

Szegedi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar, Természettudományi és Informatikai  
Kar

Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet

**A terjedő depolarizáció farmakológiai gátlása iszkémiás stroke  
kísérletes állatmodelljében**

PhD Tézis



Szabó Írisz

Témavezető: Dr. Farkas Eszter

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Szeged, 2020

# 1. Bevezetés

## 1.1. Iszkémiás stroke és a terjedő depolarizáció

Az iszkémiás stroke az agyi vérkeringést érintő betegségek súlyos, akut formája, mely a stroke-os esetek 87%-ért felelős. Az iszkémiás szövet két fő régióra osztható: az iszkémiás mag, valamint a penumbra régió. Az iszkémiás magban a perfúzió jelentősen csökkent és az idegszövetre nekrozis jellemző. Az ezt körülvevő penumbra régióban az agyi vérkeringés (cerebral blood flow: CBF) 60-80%-al az alapáramlás alatt van. A penumbra elektrofiziológiai szempontból ugyan inaktív, de életképes szövet. Kiemelkedően fontos, hogy a penumbra funkciója helyreállítható, ezért a penumbra régió a neuroprotektív terápia lényeges célpontja. Az idő előre haladtával a penumbra régió mag régióvá alakul, így a lézió mérete nő és a neurológiai károsodás súlyosbodik. A penumbra régió mag régióvá történő átalakulása nagy részben a terjedő depolarizációk (spreading depolarization: SD) ismétlődő megjelenésének köszönhető. Az SD az idegsejtek és gliasejtek egy kritikus szöveti térfogatot érintő depolarizációs hulláma, amely az agyi szürkeállományban 2-6 mm/min sebességgel terjed. Az SD-t követően a nyugalmi membrán potenciál helyreállításában szerepet játszó ATP-függő ion pumpák (pl.:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpa) működése miatt megnő a metabolikus igény, amelyet az SD-re válaszul kialakuló hiperémiás CBF válasz elégít ki az egészséges agyszövetben. A CBF válasz jellemzően négy komponensből áll: a korai hipoperfúziót, meghatározó, tranziens hiperémia, gyakran egy késői hiperémia, majd hosszú ideig tartó oligémia követi. A csatolás az SD és a helyi CBF között iszkémiában sérül, a metabolikus szubsztrát-felhasználás és a gátolt szubsztrát-ellátásból adódó hiány tovább rontja az iszkémiával összefüggő, fennálló metabolikus stresszt, és ezzel súlyosbítja a sérülést.

## 1.2. Az SD gátlásának farmakológiai lehetőségei

Elsőnek az új ígéretes dihidropiridin-származék LA1011-et teszteltük, amely különféle hő sokk proteinek (heat shock protein: Hsp; legfőképp Hsp27 és Hsp70) ko-indukálója. Az LA1011 nem rendelkezik kalcium csatorna antagonistá tulajdonsággal, így sem vazodilatátor sem vérnyomás csökkentő hatása nincs. A krónikus LA1011 kezelés javította a tanulási képességet, megakadályozta az idegsejtek pusztulását, növelte a dendrit túske sűrűséget, és lassította a tau patológiát és az amiloid plakkok keletkezését transzgen Alzheimer-kór egér modellben, valószínűleg a protein homeosztázis fenntartásával. Mivel a Hsp27 és Hsp70 aktiválása protektívnek bizonyult iszkémiás neurodegenerációban, az LA1011 feltételezhetően Hsp ko-indukátor szerepében segíthet megőrizni a neuronális funkciókat agyi iszkémiában. ***Célul tűztük ki az LA1011 kezelés hatásának vizsgálatát a neuronális aktivitásra, az SD-re és a***

