

Kutatási tevékenységüket az előzetes munkaterv keretein belül, annak megfelelően végeztük. Természetesen az eltervezett kísérleti elképzeléseken módosítanunk kellett, hiszen egyfelől azok túl ambiciózusnak bizonyultak, másrészt az elvégzett munka során olyan új problémák vetődtek fel, amelyeket tovább kellett vizsgálni. A pályázat elnyerését követően sikerült egy nemzetközi kiegészítő OTKA támogatást is megkapnunk, amely lehetővé tette, hogy munkacsoportunkból többen is dolgozhassanak az Észak-Karolina Állambeli Winston-Salemben, Dr. David Busija professzor laboratóriumában. Az ott végzett munka szervesen kapcsolódott az elmúlt másfél évtizedes tudományos együttműködésünkhöz. Ennek keretében mód nyílt fiatal kollégák (Dr. Mracskó Éva, Dr. Institóris Ádám és Dr. Domoki Ferenc) rövidebb tanulmányútja költségeinek részbeni fedezésére. A kint végzett munka lehetőséget nyújtott új technikák megtanulására és hazai adaptációjára is.

Ugyan nem a témavezető feladata annak megítélése, hogy mennyire volt sikeres az elmúlt négy év során végzett munka, de a tényeket sem szabad elhallgatni:

- A pályázat futamideje alatt, teljesen, vagy részben annak támogatásával 31 teljes szövegű angol nyelvű folyóirat cikk és egy könyvfejezet született. A közlemények összesített impakt faktora 105,49. Emellett 4 PhD dolgozat került megvédésre (Gáspár Tamás, Institóris Ádám, Zimmermann Alíz és Lenti Laura) amelyek egészében vagy részben az OTKA által támogatott kutatáson alapultak.
- A laboratóriumban további 2 PhD hallgató kezdte meg a munkát (Mracskó Éva és Hügyecz Marietta). Az ő védésükre várhatóan 2011-ben kerül sor.
- Emellett 14 tudományos diákköri előadás (mindegyik díjazott volt az intézményi konferencián -1-1 országos 1. és 2. díj, valamint 1 OTDK különdíj). Továbbá talán a legnagyobb eredményként az könyvelhető el, hogy kutatócsoport megtartotta és erősítette pozícióját a nemzetközi mezőnyben a cerebrovaszkuláris kutatások területén.

Az elért tudományos eredmények részletes ismertetése igen hely és időigényes lenne, ezért tételesen ismertetem azokat a legfontosabb megfigyeléseinket, amelyeket publikáltunk, ill. tudományos konferencián ismertettünk.

A krónikus agyi hipoperfúzióknak fontos szerepet tulajdonítanak egyes demencia típusok kialakulásában. Ugyanakkor nem ismert a klinikai tüneteket mérséklő hatékony terápia.

Krónikus agyi hipoperfúziót a két artéria carotis comm. lekötésével (2VO) patkányokban hoztunk létre. A bevált metodikák (magatartás vizsgálatok [Morris water maze teszt], kvantitatív morfológia [immunhisztokémia], laser Doppleres vizsgálat) mellett nagy erőfeszítést tettünk a molekuláris biológiai eszköztárunk fejlesztésére és új módszerek (elektrofiziológia, az a. basillaris *in vivo* intravitális mikroszkópos vizsgálata [„basilar window”], laser speckle módszer) beállítására is. A kísérletek során vizsgáltuk a carotisok lekötését követő első néhány napban (< 2 hét) bekövetkező változásokat, ill. a későbbi hatásokat is (> 6 hónap). Ez a modell széles körben elfogadott, a különböző laboratóriumokból származó eredmények jól összehasonlíthatók. A részletesen tanulmányozott és dokumentált eredményeink az alábbiakban foglalhatók össze:

