

Magam részéről a 2004-06 közötti periódusban az OTKA támogatásból végzett kutatásokat eredményesnek értékelem. Ugyanakkor korábban nem látott nehézségek (megnyírbált és késve érkező anyagi támogatás, ÁFA fizetési kötelezettség, a közbeszerzés hihetetlen árfelhajtó hatása) miatt a vállalt feladatokat csak részben és nagy nehézségek közepette sikerült teljesíteni.

Előljárójában néhány megjegyzés:

1. Ugyan a kutatási szerződés periódusa 2004-06-ként kerül rögzítésre, valójában a szerződés csak 2004. augusztus elején került aláírásra és a pénzügyi támogatás csak októbertől állt a rendelkezésre. Így a tényleges munkavégzés ideje kevesebb, mint két és fél évre redukálódott. Hozzátevé azt, hogy a téli zárási időszak további 2 hónapon át lehetetlenné teszi a beszerzéseket, az igen szűkös támogatási keret sem kerülhet optimális felhasználásra.
2. Tevékenységünket megkönnyítette, hogy témánk szervesen kapcsolódik a korábban megkezdett vizsgálatokhoz. Ugyanakkor mintegy féléven át rendkívül nagy problémát jelentett a kutatások finanszírozása. A korábbi, lezárt OTKA beszámolója és pénzügyi zárását követően (2004. április) ugyanis mintegy 5 hónapon keresztül nem állt pénz a rendelkezésünkre a kutatás folytatására. Munkát csak részben, egyéb, intézetben és laboratóriumon belüli átcsoportosításokból, kölcsönökből tudtuk finanszírozni.
3. Eredetileg 12 000 eFt-ot kértünk feladataink megvalósításához, ennek mintegy 60%-a került megítélésre, további 100 ezrek estek a kötelező tartalékolás áldozatául, így kb. bruttó 6,3 millió Ft állt a kutatás rendelkezésére. Csupán ebből természetesen nem lehetett volna azokat az eredményeket elérnünk, amelyről a beszámoló szól. Más forrásokat (külföldi együttműködő partnereink hathatós támogatását, egyéb, kisebb pályázati pénzeket) is be kellett vonnunk, hogy folyamatosan és eredményesen tudjunk dolgozni.

Eredeti terveinknek megfelelően, alapvetően az újszülöttkori agyi vérkeringés szabályozás mechanizmusait vizsgáltuk fiziológiás és hipoxiás körülmények között. Altatott, újszülött malacokon végzett vizsgálataink legfontosabb eredményei a következők:

1. Korábban *in vivo* és *in vitro* vizsgálatok egyaránt bizonyították a mitokondriális ATP-szenzitív K^+ csatornákat (mK_{ATP}) aktiváló diazoxid (DIAZ) neuroprotektív hatását. Nem volt azonban ismert, hogy a szer védő hatása érvényesül-e közvetlenül az agyi erekben. *In vivo* kísérleteinkben endothelium-függő vazodilatációt 5% és 10% CO_2 , 21% O_2 tartamú gázkeverék belélegeztetésével, közvetlen simaizom aktivációt prosztaciklin (iloprost, 0,1-1,0 $\mu g/ml$) alkalmazásával idéztünk elő. A neuronális-vaszkuláris csatolást a glutamát receptor izgató N-methyl-D-aszpartát (NMDA, 10^{-4} mol/L) segítségével teszteltük. Arra a következtésre jutottunk, hogy a DIAZ előkezelés részlegesen kivédi az agyi ischaemia által okozott vaszkuláris károsodást. A védelem elsősorban az agyi kiserekben az endotheliumtól függő vazodilatációra és a neuronális-vaszkuláris csatolásra terjed ki. A beavatkozás azonban hatástalan az érsimaizmot érintő ischaemiás ellen. Kísérleteink alternatív utat jelentenek az újszülöttkori agyi iszkémia által okozott neuronális károsodások mérséklésére irányuló gyógyszeres beavatkozásokban. (Domoki *et al.*, 2005, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H368-H373.)

2. Több mint 10 éve kutatjuk a glutamáterg vazodilatáció mechanizmusát. Az elmúlt időszakban ezen a területen is értünk el új eredményeket.

a) Megállapítottuk, hogy az endogén glutamát antagonistaként ismert kinurénsav (KYNA) módosítja a glutamáterg (NMDA és a kainsav által kiváltható) agyi vazodilatációt. Ugyanakkor azt találtuk, hogy a KYNA nem befolyásolja sem a közvetlen ér simaizom ingerléssel, sem az endothelium aktivációján keresztül kiváltott agykérgi vazodilatációt.

