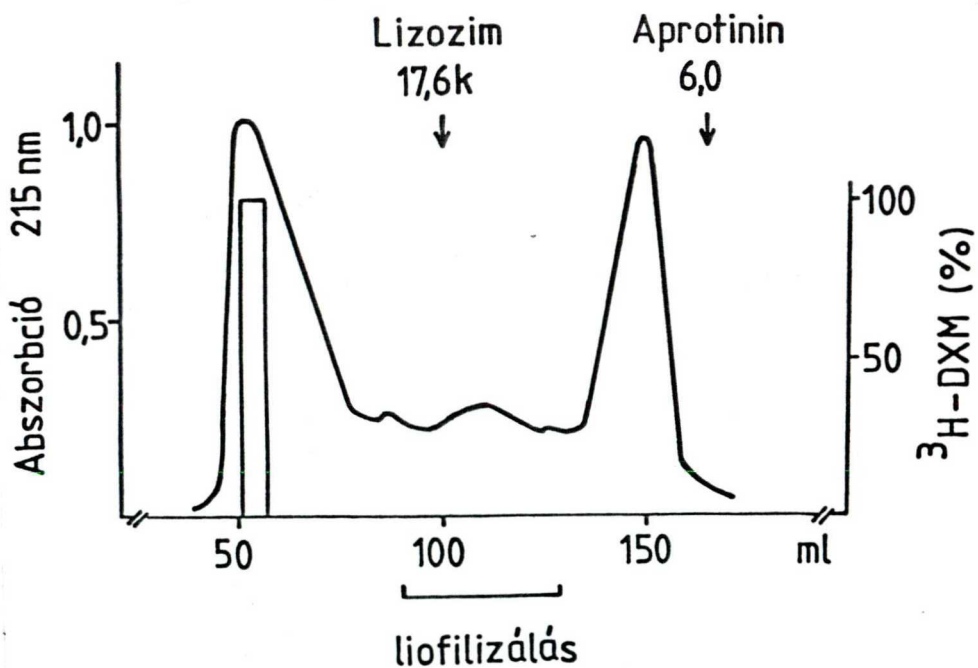
215 nm hullámhosszon mértük. ^3H -dexamethasont $/10^{-12}$ M, 20 μCi / használtunk arra a célra, hogy kimutassuk, az eluátum melyik frakciójában jelenik meg a dexamethason. A radioaktivitás mérése alapján kiderült, hogy a ^3H -dexamethasonnal csupán a 17,2 %-a volt jelen az első csucsban, melyet 160-200 ml közötti tartományban eluáltunk /7. ábra/.



7. ábra Makrokortin oszlopkromatográfiás szeparálása Szefadex G-25 gélen

Az első csucsban eluált 40 ml-es frakciót liofilizáltuk, s a liofilizátumot felvettük 4 ml 0,1 %-os ammonium-bikarbonátban, s Szefadex G-50-et tartalmazó üvegoszlopra vittük. Az eluciót ugyanazzal az oldattal végeztük. Az áramlási sebesség 0,5 ml/perc,

a szedett frakciók térfogata pedig 2 ml volt. A maradék ^3H -dexamethason /17,2 %/ radioaktivitása mérhető volt az így megjelenő első csucsban /42-65 ml/. Az oszlopot a kísérletek elvégzése előtt 17,6 K molekulasúly lizozimmal kalibráltuk, annak megállapítása céljából, hogy mely frakciótartományban jön le az oszlopról a 16 K molekulasúly makrokortin. A lizozim eluciós csúcsa 102 ml-nél jelent meg. A frakciók mutattak egy kis abszorpciós csúcsot a 85-115 ml közötti tartományban. Ezeket egyesítettük és liofilizáltuk. A folyamatot a 8. ábra szemlélteti.



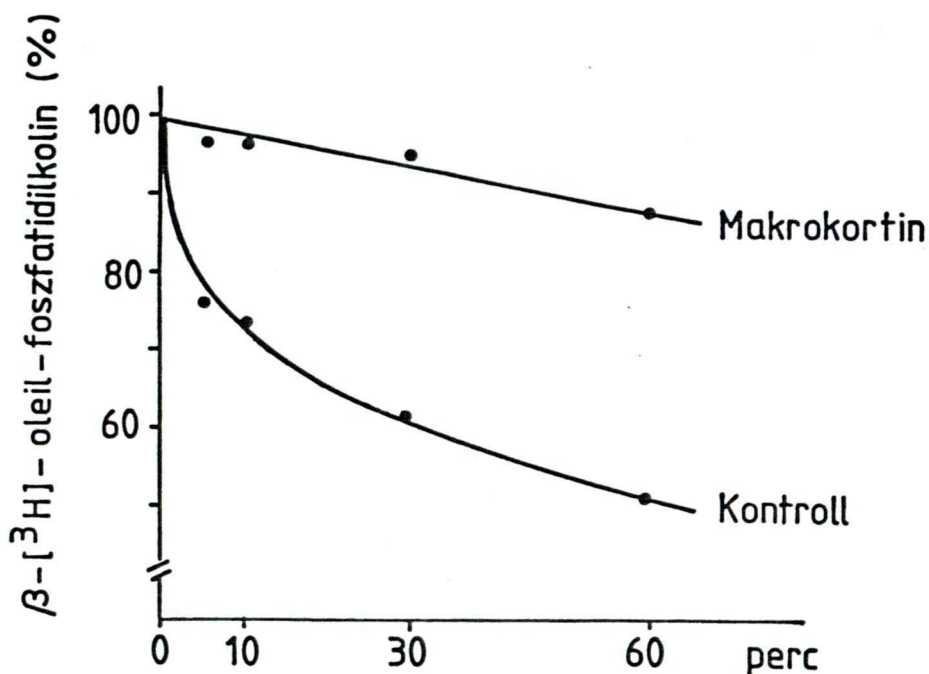
8. ábra Makrokortin részleges tisztítása oszlopkromatográfiával Szefadex G-50 típusu gélen

Az így nyert liofilizált anyag teljesen mentes volt a jelzett dexamethasontól. A felhasználás előtt a dexamethason nélküli és dexamethasont tartalmazó preparátumok megfelelő frakcióit külön-külön 4 ml izotóniás nátrium klorid oldatban oldottuk fel.

