

## SZAKMAI BESZÁMOLÓ

### I. FELADATCSOPORT

Célkitűzéseink:

1. Kísérleteink kitűzött célja az volt, hogy megmutassuk a keringésbe juttatott  $\beta$ -amyloid és  $TNF\alpha$  károsító hatását az agyi vérátáramlásra és az agyi mikroerek ultrasztruktúrájára.
2. Igazolni kívántuk a mások által, a bél mikrokeringésén végzett kísérletek alapján felvetett hipotézist, hogy a  $\beta$ -amyloid mikroereken kiváltott károsító hatását  $TNF\alpha$  felszabadításán keresztül valósítja meg.
3. Végül azonosítani kívántuk a  $TNF\alpha$  mikrovaszkuláris hatásának mediátorát.

A célok megvalósítására alkalmazott módszerek:

1. A  $\beta$ -amyloid és a  $TNF\alpha$  cerebrovaszkuláris hatásainak kimutatására a következő módszereket alkalmaztuk:  
Az agyi vérátáramlás mértékének megállapítására lézer-Doppler áramlásmérést végeztünk. Altatott patkányokon (felnőtt, hím, Wistar, 280-360g) megkanuláltuk a farokartériát, a femorális vénát és az a. carotis communist. A farokartériás kanül segítségével artériás középnyomást mértünk, a vénás kanülön keresztül oldatokat infundáltunk (altató, L-NAME), majd a carotis kanülön át juttattuk be az agyba a  $\beta$ -amyloidot ( $A\beta_{1-42}$ , és a nem toxikus kontroll  $A\beta_{35-25}$ ) és a  $TNF\alpha$ -t (kontroll: fiziológiás sóoldat). A parietális kéreg fölött megnyitottuk a koponyacsontot, majd az agyfelszínre helyeztük a lézer-Doppler mérőfejet.  
Az agykérgi mikroerek ultrasztruktúráját kvantitatív elektronmikroszkópiával értékeltük ki. A műtéti eljárások megegyeztek az agyi vérátáramlás mérésénél alkalmazottakkal. Az anyagok infúzióját követő három időpontban (45 min, 4 h és 8 h elteltével) vettünk agykérgi mintákat, melyeket elektronmikroszkópos feldolgozásra készítettünk elő.
2. Annak megválaszolására, hogy a  $\beta$ -amyloid mikroereken kiváltott károsító hatását  $TNF\alpha$  felszabadításán keresztül valósítja-e meg, összevetettük a  $\beta$ -amyloid és a  $TNF\alpha$  infúziója után kapott eredményeket.
3. Korábbi közlemények alapján feltételeztük, hogy a  $TNF\alpha$  mikrovaszkuláris hatásának egy lehetséges mediátora a nitrogén-monoxid (NO). Annak eldöntésére, hogy az általunk használt modellben az NO-n keresztül fejti-e ki hatását a  $TNF\alpha$ , egy általános nitrogén-monoxid szintáz (NOS) gátlót, az L-NAME-et használtuk a fentebb leírt állatmodellben.

