

# **A hipoxiás-izkémias encefalopátia molekuláris mechanizmusai újszülött malacban**

Ph.D. értekezés tézisei

Varga Viktória Éva

Témavezető:

Dr. Domoki Ferenc



Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Szeged

2018

# **A hipoxiás-iszkémiás encefalopátia molekuláris mechanizmusai újszülött malacban**

Ph.D. értekezés tézisei

Varga Viktória Éva

Témavezető:

Dr. Domoki Ferenc

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Szeged

2018

## **BEVEZETÉS**

A perinatális aszfixiát (PA) a születés körüli időszakban bekövetkező gázcsere-elégtelenség idézi elő, a kialakuló sokszervi károsodás mechanizmusában a kifejlődő súlyos hipoxia, acidózis, és a keringési rendszer károsodása miatt létrejövő hipoperfúzió, iszkémia egyaránt fontos kóroki szerepet játszik. A súlyos PA előfordulása nem ritka, fejlett szülészeti ellátással rendelkező országokban is 1000 élveszületésből 1-6 újszülöttet érint, és az újszülött-halálozások egyik leggyakoribb előidézője világszerte.

Az újszülöttkori agykárosodás, enkefalopátia azon eseteit tartoznak az ún. hipoxiás-iszkémiás enkefalopátia (HIE) szindrómába, ahol bizonyítható a súlyos PA vagy más okból kifejlődő agyi iszkémia kialakulása a kórelőzményben. A HIE klinikai tünetei nem specifikusak: általánosan károsodott idegrendszeri működések jellemzik, pl. a légzés megkezdésének és fenntartásának zavara, az izomtónus változásai, megváltozott vagy hiányzó reflexek, az alvás-ébrenlét ciklus kómáig terjedő zavarai, epilepsziás görcsrohamok. Kimenetele a hipoxiás-iszkémiás inzultus súlyosságától függ, de a prognózis nehéz. Az ún. Sarnat-osztályozás szerint megkülönböztetünk enyhe, mérsékelt, ill. súlyos HIE-át. Míg néhány újszülött akár súlyos HIE-át is túlél szövődmények nélkül, a legtöbb túlélőnek maradandó szövődményekkel kell megküzdenie: a cerebrális parézis hátterében az esetek 80%-ában HIE áll, továbbá hallás- és látásromlás, tanulási nehézségek, figyelemzavarok, hiperaktivitás, autisztikus tünetek kísérhetik végig az érintett gyermekek életét, sőt, pl. a skizofréniára való hajlamuk is nőhet PA/HIE következtében. Részletes epidemiológiai adatokkal azonban elsősorban csak a fejlett országokban végzett felmérések alapján rendelkezünk. A fejlődő országokban a PA/HIE előfordulása és halálozása akár 8-szor magasabb is lehet, mint a fejlett államokban.

A fenti adatok tükrében megkérdőjelezhetetlen egy hatásos, optimális esetben egyszerűen alkalmazható és olcsó terápiás beavatkozás kifejlesztésének szükségessége, amely enyhítené a PA/HIE következményeit.

Jelenleg a klinikumban neuroprotektív terápiaként a mérsékelt testhűtés áll rendelkezésre a PA/HIE kezelésére, azonban a hipotermiás kezelés nem kínál teljes neuroprotektíót, és mellékhatásokat is okozhat: pl. bradikardiát, hipotenziót és trombogenezist. A hipotermiás kezeléshez szükséges berendezés drága, mivel a hűtést-visszamelegítést jól szabályozottan, szigorú kritériumok szerint kell végezni, éppen ezért az eljárás nehezen hozzáférhető számos nélkülöző orvosi intézmény számára. Számos kutatás irányul ezért egy, a

testhűtést kiegészítő/helyettesítő terápia kifejlesztésére, ilyenek pl. a neuroprotektív gázokkal történő vizsgálatok.

Kutatócsoportunk Ohsawa és munkatársai Nature-ben közölt publikációja alapján választotta ki a molekuláris hidrogént, mint potenciális neuroprotektív szert a PA/HIE kezelésének vizsgálatára. A H<sub>2</sub>-t *ex vivo* antioxidánsnak, *in vivo* felnőtt patkány stroke modellben pedig neuroprotektívnek találták. A H<sub>2</sub> kis, membránoldékony, a vér-agy gáton könnyen átjutó molekula, amelyet belélegeztetve már az 1960-as években az agyi vérátáramlás meghatározására használtak (ún. H<sub>2</sub>-clearance technika). A vizsgálatainkban használt, az irodalomban optimális neuroprotektív hatásúnak tartott 2 %-os H<sub>2</sub>-koncentráció belélegeztetése patkányokban és emberekben egyaránt 10-20 μmol/l-es nagyságrendű agyi H<sub>2</sub>-koncentrációt eredményez.

