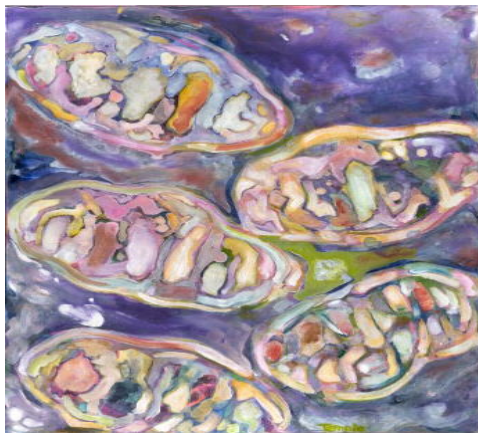


A MITOCHONDRIÁLIS ATP-SZENZITÍV K^+ CSATORNÁK SZEREPE A
FARMAKOLÓGIAI PREKONDITIONÁLÁSSAL KIALAKÍTOTT
NEUROPROTEKCIÓBAN

Ph.D. értekezés tézisei

Nagy Krisztina



Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvos-és Gyógyszerésztudományi Centrum
Általános Orvostudományi Kar
Élettani Intézet

2006
Szeged

Rövidítések jegyzéke

5-HD: 5-hidroxi-decanoát

3-NPA: 3-nitropropionsav

AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionsav

DIAZ: diazoxid

HET: hidroetidin

I/R: iszkémia/reperfúzió

mCSF: mesterséges cerebrospinális folyadék

NMDA: N-metil-D-aszpartát

OGD: oxigén-glükóz depriváció

ROS: reaktív oxigén speciesz

SDH: szukcinát-dehidrogenáz

SOD: szuperoxid-dizmutáz

TMRE: tetrametilrodamin-etil-észter

$\Delta\Psi_m$: membránpotenciál

Bevezetés

A fejlett országokban a stroke a vezető halálokok közé tartozik. A kedvezőtlen mortalitási mutatók mellett további problémát jelent, hogy az átmeneti vagy tartós vérellátási zavarok következtében kialakuló neurológiai és pszichiátriai betegségek hatalmas terheket rónak a társadalomra, a betegellátó rendszerekre és a családokra. Ezért nagyon fontos lenne olyan terápiák kifejlesztése, amelyek hatékonyan tudják csökkenteni a stroke következtében kialakuló agyi károsodásokat. Manapság az egyik legígéretesebb stratégiának a farmakológiai prekondicionálással kialakított iszkémiás tolerancia tűnik. Az alkalmazott farmakonok hasonló folyamatokat indukálnak, mint amilyenek rövid iszkémiás inzultusok hatására keletkeznek az agyban, így a neuronális szövetet ellenállóvá tudják tenni egy későbbi, egyébként letális stresszel szemben.

A prekondicionáló hatást kiváltó vegyületek közül az egyik leginkább kutatott a mitochondriális ATP szenzitív K^+ (mitoK_{ATP}) csatornákon ható diazoxid (DIAZ). A szer hatásmechanizmusa még nem teljesen tisztázott, de már több részletét ismerjük. A DIAZ egy chlorothiazid származék, amely többek között a mitoK_{ATP} csatornákat nyitja és feltehetőleg ez az út is szerepet játszik a védettség kialakításában. Ezt a megállapítást alátámasztja, hogy a mitochondriális K^+ csatorna-blokkoló 5-hidroxidekanoát (5-HD) gátolni képes a protektív hatást. Azonban a 5-HD főleg *in vivo* kísérletekben és a védelem akut fázisában hatásos, ami azt feltételezi, hogy a DIAZ-nak a mitoK_{ATP} csatornák mellett egyéb célpontjai is vannak a protektív hatás kialakítása során. Több mint 30 éve ismert, hogy a K^+ csatornákon kifejtett hatásán túl a DIAZ gátolja a szukcinát-dehidrogenáz (SDH) aktivitását is, aminek következtében a citromsav ciklus gátlódik és a mitochondriális flavoproteinek oxidálódnak. Feltételezhető tehát, hogy a DIAZ a SDH gátlásán keresztül is képes védelmet kialakítani. Ezt az utat látszik megerősíteni, hogy a specifikus SDH blokkoló 3-nitropropionsavnak (3-NPA) is neuroprotektív hatásáról számoltak be. Feltehetően mindkét mechanizmusnak fontos szerepe van, de lehetséges, hogy amíg a mitoK_{ATP} csatorna nyitása egy köztes lépés a prekondicionálás felé, addig a szabadgyökök közvetítésén keresztül zajló folyamat lehet a végső fázis. Új fejlesztésű vegyület a szintén mitoK_{ATP} csatorna-nyitó BMS-191095,