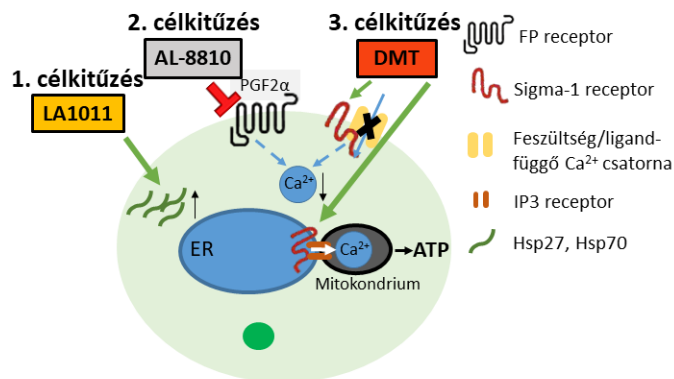
***csatolt CBF válasz kialakulására akut agyi iszkémiás patkány modellben (1. célkitűzés) (1. ábra).***

A PGF2 $\alpha$ -FP receptor jelátviteli kaszkád szintén szerepet játszik az iszkémia/reperfúzió okozta neurodegenerációban. Agyi iszkémia állat modelljében a PGF2 $\alpha$  szintje megemelkedik az agyszövetben és gerincvelői folyadékban. Az FP-receptor gén kiütött állatokban kisebb volt a neurológia károsodás mértéke és az iszkémiás lézió mérete a vad típusú egerekhez képest, valamint az FP receptor farmakológiai gátlása csökkentette az infarktus mérettel és javította a funkcionális teljesítményt fokális iszkémia egér modelljében. A PGF2 $\alpha$ -FP receptor jelátvitel agyi iszkémiában betöltött központi szerepe és az SD jelentőségének ismerete alapján azt feltételeztük, hogy az SD központi szereplője lehet az FP receptor aktivációjához köthető iszkémiás idegszöveti sérülésnek. Feltételeztük, hogy az SD hatására akkumulálódó PGF2 $\alpha$  aktiválhatja a neuronális FP receptorokat, amely közvetlenül neuronális sejtpusztuláshoz vezet. Ezzel együtt a PGF2 $\alpha$ -FP receptor jelátvitel az agyi keringést is befolyásolva vazokonstriktációt okoz, mely tovább csökkenti a neuronok túlélési esélyét penumbrára jellemző iszkémiás állapotban. ***A munkánk célja volt az FP receptor gátlás védő hatásának felmérése az SD és a hozzá köthető neurodegeneráció ellen (2. célkitűzés) (1. ábra).***

Az *N,N*-Dimetiltriptamin (DMT) egy indol alkaloid, mely a növényekben található meg (pl.: *Psychotria viridis* és *Diplopterys cabrerana*) és pszihedelikus hatása miatt jól ismert (pl.: ayahuasca főzet). A DMT úgyszintén megtalálható emlős szövetekben (pl.: tüdő, tobozmirigy, agy) és testnedvekben is (vizelet, vérplazma, gerincvelői folyadék), mint endogén trace amin. Az endogén DMT fiziológiai és patofiziológiai szerepe a mai napig vita tárgyát képezi. A DMT szintje környezeti stressz (áramütés) hatására megnövekszik rágszáló agyban. Továbbá a szívfunció megszűnésének kísérletes állat modelljében is kimutatták, hogy a DMT agyi szintje megemelkedett. Végül a közelmúltban leírták, hogy a DMT képes kivédeni a hipoxia és a fokális iszkémia károsító hatását.

A DMT farmakológiai hatásmechanizmusának feltérképezése során kimutatták, hogy számos jelátviteli utat modulál, affinitást mutat például biogén amin receptorok, uptake receptorok és trace amin-kapcsolt receptorokkal. Kiemelkedően fontos, hogy a DMT bizonyított endogén agonistája a sigma-1 receptornak (Sig-1R). A Sig-1R egy intracelluláris receptor, mely az endoplazmatikus retikulum (ER) mitokondriummal összefekvő membránján (mitochondria-associated ER membrane, MAM) található. A Sig-1R a mitokondrium Ca<sup>2+</sup> felvételét szabályozza a MAM-on keresztül, bizonyos kálium csatornák expresszióját modulálja, csökkenti a szabadgyökök képződését és végeredményben a sejtek túlélését segíti elő. ***Célul tűztük ki a DMT Sig-1R-on kifejtett neuroprotektív hatásának vizsgálatát kísérletes, tranzien***

*előagyi iszkémia akut szakaszában, melyet SD kiváltással és tranzienst hipoxiával súlyosbítottunk. (3. célkitűzés) (1. ábra).*



**1. ábra:** A kísérletek céljainak ábrázolása sematikus sejten (neuron, asztrocita, simaizom sejt) a sejtben található farmakológiai beavatkozások célpontjaival. Rövidítések: ATP: adenosin trifoszfát, DMT: *N,N*-dimethyltryptamine, ER: endoplazmatikus retikulum, Hsp: heat shock protein, IP3 receptor: inozitol trifoszfát receptor, PGF2 $\alpha$ : prosztaglandin-F2 $\alpha$ .