A H<sub>2</sub> neuroprotektív hatása részben antioxidáns tulajdonságán alapulhat: szelektíven eliminálja ugyanis a szabadgyököket, úgymint a OH<sup>•</sup> és ONOO<sup>-</sup> ionokat, továbbá ún. „mitohormetikus” hatást is tulajdonítanak a H<sub>2</sub>-nek, amely szerint az Nrf2-út vonal transzkripció aktiválásával különböző antioxidatív enzimek expresszióját fokozza. Azonban a H<sub>2</sub>-nek további, mindeddig ismeretlen farmakológiai célpontjai is lehetnek. A H<sub>2</sub> viszonylag könnyen hozzáférhető, olcsó és könnyen felhasználható, neuroprotektív koncentrációban nem gyúlékony, és humán tolerancia vizsgálatok is alátámasztják klinikai alkalmazhatóságát.

A PA/HIE mechanizmusainak megismerése és a neuroprotektív stratégiák tesztelése céljából kutatócsoportunk újszülött malac PA/HIE modelleket hozott létre. Az újszülött malac megfelelő transzlációs modellje a humán újszülötteknek, hiszen az emberéhez hasonló *gyrencephalicus* felépítésű aggyal rendelkezik, amelynek fejlettségi állapota és anyagcserearánya az emberi újszülöttekével közel megegyező a születés pillanatában.

Munkacsoportunk korábban két kísérletsorozatban vizsgálta a H<sub>2</sub> neuroprotektív hatását. A két kísérleti protokoll elsősorban az aszfixia kiváltásának módjában és időtartamában különbözött. Míg az első kísérletsorozatban 8 perces tracheaokklúziót alkalmaztunk, addig a második kísérletsorozatban 20 percen át hipoxiás-hiperkapniás gázkeverékkel lélegeztettük a kísérleti állatokat. Mindkét esetben az aszfixiát követő 24 órán keresztül figyeltük meg és rögzítettük, és kontrolláltuk az állatok különböző élettani paramétereit (az O<sub>2</sub>-szaturációt, maghőmérsékletet, artériás középnyomást, szívfrekvenciát, vérgáz- és vércukor-értékeket), és folyamatosan monitoroztuk az agyi elektromos aktivitást.

Az aszfixia végén vett vérminták alapján a hipoxiás-hiperkapniás gázkeverékkel történő 20 perces lélegeztetés súlyosabb acidózist, hiperkapniát és hiperglikémiát eredményezett, mint a 8 perces tracheaokklúzió. Az állatok agyából készült szövettani metszeten hematoxin-eozin

festés segítségével súlyosabb neuronpusztulást detektáltunk a kérgi és szubkortikális területeken egyaránt a 20 perces aszfixiás csoportban. Összességében, a 8 perces tracheaokklúzió inkább enyhe-mérsékelt, míg a 20 perces aszfixia inkább mérsékelt-súlyos HIE-át idézett elő. A második kísérletsorozatban létrehozott súlyosabb HIE alkalmasabbnak bizonyult a H<sub>2</sub> neuroprotektív hatásának kimutatására, a kezelés hatékonyságának jellemzésére.

Célul tűztük ki a neuronpusztulás és a H<sub>2</sub> neuroprotektív hatásának háttérben zajló folyamatok alaposabb megismerését újszülött malac PA/HIE modelleinkben, jelentős részben a két korábbi kísérletsorozat során gyűjtött minták további analízisének segítségével.

A ciklooxygenáz (COX) enzimek a prosztaglandin-szekréció első lépését katalizálják. Legalább két izoformájuk megtalálható a központi idegrendszerben: a COX-1 és a COX-2. Mindkét izoforma membránasszociált enzim. Aminosav-sorrendjük 63%-os homológiát mutat, és katalitikus aktivitásuk is hasonló, farmakológiai jellemzőik és szöveti eloszlásuk azonban különböző. A COX-1 és COX-2 is folyamatosan expresszálódik a központi idegrendszerben, továbbá, az újszülött agyban a COX-2 a domináns izoforma, amely az agyi COX-aktivitás mintegy 80%-áért felel. Míg a COX-1 a legtöbb agyi régióban folyamatosan expresszálódik, addig a COX-2 expressziója a kéregben és a hippokampuszban a legintenzívebb. A COX-2 fontos fiziológias szerepet játszik a neuronális aktivitás modulációjában, ill. a neurovaszkuláris csatolásban.

