

Szakmai beszámoló az F043101sz ifjúsági OTKA pályázathoz

Az elégtelen agyi vér és oxigénellátás által létrehozott neuronális károsodás mechanizmusainak megismerése és a különböző intervenciós lehetőségek kutatása újszülöttkorban is kiemelt fontosságú feladat. Hazánkban évente mintegy 300, világszerte pedig mintegy 2 millió újszülöttet érint a perinatális hipoxiás állapotok talaján kifejlődő maradandó idegrendszeri károsodás. Megállapíthatjuk, hogy a hipoxiás inzultust követő idegrendszeri károsodások kialakulásának csökkentése, vagy megakadályozása a neonatológia egyik legnagyobb kihívása.

Az utóbbi évtizedben reneszánszát éli a mitokondriumok kutatása. A terminális oxidáció ill. a változatos metabolikus reakcióutak mellett a mitokondriumok sejtszintű adaptációban, ill. a sejthalál aktív kezdeményezésében betöltött szerepe is nyilvánvalóvá vált. Csak az utóbbi években kezdődött meg az intracelluláris membránokban található ioncsatornák molekuláris biológiai és farmakológiai jellemzése. Közülük az egyik legfontosabb minden bizonnyal a mitokondrium belső membránjában található K_{ATP} (mito K_{ATP}), mert igen fontos szerepet játszik a sejtek hipoxia tűrőképességében. Valóban, a mito K_{ATP} nyitók, mint pl. a diazoxid markáns neuroprotektív hatást fejt ki neonatális és felnőtt állatkísérletes stroke modellben.

A diazoxid központi idegrendszeri funkcióra kifejtett jótékony hatását először a pályázó írta le, mikor az Amerikai Egyesült Államokban, a Wake Forest University School of Medicine Élettani és Gyógyszertani Intézetében (Winston-Salem, Észak-Karolina), Dr. David W. Busija professzor laboratóriumában dolgozott. A mito K_{ATP} -t aktiváló lokális diazoxid előkezelés a nem-szelektív K_{ATP} nyitó aprikalimhoz hasonlóan megakadályozza az NMDA-val kiváltott neuronális-vaszkuláris csatolás károsodását iszkémia/reperfúzió (I/R) után, újszülött malacban. A diazoxid mito K_{ATP} -re gyakorolt szelektív dózis-függő protektív hatását alátámasztja, hogy 1) a diazoxid szemben az aprikalimmal nem hoz létre számottevő vazodilatációt, 2) szelektív antagonistája az 5-hidroxi-dekanoát (5HD) meggátolja a szer protektív hatását, és végül 3) az 5HD az alkalmazott koncentrációban nem gátolja az aprikalim vazodilatátor hatását.

A diazoxid által kifejtett neuroprotektív hatás jobb megismerését célzó kutatást, valamint a diazoxid hatásához kapcsolódó élettani folyamatok mechanizmusának kutatását (újszülöttkori agyi vérellátás alapmechanizmusai, az agyi iszkémia által létrehozott neuronális-vaszkuláris károsodás) a témavezető az F043101sz. OTKA pályázati periódus alatt

a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Élettani Intézetében Dr. Bari Ferenc egyetemi tanár cerebrovaszkuláris laboratóriumában kis munkacsoport vezetőjeként végezte.

Kutatási eredményeink:

1. Az MTA SZBK Biofizikai Intézetében Dr. Siklós László vezetésével kidolgozott elektronmikroszkópos kvantitatív hisztokémiai módszerrel először jellemeztük az iszkémia/reperfúzió-ra (I/R) különösen érzékeny hippocampus CA1 régió piramisneuronjaiban a mitokondriális Ca^{2+} szint alakulását I/R után újszülött malacban. Tíz perc globális iszkémia után a neuronális mitokondriumok a maximális duzzadást és Ca^{2+} akkumulációt a reperfúzió 15-dik percében mutatták. Ebben az időpontban szisztémásan adott diazoxid előkezelés markánsan csökkenti globális I/R után a mitokondriumok duzzadását és Ca^{2+} felhalmozását. A $mitoK_{ATP}$ antagonistá 5HD nem csökkentette a diazoxid mitokondrium-duzzadást mérséklő hatását, de lényegében kivédte a diazoxid mitokondriális Ca^{2+} akkumulációt mérséklő hatását. Kutatócsoportunk eredményei az elsők, amelyek bizonyították, hogy a neuroprotektív dózisú szisztémásan adott diazoxid képes hatást kifejteni az idegsejtek mitokondriumaira *in vivo*.
2. A diazoxid direkt, neuronális hatásmechanizmusán túl feltételeztük, hogy a diazoxid indirekt is fejthet ki neuroprotektív hatást az ún. iszkémia-vulnerábilis érreakciók védelmén keresztül. Megvizsgáltuk tehát a diazoxid előkezelés hatását egyes I/R által károsított érreakciókra. Azt tapasztaltuk, hogy az endothélium függő, hiperkapniával kiváltott vazodilatáció károsodását a diazoxid jelentősen mérsékli, míg a direkt simaizomingerlő prosztaciklinnel kiváltott vazodilatáció károsodását nem befolyásolja. A diazoxid hatását feltehetően az endothelialis mitokondriumokban található $mitoK_{ATP}$ aktiválásával fejtette ki, mert malac agyi endothelium kultúrában a diazoxid depolarizálta a mitokondriumokat, és *in vivo* az 5HD a protektív hatást antagonizálta. A diazoxid hatását nem magyarázhatja a direkt neuroprotektív hatás, mert ellentétben a diazoxiddal a ciklooxygenáz (COX)-2 inhibitor, szintén neuroprotektív hatású NS-398 nem védte ki a hiperkapniával kiváltott vazodilatációt I/R után.
3. Az agyi rezisztenciaerek sajátos tulajdonsága nagyfokú szén-dioxid érzékenységük. Mindazonáltal az agyi kiserek ez alapvető fiziológiai jellemzőjének sejt szintű mechanizmusa nem ismert. A 2. pontban részletezett eredményeink interpretációját nehezítette, hogy a korábbi adatok szerint a COX gátlónak önmagában gátolnia kellett volna a hiperkapnia vazodilatátor hatását, amit mi nem tapasztaltunk. Ezért megvizsgáltuk 5 strukturálisan különböző COX gátló hatását, és azt találtuk, hogy csak az indomethacin

gátolja ezt az érválaszt, mégpedig függetlenül a COX gátló hatásától. A diazoxid vaszkuláris-endothelialis protektív hatásának megértéséhez ezért szükséges a fiziológiai alapjelenségek mechanizmusának pontosabb megismerése is.

4. A diazoxid korábbi vizsgálataink alapján kivédi az NMDA-val kiváltott vazodilatáció azaz a neuronális-vaszkuláris csatolás egyik mechanizmusának károsodását. Azonban más neuroprotektív mechanizmusok is közrejátszhatnak a diazoxid hatásában. Megvizsgáltuk tehát a neuroprotektív hatású, a triptofán metabolizmusa során keletkező kinurénsav hatását. Eredményeink szerint a kinurénsavszint emelkedése nem lehet oka a neuronális vaszkuláris csatolás megőrzésében, sőt a kinurénsav a glutamáterg neuronális vaszkuláris csatolásra direkt gátló hatást fejt ki.
5. Jellemezni kívántuk a hipoxiás periódust (iszkémiát vagy aszfixiát) követő reoxigenizáció során keletkező ROS termelés változásait hipoxiás malacmodellben, hogy megvizsgálhassuk a diazoxid és a COX-gátlók szerepét. A különböző ROS fajták közös sajátossága rövid féléletidejük, és az ebből fakadó mérés technikai nehézségek. Ezért az oxidatív stressz jellemzését az újszülött agyban több módszerrel igyekeztünk elvégezni. Sajnos egyik módszerrel sem tudtunk konzisztensen a ROS termelés növekedését kimutatni a reoxigenizáció akut szakában. A következő kísérleteket végeztük:
 - a) A szuperoxid anion szemikvantitatív meghatározását, *ex vivo* lucigenin kemilumineszcenciás módszerrel végeztük. Tíz perces aszfixiát hoztunk létre a lélegeztetés felfüggesztésével. Az agyban létrejövő metabolikus katasztrófa (hipoxia, hiperkapnia, acidózis) jól tükrözi a humán perinatalis viszonyokat. Megállapítottuk, hogy a kontroll állatokból vett mintákban, *ex vivo* termelődő szuperoxid anion mennyisége 10 perc asphyxia és 5 perc reventilláció után felére csökken (!) a normoxiás körülmények között vett mintákhoz viszonyítva. Az újraélesztést követő 30 perc után a csökkenés már nem volt kimutatható.
 - b) A peroxinitrit gyök mérését szintén az aszfixia/reventillációs periódus alatt gyűjtött mesterséges liquor cerebrospinalis-ból, a peroxinitrit hatására keletkező nitrotirozin koncentráció ELISA-val történő meghatározásával kívántuk meghatározni. Az általunk gyűjtött liquor/agymintákban azonban a nitrotirozin szint nem érte el a detektálási küszöböt. A peroxinitrit termelés meghatározására új kísérleteket terveztünk, melyben szövetmintákból a nitrált fehérjék immunoblot kimutatását kíséreltük meg ún. dot-blot technikával. Ezzel a kísérlettel ki tudtunk mutatni nitrált fehérjéket, melyek peroxinitrit képződésre utalnak, azonban nem tapasztaltunk különbséget az időkontroll és az aszfixián átesett állatok mintái között.