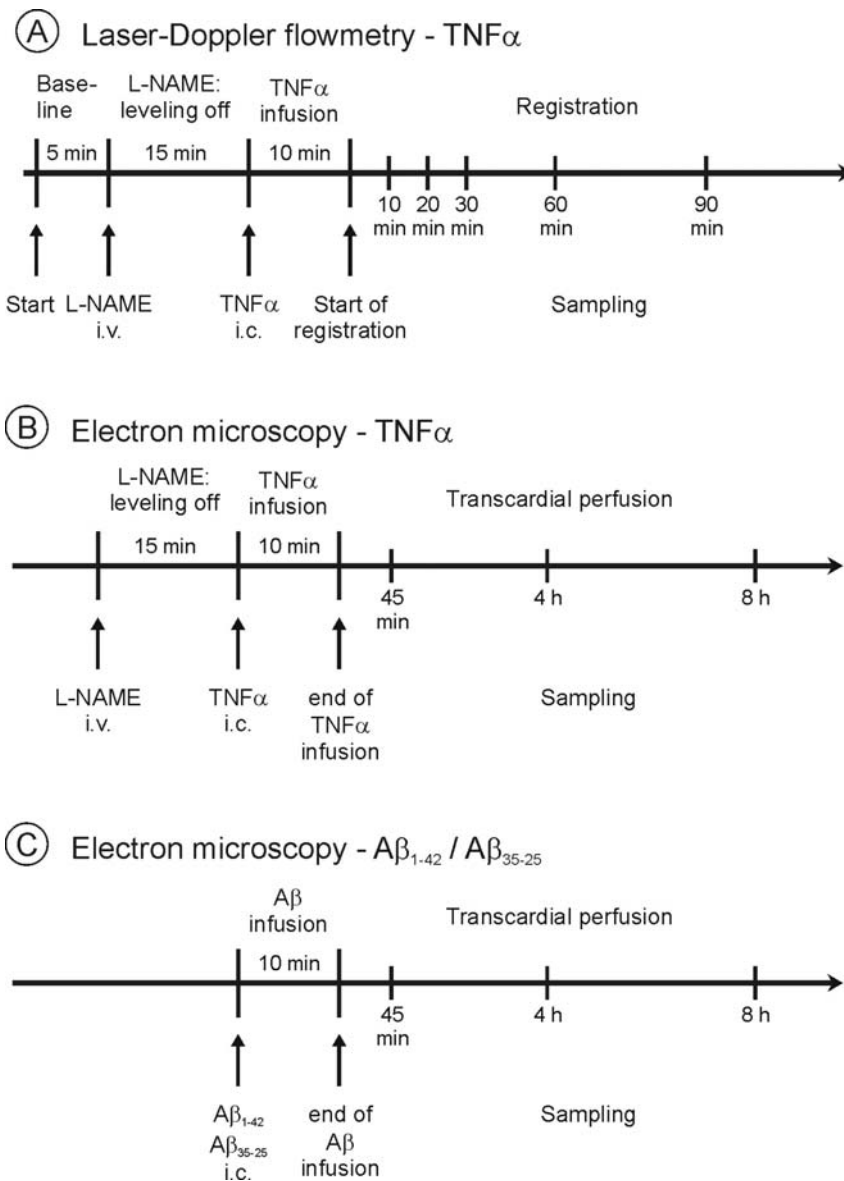
Kísérleti csoportjainkat az 1. táblázat mutatja be. A kísérleti protokollokat az 1. ábra foglalja össze.

**1. táblázat.** Kísérleti csoportok és állatszámok.

Laser-Doppler flowmetry:				
survival time	saline	L-NAME + saline	$TNF\alpha$	L-NAME + $TNF\alpha$
90 min	5	5	5	5

Electron microscopy:						
survival time	saline	L-NAME + saline	$TNF\alpha$	L-NAME + $TNF\alpha$	$A\beta(35-25)$	$A\beta(1-42)$
45 min	5	5	5	5	5	5
4 h		5	5	5		5
8 h		5	5	5		5

**1. ábra. A kísérleti protokollok grafikus összefoglalása.** A: Lézer-Doppleres áramlásmérés. B: Elektronmikroszkópia  $\text{TNF}\alpha$  és L-NAME adását követően. C: Elektronmikroszkópia  $\beta$ -amyloid adását követően.



## Eredmények:

Az agyi vérátáramlásra a  $\beta$ -amyloid nem volt hatással, míg a  $\text{TNF}\alpha$  jelentős mértékben növelte azt (2. ábra). A  $\text{TNF}\alpha$  hatására létrejövő agyi vérátáramlás-növekedés az infúziót követő 30 perccel vált szignifikánssá, csúcsertékét (az alapérték kétszeresét) 60 perccel az infúzió után érte el. A NOS gátló L-NAME teljes mértékben kivédte a  $\text{TNF}\alpha$  agyi keringésre gyakorolt hatását.

Az agyi vérátáramlás változásait nem követte vérnyomásváltozás.

**2. ábra.** A  $\text{TNF}\alpha$  és az L-NAME hatása az agyi vérátáramlásra.

Szignifikancia-értékek:

$p < 0.05$ .