Leírták, hogy különböző kórállapotokban, mint pl. agyi trauma, agyi iszkémia és gyulladási folyamatok hatására a neuronális COX-2-expresszió fokozódik, továbbá azt is, hogy pl. stroke-ot követően a COX-2 farmakológiai gátlásával a neuronális lézió nagysága mérsékelhető.

A COX aktiválódásakor a prosztaglandintermelés mellett oxigén-szabadgyökök is felszabadulnak, amelyeket az endogén antioxidáns-rendszerek közömbösítenek. Azonban az újszülöttek fokozottan érzékenyek az oxidatív stresszre, hiszen szerveik még nem érték el teljes fejlettségüket és a fejlődés fokozott aerob anyagcserét igényel, mindamellet emberben az antioxidáns rendszer csak az első életév végére fejlődik ki.

Noha patkány HIE modellben kimutatták már COX-2-gátlók neuroprotektív hatását, és neuropatológiai vizsgálatok is kimutatták a COX-2 emelkedett szintjét agyi iszkémiát követően humán újszülöttekben, újszülött malacokban mindeztidáig csak globális agyi iszkémiával, de nem aszfixiával sikerült a neuronális COX-2 expresszióját fokozni 2-8 órával az inzultust követően. Korábbi saját vizsgálatunkban a 8 perces tracheaokklúziót követő 4 órás túlélés végén nem sikerült kutatócsoportunknak neuronális COX-2-expressziófokozódást detektálnia, ezért felmerült a kérdés, vajon hosszabb túlélésre vagy súlyosabb inzultusra van-e szükség.

A PA/HIE által létrehozott neuronkárosodásban az inzultus hatására kifejlődő gyulladásos válasznak, és ezen belül a mikroglának fontos szerepet tulajdonítanak. A mikroglia sejtek a neuroinflammációban azonban kettős szerepet töltenek be, sejtkárosító, de a reparációt elősegítő hatásuk is ismert. Aktivitásukat és hatásukat az idegrendszeri sérülés mechanizmusa, helye, súlyossága és az életkor határozza meg. A mikroglia szerepe és jelentősége a PA/HIE újszülött malac modelljében sem tisztázott az szakirodalomban, ezért fontosnak tartottuk a mi modellünkben is jellemezni a mikroglia aktivációját.

Bár az aszfixia számottevő neuronkárosodást indukál, egy adott régióban a neuronok jelentős része, akár többsége is túléli az inzultust. Fontosnak tartottuk az endogén neuroprotektív folyamatok vizsgálatát is, hiszen ezek serkentése is potenciális neuroprotektív terápiaként szolgálhat.

Az agyi eredetű neurotrofikus faktor (BDNF) a neurotrofikus faktorok családjába tartozik, és fontos szerepet játszik a központi idegrendszer fejlődésében. A BDNF a mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK), ill. a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI-3-K) útvonalon keresztül neuroprotektív hatást fejt ki. Az említett jelátviteli utak aktivációját az extracelluláris szignálkapcsolt kináz (ERK) aktivációs – azaz foszforilációs – szintjével jellemezhetjük. Rágcsáló HIE modellekben a BDNF neuroprotektívnek bizonyult. 7 napos patkánykölykökben a BDNF intracerebroventrikuláris alkalmazása emelte az ERK és az Akt foszforilált formájának szintjét, míg az ERK farmakológiai gátlása növelte a lézió nagyságát. Azonban nagyállat modellben keveset tudunk a BDNF-jelátvitelről PA/HIE során.

Fenti ismereteink fényében az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul, hogy részletesebben jellemezhesük PA/HIE modellünket és a HIE kialakulásának sejtszintű folyamatait alaposabban megismerhesük:

- 1.) Mivel a neuronális COX-2-expresszió regionális különbségeit már ismertük, felmerült a kérdés, vajon a 24 órás anesztézia önmagában befolyásolja-e a COX-2-immunpozitív neuronok arányát a különböző agyterületeken?
- 2.) 24 órás túlélést követően megfigyelhetjük-e a neuronális COX-2-expresszió fokozódását aszfixia hatására, és ha igen, van-e regionális különbség?
- 3.) Van-e összefüggés a COX-2-t expresszáló neuronok aránya és a neuronpusztulás súlyossága között?
- 4.) Összefügg-e a neuronális COX-2-expresszió és a neuronok oxidatív károsodása?