amely a legutóbbi irodalmi adatok szerint kisebb dózisban nagyobb neuroprotektív hatást képes előidézni, mint a DIAZ.

Célkitűzések

Kísérleteink célja az volt, hogy a farmakológiai prekondicionálás kialakítása során gyakran alkalmazott $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ csatorna nyitók hatásmechanizmusát széles körben megvizsgáljuk. Ezért *in vivo* és *in vitro* modelleken is végeztünk vizsgálatokat. *In vivo* kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy

1. a DIAZ-nak van-e hatása a posztisztkémiás mitochondriális duzzadásra, valamint a Ca^{2+} akkumulációra,

2. az iszkémia/reperfúziót (I/R) megelőző DIAZ kezelés képes-e megőrizni az endothélium-függő, hiperkapniával kiváltott piális arteriolák vazodilatációját, és a hatás vajon kivédhető-e a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ csatorna-blokkoló 5-HD-vel, újszülött malacokban.

In vitro kísérleteinkben az vizsgáltuk, hogy

1. a DIAZ-nak van-e közvetlen hatása a cerebrovaszkuláris endothél sejtek mitochondriumain újszülött malacból nyert sejt kultúrán,

2. a DIAZ előkezelés képes-e megvédeni a kortikális neuronokat oxigén-glükóz depriváció (OGD) vagy glutamát behatással szemben patkány idegsejt tenyészetén és a hatás blokkolható-e 5-HD-vel, szuperoxid dizmutázzal (SOD) vagy esetleg protein kináz gátlókkal.

3. az új-fejlesztésű BMS-191095, amely szintén szelektíven nyitja a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ csatornákat, vajon képes-e a DIAZ-hoz hasonló protekciót létrehozni patkányból nyert kortikális neuron tenyészetén OGD vagy glutamát behatás ellen.

Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok

In vivo kísérleteinket altatott, szobalevegővel lélegeztetett újszülött malacokon végeztük. A kísérletek alatt az artériás középnyomást, az artériás vérgáz paramétereiket és a rektális hőmérsékletet fiziológiás értéktartományban tartottuk. A bal parietális csonton kör alakú kraniotómiát végeztünk, majd a dura matert felmetszve a koponyacsontba 17 mm átmérőjű rozsdamentes acél koponya-ablakot helyeztünk, amelynek közepébe kör alakú fedőlemezt rögzítettünk. Az agykéreg felszíne és az agyi ablak által határolt terület mesterséges cerebrospinális folyadékkal (mCSF) töltöttük fel, így a kéreg felszínén elhelyezkedő pia arteriolákat fiziológiás körülmények között figyelhettük meg. Intravitális mikroszkópia során a pia arteriolákat a mikroszkóphoz kapcsolt videokamera segítségével tévémonitoron jelenítettük meg, majd video-mikrométer segítségével folyamatosan mértük az érátmérő változásait.

Az *in vitro* kísérletekhez 18 napos Wistar patkány embriók kortexét használtuk. A kortex darabokat diszpáz I enzimmel inkubáltuk, majd az emésztés után poly-D-lizinnel bevont fedőlemezekre (2×10^5 sejt/cm²), illetve 96 lyukú tenyésztőlemezen (10^6 sejt/cm²) sejttenyészeteket készítettünk. A tenyészeteket Neurobasal mediumban tartottuk, amelyet minden harmadik napon cseréltünk. Kísérleteinket 7-9 napos kultúrákon végeztük, amikor a sejtek már expresszálnak N-metil-D-aszpartát (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionsav (AMPA), valamint kainát receptorokat.