5.5.3. A makrokortint tartalmazó és kontroll liofilizátumok foszfolipáz A₂ aktivitásának meghatározása

A foszfolipáz A₂ aktivitás meghatározása a következőképp történt a kontroll és a dexamethasonnal inkubált sejtek felüluszójának 16 K molekulasúlyu frakcióiban. Az enzimet a Vipera Russelli mérgéből kaptuk, amelynek egy egysége 1 μM /perc sebességgel hasította a szubsztrátot. A szubsztrát alfa-palmitoil és béta-³H/-oleil-foszfatidilkolin /100 nCi/ μM / volt. Az inkubációs közeg tartalmazott 20 mM trisz-HCl puffert /pH 6,5/, 10 mM kalcium kloridot és 0,3 egység/ml enzimet, 1 μM szubsztrátot és dexamethason nélkül, illetve dexamethasonnal inkubált sejtek felüluszójának 16 K frakcióinak 50 μl -ét. A frakciók fehérjetartalma 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ volt. A fehérje meghatározását Lowry és mtsai /1951/ szerint hajtottuk végre. Az inkubációt 37 C^o-on végeztük egy órán keresztül, s a

dexamethasonos frakció foszfolipáz A₂ aktivitását gátló hatását összehasonlítottuk a nem dexamethasonos frakcióval, és a különbséget %-ban fejeztük ki /9. ábra/.



9. ábra A makrokortin foszfolipáz A₂ aktivitásának vizsgálata

Az ábráról leolvasható, hogy a foszfolipáz A₂ jelzett oleil-foszfátidil-kolint bontó aktivitása makrokortint tartalmazó frakció hozzáadására csak mintegy 10 %-al csökkent az inkubációs periódus alatt, míg a makrokortint nem tartalmazó kontroll frakció jelenlétében ugyanezen idő alatt az enzim a szubsztrátnak kb. 50 %-át bontotta el. Makrokortin preparátumunk tehát jelentős foszfolipáz A₂ aktivitást mutatott.

5.5.4. Dexamethason és actinomycin D hatása az állatok túlélésére kétoldali arteria carotis lekötés következtében fellépő agyischemiában

Kísérleteinkben először a szubkután 0,5, 1, 2 mg/kg dózisban adott dexamethason hatását vizsgáltuk az állatok elhullására. Az említett koncentrációkban nem kaptunk különbséget egyik esetben sem a kontroll értékhez képest, ha a kezelést közvetlenül a műtéti beavatkozáskor, vagy pedig azt megelőzően fél és egy órával végeztük. A hatás akkor kezdett mutatkozni, amikor 3 órás előkezelést alkalmaztunk, de akkor is csak a 2 mg/kg-os dózis esetén. A maximális protektív hatást 5 órás előkezelés után kaptuk. Az utóbbi adatokat az V. táblázat tünteti fel, amelyből megállapítható, hogy 2 mg/kg dexamethason nem csak a túlélési arányt javította, hanem az első tünetcsoport megjelenésének időpontját is szignifikáns mértékben megnyújtotta.

A táblázatból az is kitűnik, hogy az actinomycin D 0,5 mg/kg dózisban 2 órával a carotis lekötés előtt i.v. adva, nem befolyásolta az állatok elhullását a kontroll csoporthoz képest. A következő lépésként megvizsgáltuk, hogy vajon az actinomycin D

V. táblázat A dexamethason cerebroprotektív hatása és annak felfüggesztése actinomycin D-vel

Kísérleti csoportok	n	Elhullás n	Elhullás %	Az első tünet megjelenése /perc/
Kontroll	30	20	67	147± 5,8
Dexamethason 2 mg/kg	24	4	*** 17	210± [*] 16,8
Actinomycin D 0,5 mg/kg	26	17	65	141±12,3
Actinomycin D 0,5 mg/kg + Dexamethason 2 mg/kg	25	15	60	152±13,2

átlag ± SE; A szignifikanciát a kontrollhoz képest a kétminta Student-féle t-teszttel számítottuk ki;

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

képes-e felfüggeszteni a dexamethason védő hatását. A kísérletet a következőképp végeztük el: az actinomycin D után egy órával adtuk a dexamethasont 2 mg/kg adagban, majd ettől az időponttól számítva 5 óra múlva végeztük el a kátoldali arteria carotis okkluzióját. Azt tapasztaltuk, hogy ebben az esetben a dexamethason nem fejtette ki protektív hatását, s az állatok túlélési arányának növekedése elmaradt /V. táblázat/.



5.5.5. Actinomycin D és dexamethason hatása az agyischemia egyes szakaszaiban fellépő agyoedemára

A vizsgálatainkat a következőképpen végeztük. 1 órával az actinomycin D beadása után 2 mg/kg dexamethasont injiciáltunk s ettől az időponttól számítva 5 óra múlva történt az arteria carotisok lekötése.