- 5.) Kimutatható-e mikroglia-aktiváció PA/HIE modellünkben? Van-e korreláció a COX-2-immunpozitív neuronok aránya és a mikrogliasejtek aktivációja között?
- 6.) Tudja-e a H<sub>2</sub>-kezelés befolyásolni a PA hatását a neuronális COX-2-expresszióra, hatással van-e a mikroglia-aktivációra?
- 7.) Szerepet játszhat-e az Akt és ERK jelátviteli utak aktivációja a neuronok túlélésében 24-48 órával az aszfixiát követően?

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Állatkísérleteinket a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának engedélyével és a hatályos jogszabályok szerint végeztük.

### 1. Neuronkárosodás és neuroinflammáció vizsgálata immunhisztokémiai módszerekkel

Immunhisztokémiai vizsgálatainkhoz főként a korábbi kísérletsorozataink során felhasznált újszülött malacok (életkor < 24 h a kísérlet kezdetén, 1,5-2,5 kg, n=47) agymintáit használtuk fel. A legfőbb különbség a kísérletsorozatok között az aszfixia előidézésében rejlett: az első kísérletsorozatban az aszfixiát 8 perces tracheaokklúzióval, a második kísérletsorozatban 20 perces, hipoxiás-hiperkapniás (6% O<sub>2</sub>, 20% CO<sub>2</sub>) gázkeverékkel történő lélegeztetéssel idéztük elő. Mindkét aszfixiás csoportot megfelelő időkontroll és H<sub>2</sub>-kezelt aszfixiás csoporttal egészítettük ki (n=7-7). A korábbi kísérleteket egy naiv csoporttal (n=5) bővítettük ki: az állatokat nátrium-tiopentállal (45 mg/kg, ip.) altattuk majd agy agyukat az *arteria carotis communis*-okon keresztül fiziológiás sóoldattal perfundáltuk és begyűjtöttük további vizsgálatainkhoz. Szövetteni vizsgálatainkat megelőzően az agyakat 4%-os, 4 °C-os paraformaldehiddel 2 hétig immerziósan fixáltuk. A mintákat paraffinba ágyaztuk és 4 µm-es metszeteket készítettünk. A neuronális lézió megállapítására a metszeteket hematoxilín-eozinnal megfestettük, és sejtszámolással, ill. szövettani pontszámokkal jellemeztük a mintákat. Az immunhisztokémiai festéseket automatizált immunfestő készülékkel végeztük. A metszeteket digitalizáltuk és sejtszámlálással állapítottuk meg a COX-2-immunpozitív neuronok arányát a frontális, parietális, temporális és occipitális kéregben, a hippocampusz CA1, CA3 és *gyrus dentatus* területén, a bazális ganglionokban, a cerebelláris Purkinje-sejtjei között, valamint a talamusz területén. Szintén számolással állapítottuk meg az oxidatív stressz jellemzésére szolgáló 8-hidroxi-2'-deoxiguanozin (8-OHdG) immunpozitív neuronális magok arányát a parietális kéreg területén.

A parietális kéreg területén vizsgáltuk a mikrogliasejtek aktivációját is. Jellemzésükre az ún. ramifikációs indexet használtuk, amely az egységnyi területen található Iba-1 pozitív mikroglia-sejttestek, valamint a területet fedő négyzetrácsot metsző mikroglia-nyúlványok arányát fejezi ki: ugyanis minél kevésbé nyúlványos a mikroglia, annál aktívabb állapotú.



## **2. Neuroprotektív jelátviteli utak vizsgálata Western blot analízissel**

Az Akt és ERK jelátviteli utak aktivációját a 20 perces aszfixiát követő 24 és 48 órás túlélési időablakokban vizsgáltuk a különböző kortikális és szubkortikális régiókban; időkontroll és naiv állatokhoz hasonlítottuk az aszfixia hatását (n=12). Az össz- és foszforilált fehérjeszinteket Western blot analízissel állapítottuk meg. Eredményeinket Akt és ERK kináz inhibitorok (U0126, ill. A-6730) topikális alkalmazásával ellenőriztük (n=4-4).

## **EREDMÉNYEK**

### **1. Anesztézia hatása a neuronális COX-2-expresszióra**

A neuronális COX-2-expresszió számottevő regionális különbségeket mutatott: naiv állatokban a frontális és parietális kéregben volt a legmagasabb, hasonlóan a 4 órás túlélést követően megfigyeltekhez. Azonban 24 órás túlélést követően az időkontollokban ez a mintázat jelentősen megváltozott, ugyanis a COX-2-pozitív neuronok száma minden neokortikális régióban lecsökkent a naiv és a 4 órás időkontroll csoportokéhoz képest egyaránt. A COX-2-expressziója viszont a hippokampuszban változatlan maradt.