Karakterizáltuk az újszülött malac agyában a kinurénsav, ill. a kvinolinsav regionális előfordulását, elemeztük a globális agyi ischemia hatását ezen metaboliokra. Eredményeink fontos támpontot jelentenek a neuroprotekciónak új, az endogén glutamát receptor antagonisták alkalmazásával összefüggő problémáinak megértéséhez
(Bari et al., 2006, *Brain Res* 1069:39-46.)

b) Újszülött malacok anyából nyert izolált, 100-200 μm átmérőjű, nyomás (30, 60 és 100 Hgmm) alá helyezett arteriolákon megvizsgáltunk az NMDA lehetséges, közvetlen értágító hatását. Korábban ugyanis olyan feltételezések kerültek nyilvánosságra, hogy az érsimaizom sejteken vagy/és az agyi érendotheliumon vannak funkcionális glutamát receptorok, és azok közvetítésével valósul meg a vazomotor válasz. Eredményeink szerint izolált ereken ugyan létezik csekély mértékű glutataterg vazodilatáció (farmakológiai dózis esetén), de azt nem NMDA receptorok mediálják. Eredményeink fontos támpontot jelentenek az agyban a funkcionális aktivációval összefüggő agyi vazodilatáció mechanizmusának megértéséhez.
(Simandle et al., 2005 *Microvasc Res* 70: 76-82)

3. Ismert, hogy az újszülött agyban a prosztanoidok kiemelkedően fontos szerepet játszanak az agyi érreakciókban. Az utóbbi években lehetőség nyílt arra, hogy a korábbi, nem-szelektív ciklooxygenáz (COX) gátlók, az indomethacin és ibuprofen, mellett szelektív COX-1 és COX-2 gátlók alkalmazásával karakterizáltuk a hiperkapnia és a hipotenzió okozta agyi arteriola dilatációt, valamint az ACh hatására bekövetkező vazokonstriktív mechanizmusát. Tapasztalataink szerint az újszülött agyban a legfontosabb értágító mechanizmusok a COX-2 enzim által katalizált úton termelődő prosztanoidok hatására jönnek létre. Ugyanakkor arra is rámutattunk, hogy az indomethacin nem csupán a COX-1 és -2 gátlásán keresztül befolyásolja az agyi érreakciókat.
(Domoki et al., 2005 *Ped Res* 57:853-857.)

4. Folytattuk a hipoxiás állapotokat követő reaktív oxigénradikálok (ROS) termelésének hatásának vizsgálatát. Kísérleteinkben a lélegeztetés felfüggesztésével 10 perces asphyxiát hoztunk létre. A reventillációkor az állatokat vagy szobalevegővel, vagy 100% oxigénnel lélegeztettük további 3 órán keresztül. Intravitális mikroszkópiával és laser Doppleres áramlásméréssel követtük a nagyagy- és kisagy kérgi perfúzió változásokat. Megállapítottuk, hogy a kisagyban szignifikánsan nagyobb az asphyxiát követő reaktív hyperaemia, mint a nagyagyban. A szövettani vizsgálatok rámutattak az oxigén-toxicitásra utaló neuropatológiai eltérések a mikrokeringésben tapasztalt eltérések közötti összefüggésekre.
(Domoki et al. 2006, *Acta Paediatrica* 95:1109-1115)

5. Malac agyból frissen elválasztott mitochondriumokon megvizsgáltunk a mK_{ATP} -aktiváló DIAZ kezelés hatását. Erre azért volt szükség, hogy tisztázzuk a DIAZ hatásmechanizmusának korábban még ismeretlen lépéseit. Eredményeink szerint a DIAZ kezelés hatására a mitochondriumok depolarizálódnak, és bennük fokozódik a ROS termelés. Ugyanakkor megállapítottuk, hogy a nagyobb hatékonyságú, ugyancsak mK_{ATP} -aktiváló szer, a BMS-191095 kezelés szintén membrán depolarizációt eredményez, ugyanakkor nem emelkedik a ROS termelés. Mind a két szer neuroprotektív hatású, ill. velük farmakológiai prekondicionálás hozható létre. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a mK_{ATP} aktiváció feltehetően nem a ROS termelés fokozása révén fejt ki prekondicionáló hatást /neuroprotekciónak az agyban.
(Busija et al., 2005, *Brain Res Bull* 66:85-90.)