c) A ROS-hatás eredményeként létrejövő lipid peroxidációt az OxyStat kolorimetriás esszé segítségével is igyekeztünk kvantitatívan meghatározni agyhomogenizátumban, azonban itt sem találtunk lényeges különbséget a hipoxiás/iszkémiás és a normoxiás állatok mintái között még négy órával az aszfixia után sem.

6. A ROS termelés fokozása és hatásának megismerése céljából új kísérleteket terveztünk. Tíz perc aszfixia után az állatokat levegővel vagy 100% oxigénnel lélegeztettük egy órán keresztül, majd még három órán át levegővel folytatjuk a lélegeztetést. Az állatok agyát egyrészt fénymikroszkópos neuropatológiai elemzésre fixáltuk, másrészt pedig fagyasztott mintákat vettünk biokémiai/molekuláris biológiai elemzésre. Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy az újszülött agyban a különböző régiók differenciáltan viselkednek, neuropatológiai vizsgálatokkal tetten érhető oxigén-toxicitást a kisagy és a hippocampus területén tapasztaltunk. Ezzel szemben a nagyagykéregben a morfológiai károsodás hasonló volt mindkét csoportban. Csak a bazális ganglionok területén tapasztaltunk az oxigénlélegeztetés enyhe jótékony hatását. Az elvégzett biokémiai vizsgálatok azonban nem tükrözték ezeket a különbségeket, sem az agyi glutationszintben, sem pedig a lipidperoxidációt jelző malondialdehid koncentrációban nem tudtunk lényeges különbségeket kimutatni. Viszont lézer-Doppler áramlásmérővel végzett méréseink arra utalnak, hogy a cerebellumban, ahol kimutatható volt oxigéntoxicitás, ott jelentősen nagyobb reaktív hiperémia játszódik le az aszfixiás periódus után a nagyagykéreggel összehasonlítva, ahol oxigéntoxicitást nem tudtunk kimutatni.

Kísérleti eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a diazoxid mind a neuronok mind a vaszkuláris endothelium mitokondriumain fejt ki hatását, jórészt a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ aktivációján keresztül. A diazoxid neuroprotektív hatásában tehát mind direkt neuronális mechanizmusok, mind indirekt, az idegszövet integritásáért felelős sejtek – pd. A cerebrovaszkuláris endothelium is szerepet játszhat.

A fent részletezett eredményeket (az 5. pontban leírt negatív eredmények kivételével) 5 elfogadott *in extenso* közleményben ($\Sigma\text{IF}=12.33$), egy magyar nyelvű összefoglaló közleményben valamint számos hazai és nemzetközi konferencia prezentációban számoltunk be. Ezek a publikációk fontos szerepet játszanak Nagy Krisztina és Dr. Zimmermann Alíz Ph. D. hallgatók doktori fokozatszerzése szempontjából is. Fontosnak tartom megemlíteni, hogy az SZTE ÁOK Élettani Intézetben folyó kísérletes munka számos orvostanhallgató részére

biztosított lehetőséget tudományos diákköri munka végzésére, a pályázati kutatások eredményeiből 7 TDK konferencia előadás és 3 szakdolgozat is született.

Kérem az OTKA szakzsüri, hogy szakmai beszámolómat elfogadni szíveskedjen.

Szeged, 2006 február 28.

Tisztelettel:

Dr. Domoki Ferenc
Egyetemi adjunktus
Témavezető