### **2. Aszfixia és H<sub>2</sub>-kezelés hatása a neuronális COX-2-expresszióra**

A 8 perces tracheaokklúzió egyik vizsgált agyterületen sem idézett elő változást, azaz nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az időkontroll és az aszfixiás csoportok között. Tehát a H<sub>2</sub>-kezelés sem volt hatással a COX-2-expresszióra ebben a kísérletben. Ezzel szemben a 20 perces aszfixia számottevően fokozta a COX-2-immunpozitív neuronok arányát a parietális és occipitális kéreg, ill. a hippokampális CA3 régió területén, valamint tendenciózus emelkedést figyelhetünk meg a frontális és temporális kéregben, ill. a bazális ganglionokban. A H<sub>2</sub>-kezelt aszfixiás csoportban minden említett területen a kezeletlen aszfixiásnál jelentősen alacsonyabb, az időkontroll csoporttal azonos volt a COX-2-t expresszáló neuronok aránya. A hippokampális CA1 régióban, a *gyrus dentatus* és a talamusz területén konstansan alacsony COX-2-pozitivitást figyelhattunk meg, és a csoportok nem mutattak különbséget, míg a cerebellum Purkinje-sejtjeinek mintegy harmada mutatott COX-2-immunpozitivitást ugyancsak a kísérleti csoporttól függetlenül.

Megjegyzendő, hogy erősen festődött COX-2-pozitív neuronokat csak a 20 perces aszfixiás csoportban figyelhattunk meg.

### **3. Neuronális COX-2-expresszió és neuronkárosodás kapcsolata**

Mivel a neuronális COX-2-expresszióra csak a 20 perces aszfixia volt hatással, további vizsgálatainkat csak ebből a kísérletsorozatból származó mintákon végeztük.

Elsőként megvizsgáltuk, vajon a COX-2-immunpozitív neuronok aránya korrelál-e a korábban megállapított neuropatológiai pontszámokkal, ahol is a magasabb pontszám súlyosabb károsodást jelöl. Habár statisztikailag kimutatható összefüggést nem detektáltunk, 3 expressziós mintázatot figyelhattunk meg: az alacsony szövettani károsodást mindig alacsony COX-2-pozitivitás kísérte, míg a súlyosan károsodott agyterületeket alacsony vagy magas COX-2-pozitivitás egyaránt jellemezte. Kiemelendő, hogy nagyarányú COX-2-expressziót

sosem kísért enyhe neuronkárosodás. Hasonló eredményt kaptunk a hippokampusz CA3 régiójában is.

#### **4. Neuronális COX-2-expresszió és oxidatív DNS-károsodás összefüggése**

A 20 perces aszfixia szignifikánsan növelte a 8-OHdG-immunpozitív neuronális sejtmagok arányát, mind az időkontroll, mind a H<sub>2</sub>-kezelt aszfixiás csoporthoz képest, alátámasztva ezzel, hogy az aszfixia-okozta oxidatív stresszt a H<sub>2</sub>-kezelés mérsékeli. Összevetve a COX-2-pozitív neuronok arányával, számottevő korrelációt figyeltünk meg a neuronok COX-2-expressziója és oxidatív DNS-károsodása között.

#### **5. Mikroglia-aktiváció és viszonya a neuronális COX-2-expresszióval**

Az Iba-1 immunhisztokémia felfedte, hogy a 20 perces aszfixiás inzultus a mikrogliasejtek nyúlványainak redukcióját, amöboid morfológia kialakulását eredményezte. A fenotípus megváltozását a ramifikációs index kiszámításával kvantifikáltuk, amelynek segítségével megállapítható volt, hogy a mikroglia aktivációja szignifikánsan előrehaladottabb az időkontrollhoz képest az aszfixiás csoportban, a H<sub>2</sub>-kezelt aszfixiás csoportban azonban nem tér el az időkontrolltól. A COX-2-pozitív neuronok aránya és a mikroglia aktivációs státusza a kezeletlen aszfixiás csoportot tekintve statisztikailag szignifikáns korrelációt mutatott, azonban mindhárom csoportot figyelembe véve az összefüggés nem volt szignifikáns.

#### **6. Akt és ERK jelátviteli utak aktivációja**

A frontoparietális kéreg területén mind az Akt, mind az ERK kinázok magas foszforilációs szintet mutattak már a naiv csoportban is. Ettől sem az időkontroll, sem az aszfixiás csoport nem tért el szignifikánsan egyik vizsgált időpontban sem.

Az Akt és az ERK foszforilációját specifikusan gátló inhibitorok topikális alkalmazásával azonban jelentősen csökkenteni tudtuk az Akt és az ERK aktivációját az agykéreg kezelt oldalán a kezeletlen kontralaterális oldalhoz viszonyítva, igazolva méréseink validitását.