Meghatároztuk a viz, a nátrium, a kálium, a kalcium tartalmat, valamint az albumin extravazációt az ischemia egyes szakaszaiban. Az így nyert adatok jelezték számunkra, hogy milyen mértékű változások játszódnak le az egyes periódusokban a kontroll csoportban, a dexamethasonnal és actinomycin D-vel külön-külön és a két szer kombinációjával kezelt állatok agyállományában. Az előkezeléseket követő lekötés által okozott paraméterek változását álműtött csoportban kapott értékekhez viszonyítottuk. A szignifikancia számítását kétmintás Student t-teszt segítségével végeztük el.

A VI. táblázat mutatja a vizeztartalom növekedését patkányagyban az ischemia különböző periódusaiban a kezeletlen és kezelt állatok esetén. Az adatokból megállapítható, hogy az agy vizeztartalmának az emelkedése már az ischemia első szakaszában szig-

VI. táblázat Dexamethason, actinomycin D és kombinált kezelés hatása az agyszövet víztartalmára az ischemia egyes fázisaiban

Kísérleti csoportok	Álmütött csoportok	Az ischemia stádiumai		
		I.	II.	III.
Kontroll	78,8 \pm 0,42	80,3 \pm 0,18*	81,3 \pm 0,23***	81,6 \pm 0,27***
Dexamethason 2 mg/kg	79,1 \pm 0,12	79,0 \pm 0,18 ++	78,9 \pm 0,12 +++	78,9 \pm 0,15 +++
Actinomycin D 0,5 mg/kg	79,1 \pm 0,15	80,9 \pm 0,18***	80,8 \pm 0,32**	81,2 \pm 0,27***
Actinomycin D 0,5 mg/kg + Dexamethason 2 mg/kg	79,3 \pm 0,07	80,8 \pm 0,25**	81,2 \pm 0,12***	81,2 \pm 0,11***

+Szignifikancia mértéke az azonos oszlopban lévő kontroll értékhez képest.

*Szignifikancia mértéke az azonos sorban lévő álmütött állatok értékeihez képest.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$;
 átlag \pm SE; n = 6

nifikáns az álműtött patkányok értékeihez viszonyítva. A táblázatból az is leolvasható, hogy a dexamethason víztartalom emelkedést védő hatása agyischemiában actinomycin D-vel felfüggeszthető. Továbbá a kapott eredményekből az is megállapítható, hogy önmagában az actinomycin D ezen paraméter változását a kontroll értékhez képest nem befolyásolta.

A következő három táblázat /VII., VIII. és IX./ a nátrium, a kálium és kalcium koncentrációjának változását szemlélteti.

A VII. táblázatból kitűnik, hogy a nátrium koncentrációja szignifikáns mértékben növekedett az agyszövetben a kétoldali arteria carotis lekötés hatására az álműtött patkányok értékeihez viszonyítva.

A kálium koncentrációjának csökkenése szintén megfigyelhető volt a kontroll csoportban, de szignifikáns mértékű veszteség csak az ischemia II. fázisában kezdődött /VIII. táblázat/.

A kalcium akkumuláció szignifikáns mértékű növekedése pedig csak a III. periódusban volt mérhető /IX. táblázat/.

Ezen táblázatokból az is kiderül, hogy a dexamethason kezelés megakadályozta a kálium veszteséget, a nátrium és a kalcium akkumulációt. Az actinomycin D pedig gátolta a dexamethason védő hatását. A kapott

VII. táblázat Dexamethason, actinomycin D, valamint kombinált kezelés hatása az agyszövet Na⁺ koncentrációjára az ischemia egyes stádiumaiban
/mmol/kg száraz súlyban/

Kísérleti csoportok	Álmütött csoportok	Az ischemia stádiumai		
		I.	II.	III.
Kontroll	200,0 _± 4,1	240,8 _± 7,4 ^{**}	278,7 _± 7,5 ^{**}	297,0 _± 7,3 ^{**}
Dexamethason 2 mg/kg	198,2 _± 4,0	194,3 _± 4,5 ⁺⁺⁺	189,0 _± 3,0 ⁺⁺⁺	191,3 _± 0,8 ⁺⁺⁺
Actinomycin D 0,5 mg/kg	192,8 _± 3,4	222,9 _± 3,9 ^{**}	240,0 _± 6,2 ^{**} ++	268,0 _± 7,4 ^{**} +
Actinomycin D 0,5 mg/kg + Dexamethason 2 mg/kg	194,4 _± 2,8	210,2 _± 4,4 [*] ++	242,0 _± 5,4 ^{**} +++	281,0 _± 4,6 ^{**}

+Szignifikancia mértéke az azonos oszlopban lévő kontroll értékhez képest.
*Szignifikancia mértéke az azonos sorban lévő álmütött állatok értékeihez képest.

* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; + p < 0,05, ++ p < 0,01, +++ p < 0,001; átlag ± SE; n = 6

VIII. táblázat Dexamethason és actinomycin D, valamint kombinált kezelés hatása az agyszövet kálium koncentrációjára az ischemia különböző stádiumaiban kezelés hatására
/mmol/kg száraz súlyban/

Kísérleti csoportok	Álműtött csoportok	Az ischemia stádiumai		
		I.	II.	III.
Kontroll	420,7 \pm 12,8	394,7 \pm 6,6	343,1 \pm 11,0 ^{***}	323,0 \pm 14,8 ^{***}
Dexamethason 2 mg/kg	413,2 \pm 6,5	409,0 \pm 7,1	407,7 \pm 11,2 ⁺⁺⁺	428,7 \pm 3,6 ⁺⁺⁺
Actinomycin D 0,5 mg/kg	420,8 \pm 5,0	380,8 \pm 6,1	364,0 \pm 8,2 ^{**}	348,8 \pm 8,2 ^{***}
Actinomycin D 0,5 mg/kg + Dexamethason 2 mg/kg	388,3 \pm 5,7	366,0 \pm 7,0	347,0 \pm 2,8 ^{**}	311,6 \pm 4,3 ^{***}

+Szignifikancia mértéke az azonos oszlopban lévő kontroll értékhez képest.