Globális agyi (I/R)

A globális agyi iszkémia kialakításához a bal frontális koponyacsonton keresztül a szubarachnoidális térbe 3 mm átmérőjű szondát vezetünk be, amelyen keresztül mCSF infúziójával az intrakraniális nyomást az artériás vérnyomás fölé emeltük. Korábbi kvantitatív vizsgálatok igazolták, hogy az eljárással az egész agy területén, beleértve a gerincvelőt és a retinát is komplett, ún. „no-flow” iszkémia hozható létre. Az iszkémia ideje alatt kialakuló erőteljes vérnyomás emelkedés (Cushing reflex) kompenzálására a vena femoralisba vezetett katéteren keresztül 20-30 ml/kg vénás vért vettünk, hogy az artériás középnyomást a fiziológiás értéken tartsuk. A 10 perces iszkémiás periódus után

a mCSF infúzióját megszüntettük, és a heparinizált vért reinfundáltuk. A kérgi reperfúziót intravitális mikroszkópiával ellenőriztük.

Az agyi erek reaktivitásának vizsgálata

Hiperkapnia kiváltásához az állatokkal 5 vagy 10% CO₂ tartalmú gázkeveréket lélegeztettünk, majd a létrejövő érreakciókat 5-7 percen keresztül folyamatosan mértük. A koponya-ablakot minden stimulus után átmostuk mCSF-kal és megvártuk amíg az arteriála átmérője visszatér a kiindulási értékre.

Kísérleti csoportok az in vivo vizsgálatokhoz

Mind az agyi erek reaktivitásának vizsgálatánál, mind a mitochondriális változások vizsgálatánál az első állatesoport DIAZ (3 mg/kg, iv) előkezelést kapott 15 perccel az I/R előtt. A kontroll csoportnál a DIAZ oldószerét adtuk az I/R előtt. A harmadik csoport annyiban különbözött az első csoporttól, hogy a DIAZ kezelés előtt 15 perccel 5-HD-t (20 mg/kg, iv) kaptak az állatok.

Mintaelőkészítés az elektronmikroszkópos hisztokémiai vizsgálatokhoz és a CA1 piramis sejtek analízise

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz az állatokat speciális fixáló folyadékkal perfundáltuk (3% glutáraldehid, 90 mmol/l oxálsav, pH 7,4), majd az agy eltávolítása után a hippokampuszt izoláltuk és ugyanabban a fixáló oldatban egy éjszakán keresztül utófixáltuk. Az izolált hippokampuszból kb. 1 mm vastag metszeteket készítettünk, amelyeket kálium-oxalát tartalmú cukor oldattal mostunk, majd további két órán keresztül fixáltuk kálium-piroantimonát tartalmú fixáló oldattal. A fixálás után elvégeztük a dehidrációt és polimerizációt, ultramikrotómmal félvékony metszeteket készítettünk, amelyeket festettünk és fénymikroszkóp alatt a CA1 piramis sejtek rétegét tartalmazó ultravékony metszeteket készítettünk. Az oxalát-piroantimonát eljárás során a szubcelluláris struktúra jól megtartott marad, ami lehetővé teszi a Ca²⁺ kimutatását. A random módon kiválasztott piramis sejtek perikariális régiójáról 12000-szeres nagyításon fotókat készítettünk, majd mikrográf segítségével pont-számlálós módszerrel analizáltuk a metszeteket.

Az OGD és a glutamát excitotoxicitás hatásának vizsgálata az in vitro preparátumokon

Az OGD kialakításához a neuron tenyészetekre deoxigenált, glükóz mentes tápoldatot tettünk, majd a sejteket 70 percre 37 °C-os anaerob kamrába helyeztük (5% CO₂, 5% H₂, 90% N₂), ahol az oxigén szint a kísérlet alatt végig 0,1% alatt volt. A kontroll tenyészetekre glükóz (5,5 mM) tartalmú tápoldatot tettünk és normál sejttenyésztő inkubátorban tartottuk 70 percen keresztül. A 70 perc elteltével az OGD-nek kitett sejteken a tápoldatot glükóz tartalmúra cseréltük és normál inkubátorba helyeztük a lemezeket. A sejtek életképességét mikroplate spektrofotométerrel (490 nm) mértük az OGD után 24 órával.