Az Akt és az ERK aktivációja a vizsgált hippokampális és szubkortikális területeken is a frontoparietálishoz hasonlóan magasnak bizonyult.

## MEGBESZÉLÉS

A disszertáció fő tézisei a következők:

- 1.) A neocortexben a régióspecifikus neuronális COX-2-expresszió 4 órás túlélést követően még hasonló a naiv állatokban meghatározott szintekhez, azonban 24 órás anesztézia során jelentősen csökken az időkontroll állatokban.
- 2.) A 8 perces tracheaokklúzió nem, de a 20 perces aszfixia képes szignifikánsan fokozni a neuronális COX-2-expressziót a neokortexben és a hippocampális CA3 régióban, azonban más hippocampális területeken és szubkortikális régiókban nem.
- 3.) A magas COX-2-expressziójú területeket mindig súlyos neuronkárosodás jellemezte.
- 4.) A COX-2-t expresszáló neuronok aránya összefügg a neuronok oxidatív károsodásával a parietális kéreg területén.
- 5.) A mikroglia-aktiváció PA hatására már 24 órás túlélést követően kimutatható modellünkben a parietális kéregben, és mértéke összefügg a neuronális COX-2-expresszióval.
- 6.) A neuroprotektív H<sub>2</sub>-kezelés kivédi a PA-okozta COX-2-expressziófokozódást minden érzékeny agyterületen, enyhíti az oxidatív károsodást és csökkenti a mikroglia-aktivációt PA-t követően.
- 7.) Mind az Akt, mind az ERK foszforiláltsága (aktiváltsága) magas az újszülött malacok agykérgében és más vizsgált régiókban, ezt a magas szintet az anesztézia hossza, ill. a PA nem befolyásolja, azonban specifikus inhibitorokkal aktivációjuk *in vivo* csökkenthető.

Aszfixiás inzultust követően elsőként sikerült detektálnunk a neuronális COX-2-expresszió indukálódását PA/HIE malac transzlációs modelljében. Jelen tanulmányt megelőzően modelljeinket átfogóan jellemeztük, és megállapítottuk, hogy a 20 perces aszfixiás inzultus a humán mérsékelt-súlyos HIE patológiás folyamatainak feleltethető meg. Korábban a 10 perces aszfixia nem volt képes a COX-2 indukciójára, csupán a 10 perces globális előagyi iszkémia. Jelen vizsgálataink szerint sem bizonyult eredményesnek a 8 perces tracheaokklúzió a neuronális COX-2-expresszió befolyásolásában. Mindez arra utal, hogy súlyosabb inzultusra volt szükség a változás előidézéséhez.

A COX-2-immunopozitív neuronok aránya 24 órás túlélést követően minden neokortikális régióban csökkent az időkontroll csoportban a naiv állatokhoz képest. A jelenség hátterében az anesztézia okozta neuronális inaktiváció állhat, hiszen a COX-2-expressziót a neuronális aktiváció fokozza. Az alkalmazott anesztetikus/analgetikus szerek továbbá gátolhatják a

COX-2-expressziót az NF- $\kappa$ B jelátvitel modulációján keresztül, ami a COX-2 egyik ismert transzkripciós regulátora. Bár a morfin hatása ellentmondásos az NF- $\kappa$ B jelátvitelre, a midazolam egyértelműen gátló hatású. A morfin és a midazolam a humán újszülöttek PA/HIE terápiájában is alkalmazott szerek, ezért a transzlálhatóság érdekében alkalmazzuk mi is ezeket a hatóanyagokat. Továbbá azt is leírták, hogy a morfinnak fontos megengedő szerepe lehet neuroprotektív beavatkozások, úgymint a terápiás hipotermia alkalmazása során, megfelelő anesztézia/ analgészia hiányában ugyanis hatástalannak bizonyulnak a terápiás próbálkozások.

Eredményeink arra utalnak, hogy a COX-2-eredetű oxidatív gyököknek és prostanoidoknak agyterületenként más-más fázisban lehet szerepe a HIE kialakulás során: a korai reventilációs-reoxigenizációs fázisban azon területeken játszhat szerepet a COX-2, ahol magas az alap expressziós szintje, míg az elnyújtott másodlagos energiadeficités fázisban főként azon régiókban jelenthet patogén faktort, ahol a PA-indukálta aktivációjuk dominál az anesztézia-okozta gátlás felett.