*Szignifikancia mértéke az azonos sorban lévő álműtött állatok értékeihez képest.

* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001; + p<0,05, +++ p<0,001;
átlag \pm SE; n = 6

IX. táblázat A kalcium koncentrációjának változása az ischemia egyes stádiumaiban dexamethason, actinomycin D és kombinált kezelés hatására
/mmol/kg száraz sulyban/

Kísérleti csoportok	Álmütött csoportok	Az ischemia stádiumai		
		I.	II.	III.
Kontroll	2,73±0,13	2,85±0,16	3,12±0,13	4,62±0,54 ^{**}
Dexamethason 2 mg/kg	2,61±0,13	2,44±0,14	2,60±0,31	2,52±0,12 ⁺⁺⁺
Actinomycin D 0,5 mg/kg	3,15±0,05	3,18±0,07	3,37±0,14	6,05±0,38 ^{**}
Actinomycin D 0,5 mg/kg + Dexamethason 2 mg/kg	2,99±0,04	3,11±0,06	3,18±0,06	4,10±0,26 ^{**}

+Sznifkancia mértéke az azonos oszlopban lévő kontroll értékhez képest.

*Sznifkancia mértéke az azonos sorban lévő álmütött állatok értékeihez képest.

** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; +++ $p < 0,001$;
átlag ± SE; n = 6

X. táblázat Evans-kék koncentrációjának változása az agyban az ischemia egyes stádiumaiban dexamethason, actinomycin D és kombinált kezelés hatására
/µg/g nedves súlyban/

Kísérleti csoportok	Álmütött csoportok	Az ischemia stádiumai		
		I.	II.	III.
Kontroll	1,79±0,24	2,05±0,30	7,53±0,67 ^{***}	7,62±0,36 ^{***}
Dexamethason 2 mg/kg	1,81±0,20	1,82±0,22	1,70±0,15 ⁺⁺⁺	1,85±0,25 ⁺⁺⁺
Actinomycin D 0,5 mg/kg	1,74±0,18	2,11±0,38	9,00±0,81 ^{***}	9,95±1,04 ^{***}
Actinomycin D 0,5 mg/kg + Dexamethason 2 mg/kg	1,67±0,30	1,98±0,23	10,07±0,85 ^{***}	8,22±0,44 ^{***}

+Szignifikancia mértéke az azonos oszlopban lévő kontroll értékhez képest.

*Szignifikancia mértéke az azonos sorban lévő álmütött állatok értékeihez képest.

*** $p < 0,001$, +++ $p < 0,001$;

átlag ± SE; n = 6

eredmények azt is mutatják, hogy az actinomycin D önmagában nem változtatta meg a mért paramétereket a kontroll értékekhez képest.

A X. táblázat az albumin kiáramlásának mértékét mutatja az intersticiális térbe, amelyet az agyszövet Evans-kék koncentrációjának emelkedése jelzett. A nyert adatok azt mutatják, hogy az albumin kiáramlása a II. szakaszban kezdődött, a dexamethason pedig megakadályozta az albumin kiáramlását ugyanúgy mint az ionokét. Az actinomycin D egymagában nem hozott létre lényeges változást, a dexamethason védőhatását azonban megakadályozta.

5.5.6. Makrokortin védőhatása agyischemiában

Patkányok peritoneális fehérvérsejtjeiből dexamethason kezelés hatására termelődő makrokortin preparátumunk a liofilizálás és az izotoniás NaCl-ban történő oldás után 170 µg/ml proteint tartalmazott. E preparátum agyischemiában kifejtett protektív hatását szintén megvizsgáltuk.

Kísérleteink során 100 µg proteint adtunk szubkután két részletben elosztva az állatoknak, 50 µg-ot a műtétkor, 50 µg-ot pedig a lekötést követő második órában. Azt tapasztaltuk, hogy a túlélési arány a kezelés hatására nem javult.



Következő lépésként intraciszternálisan 20 μ l-es mennyiséget kaptak a kísérleti állatok a nyert preparátumból, amely 3,4 μ g proteinnek felelt meg. Ezt a fehérjemennyiséget közvetlenül a műtét előtt adtuk a patkányoknak. A makrokortint tartalmazó preparátum védőhatást mutatott, s csökkentette az állatok mortalitását. A kísérleteket dexamethasonnal nem exponált sejtek 16 K frakciójával is elvégeztük. A kontroll csoport egyedei kétszeresére higitott izotóniás nátrium klorid oldatból 20 μ l-t kaptak intraciszternálisan. A szignifikancia számításánál a makrokortinnal nyert eredményeket a sóval kezelt csoport értékeihez viszonyítottuk. A szignifikanciát χ^2 próbával számoltuk /XI. táblázat/.

A túlélési arány mellett az albumin extravazációjának a mértékét is felhasználtuk az általunk előállított makrokortin frakció védőhatásának igazolására.