Glutamát excitotoxicitást 200 µM-os glutamát oldattal idéztünk elő, amellyel egy órán keresztül inkubáltuk a sejteket 37 °C-on tenyésztő inkubátorban, majd 24 óra elteltével a fentiekhez hasonlóan mértük a sejtek életképességét.

DIAZ és BMS-191095 kezelés

A sejteket 50, 100, 250 500 vagy 750 µM diazoxiddal, illetve 1, 5, 10, 20, 30, 40 µM BMS-191095-tel kezeltük 1 vagy 24 órával a glutamát behatás előtt, majd a glutamát kezelést követően, 24 óra elteltével életképességet mértünk. Az OGD esetén mindkét szerből a fenti dózisokat használtuk, azonban a sejteket egy nappal vagy három napon keresztül naponta egyszer az OGD előtt kezeltük. Az OGD-t követő 24 óra elteltével a sejteken életképességet mértünk.

Membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$) mérés

A $\Delta\Psi_m$ méréshez a $\Delta\Psi_m$ -érzékeny tetrametilrodamin-etil-észter (TMRE) festéket használtuk. A sejteket 0,5 µM TMRE tartalmú Neurobasal médiummal 15 percen keresztül, sötétben előinkubáltuk. Az inkubációt követően a sejteket háromszor mostuk foszfát pufferrel. A sejtek TMRE fluoreszcenciájának konfokális képét lézer scanning mikroszkóppal rögzítettük. A sejtek egy részét előinkubáltuk 5-HD-vel, majd az előkezelt, illetve a 5-HD-vel nem kezelt sejteket is kezeltük DIAZ-dal. A kezelés után öt percen keresztül, minden 20. másodpercben rögzítettük a sejtek fluoreszcens képeit ($\lambda_{\text{ex}} = 488$, $\lambda_{\text{em}} > 560$ nm), majd a sejtestek átlagos pixel intenzitását speciális mérőprogrammal kiértékeltek.

ROS képződés mérése

A szabadgyökök képződésének méréséhez az oxidáció-érzékeny hidroethidin (HEt) festéket használtuk. Az idegsejt kultúrákat sötétben, 3 percig 5 μM HEt tartalmú foszfát pufferben előinkubáltuk. A festés után a sejtek HEt fluorescens konfokális képét ugyan azzal a konfokális mikroszkópos technikával rögzítettük, mint amelyet a membránpotenciál mérésnél használtunk. A médiumba 300 és 500 μM diazoxidot vagy 200 μM glutamátot tettünk, majd a fluorescens képet rögzítettük ($\lambda_{\text{ex}} = 488$, $\lambda_{\text{em}} > 560$ nm). A képeket 10 percen keresztül, minden 20. másodpercben rögzítettük, majd a sejtestek átlagos pixel intenzitását speciális mérőprogrammal kiértékeltek.

Western blot analízis

A tenyésztett sejteket összegyűjtöttük, majd centrifugálás után Lowry-féle módszerrel fehérjetartalmukat meghatároztuk. A 10 μg összfehérje tartalmú mintákat 3 percen keresztül 100 °C-on forraltuk, majd 10%-os poliakrilamid géltre vittük fel őket és elvégeztük a gélelektroforézist. A szétválasztott fehérjék transzferálása nitrocellulóz membránra történt. A fehérjék blokkolása után (5%-os tejpor 50 mM TBS-ben oldva, pH 7,5) különböző antitestekkel szobahőmérsékleten egy éjszakán keresztül inkubáltuk a mintákat. Az elsődleges antitestek vizualizálására tormaperoxidáz konjugált kecske anti-nyúl vagy anti-egér IgG típusú másodlagos antitestet használtunk. A blottolt mintákat röntgenfilmen hívtuk elő, majd denzitometriás képanalízissel értékeltük.