A COX-2-expresszió és a neurológiai sérülés is változatos mértéket mutat az egyes állatokban, megfelelően a humán patológia sokszínűségének. A magas COX-2-immunpozitivitás mindig súlyos neuronkárosodással társul, azonban előfordulnak olyan esetek, amikor a súlyos károsodást alacsony COX-2-pozitivitás kíséri. Ezek lehetnek azon területek, amelyekben a károsodás már olyan mértékű, hogy transzlációs blokádnak lépett fel, akadályozva a COX-2-expresszióját.

A 8-OHdG a DNS oxidatív módosításainak, ezáltal az oxidatív stressznek alkalmazott biomarkere, A H<sub>2</sub>-kezelés egyaránt csökkenti a 8-OHdG és a COX-2-immunpozitivitást, alátámasztva ezzel antioxidáns mivoltát, ill. a szabadgyökök szerepét a COX-2-expressziójában. A kapcsolatot az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor jelenti, amelyről ismert, hogy a hidroxil-gyökök aktiválják, míg az antioxidánsok gátolják. Az NF- $\kappa$ B számos folyamatot befolyásol: az apoptózist, a sejtnövekedést, a sejtszintű stresszválaszokat és a sejten belüli jelátvitelt. Hatással van a neuronális fejlődésre, a gyulladásra és a neurodegenerációra. Az agykárosodás növeli az NF- $\kappa$ B aktivitását. A COX-2 gén az NF- $\kappa$ B egyik célpontja, ezáltal az aszfixia okozta COX-2-expresszió indukciójában is nélkülözhetetlen. Nemrégiben leírták, hogy a H<sub>2</sub>-kezelés újszülött patkányokban csökkentette az NF- $\kappa$ B aktivációt, alátámasztva elméletünket. Az NF- $\kappa$ B útvonal ugyanakkor a mikroglia aktivációjában is szerepet játszik, magyarázva ezzel a H<sub>2</sub>-kezelés mikroglia-aktivációban is megjelenő jótékony hatását.

A neuroprotekciónak másik lehetséges módját az antiapoptotikus útvonalak aktivációja jelentheti. Az endogén és az exogén BDNF is kifejtethet neuroprotektív hatást. A BDNF mRNS-ének emelkedett szintjét detektálták 48 órával PA-t követően minden agyterületen

újszülött malac HIE-modellben. Patkány HIE-modellben az exogén BDNF neuroprotektívnek bizonyult, agykamrába juttatva 7 napos patkányokban fokozta az Akt és ERK kinázok foszforilációját. Az Akt és ERK útvonalak farmakológiai befolyásolása is alátámasztotta neuroprotektív szerepüket. A mi PA/HIE modellünkben azonban az Akt és ERK aktivációja szinte teljes volt minden vizsgált agyterületen a naiv és az időkontroll csoportban is, így aszfixia hatására sem fokozódhatott sem 24, sem 48 órával az inzultust követően, ill. a H<sub>2</sub>-kezelés sem lehetett rá hatással. Annak érdekében, hogy ellenőrizzük a kapott eredményt, specifikus inhibitorokkal sikerült csökkentenünk az Akt és az ERK aktivációját.

A kinázok magas aktivációjának hátterében a malacok életkora állhat: a kísérlet kezdetén minden állat 24 óránál fiatalabb. A vaginális szülést még fiziológiás körülmények között is enyhe aszfixia kíséri, amely elegendő lehet az Akt és ERK aktivációjához. A BDNF továbbá a szülés beindításának egyik neuroendokrin komponense, így emelkedett szintjét mérték köldökzsinórvérben is. Ez éles ellentétben áll a rágcsáló modellel, ahol 7-8 napos kölyköket használnak, mert agyi érettségük akkor közelíti meg a humán újszülöttét. A szülés aktiváló hatása azonban ekkorra elmúlhat. A ténylegesen újszülött malac modell jobban megközelíti a klinikai körülményeket; ez felveti a kérdést a BDNF-terápia transzlálhatóságáról. Hasonló tapasztalatokról adott számot a Robertson-munkacsoport is a melatonin kezelés hatékonyságának vizsgálata kapcsán: bár a melatonin neuroprotektívnek bizonyult, antiapoptotikus hatását nem sikerült detektálni. Yue és munkatársainak eredményével egybehangzóan arra következtethetünk a fentiek alapján, hogy a PA/HIE-okoza neuronpusztulás elsősorban nekrosis következménye.

## KONKLÚZIÓ

Az újszülött malacban a PA fokozza a neuronális COX-2 kifejeződést: az indukció mértéke függ a PA súlyosságától, és kifejezett regionális specificitást is mutat. Kimutattuk, hogy a neocortexben a neuronális COX-2-expresszió az anesztézia hosszától is függ.