Ebben a kísérletsorozatban 20 μ l-es makrokortint tartalmazó frakciót és 20 μ l kétszeresére higitott izotóniás NaCl oldatot adtunk intraciszternálisan. Valamennyi állatot a II. tünet megjelenésekor várható időpontban, azaz 4 órával a lekötést követően megöltük, s analizáltuk az Evans-kék festék koncentrációját, az agyszövetben. Az így kapott eredmé-

XI. táblázat Makrokortin kezelés hatása agy-
ischemiás állatok túlélésére

Kísérleti csoportok	n	Elhullás n	Elhullás %
Izotóniás NaCl kétszere- sére higitva, szubkután 0,6 ml	10	7	70
Kontroll frakció, szubkután 2x 0,3 ml	10	8	80
Makrokortint tartalma- zó frakció, szubkután 2x0,3 ml	10	6	60
Izotóniás NaCl kétsze- resére higitva, intra- ciszternálisan 20 µl	72	52	72
Kontroll frakció, int- raciszternálisan 20 µl	35	21	60
Makrokortint tartalma- zó frakció, intracisz- ternálisan 20 µl	35	16	46 **

** Szignifikancia mértékének megállapítása a 20 µl kétszeresére higitott NaCl intraciszternális adásához viszonyítva, $p < 0,01$

nyek azt mutatták, hogy a makrokortinnal kezelt csoportban szignifikáns védőhatás jelentkezett az albumin kiáramlásával szemben a kezeletlen csoporthoz képest /XII. táblázat/.

XII. táblázat Albumin kiáramlás változása makrokortin kezelés hatására

Kísérleti csoportok	n	$\mu\text{g/g}$ nedves súly festék $\bar{X} \pm \text{SE}$
Izotóniás NaCl oldat kétszeresére higitva, intraciszternálisan 20 μl	9	5,20 \pm 0,60
Szupernatans frakció, intraciszternálisan 20 μl	9	3,14 \pm 0,57
Makrokortin frakció, intraciszternálisan 20 μl	9	2,73 \pm 0,74

X Szignifikancia mértéke a Na Cl oldattal kezelt csoporthoz viszonyítva, * $p < 0,05$.

6. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A disszertációban leirt eredmények azt mutatják, hogy kétoldali arteria carotis okkluzió következményeként Sprague-Dawley patkányokban az agyischemia jellemző tünetei alakulnak ki, amelyek összefüggésben állnak az agyoedema kialakulásával.

Az agyischemia állatkísérletes létrehozására alkalmazott modellünk helyességét az irodalomban már leirt szerek védőhatása alapján igazoltuk.

Megállapítottuk, hogy az agy oxigénigényét csökkentő pentobarbital és diazepam hatásosnak bizonyultak az általunk kidolgozott modellen.

A vinpocetin számos előnyös, az irodalomban leirt tulajdonsága ellenére nem mutatott védőhatást kísérleti modellünkön. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy a vinpocetin ugyan kedvező irányba befolyásolja a biokémiai paraméterek változását, de ez a hatás kísérleteinkben nem volt elegendő a patkányok túlélésének biztosítására az okkluziót követően, feltehetően azért, mert a vérnyomást is csökkenti, s ezáltal csökken a lekötés mögötti terület vérellátása.

A dexamethason megnöveli a patkányok túlélését, s megakadályozza a korai citotoxikus, valamint az ezt

követő vazogén agyödema kialakulását. Mindezt bizonyítja a kísérletek során az agyszövet víztartalmának a csökkenése, a nátrium és a kalcium ionok akkumulációjának, továbbá a kálium ion veszteségnek a megakadályozása, valamint az albumin extravazációjának a gátlása.

Azt találtuk, hogy az actinomycin D, amely gátolja a m-RNS szintézist, teljes mértékben felfüggeszti a glukokortikoidok cerebroprotektív hatását. Ez az eredmény azt igazolja, hogy a de novo proteinek szintézise szerepet játszik a glukokortikoidok védőhatásának kialakulásában. A gyulladásgátló glukokortikoidok indukálják a foszfolipáz A₂ gátló polipeptidek szintézisét /Flower és Blackwell 1979, Di Rosa és Persico 1979, Hirata és mtsai 1980/, s így megakadályozzák az érfal endotél sejtjeiben az arachidonsav felszabadulását.

Koltai és mtsai /1983/ a PLA₂ gátló makrokortin előnyös hatását figyelték meg kísérletes miokardiális infarktusbán. Valószínű, hogy a makrokortin az arachidonsav metabolitok képződésének gátlása útján fejti ki mind kardioprotektív /Needleman és mtsai, 1976/, mind pedig cerebroprotektív hatását /Kusunoki és mtsai, 1982/.

A dexamethason által indukált foszfolipáz A₂

gátló proteinek intraciszternálisan történő beadása szintén védi a patkányokat az agyischemia következtében fellépő elhullásával szemben. Mivel a makrokortinnak szubkután adást követően még harmincszoros dózisban sem volt kimutatható védőhatása cerebrális ischemiában, feltételezzük, hogy a szubkután adott makrokortin vagy gyorsan elbomlik, vagy pedig még valószínűbb, hogy nem képes átjutni a véragygáton.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során megfelelő modellt kerestünk az akut érelzáródás következtében kialakuló agyischiemiás károsodás farmakológiai befolyásolhatóságának tanulmányozására. Azt találtuk, hogy Sprague-Dawley CFY nőstény patkányokban a kétoldali arteria carotis communis lekötése után az agyischemia jellegzetes tünetei alakulnak ki. Az első tünet jellemző 'turkáló' fejmozgás megjelenése, amelyet forgó mozgások, majd központi idegrendszer eredetű görcsök követnek. Később az állatok mély kóma állapotába kerülnek, s 12 órán belül elpusztulnak. Amennyiben az első tünet megjelenik, a folyamat irreverzibilis. A beavatkozás gyógyszeres kezelés nélkül az állatok kétharmad ré-

szében okoz elhullást.

Az agyi keringészavarok talaján kifejlődő biokémiai változások közül tanulmányoztuk az ATP, CP és tejsav szintjének változását a teljes agyszövetben, továbbá az agy víztartalmának, nátrium, kálium és kalcium koncentrációjának változását és az Evans-kékkel jelzett albumin kiáramlását az egyes tüneteknek megfelelő időpontokban.