Statisztikai analízis

Eredményeinket átlag \pm átlagszórás formában adtuk meg. A csoportok közötti különbségek feltárásához variancia analízist használunk. Amennyiben az F értékek szignifikáns különbséget jeleztek, a páronkénti eltérések meghatározásához a Student-Newman-Keuls tesztet, illetve a Tukey-tesztet használtuk (SigmaStat statisztikai programcsomag). Szignifikáns eltérésnek a $P < 0.05$ értéket tekintettük.

Eredmények és következtetések

A DIAZ protektív hatása az endothélium-függő hiperkapnia által kiváltott vazodilatációra I/R után

Közvetlenül az iszkémia előtti szelektív mitoK_{ATP} csatorna nyitó DIAZ-dal történő kezelés megakadályozza a hiperkapniával kiváltott érreakciók csökkenését. A DIAZ önmagában, iszkémia nélkül nem befolyásolja a hiperkapniával kiváltott vazodilatációt. A DIAZ mitoK_{ATP} csatornára gyakorolt protektív hatását valószínűsíti, hogy 1) a DIAZ önmagában nem hoz létre számottevő vazodilatációt, 2) szelektív antagonistája, a 5-HD meggátolja a szer protektív hatását. Habár a mitoK_{ATP} csatorna aktiváción keresztül kialakuló protekció mechanizmusa még nem tisztázott, valószínűnek tűnik, hogy a mitochondriumoknak jelentős szerepük van. Malac cerebrovaszkuláris endothél tenyészetben vizsgáltuk, a DIAZ esetleges direkt hatását a mitochondriumon. Mitochondriális potenciál-érzékeny festéket (MitoTracker Red) használva kimutattuk, hogy a DIAZ-nak erőteljes közvetlen hatása van a cerebrovaszkuláris endothél sejtek mitochondriumán. Habár a mitochondrium és az I/R által okozott endotheliális diszfunkció létrejöttének megakadályozása közötti kapcsolat még nem tisztázott, a legvalószínűbbnek az tűnik, hogy a mitoK_{ATP} csatorna nyitása során a mitochondriális reaktív oxigén speciesz (ROS) termelés csökken.

A DIAZ protektív hatása a CA1 piramis sejtek mitochondriális duzzadására és Ca²⁺ akkumulációjára

Az iszkémiát követő reperfüzió korai fázisában a neuronális mitochondriumok térfogata szignifikánsan megnő, ami egybe esik egy Ca²⁺ akkumulációs csúccsal. Ez a korai mitochondriális duzzadás valószínűleg fontos szerepet játszik az I/R során kialakuló neuronális károsodásban mivel ismert, hogy a mitochondriális mátrix megnövekedett térfogata stimulálja az elektrontranszport-lánc aktivitását, a mitochondriális ROS és/vagy proapoptotikus faktorok termelődését.

Az I/R előtti DIAZ kezelés megakadályozza a posztiszkémiás mitochondriális duzzadást és a Ca²⁺ akkumulációt a CA1 piramis sejtekben. Azonban a hatás nem védhető ki 5-HD-vel, ami azt valószínűsíti, hogy habár a DIAZ-ot szelektív mitoK_{ATP} csatorna nyitóként

tartják számon, valószínűleg egyéb támadási pontja is van, mint pl. a mitochondriális légzési lánc II-es komplexe.

A DIAZ és a BMS-191095 protektív hatása a kortikális neuron tenyészeteken OGD és glutamát excitotoxicitás ellen