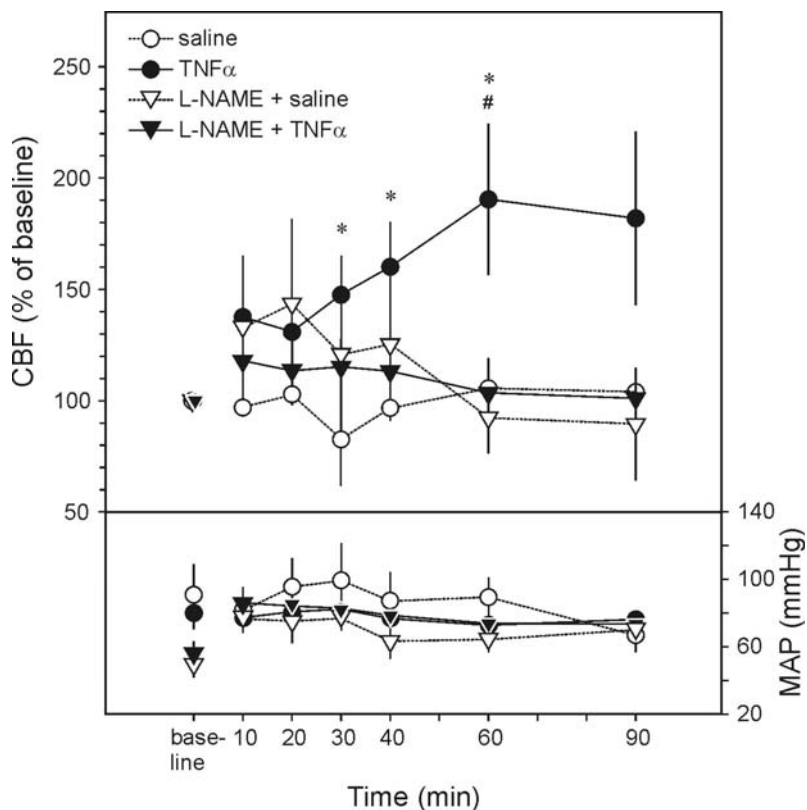
\*:  $\text{TNF}\alpha$  vs. saline

#: L-NAME +  $\text{TNF}\alpha$  vs.  $\text{TNF}\alpha$

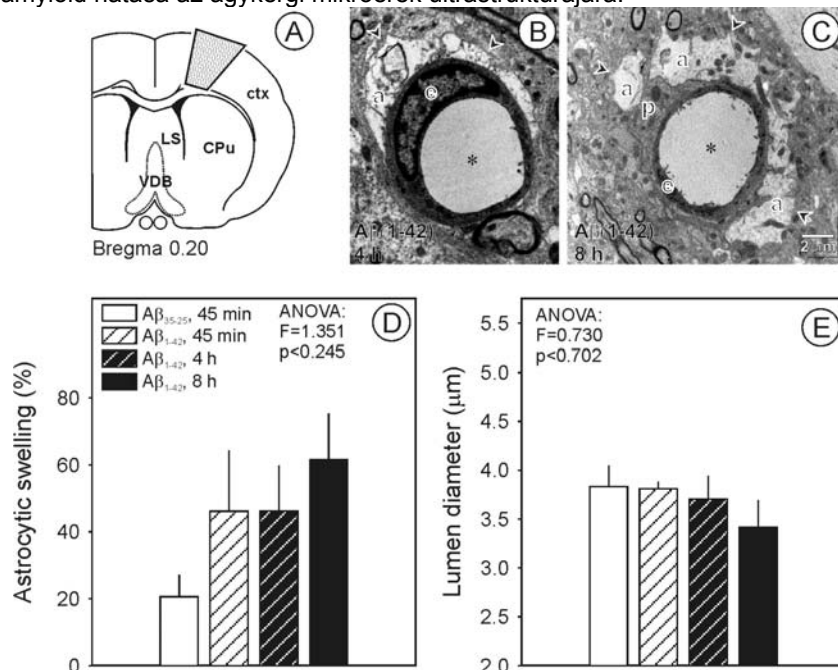
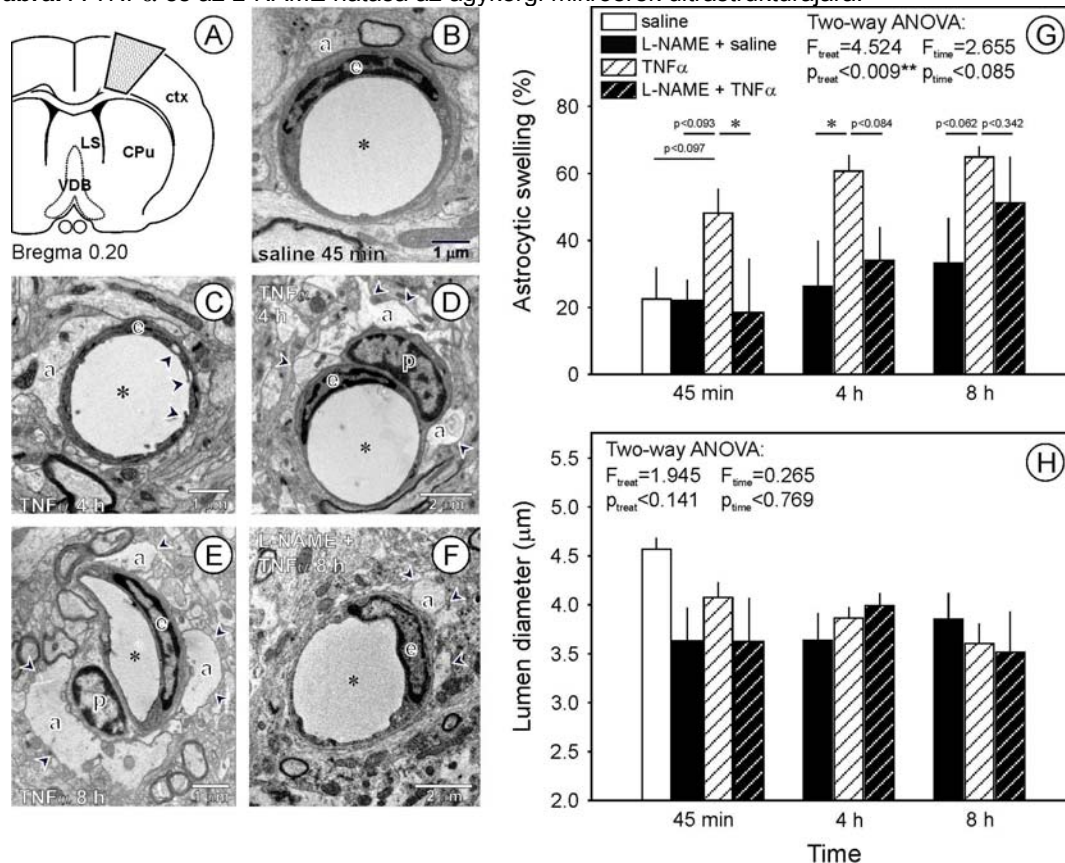
Rövidítések:

CBF: agyi vérátáramlás

MAP: artériás középnyomás



Az agykérgi mikroereken számos elváltozás volt megfigyelhető. A  $\beta$ -amyloid és a  $\text{TNF}\alpha$  is növelte az endothélszövetek lumen felületén megjelenő nyúlványok előfordulási gyakoriságát (3C és 4C ábra). A kapillárisok lumenének átmérője mindkét kezelés esetében tendenciózusan csökkent (3E és 4H ábra). A mikroereket körülölelő asztrocyta-végtalp duzzadásának gyakorisága  $\beta$ -amyloid adását követően kevéssé, míg  $\text{TNF}\alpha$  infúziója után jelentősen nőtt (3B, C, D és 4D, E, G ábra). A  $\text{TNF}\alpha$ -val együtt alkalmazott L-NAME kezelés kivédte az asztrocyta-végtalp duzzadását (4F és 4G ábra).

3. ábra. A  $\beta$ -amyloid hatása az agykérgi mikroerek ultrastruktúrájára.4. ábra. A  $\text{TNF}\alpha$  és az L-NAME hatása az agykérgi mikroerek ultrastruktúrájára.

Szignifikancia-értékek:  $p < 0.05$ . Rövidítések: \*: kapillárlumen, a: asztrocyta-végtalp, CPu: putamen, ctx: cortex, e: endothélsajt, LS: laterális septum, p: pericyta, VDB: ventrális harántköteg, nyílhegyek: pathológias elváltozások.