Azt találtuk, hogy a beavatkozás hatására fokozatosan csökken az agyszövet makroerg foszfáttartalma, nő a nátrium és kalcium koncentrációja, s káliumvesztés jelentkezik a víztartalom egyidejű megnövekedésével, ami citotoxikus agyoedema megjelenésére utal. Az ischemia második fázisában kezdődik az érpályából az albumin nagyfoku kiáramlása, a vazogén agyoedema megjelenése. Mindezen változások tipikusak az ischemiás jellegű agyszövet károsodásra.

A modell validitásának megítélésére farmakológiai beavatkozásokat végeztünk. Azt találtuk, hogy az agyszövet oxigénigényét csökkentő szerek, mint a pentobarbital és diazepam, az irodalmi adatokkal megegyezően késleltetik az ischemiás tünetek és biokémiai változások kialakulását, míg az agyi értágítóként alkalmazott vinpocetin hatástalannak bizonyult.

E kísérleti eredmények birtokában megvizsgáltuk



a klinikumban széles körben alkalmazott glukokortikoidok közül a dexamethason cerebroprotektív hatását. Kiderült, hogy az agyi ischemia kiváltása előtt szubkután 2 mg/kg dózisban adott dexamethason 67 %-ról 17 %-ra csökkenti a mortalitást és kivédi mind a citotoxikus, mind pedig a vazogén agyödéma kifejlődését. A dexamethason védő hatását a de novo protein szintézist gátló actinomycin D teljesen megakadályozza, ami arra utal, hogy a glukokortikoidok cerebroprotektív hatása új fehérjeszintézis útján jön létre.

Megvizsgáltuk, hogy patkány peritoneális sejtjeiből dexamethason jelenlétében nyert foszfolipáz A₂ gátló polipeptid intraciszternális bevitele képes-e védőhatást kifejteni ischemiás modellünkön. Kísérleteink azt mutatták, hogy a makrokortin szignifikánsan fokozza a patkányok túlélését és csökkenti az albumin kiáramlását a szövetekbe. Eredményeink arra utalnak, hogy a glukokortikoidok cerebroprotektív hatásában a makrokortin fontos szerepet játszik.

8. IRODALOM

- Awad I, Little Jr, Lucas F, Skrinska V, Slugg R, Lesser P: Treatment of acute focal cerebral ischemia with prostacyclin. *Stroke* 14: 203-209, 1983.
- Bartko D, Reulan HJ, Koch H, Schurmann K: Effect of dexamethasone on the early edema following occlusion of the middle cerebral artery in cats. In: "Steroids and brain edema." New York: Springer-Verlag, 127-137, 1972.
- Basharahil KA, Takáts I, Leprán I, Szekeres L: Changes in high energy phosphate ester concentrations following cerebral ischemia in rat brain. An Abstract of the Hungarian Physiological Society LXL Meeting 1979.
- Bielicki L, Krieglstein J: Inhibition of glucose phosphorylation in rat brain by thiopental. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 293: 25-29, 1976.
- Blackwell GJ, Carnuccio R, Di Rosa M, Flower RJ, Parente L, Persico P: Macro cortin: a polypeptide causing the antiphospholipase effect of glucocorticoids. *Nature* 287: 147-149, 1980.
- Blackwell GJ, Carnuccio R, Di Rosa M, Flower RJ, Langham CSJ, Parente L, Persico P, Russel-Smit NC, Stone D: Glucocorticoids induce the formation and release of anti-inflammatory and antiphospholipase proteins into the peritoneal cavity of the rat. *Br J Pharmac* 76: 185-194, 1982.
- Cohen MM: Biochemistry of cerebral anoxia, hypoxia and ischemia. In *Monographs in Neural Sciences* 1: 2-49, 1973.
- Cooper PR, Moddy S, Clark WK, Kirkpatrick J, Maravilla K, Gould AL, Drane W: Dexamethasone and severe head injury: A prospective double-blind study. *J Neurosurg* 51: 307-316, 1979.

- Csete K, Szekeres L, Takáts I: Agyi keringést befolyásoló szerek hatása egerek túlélésére és agyszöveti metabolitjaira késleltetett bilaterális carotis occlusio után. Magyar Élettani Társaság XLVI. Vándorgyűlése, 1981.
- De Riu PL, Orunesu G, Pau A: Effect of reperfusion on the uptake of tritiated uridine in the gerbil brain after prolonged ischemia. *Acta Neurochyr* 47: 253-260, 1979.
- Diaz FG, Ausmann JI: Experimental cerebral ischemia. *Neurosurg* 6: 436-445, 1980.
- Di Rosa M, Persico P: Mechanism of inhibition of prostaglandin biosynthesis by hydrocortisone in rat leucocytes. *Br J Pharmac* 66: 161-163, 1979.
- Djuricic BM, Paschen W, Bosma HJ, Hossmann KA: Biochemical changes during graded brain ischemia in gerbils. *J Neurol Sci* 58: 25-36, 1983.
- Dóczi T, Szerdahelyi P, Gulya K, Kiss J: Brain water accumulation after the central administration of vasopressin, *Neurosurg* 11: 402-407, 1982.
- Domanska-Janik K, Strosznajder J, Zalewska T: Effect of ischemia and hypoxia on rat brain glycolipids. *J Neurosci Res* 7: 363-370, 1982.
- Duffy TE, Nelson SR, Lowry OH: Cerebral carbohydrate metabolism during acute hypoxia and recovery. *J Neurochem* 199: 959-977, 1972.
- Flower RJ, Blackwell GJ: Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A₂ inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature* 278: 456-459, 1979.
- Franklin RM: Inhibition of ribonucleic acid synthesis in mammalian cells by actinomycin D. *Biochim Biophys Acta* 72: 555, 1963.