## 2. Anyagok és módszerek

Fiatal, hím Sprague-Dawley patkányokat (n=132) használtunk a kísérletekben. Az állatokat 1,5-2% izofluránnal altattuk N<sub>2</sub>O:O<sub>2</sub> (3:2) gázelegységben. Az LA1011-es második kísérletsorozatban  $\alpha$ -kloralózzra vezettük át az altatást az adatgyűjtés alatt. A bal artéria femoralist megkanuláltuk az artériás középnyomás (mean arterial blood pressure: MABP) folyamatos monitorozásának céljából. Az altató vagy a vizsgálni kívánt anyag beadásának céljára a femorális véna kanült ültettünk be. Az artéria carotisokat kipreparáltuk a későbbi előagyi iszkémia előidézésére. Két koponya ablakot készítettünk a jobb parietális koponyaacsonton, melyek közül a rostrális ablakból elektrofiziológiai és CBF regisztrátumokat vezettünk el, a kaudális ablakban 1M KCl-dal SD-kezelést váltottunk ki. Az AL-8810-es kísérletek esetében ez fordítva történt, valamint a koponyaacsont nagy részét elvékonyítottuk, hogy a CBF változásokat lézer speckle kontraszt képalkotással (LSCI) térben is követhessük. A kísérletek végén az altatót túladagoltuk, vagy az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk további hisztológiai vizsgálatok céljából.

### 2.1. Az új dihidropiridin-származék LA1011 vizsgálata

Az kísérletek első felében az LA1011-et (Richter Gedeon Nyrt. tulajdona, 1 mg/ttkg 0,4 ml fizioológias sóoldatban) vagy annak oldószerét (fizioológias sóoldat) intraperitoneálisan, előkezelésben adagoltuk az állatoknak kétszer egy nap két héten keresztül. A második kísérletsorozatban topikálisan mostuk a koponyaablakokra az LA1011-et (100  $\mu$ M aCSF-ben) vagy annak oldószerét (aCSF) 5 perc alapfelvételt követően. Az első sorozatban három SD-ét váltottunk ki 1 M KCl-dal a kezelt és kezeletlen csoportban, míg a második sorozatban a 30 perc LA1011 inkubáció után mindkét artéria carotist elszorítottuk (two-vessel occlusion: 2VO). Kontrollként álműtött állatok szolgáltak. Tizenöt perccel a 2VO után mechanikai

bajuszingerlést végeztünk. Ezután az első sorozathoz hasonlóan három SD-ét váltottunk ki. A kezelésekből fakadóan (anyagok, 2VO) hat kísérleti csoportunk volt.

## **2.2. Az FP receptor gátlása AL-8810-zel**

Tíz perc alapfelvétel után mindkét artéria carotist elzártuk. Az AL-8810-et (1 mg/ttkg, dimetilszulfoxiddal (DMSO) oldva, Sigma-Aldrich, USA) vagy annak oldószerét intravénásan bólusban adtuk az állatoknak 1 ml térfogatban, tíz perccel a 2VO kezdete után. Az SD-eket 1 M KCl-dal váltottuk ki húsz perccel az anyag beadása után. Az érelzárás feloldásával reperfüziót hoztunk létre, mely alatt az állatok 1% izofluránon aludtak. Az állatokat 3 órával később klorálhidrát altatásra áttérve hideg fiziológiás sóoldattal transzkardiálisan perfundáltuk, amelyet 4% paraformaldehidos perfúzió követett. Az apoptózis mértékét hasított kaszpáz-3 (cleaved caspase-3: CC3) immunhisztolói festéssel mértük fel. Vizsgáltuk továbbá a CC3 ko-lokalizációját neuronális mag protein (neuronal nuclear protein: NeuN) neuron markerrel, és gliális savas protein (glial fibrillary acidic protein: GFAP) asztrocita markerrel. Az FP receptor ko-lokalizációját is feltártuk neuronnal, asztrocitával és agyi vaszkuláris sejtes összetevőkkel. Mikroglia aktivációt is vizsgáltuk Iba-1 markerrel.