1. Megvizsgáltuk, rendelkezik-e a leginkább antioxidáns tulajdonságáról ismert  $\alpha$ -tocopherol védő hatással a hipoperfúzió okozta agyi károsodással szemben. Az állatoknak a műtétet megelőző, vagy az azt követő 5 napon keresztül (elő- ill. utókezelés) szójaolajban oldott  $\alpha$ -tocopherolt (100mg/tskg, i.p.) adtunk. Célunk az volt, hogy az elő- és utókezelés hatásait is összehasonlítsuk, azaz adatokat nyerjünk arra vonatkozóan is, hogy a már hipoperfundált agyban van-e az antioxidáns terápiának valamilyen jótékony hatása. Kontrollként áloperált, szójaolajjal kezelt állatokat használtunk. A műtét után egy héttel a hippocampushoz kapcsolódó térbeli tanulást a Morris water maze-ben teszteltük. A magatartási kísérleteket követően HPLC-vel meghatároztuk a perifériás szövetekben és az agyban az  $\alpha$ -tocopherol koncentrációt, immuncitokémiaileg jellemeztük a hippocampusban a mikroglia sejt aktiválódást, valamint krezil ibolya késsel megfestett metszeteken megmértük a CA1 régió str. pyramidale vastagságát. Ez utóbbiból a neuronpusztulás mértékére következtethetünk. Az elő- és utókezelés hasonló eredményeket hozott. Az  $\alpha$ -tocopherol csökkentette a tanulásromlás mértékét, kivédte a CA1 régióban a neuronpusztulást és a mikroglia-aktivációt (0.14% vs. 1.7%, 0.12% vs. 2.7%). Kezelés hatására a májban, a zsírszövetben és a vérben az  $\alpha$ -tocopherol koncentrációja emelkedett, míg az agyban nem változott. Kísérleteink alapján ebben a modellben az  $\alpha$ -tocopherol mind elő-, mind utókezelésben neuroprotektívnek bizonyult. Külön kísérletekben elemeztük az oxidatív stressz mértékét a leköttést követő 1-7 napon. A nitrotyrosin immunhisztokémia és a kvantitatív fehérje meghatározás (Western blot) az oxidatív stressz elfogadott markere. Eredményeink szerint a leköttést követő 2-3 napon a legmarkánsabb az oxidatív stressz, melynek mértékét az E-vitamin kezelés jelentősen csökkenti.

2. Az iszkémia-függő neuronális károsodások kialakulását ciklooxygenáz (COX) enzimek által katalizált biokémiai folyamatok is elősegítik. Célunk volt, hogy megvizsgáljuk a nem-szelektív COX és a szelektív COX-2 gátlás esetleges neuroprotektív hatását agyi hipoperfúziós modellben. A műtét utáni három napon nem-szelektív COX-gátló indometacin (3mg/kg) és COX-2 gátló NS398 (15mg/kg) kezelést alkalmaztunk, i.p. Kontrollként áloperált és kezeletlen állatok szolgáltak (n=24). Egy hét elteltével a hippocampushoz kapcsolódó térbeli tanulást Morris water maze-ben teszteltük, majd immuncitokémiai jelölés után neuronszámolást végeztünk a hippocampus CA1 régiójának piramisesejt rétegében. A túlélést az NS398 (66,67%), szemben az indometacinnal (41,67%) szignifikánsan javította és meggátolta a térbeli tanulási zavar kialakulását is. Emellett az NS398 meggátolta a neuronpusztulást a hippocampus CA1 piramisesejt rétegében. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a hipoperfúzió okozta károsodás kialakulásában elsősorban az COX-2 által katalizált folyamatok játszanak szerepet és az enzim szelektív gátlása jótékony hatású lehet agyi hipoperfúzió esetén.

3. Az ischaemia/ reperfúzió, illetve a krónikus agyi hipoperfúzió által kialakuló oxidatív stressz jelenlétét közvetett markerek (COX-2, iNOS, nNOS, eNOS és MnSOD) segítségével igazoltuk. Ezen markerek kvantitatív analízisét western-blot technikával végeztük. Eredményeink azt mutatják, hogy tranziens leköttetés hatására a COX-2 fehérje expressziója megemelkedik a leköttetések hatására, továbbá ez a változás 1 illetve 3 napos túlélést követően is fennmarad, azonban mértéke csökken. Permanens leköttetés esetén, krónikus agyi hipoperfúzió kiváltásakor is azt tapasztaltuk, hogy a COX-2 enzim expressziója megemelkedik. Az iNOS enzim expressziója ischaemia/reperfúziót követően az 1 és 3 napos túlélések esetén is

csökkent, mind a hippocampusban, mind pedig a cortex mintákban. Krónikus agyi hipoperfúziót követően az 1 és 3 napos túlélések esetén is szignifikánsan csökkent az iNOS expresszió hippocampusban, azonban cortex mintákban jelentős változást nem tapasztaltunk. Az nNOS enzim expressziója hipoperfúziót követően az 1 és 3 napos túlélések esetén is szignifikánsan lecsökkent. E két enzim expressziójának csökkenését a lekötések által okozott neuron pusztulással magyarázzuk. MnSOD esetén, krónikus agyi hipoperfúzió hatására 1 illetve 3 napos túlélést követően sem tapasztaltunk számottevő változást. Vizsgálatainkat kiterjesztettük 1 hét-12 hónapra is (a vizsgálatokat 1-3-6 és 12 hónapos túlélés után végeztük el). Az akut hatásuk eltűnését követően a fehérje expressziók változásai jól korrelálnak a hippocampális neuron pusztulás.

4. Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a mitokondriális ATP-függő K<sup>+</sup> (mitoKATP) csatorna aktivációt okozó diazoxid (DIAZ) neuroprotektív hatású számos ischaemia modellben. Gábrriel Róbert professzor munkacsoportjával végzett kollaborációs kísérleteinkben igazoltuk, hogy a két carotis comm. lekötését követően leírt súlyos retinális károsodások intravitreális DIAZ kezeléssel mérsékelhetők. Rámutattunk arra is, hogy a DIAZ védelmet jelent a retinában a glutamát toxikus hatásai ellen is.

5. Folytattuk korábbi években elkezdett vizsgálatainkat a mitoKATP csatornákra ható vegyületek hatásmechanizmusának területén is, hiszen a DIAZ protektív hatását a 2VO modellben részben farmakológiai prekondicionáló mechanizmussal magyaráztuk. In vitro kísérleteinkben bebizonyítottuk, hogy az anti-anginás szerként használt bepridil (BEP) depolarizálja a mitokondriumokat, fokozza a ROS termelést. Ugyanakkor nem találtunk bizonyítékot a korai prekondicionálásra. Egyidejűleg azonban kimutattuk, hogy a BEP késői prekondicionáló hatása érvényesül oxigén-glükóz megvonásos ischaemia modellben.

6. Módszereink lehetővé tették, hogy részt vegyünk egy kicsit eltérő, de mindenképpen érdeklődésre számot tartó probléma vizsgálatában is. Ismert, hogy a nitrovazodilatátorok emberben fejfájást okoznak, ill. migrént indukálhatnak. Ennek kapcsán patkány modellben vizsgáltuk a szelektív COX-1/-2 gátlásnak a nitroglicerinnel okozott neuronális NOS aktivációra gyakorolt hatását. Eredményeink szerint szelektív COX-2 gátlással meggátolható a n. trigeminalis caudalis magjában a nitroglicerinnel okozott nNOS indukció. Megfigyelésünk újabb adatokkal szolgál a migrén pathomechanizmusára vonatkozóan.

7. Laser Doppleres vizsgálatokkal azt tapasztaltuk, hogy a krónikus agyi hipoperfúzió egy kicsit rontja az agyi autoreguláció dinamikáját, lassul a vérnyomás változások agyi kompenzációja. Modellünkben (a kétoldali permanens carotis comm. lezárását követően) intravitális mikroszkópia segítségével *in vivo* vizsgáltunk arteria basilaris reakcióit különböző stimulusok esetében (vérnyomásváltozás, acetilkolin stb). Azt tapasztaltuk, hogy 1-3 hónapos megfigyelési idő alatt az érválaszok csak kis mértékben tükrözik az a. carotis comm. elzárása után létrejött vaszkuláris átrendeződés hatásait.

8. A kúszó agykérgi depolarizáció (CSD), az öregedés és az agyi hipoperfúzió vizsgálata során azt találtuk, hogy az idős agyban a folyamatosan fenntartott KCl

expozícióval kiváltott CSD-k gyakorisága csökken, ugyanakkor a hipoperfúzió érzékenyebbé teszi az agykérget (megváltozik a CSD-hez kapcsolódó agykérgi perfúziós válaszok dinamikája).

9. Korábbi munkáinkat és a szakirodalmi adatokat áttekintve összefoglaló tanulmányt készítettünk a krónikus agyi hipoperfúzió állatkísérletes modellezéséről. Ezt a tanulmányt a Brain Research Reviews –ben publikáltuk.

10. Módszertárunkat bővítve a krónikus agyi hipoperfúziós modellt beállítottuk egereken. Két genetikailag változtatott egértörzsön végeztünk agyi hipoperfúziós kísérleteket. A hyperlipidemiás, apolipoprotein B-100-at (apoB-100) overexpresszáló egerekben egyoldali carotis comm. okklúzióval hoztunk létre agyi hipoperfúziót. Kvantitatív morfológiai vizsgálataink rámutattak, hogy az apoB-100 túltermelése csökkenti az agyi kapillárisok számát, miközben azok egyedi átmérője nő. Ugyanakkor a genetikailag módosított, zsírdús táplálékon tartott egerek ischemiás károsodása nem különbözött az vad típusú kontrolléktól.