Az OGD előtt három napon keresztül, naponta egyszer alkalmazva a DIAZ megvédte a neuronokat a sejtpusztulástól. A DIAZ protektív hatása 5-HD-vel antagonizálható volt, ami azt valószínűsíti, hogy mitoK_{ATP} csatorna aktiváción keresztül alakul ki a védelem. Azonban a protekció kialakításához szükséges DIAZ koncentráció jóval magasabb volt, mint ami az irodalom szerint a mitoK_{ATP} csatorna aktivációhoz szükséges. Megvizsgáltuk, hogy a DIAZ-nak van-e közvetlen hatása a kortikális neuronok mitochondriumain. DIAZ kezelés hatására a kortikális neuronok mitochondriumai depolarizálódnak. A hatás 5-HD-vel kivédhető, azonban az általunk használt 5-HD dózisa jóval nagyobb volt, mint ami a mitoK_{ATP} csatornák blokkolásához szükséges, illetve irodalmi adatok szerint a mitoK_{ATP} csatornák nyitása miatti K⁺ beáramlás nem elegendő ahhoz, hogy depolarizálni tudja a mitochondriumot. További vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy a DIAZ szignifikánsan gátolja a SDH aktivitást a sejt kultúrákon. Feltételezzük, hogy a SDH gátlása a citromsav ciklus és a II-es komplex gátlásához vezet és így az elektrontranszport-lánc gátlása révén depolarizálódik a mitochondrium. A DIAZ szignifikánsan megnöveli a ROS termelődést a tenyésztett neuronokon és SOD mimetikummal gátolható a neuroprotektív hatása. A SOD mimetikum hatása azt mutatja, hogy a szuperoxid valószínűleg mediátora a DIAZ-indukálta neuronális prekondicionálásnak.

A DIAZ kezelés glutamát excitotoxicitás ellen is megvédte a neuronokat a sejtpusztulástól, azonban míg OGD ellen csak késői prekondicionálást tudtunk kialakítani, addig glutamát ellen akut protekció is létrejött. A különbség feltehetően a különböző modellek használata miatt volt. A DIAZ protektív hatását SOD mimetikummal antagonizálni tudtuk, míg a 5-HD hatástalannak bizonyult. Ez szintén alátámasztja azt a feltételezést, hogy a ROS termelődés fontos szerepet játszik a neuroprotektió kialakításában.

A BMS-191095 kezelés OGD ellen késői, míg glutamát excitotoxicitás ellen mind akut, mind késői neuroprotekción kialakít. A protektív hatást a 5-HD nem blokkolta. Ellentétben a DIAZ kezeléssel, a BMS-191095 alkalmazásakor nem növekedett a ROS termelődés, ami azt valószínűsíti, hogy a DIAZ kezelés során felszabaduló szabadgyökök inkább a SDH gátlás miatt szabadulnak fel, mint a mitochondrium depolarizációja miatt, mivel a BMS-191095 nem befolyásolja a SDH működését.

Összegzés

Kísérleteink rámutatnak arra, hogy a mitoK_{ATP} csatorna nyitók, mint a DIAZ és a BMS-191095 fontos szerepet játszanak az I/R utáni neuronális/vaszkuláris funkciók megőrzésében. Mindazonáltal az is világossá vált, hogy nemcsak az akut illetve a késői neuroprotekción utak között van különbség, de az *in vivo* és az *in vitro* modellek között is. A DIAZ dózisában és hatásában jelentkező különbségek az *in vivo* és az *in vitro* modellekben feltehetően a sejtek különböző környezete miatt adódott, mivel *in vivo* a sejtek eredeti környezetükben vannak és így más faktorok, mint pl. a glia sejtek, az agyi endothél sejtek erősíthetik a DIAZ protektív hatását azáltal, hogy az ionális egyensúlyt vagy az agyszövet megfelelő perfúzióját fenntartják. Feltehetően ez az oka annak, hogy *in vivo* a DIAZ kis dózisban és akutan is hatékony, míg *in vitro* meglehetősen nagy dózis szükséges és többnyire késői protekción vált ki.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akik hozzájárultak a Ph.D. dolgozatom elkészüléséhez.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Prof. Bari Ferencnek, hogy megtanított az *in vivo* keringésélettani vizsgálatok metodikájára és, hogy a munkám során végig támogatott és irányt mutatott. Valamint köszönöm a tézisek alapjául szolgáló közlemények és a disszertáció elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönetet szeretnék mondani David W. Busija professzornak, aki lehetővé tette számomra, hogy a laboratóriumában dolgozzam az Amerikai Egyesült Államokban, Észak-Karolinában, a winston-salemi Wake Forest Egyetem Élettani és Farmakológiai Intézetében.