## **2.3. A Sig-1R agonizmus DMT-vel**

Az összes használt anyagot fiziológiás sóoldatban oldottuk és 1 mg/ttkg/óra koncentrációban adtuk az állatoknak folyamatosan a kísérleti protokoll időtartama alatt a femorális vénán keresztül. A következő anyagokat használtuk: DMT, nagy szelektivitású Sig-1R agonista PRE-084, szelektív Sig-1R antagonist NE-100 önmagába vagy DMT-vel kombinálva, és a nem specifikus szerotonin receptor (5-HT<sub>2</sub>) antagonist azenapin önmagában vagy DMT-vel kombinálva. A kontroll csoport fiziológiás sóoldatot, az anyagok oldószerét kapta.

Öt perc alapfelvételt követően agyi iszkémiát indukáltunk az állatokban 2VO-val. A DMT-t, PRE-084-et vagy az oldószert a 2VO után közvetlenül kezdtük infundálni az állatoknak. A receptor blokkolókkal kezelt csoportokban (önmagukban vagy DMT-vel kombinálva) az NE-100-t és az azenapint tíz perccel az iszkémia indukció előtt kezdtük el adagolni. A 2VO után három SD-ét váltottunk ki a fent leírt módon, majd tranziens hipoxiát indukáltunk az O<sub>2</sub> részleges megvonásával az altató gázból (kb. fél-1 perc). A kísérleti protokollt az 2VO feloldásával egy órás reperfüzió zárta altatásban.

Naiv, kontroll és DMT kezelt állatokat transzkardiálisan perfundáltunk és koronális agyszeletek készítettünk. Apoptotikus sejthalált (CC3), és ferroptózist vizsgáltunk (4-hidroxinonenal: 4-HNE) immunhisztokémiával, valamint neuron (NeuN) és asztrocita (GFAP) sérülést. Mikroglia

aktivációt mértünk Iba-1 immunhisztokémiával. Annak céljából, hogy meghatározzuk a Sig-1R kifejeződését. ko-lokalizáltuk NeuN-nel, GFAP-val és Iba-1-gyel naiv állatokban.

### **3. Eredmények**

#### **3.1. Az új dihidropiridin-származék LA1011 vizsgálata**

##### **3.1.1. Fiziológiai paraméterek és az alap CBF változásai**

Sem az iszkémia sem a kezelés nem okozott különbséget a csoportok között a fiziológiai paramétereket tekintve (MABP, artériás vér pH, artériás O<sub>2</sub> és CO<sub>2</sub> nyomás).

A farmakológiai kezelések hatásait a CBF alapvonalra a kísérleti protokoll során kiválasztott időpontokban vizsgáltuk. Az iszkémia indukció a második sorozatban a CBF határozott csökkenését okozta (53±23%), amely a kezelésre nézve kontroll csoportban 74±11%-on stabilizálódott az első SD előtt, majd 67±15%-on az ezt követő SD-k előtt (recurrent SD: rSD). Az első SD oligémiát okozott, amely a hosszan elhúzódó (30-60 perc) utolsó összetevője az SD-re adott CBF válasznak, tehát a következő SD-k az oligémiára épülve alakultak ki. Sem a krónikus sem pedig az akut LA1011 kezelés nem változtatta meg a CBF alapáramlást a vizsgált időpontokban.