- Gatfield PD, Lowry OH, Schulz DW, Passonneau JV:
Regional energy reserves in mouse brain and changes
with ischemia and anaesthesia. *J Neurochem* 13:
185-195, 1966.
- Geiger A, Magnes J: Isolation of cerebral circulation
and perfusion of brain in living cat. *Am J Physiol*
149: 517-537, 1947.
- Gellert M, Smith CE, Neville D, Felsenfeld G: Acti-
nomycin binding to DNA. Mechanism and specificity.
- Gryglewski RJ, Nowak S, Kostka-Trabka E, Bieron K,
Dembinska-Kiec A, Blaszczyk B, Kusmiderski J, Markowska
E, Szmatoła S: Clinical use of prostacyclin /PGI₂/ in
ischaemic stroke. *Pharmacol Res Comm* 14: 879-908,
1982.
- Hanid MA, Davies M, Mellon PJ, Silk DBA, Strunin L,
McCabe JJ, Williams R: Clinical monitoring of int-
racranial pressure in fulminant hepatic failure.
Gut 21: 866-869, 1980.
- Hansen AJ, Nordstrom CH: Brain extracellular potassium
and energy metabolism during ischemia in juvenile
rats after exposure to hypoxia for 24 h.
J Neurochem 32: 915-920, 1978.
- Harper AM, Desmukh VD, Rowan JO: The influence of
sympathetic nervous activity on cerebral blood
flow. *Arch Neurol* 27: 1-6, 1972.
- Harrison MJG, Ellam LD: Role of 5-HT in the morbidi-
ty of cerebral infarction: Study in the gerbil
stroke model. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44:
140-143, 1981.
- Hirata F, Schiffman E, Venkatasubramanian K, Salomon
D, Axelrod J: A phospholipase A₂ inhibitory protein
in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids.
Proc Natn Acad Sci USA 77: 2533-2536, 1980.

- Hohorst HJ: L /+/-Lactate. Determination with lactic dehydrogenase and DPN. Bergmeyer HU, Methods of enzymatic analysis, Acad Press, New York p. 266. 1965.
- Honig GR, Rabinowitz M: Inhibition of protein synthesis unrelated to effect on template RNA synthesis. Science 149: 1504-1511, 1965.
- Hurwitz J, Furth JJ, Malamy M, Alexander M: The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis. III. The inhibition of the enzymatic synthesis of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid by actinomycin and proflavin. Proc Natn Acad Sci USA 48: 1222-1227, 1962.
- Ishimitsu H: Experimental brain edema: 2. The effects of various glucocorticoids on experimental brain edema. Okayama Igakkai Zasshi 91: 819-830, 1980.
- Jarrott DM, Domer F: A gerbil model of cerebral ischemia suitable for drug evaluation. Stroke 11: 203-209, 1980.
- Jaworek D, Gruber W, Bergmeyer HU: Adenosine-5'-diphosphate and adenosine-5'-monophosphate. In: Bergmeyer HU, /Ed./ Methods of enzymatic analysis. 2nd. ed. Verlag Chemie Weinheim and Academic Press, Inc. New York and London, p. 2127, 1974.
- Johansson B, Linder L, Borenstein P: Cerebrovascular permeability in acute arterial hypertension: Effect of unilateral ligation of the common carotid artery. Eur Neurol 17: 205-210, 1978.
- Kahan E, Kahan FM, Hurwitz J: The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis. VI. Specificity of action of actinomycin D. J Biol Chem 238: 2491, 1963.

- Koltai M, Leprán I, Nemezc Gy, Szekeres L: The possible mechanism of protection induced by dexamethasone against sudden death due to coronary ligation in conscious rats. *Br J Pharmac* 79: 327-329, 1983.
- Kusunoki M, Kimura K, Nagatsuka K: Platelet hyperaggregability in ischemic cerebrovascular disease and effect of aspirin. *Thromb Haemostas* 48: 117-119, 1982.
- Leprán I, Koltai M, Szekeres L: Effect of non-steroid anti-inflammatory drugs in experimental myocardial infarction in rats. *Eur J Pharmac* 69: 235-238, 1981.
- Leprán I, Koltai M, Szekeres L: Effect of actinomycin D and cycloheximide on experimental myocardial infarction in rats. *Eur J Pharmac* 77: 197-199, 1982.
- Lespinnasse P, Le Poncin-Lafitte M, Pesquies PC, Rapin JR: Demonstration of vascular redistribution after carotid clamping in rats. *Experientia* 39: 369-371, 1982.
- Levine S: Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 36: 1-18, 1960.
- Levine S: Lesions of amygdala, pyriform cortex and other brain structures due to dipiperidinoethane intoxication. *J Neuropathol Exp Neurol* 39: 56-64, 1980.
- Levy DE, Duffy TE: Cerebral energy metabolism during transient ischemia and recovery in the gerbil. *J Neurochemistry* 28: 63-70, 1976.
- Lewis LD, Ponten U, Siesjö BK: Homeostatic regulation of brain energy metabolism in hypoxia. *Acta Physiol Scand* 88: 284-286, 1973.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.