Külön köszönettel tartozom Dr. Kis Bélának, aki társ-témavezetőm volt az Egyesült Államokban és aki lehetővé tette számomra, hogy megtanuljam az *in vitro* technikák használatát. Köszönöm a bátorítást, a támogatást és a segítséget, amelyet a kísérletek megtervezéséhez és kivitelezéséhez nyújtott és végül szeretném megköszönni a tézisek alapjául szolgáló kéziratok elkészítésében nyújtott segítségét.

Tisztelettel köszönöm Prof. Jancsó Gábornak, hogy részt vehettem az „Idegtudomány” elnevezésű Ph.D. programban.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Benedek Györgynek, a Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézete vezetőjének, amiért lehetőséget adott, hogy az intézetben dolgozzam és támogatott a Ph.D. fokozat megszerzésében.

Külön köszönet illeti Dr. Domoki Ferencet, akihez bármikor fordulhattam a munkám során felmerülő problémákkal, illetve Tóth-Szűki Valériát a kitűnő technikai segítségért.

Szeretnék köszönetet mondani barátaimnak és kollégáimnak a segítségükért, kiváltképp Andy J. Snipesnak, Dr. Erdős Benedeknek, Nishadi Rajapaksenak, Dr. Annaházi Anitának, Dr. Zimmermann Alíznak, Dr. Lenti Laurának.

Végül szeretném megköszönni az Élettani Intézet minden munkatársának, hogy támogattak a disszertáció és a tézisek elkészítésében.

A tézisek alapjául szolgáló publikációk

- I. Domoki F, Kis B, Nagy K, Farkas E, Busija DW, Bari F. Diazoxide preserves hypercapnia-induced arteriolar vasodilation after global cerebral ischemia in piglets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289(1):H368-73. 2005
- II. Nagy K, Kis B, Rajapakse NC, Bari F, Busija DW. Diazoxide preconditioning protects against neuronal cell death by attenuation of oxidative stress upon glutamate stimulation. *J Neurosci Res.* 1;76(5):697-704. 2004
- III. Domoki F, Bari F, Nagy K, Busija DW, Siklos L. Diazoxide prevents mitochondrial swelling and Ca²⁺ accumulation in CA1 pyramidal cells after cerebral ischemia in newborn pigs. *Brain Res.* 3;1019(1-2):97-104. 2004
- VI. Kis B, Nagy K, Snipes JA, Rajapakse NC, Horiguchi T, Grover GJ, Busija DW. The mitochondrial KATP channel opener BMS-191095 induces neuronal preconditioning. *Neuroreport.* 9;15(2):345-9. 2004
- V. Kis B, Rajapakse NC, Snipes JA, Nagy K, Horiguchi T, Busija DW. Diazoxide induces delayed pre-conditioning in cultured rat cortical neurons. *J Neurochem.* 87(4):969-80. 2003

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények

Bari F, Nagy K, Guidetti P, Schwarcz R, Busija DW, Domoki F. Kynurenic acid attenuates NMDA-induced pial arteriolar dilation in newborn pigs *Brain Res.* 19;1069(1):39-46. 2006

Domoki F, Nagy K, Temesvari P, Bari F. Selective Inhibitors Differentially Affect Cyclooxygenase-Dependent Pial Arteriolar Responses in Newborn Pigs *Pediatr Res.* 57(6):853-7. 2005

Nagy K, Domoki F, Bari F. Iszkémiás prekondicionálás az agyban

Ideggyógyászati szemle 20;58(9-10):305-13. 2005

Slézia A, Kékesi KA, Szikra T, Papp AM, Nagy K, Szenté M, Maglóczky Z,

Freund TF Juhász G. Uridine release during aminopyridine-induced epilepsy

Neurobiol Dis. 16:490-9. 2004

Kis B, Snipes JA, Isse T, Nagy K, Busija DW. Putative cyclooxygenase-3

expression in rat brain cells *J Cereb Blood Flow Metabol.* 23(11):1287-92. 2003

A tézisek alapját képező közlemények impact faktora: 16,830

Az összes közlemény kumulatív impact faktora: 31,659

Független idézetek száma: 55