A PA hatására megemelkedő neuronális COX-2-immunpozitivitás korrelál a neuronok oxidatív károsodásával és a mikroglia-aktivációval.

Feltártuk, hogy a H<sub>2</sub>-kezelés – feltehetően antioxidáns hatásából adódóan – enyhíti a COX-2-expresszió PA-okoza fokozódását, az oxidatív stresszt és a mikroglia-aktivációt.

Az antiapoptotikus jelátviteli utak magas alap-aktivációs szintje alátámasztja azt a feltételezést, hogy a PA/HIE vizsgált időszakában bekövetkező neuronpusztulás elsősorban nekrosis eredménye.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni Dr. Jancsó Gábor Professzor Úrnak, az Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola vezetőjének, hogy doktori iskolájába felvételt nyerhettem és doktori képzésemet elvégezhettem.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Sály Gyula Professzor Úrnak, az Élettani Intézet vezetőjének, hogy lehetővé tette, hogy kutatásaimat az Élettani Intézetben végezhessem.

Köszönetet mondok témavezetőmnek, Dr. Domoki Ferencnek, hogy kutatócsoportjába csatlakozhattam, valamint, hogy tanácsaival és segítségével lehetővé tette, hogy kutatómunkámat végezhessem, ill. a doktori disszertációm elkészíthessem. Továbbá köszönöm a Kísérletes Neonatológia Kutatócsoport munkatársainak, Dr. Németh Jánosnak, Dr. Kovács Viktóriának, Remzső Gábornak és Tóth-Szűki Valériának a kísérletekben nyújtott segítségüket.

A munkacsoport nevében köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Bari Ferenc Professzor Úrnak és Dr. Temesvári Péter Professzor Úrnak, hogy a hidrogén neuroprotektív hatásának kutatását megalapozták az Élettani Intézetben 10 évvel ezelőtt.

Köszönöm Prof. Dr. Molnár Zoltánnak és munkatársainak, Anna Schoerder-Suabadissen-nek és Kris Parley-nak a laborlátogatásom során tanúsított vendégszeretetüket és támogatásukat.

Köszönöm Dr. Szigeti Csabának, Ambrus Zsuzsának és Darányi Olgának, hogy megismertették velem a tudomány és a labormunka világát.

Köszönöm Dr. Farkas Eszternek és csapatának, Dr. Varga Dánielnek, Dr. Menyhárt Ákosnak, Kiss Orsolyának, Szabó Írisznek, Frank Ritának és Dr. M. Tóth Orsolyának támogatásukat és barátságukat.

Végezetül, szívből köszönöm a töretlen szeretetet és támogatást családomnak, valamint barátaimnak: Olgának, Ágotának, Bettinek és Diának.

## A PH.D. ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

- I. Viktória Varga, János Németh, Orsolya Oláh, Valéria Tóth-Szűki, Viktória Kovács, Gábor Remzső, and Ferenc Domoki: Asphyxia-induced neuronal cyclooxygenase-2 expression is alleviated by molecular hydrogen in newborn pigs. *Acta Pharmacol Sin* [Epub ahead of print] doi: 10.1038/aps.2017.148 2018.  
IF: 3.223
  
- II. Viktória Kovács, Valéria Tóth-Szűki, János Németh, Viktória Varga, Gábor Remzső, and Ferenc Domoki: Active forms of Akt and ERK are dominant in the cerebral cortex of newborn pigs that are unaffected by asphyxia. *Life Sci* 192:1-8 2018.  
IF: 2.936



TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírott *Dr. Kovács Viktória* hozzájárulok, hogy *Varga Viktória Éva* felhasználja

*Active forms of Akt and ERK are dominant in the cerebral cortex of newborn pigs that are unaffected by asphyxia*

*Viktória Kovács, Valéria Tóth-Szűki, János Németh, Viktória Varga, Gábor Remzső, Ferenc Domoki;*

*Life Sciences, 2018., Jan 1;192:1-8. doi: 10.1016/j.lfs.2017.11.015. Epub 2017 Nov 11.*

közleményünkben foglalt eredményeinket az *SZTE ÁOK Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola Idegtudomány* programjában a PhD fokozat eléréséért benyújtott dolgozatában, és egyúttal kijelentem, hogy ezeket az eredményeket nem használtam fel tudományos fokozat megszerzésekor, s ezt a jövőben sem teszem. A szóban forgó közleményben a jelölt szerepe meghatározó fontosságú, részt vett a közleményben szereplő állatkísérletek kivitelezésben és az eredmények kiértékelésében.

Szeged, 2018. szeptember 21.

.....

Dr. Kovács Viktória