Következtetések (a célkitűzéseknek megfelelően):

1. Eredményeink szerint elsősorban a  $TNF\alpha$  infúziója vezetett cerebrovaszkuláris reakciókhoz, amelyek az agyi vérátáramlás növekedésében, és az agyi mikroerek patológiás elváltozásában mutatkoztak meg. A  $TNF\alpha$ -val szemben, a  $\beta$ -amyloid nem változtatta meg az agyi vérátáramlást, és az agyi kapillárisokat is csak kis, nem szignifikáns mértékben károsította.
2. A  $\beta$ -amyloid és a  $TNF\alpha$  infúziója révén nyert adatsorokat összehasonlítva azt állapíthatjuk meg, hogy a  $\beta$ -amyloid agyi vérátáramlásra és kapilláris ultrastruktúrára kifejtett hatása csekély a  $TNF\alpha$  okozta károsodáshoz képest. Ezek a megfigyelések nem egyeznek azon korábbi adatokkal, mely szerint a  $\beta$ -amyloid és  $TNF\alpha$  az általunk is alkalmazott koncentrációkban megnyitja a vér-agy gátat. Ezek alapján a következő megállapításokat tehetjük:
  - a. A  $\beta$ -amyloid a vér-agy gát megnyitását nem kizárólagosan  $TNF\alpha$  termelésén keresztül éri el, illetve a  $\beta$ -amyloid és a  $TNF\alpha$  mások által leírt vér-agy gát megnyitó hatásainak különböző mediátorai lehetnek.
  - b. Ha a  $\beta$ -amyloid  $TNF\alpha$ -t szabadít fel, annak mennyisége nem elegendő az agyi vérátáramlás növeléséhez és a mikroerek ultrastruktúrájának patológiás elváltozásához.
3. A  $TNF\alpha$  hatásmechanizmusát tovább vizsgálva megállapítható, hogy a  $TNF\alpha$  az agyi vérátáramlás növelését és az agykérgi mikroerek sérülését részben NO felszabadítása révén éri el, bár más mediátorok (pl. prosztanoidok) szerepe nem kizárt.

## II. FELADATCSOPORT

Második kísérletsorozatunk elképzelései az eredeti kísérleti tervekben nem szerepeltek, de mivel előkísérleteink nagyon ígéretesek voltak, az I. feladatcsoporttal párhuzamosan ezt a munkát is elvégeztük. A munka eredményei tömören az alábbiakban foglalhatók össze.

Célkitűzések:

Öregedés és Alzheimer-kór során krónikus agyi hipoperfúzió alakul ki, amely hozzájárulhat az idegsejtek sérüléséhez és a fellépő neurodegenerációs folyamatokhoz. Kísérleteink célja az volt, hogy a krónikus agyi hipoperfúzió egy állatmodelljében (tartós, kétoldali a. carotis communis lekötés patkányban, 2VO) potenciálisan neuroprotektív szerek hatását jellemezzük.

Módszerek:

Állatmodell: felnőtt, hím, Wistar patkányokon (280-350g) tartós, kétoldali a. carotis communis lekötést végeztünk; kontrollként áloperált állatokat használtunk.

Kezelések: négy anyag hatását vizsgáltuk (kontrollként mindig az oldószer szolgált):

1. diazoxid: mitochondriális, ATP-függő  $K^+$ -csatorna nyitó, 0.5 mg/kg i.p.
2.  $\alpha$ -tocopherol: zsírban oldódó antioxidáns, 100 mg/kg i.p.
3. indomethacin: nem-szelektív ciklooxygenáz enzim (COX) gátló, 3 mg/kg i.p.
4. NS-398: szelektív COX-gátló, 10 mg/kg i.p.

A kezeléseket közvetlenül a 2VO műtéti eljárás előtt vagy után, egymást követő napokon ismételve végeztük. A kezelések ütemezését a 2. táblázat mutatja be.

Tanulási teszt: Morris vízi útvesztő, 1 héttel a 2VO műtét után

Szövetteni vizsgálatok, 2 héttel a 2VO műtét után:

1. neuronpusztulás: Nissl-festés
2. dendritdegeneráció: MAP-2 (microtubule-associated protein-2) immuncitokémia
3. asztrocita-proliferáció: GFAP (glial fibrillary acidic protein) immuncitokémia
4. mikroglia-aktiváció: OX-42 (CD11b sejt felszíni marker) immuncitokémia

**2. táblázat.** Kezelési protokollok krónikus agyi hipoperfúzióban, patkányban.

vegyületek	előkezelés	utókezelés
diazoxid	5 x 0.5 mg/kg	5 x 0.5 mg/kg
$\alpha$ -tocopherol	5 x 100 mg/kg	5 x 100 mg/kg
indomethacin		3 x 3 mg/kg
NS-398		3 x 10 mg/kg

Eredmények:

A kezelések hatásait a 3. táblázat foglalja össze. A táblázatból kitűnik, hogy az  $\alpha$ -tocopherollal végzett kezelések bizonyultak a leghatásosabbnak. Az elő- és utókezelés közül az utókezelés eredményezte a legszembetűnőbb neuroprotektívot.