##### **3.1.2. Szomatoszenzoros stimulálás**

A második sorozatban az LA1011 hatását vizsgáltuk a neurovaszkuláris csatolásra, a szomatoszenzoros kiváltott potenciálokra (evoked field potential: EFP) és a hozzájuk társuló CBF válaszra, melyet bajuszingerléssel váltottunk ki és a szomatoszenzoros barrel kortexben vizsgáltunk. Az EFP-ék amplitúdója nagymértékben csökkent iszkémiás körülmények között az intakt körülményekhez viszonyítva. Az LA1011 kezelésnek nem volt hatása az EFP-ékre. Az ingerlésre adott hiperémiás válasz amplitúdója kisebb volt iszkémiában az intakt állapothoz képest. A farmakológiai kezelés a funkcionális hiperémia amplitúdóját sem változtatta meg.

##### **3.1.3. Terjedő depolarizáció**

Kóros állapotban, kísérletesen kiváltott SD-ken és a kapcsolódó CBF válaszon vizsgáltuk a kezelés hatását. Mivel az első SD különbözött az rSD-éktől, ezért ezeket külön-külön vizsgáltuk. A részletes analízis az rSD-ékre vonatkozik. Korábbi tapasztalatainknak megfelelően iszkémiában az SD-ék amplitúdója nem változott, miközben az időtartamuk növekedett az intakt csoportokhoz képest. A krónikus és az akut LA1011 kezelés is növelte az SD-ék amplitúdóját az iszkémiától függetlenül.

Az SD-vel járó CBF válasz egyes elemeinek részvételi aránya a teljes CBF válaszban állatfajonként és a használt altatónként is változhat, illetve a szövet aktuális metabolikus állapota is nagymértékben befolyásolhatja. Az analízisünk elsősorban a hiperémiára irányult.

A késői hiperémia mértéke változó volt az egyes események esetén, így a CBF válaszok osztályozásában a késői hiperémia jelenlétét vettük alapul. Megkülönböztettünk 1-es típusú CBF választ, melyben csak a tranziens csúcs hiperémiát figyeltük meg, és 2-es típusú CBF választ ahol a csúcs hiperémia mellett a késői hiperémia is megjelent. A kontroll intakt csoportban a két CBF válasz típus előfordulási gyakorisága nagyjából egyező volt. Ezzel szemben mind az iszkémia mind az LA1011-es kezelés növelte a 2-es típusú CBF válasz megjelenésének valószínűségét. A hiperémia amplitúdójában és időtartamában nem volt különbség a csoportok között sem az LA1011 kezelést, sem pedig az iszkémiát tekintve.

### **3.2. Az FP receptor gátlása AL-8810-zel**

#### **3.2.1. Fiziológiai paraméterek**

A szisztémás fiziológiai változók a normál tartományon belül mozogtak végig a kísérleti protokoll során. Az iszkémia növelte a MABP-t (pl.: kontroll csoport:  $85,3 \pm 10,5$  vs.  $78,0 \pm 9,3$  Hgmm, iszkémia vs. alapvonal) és az artériás  $pO_2$ -t (pl.: kontroll csoport:  $110,9 \pm 11,8$  vs.  $105,4 \pm 15,1$  Hgmm, iszkémia vs. alapvonal), ahogy más iszkémiás modellekben is. Az AL-8810-es kezelés nem okozott mérhető változást a vizsgált változóknakban.

#### **3.2.2. Terjedő depolarizáció**

Vizsgáltuk, hogy az FP receptor gátlása AL-8810-zel hatással volt-e az SD-k előfordulására vagy időtartamára. Az első, kontrolláltan kiváltott SD tekintetében minden SD tranziens volt és nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között (pl. amplitúdó:  $-18,3 \pm 2,7$  vs.  $-18,0 \pm 2,6$  mV, AL-8810 vs. kontroll; fél amplitúdónál mért időtartam:  $55 \pm 25$  vs.  $56 \pm 19$  s, AL-8810 vs. kontroll).

Az első SD után a KCl-os vattát az agykérgen hagytuk, folyamatosan váltottunk ki SD-eket. Az rSD-eket a következőképpen kategorizáltuk a DC potenciálon megjelenő változás alapján: (i) tranziens, (ii) elhúzódó és (iii) küszöb alatti amplitúdójú SD. Ezután vizsgáltuk az előfordulásukat az összes SD-hez viszonyítva. Az AL-8810-zel történő FP receptor gátlás megakadályozta az elhúzódó SD-k kialakulását (0 vs. 15%, AL-8810 vs. kontroll) és növelte a küszöb alatti amplitúdójú SD-k előfordulását (25 vs. 5%, AL-8810 vs. kontroll). Emellett a tranziens SD-ék aránya a két csoportban számottevően nem változott (75 vs. 80%, AL-8810 vs. kontroll).