6. Eredeti terveink szerint malacokon vizsgáltuk volna a DIAZ előkezelésnek a vér-agy gátra gyakorolt hatását. A kísérleti állatok emelkedő ára (2 év alatt egy malac ára 2 eFt-ról 5 eFt-ra emelkedett), valamint a felhasznált farmakonok költségei azonban azt indokolták, hogy ezeket a kísérleteket rágcsálókön végezzük el. Patkányban a 2 carotis comm. leszorításával (2VO) és egyidejű hipotenzióval hoztunk létre tranziens agyi ischémiát (15-30 perc), majd 24 órás túlélést követően a vér-agy gát integritását Na fluoreszcein és Evans kék segítségével, fotometriás detektálással vizsgáltuk. Eredményeink szerint az egyszeri DIAZ adás nem, de a 3 napos DIAZ előkezelés (6, 20 és 40 mg/kg dózisokat alkalmaztunk) meggátolja a vér-agy gát károsodását ebben az ischémiás modelben. Hasonlóan, a DIAZ előkezelés szignifikánsan csökkentette az agyödéma kialakulását is.

(*Lenzsér et al., 2005, Brain Res 1051:72-80.*)

7. Azt, hogy a DIAZ előkezelés miképpen befolyásolja az ischémiás agyban a morfológiai elváltozásokat és a kognitív funkciókat, szintén patkányon vizsgáltuk meg. Modellünkben permanes 2VO-t hoztunk létre és különböző túlélési idő (2-14 hét) után vizsgáltuk az állatok tanulási képességét a Morris water maze teszt segítségével. Eredményeink szerint a DIAZ előkezelés meggátolja a tanulási képesség romlását. Ugyanakkor rámutattunk arra is, hogy a DIAZ utókezelés csak akkor hatékony, ha oldószerként DMSO-t használtunk. Vizsgálataink szerint a DMSO önmagában is jótékonyan befolyásolja a tanulási képességet. Vizsgálataink szerint a DMSO feltehetően szabadgyök fogó tulajdonsága révén szinergistaként erősítette meg a DIAZ feltételezett neuroprotektív hatását. Immunhisztokémiai vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy 2VO-t követően a hippocampusban detektálható sejtpusztulás, mikroglia aktiváció és szinaptikus leépülés jön létre. Kvantitatív morfológiai módszerekkel végzett méréseink szerint a DIAZ előkezelés hatására a morfológiai elváltozások súlyossága csökken. Egyértelmű korrelációt találtunk a morfológiai jellemzők és a kognitív funkciók között. (*Farkas et al., 2005, Neuroscience Letters 387:169-172 , illetve Farkas et al., 2006, Brain Res 1087:168-74.*)

A felsorolt közlemények mellett részben az OTKA támogatás tette lehetővé, hogy befejezzünk egy korábban elkezdett kísérletsorozatot.

8. Ebben patkányokon vizsgáltuk azt, hogy milyen mechanizmusokon keresztül károsítja a vér-agy gát integritását a tumor nekrozis faktor (TNF) α . Vizsgálataink rámutattak arra, hogy a TNF α nitrogénoxid (NO) felszabaduláson keresztül fokozza az agykérgi vérátáramlást, ugyanakkor az NO felszabadulás segíti a vér-agy gát permeabilitásának fokozódását is. (*Farkas et al., 2006, Microvasc Res 72:113-119.*)

Emellett még két olyan közlemény született, amelyhez az állatokat, vegyszereket és eszközöket részben ebből az OTKA támogatásból fedeztük. Ugyanakkor ezekben a munkákban való részvételre kollaborációs felkérésre került sor. Az egyik munka teljes egészében az általam vezetett laboratóriumban készült (*Novák et al., 2006, Respiratory Physiology & Neurobiology*), míg a másik, morfológiai jellegű vizsgálatra Pécssett Seress László professzor laboratóriumában (*Ábrahám H., 2005, Neuroscience 136:217-230.*)

Összesen tehát az OTKA pályázat segítségével 12 közlemény született, melyek mindegyikét rangos nemzetközi folyóiratban közzétettük (összesített impakt faktoruk 29,18). Emellett számos előadás összefoglaló is publikálásra került. Mindenképpen pozitívumként kell megemlíteni, hogy a munkába bekapcsolódott PhD hallgatók közül Nagy Krisztina 2006-ban szerzett doktori fokozatot, Dr. Gáspár Tamás védésére pedig 2007 első félévében kerül sor. Mellettük

jelenleg további 3 PhD hallgató dolgozik laboratóriumomban és az OTKA nyújtotta lehetőségeket kihasználva remélhetően 1-2 éven belül ők is fokozatot szereznek.

Az OTKA támogatás továbbá lehetőséget nyújtott arra is, hogy a Tudományos Diákkör keretében tehetséges fiatalok kapcsolódjanak munkacsoportunkhoz. Ők minden esztendőben eredményesen szerepelnek az intézményi diákköri konferenciákon, és munkacsoportunk 2-3 előadással képviselteti magát az OTDK-ken is.

Hasonlóan az OTKA támogatás tette lehetővé, hogy más pályázatokon is eredményesen szerepeljünk, kollaborációs partnereket találjunk itthon és külföldön ezzel is megteremtve az igényes és eredményes kutatómunka feltételeit.