Kísérleteink pontos dokumentálását megjelent vagy közlésre elküldött közleményeink tartalmazzák:

1. Farkas, E., Instítóris, Á., Domoki, F., Mihály, A., Luiten, P.G.M. and Bari, F. (2004) Diazoxide and dimethyl sulphoxide prevent cerebral hypoperfusion-related learning dysfunction and brain damage after carotid artery occlusion. *Brain Res.*, **1008(2)**, 252-258.
2. Farkas, E., Annaházi, A., Instítóris, Á., Mihály, A., Luiten, P.G.M., Bari, F. (2005) Diazoxide and dimethyl sulphoxide alleviate experimental cerebral hypoperfusion-induced white matter injury in the rat brain. *Neurosci. Lett.*, **373(3)**, 195-199.
3. Farkas, E., Timmer, N.M., Domoki, F., Mihály, A., Luiten, P.G.M., Bari, F. (2005) Post-ischemic administration of diazoxide attenuates long-term microglial activation in the rat brain after permanent carotid artery occlusion. *Neurosci. Lett.*, **387(3)**, 168-172.
4. Farkas, E., Domoki, F., Instítóris, Á., Annaházi, A., Busija, D.W., Bari, F. (2006) Neuroprotection by diazoxide in animal models for cerebrovascular disorders. *Vasc. Dis. Prev.*, **3(3)**, 253-264.
5. Farkas, E., Instítóris, Domoki, F., Mihály, A., Bari, F. (2006) The effect of pre- and post-treatment with diazoxide on the early phase of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res.*, **1087(1)**, 168-174.
6. Farkas, E., Luiten, P.G.M., Bari, F. (2007) Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.*, in press.
7. Annaházi, A., Mracsó, É., Süle, Z., Karg, E., Penke, B., Bari, F., Farkas, E. (2007) Pretreatment and post-treatment with  $\alpha$ -tocopherol attenuates hippocampal neuronal damage in experimental cerebral hypoperfusion. *Eur. J. Pharmacol.*, submitted.
8. Instítóris, Á., Farkas, E., Berczi, S., Süle, Z., Bari, F. (2007) Post-treatment with selective and non-selective cyclooxygenase inhibitors in experimental cerebral hypoperfusion. *Life Sci.*, submitted.

**3. táblázat.** A kezelések hatékonyságának összefoglalása krónikus agyi hipoperfúzióban, patkányban.

kezelések	diazoxid		$\alpha$ -tocopherol		COX-gátlók	
	elő	utó	elő	utó	indo-methacin	NS-398
Morris vízi útvesztő	+	-	+	+	±	+
hippocampus CA1 piramissejt-pusztulás	+	nincs adat	+	+	+	+
hippocampus CA3 dendritpusztulás	nincs adat	nincs adat	-	+	-	-
hippocampus CA1 mikroglia-aktivitás	-	-	+	+	-	-

Következtetések:

Eredményeink alapján elmondható, hogy az antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező  $\alpha$ -tocopherol a leghatásosabb az alkalmazott krónikus agyi hipoperfúziós állatmodellben. Az  $\alpha$ -tocopherol feltételezhetően szabadgyökfogó tulajdonságai révén eredményezett neuroprotekción.

A diazoxid elsősorban előkezelésként bizonyult hatásosnak, melyet alátámaszt a vegyület farmakológiai prekondicionáló tulajdonsága, amelyet cardiovascularis és agyi ischémiában írtak le.

A COX-gátlók védő hatása, amelyet a prosztaglandin E2 csökkent termelésének tulajdonítanak, elsősorban a COX-2 inhibitor (NS-398) adása után jelentkezik, amely összeeseng kísérletes stroke-ra vonatkozó irodalmi adatokkal. Mindemellett a COX-gátlók hatása ellentmondásos, amely tükröződik a dendritek sérülésében a COX-gátlók adását követően. Ennek magyarázata abban keresendő, hogy a COX-2 enzim gátlása a prosztaglandin E2 mellett olyan prosztanoidok termelését is csökkentheti, amelyek pl. vazodilatációs jelentőséggel bírnak.

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy kísérletes agyi hipoperfúzióban az oxidatív stressz csökkentése a legcélravezetőbb neuroprotektív stratégia.