- Macmillan V: Cerebral monoamin and energy metabolism during recovery from hypoxia-oligaemia. *Can J Physiol Pharmacol* 58: 147-152, 1980.
- Macmillan V: Effect of gamma-hydroxybutyrate and gamma-butyrolactone on cerebral energy metabolism during exposure and recovery from hypoxemia-oligaemia. *Stroke* 11: 271-277, 1980.
- Matsuoka Y, Hossman KA: The effect of induced hypertension on pial artery micropressure after middle cerebral artery occlusion in cats. *J Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1: S164-S165, 1981.
- Moncada S: Biology and therapeutic potential of prostacyclin. *Stroke* 14: 157-168, 1983.
- Nakatomi Y, Fujishima M, Tamaki K, Takao I, Ogota J, Omae T: Influence of sex on cerebral ischemia following bilateral carotid occlusion in spontaneously hypertensive rats: A metabolic study. *Stroke* 10: 196-199, 1979.
- Needleman P: The synthesis and function of prostaglandins in the heart. *Fedn Proc* 35: 2376-2381, 1976.
- Nemato EM, Frinak S: Brain tissue pH after global brain ischemia and barbiturate loading in rats. *Stroke* 12: 77-82, 1981.
- Nilsson L: The influence of barbiturate anaesthesia upon the energy state and upon acid-base parameters of the brain in arterial hypotension and in asphyxia. *Acta Neurol Scand* 47: 233-253, 1971.
- Okamatsu S, Peck RC, Lefer AM: Protective actions of dexamethasone in acute cerebral ischemia. *Circulatory Shock* 9: 445-456, 1982.

- Okoda Y, Sima T, Uozumi T: Effects of bilateral common carotid occlusion and reflow on regional cerebral blood flow and electrocorticogram in spontaneously hypertensive rats and normotensive rats. *Neurol Surg* 9: 165-172, 1981.
- Quintana A, Raczka E, Giralt MT, Quintana MA: Effects of aspirin and indomethacin on cerebral circulation in the conscious rat: Evidence for a physiological role of endogenous prostaglandins. *Prostaglandins* 25: 549-556, 1983.
- Raxmonda C, Pandolf S, Seylaz JR: Massive doses of steroids in cryogenic cerebral injury and edema /dexamethasone/. *Stroke* 10: 670-674, 1979.
- Reich E, Franklin RM, Shatkin AJ, Tatum EL: Action of actinomycin D on animal cells and viruses. *Proc Natn Acad Sci USA* 48: 1238-1243, 1962.
- Rossignol R, Ebigwei-Ibru M: Drugs against brain hypoxia. *TIPS* 1: 287-289, 1980.
- Rössner W, Tempel K: Quantitative Bestimmung der Permeabilität der sogenannten Blut-Hirnschranke für Evans-blau /T 1824/. *Med Pharmacol Exp* 14: 169-182, 1966.
- Salford LG, Brierley JB, Phum F, Siesjö BK: Energy metabolism and histology in the brain during combined hypoxaemia and ischemia. *Europ Neurol* 6: 329-334, 1972.
- Siesjö BK, Ljunggren B: Cerebral energy reserves after prolonged hypoxia and ischemia. *Arch Neurol* 299: 400-408, 1973.
- Siesjö BK, Nilsson L: Influence of anaesthetics on the balance between production and utilization of the energy in the brain. *J Neurochem* 23: 29-36, 1974.

- Smith AL, Hoff JT, Nielson SL, Larson CP: Barbiturate protection in acute focal cerebral ischemia. *Stroke* 5: 1-7, 1974.
- Spath JA, Lane DL, Lefer AM: Protective action of methylprednisolone on the myocardium during experimental myocardial ischemia in the cat. *Circulation Res* 35: 44-51, 1974.
- Szekeres L, Schein M: Cell metabolism of the overloaded mammalian heart in situ. *Cardiologia* 34: 19-25, 1959.
- Takáts I, Szekeres L, Udvary É: Influence of pharmacological interventions aimed at reducing extrasystolic activity after coronary occlusion on early metabolic changes appearing in the non-infarcted myocardium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 285: R 81, 1974.
- Tamaki K, Fujishima M, Nakatomi Y, Ishitsuka T, Ogota J, Omae T: Effects of long-term antihypertensive treatment on brain metabolism after bilateral carotid artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 42: 1141-1145, 1980.
- Thurston JV, McDougal DB Jr: Effect of ischemia on the brain on the newborn mouse. *Am J Physiol* 216: 348-352, 1969.
- Van Reempts J, Borgers M, Van Dael L, Van Eyndhoven J, Van De Ven M: Protection with flunarizine against hypoxic-ischemic damage of the rat cerebral cortex. A quantitative morphologic assessment. *Arch Int Pharmacodyn* 262: 76-88, 1983.
- Wilhjelm BJ, Arnfold I: Protective action of some anaesthetic agents against anoxia. *Acta Pharmacol Toxicol* 22: 93-98, 1965.

- Wollenberger A, Ristau O, Schoffa G: Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung grösserer Gewebestücke. Pflügers Archiv 270: 399-404, 1960.
- Yasuda H, Shuto S, Tsumagari T, Nakajima A: Protective effect of a novel imidazole derivative against cerebral anoxia. Arch Int Pharmacodyn 233: 136-144, 1978.
- Yatsu FM, Diamond I, Graziano C, Lindquist P: Experimental brain ischemia: Protection from irreversible damage with a rapid acting barbiturate /methohexital/. Stroke 3: 726-732, 1972.
- Yatsu FM, Lindquist P, Graziano C: An experimental model of brain ischemia combining hypotension and hypoxia. Stroke 5: 32-40, 1974.



Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr.Szekeres László egyetemi tanárnak a SZOTE Gyógyszertani Intézete igazgatójának, továbbá Dr.Takáts István és Dr.Koltai Mátyás docenseknek hasznos tanácsaikért és tudományos munkám támogatásáért.

Megköszönöm Dr.Kása Péter egyetemi tanárnak és Dr.Jóó Ferenc tudományos főmunkatársnak, hogy lehetővé tették azt, hogy Dr.Szerdahelyi Péter vegyészrel és Dr.Ádám Géza biológussal együttműködve számos laboratóriumi probléma megoldására választ kapjak.