A nemzetközi együttműködésben végzett munka egyik fontos fejezetét a neurovaszkuláris egység (neuron, agyi endothel, glia) farmakológiai prekondicionálásának vizsgálata jelentette.

11. A prekondicionálás során olyan endogén protektív mechanizmusok aktiválódnak, amelyek védelmet jelentenek az egyébként letális behatások ellen. Vizsgálatainkban patkány embrióból származó primér agyi idesejt tenyészeteket, ill. agyi endothel tenyészetet használtunk. A sejtek életképességét oxigén-glükóz depriváció, vagy glutamát, ill. NMDA toxikus dózisainak alkalmazása után vizsgáltuk elsősorban laktát dehidrogenáz esszé segítségével. Ugyanakkor intravitális festékekkel, konfokális lézer mikroszkópia segítségével követtük a membrán, ill. a mitochondrium potenciál változásait, reaktív oxigéngyök termelő képességét, kalcium és energia forgalmát (ATP termelését). A prekondicionálás két különböző formáját, a korai és késő prekondicionálást jellemeztük. Vizsgálataink első sorban a mitoKATP nyitó szerekre irányultak. Ezen in vitro kísérletek rámutattak, hogy még a közös támadáspontúnak tekintett vegyületek is eltérő jelátviteli mechanizmus révén fejtenek ki protektív hatást primér neuron tenyészeteken. A mitoKATP nyitó BMS-191095 prekondicionáló hatásának vizsgálata rámutatott arra, hogy a kataláz expresszió fokozása önmagában elegendő a védőhatás kialakulásához. A kísérleteket megismételtük olyan neuron tenyészeteken is, amelyekben a kataláz gént( Ad5CMVcatalase) adenovirussal vittünk be. Ezekkel a kísérletekkel megerősítettük a prekondicionálás során korábban feltárt és jellemzett védő mechanizmust.

Tanulmányoztuk az elsősorban a plazma membránra ható, szelektív BK(Ca) csatorna agonista NS1619 által kiváltott prekondicionálás mechanizmusát is glutamát neurotoxicitással szemben. Ebben az esetben azt találtuk, hogy a prekondicionáló hatás a szabadgyök termelés gátlásán, az SOD aktivitás szimultán fokozódása mellett jön létre.

Régóta vitatott kérdést válaszoltunk meg azzal, hogy bizonyítottuk, az L-glutamát nem toxikus az agyi endothel sejteken és a glutamáterg agyi vazodilatáció nagy valószínűséggel létrejön az endothel sejtek aktív részvétele nélkül is.

Kimutattuk továbbá, hogy 3 napos rozuvastatin kezeléssel lehet a neuronokat a glutamát toxikus hatásával szemben prekondicionálni.

12. Korábbi OTKA támogatással újszülöttkor hipoxás agyi károsodásokat, agyi érreakciókat vizsgáltunk. Azokat a kísérleteket nem sikerült teljes egészében befejeznünk 2006-ig, ill. bizonyos vizsgálatokat el kellett végeznünk ahhoz is, hogy dr. Domoki Ferenc kollégám abban a témakörben önálló OTKA pályázatot tudjon benyújtani. A malac kísérletekhez szükséges vegyszer, anyag és eszköz költségeket tehát ki kellett egészíteni az ebből a forrásból. Egy kísérletsorozatban az acetazolamid agyi vaszkuláris hatásait jellemeztük malacban. Bebizonyítottuk, hogy az acetazolamid újszülött malacban indomethacin- és ischemia-szenzitív piális arteriola dilatációt okoz. További kísérleteinkben a PACAP agyi vérkeringésre gyakorolt hatását vizsgáltuk részletesen. A fentieknek megfelelően a közleményekben szerepeltettük az OTKA támogatás tényét.

Az utóbbi időben előtérbe került a stroke és a cardiopulmonáris megbetegedések kapcsolatának vizsgálata. Esetleges további kutatási irányként tüdőfunkciós vizsgálatokat is végeztünk, egyetemen belüli kollaborációs partnerekkel. Ebből a munkából is több közlemény született. Egy budapesti klinikus kolléga (dr. Bánfi Andrea) ezen munka alapján készítette el PhD értekezését.

Összegezve: a 4 éves OTKA támogatás lehetővé tette, hogy a pályázatban foglalt feladatok jelentős részét elvégezzük, ill. az alapján eredményesen pályázzunk további OTKA támogatásra.

Segítségével be tudtuk fejezni korábban elkezdett munkákat és új kutatási irányok felé is tudtuk nyitni.