A részletes kvantitatív analízisnél a tranziens SD-kre fókuszáltunk. Hasonlóan a kontrolláltan kiváltott SD-khez az a folyamatosan kiváltott SD-k amplitúdójában sem volt különbség a két csoport között ( $-17,5 \pm 2,4$  vs.  $-16,9 \pm 3,1$  mV, AL-8810 vs. kontroll). Mindazonáltal az AL-8810 gyorsította a repolarizáció sebességét ( $0,84 \pm 0,4$  vs.  $0,45 \pm 0,22$  mV/s, AL-8810 vs.

kontroll) és ezzel együtt csökkentette az SD-ék időtartamát ( $30\pm 10$  vs.  $56\pm 14$  s, AL-8810 vs. kontroll) és kumulatív hosszát is a kontroll csoporthoz képest ( $304\pm 71$  vs.  $577\pm 154$  s, AL-8810 vs. kontroll). Ebből fakadóan az egyes SD-ék görbe alatti területe is csökkent az AL-8810 kezelés hatására a kontroll csoporthoz képest ( $585\pm 192$  vs.  $942\pm 251$  mV\*s; AL-8810 vs. kontroll).

Az LSCI nyújtotta térbeli felbontás lehetővé tette az SD-re adott CBF válasz átfogó analizisét. Az elektródánál megjelenő tranziens SD-kre (amplitúdó > 10 mV, időtartam < 3 perc) és az arra adott CBF válaszokra koncentráltunk az analizisünkben. Mivel több ROI-n vizsgáltuk a CBF válaszok változásait, azt figyeltük meg, hogy a CBF válasz kinetikája megváltozik az SD terjedésével. Hiperémiás CBF választ leginkább a nyitott koponyaablakban figyeltünk meg, közel az elektródához (92 és 100%, AL-8810 és kontroll). Az ugyanarra az SD-re adott CBF válaszokat gyakran nem tudtuk követni az elvékonyított csontra helyezett ROI-kon (anterior: 31 és 48%, posterior: 35 és 26%, AL-8810 és kontroll). Végül leggyakrabban a kontroll csoportban figyeltük meg, hogy a CBF válasz alkalmanként hipoperfúzióvá alakult az anterior ROI-hoz érve, amelyet a mediális fronto-parietális kortex fölé helyeztünk (12 és 22%, AL-8810 és kontroll).

A CBF részletes analizise szerint az AL-8810 kezelés hatására az alap CBF magasabbnak bizonyult az első SD-t megelőzően a kontroll csoporthoz képest (pl. laterális ROI:  $73,0\pm 13,8$  vs.  $56,8\pm 6,3\%$ ; AL-8810 vs. kontroll) és így növelte az SD-hez társuló hiperémia abszolút amplitúdóját (pl. laterális ROI:  $104,1\pm 25,0$  vs.  $76,0\pm 8,6\%$ , AL-8810 vs. kontroll). Továbbá, az AL-8810 kezelés a hipoémiás CBF válaszokat, amely a hipoperfúziók kisebb amplitúdójában mutatkozott meg ( $-5,4\pm 1,7$  vs.  $-14,0\pm 1,8$  pp., AL-8810 vs. kontroll). Az SD-k okozta perfúzió csökkenés is kisebb mértékű volt az AL-8810 kezelt csoportban, amely magasabb CBF szintet eredményezett a reperfúzió előtt ( $68,2\pm 14,5$  vs.  $58,6\pm 9,6\%$ , AL-8810 vs. kontroll). Végezetül, az SD-eket követő CBF válaszok terjedése gyorsabb volt az AL-8810-zel kezelt csoportban a kontroll csoporthoz képest ( $3,0\pm 0,7$  vs.  $2,4\pm 0,5$  mm/min, AL-8810 vs. vehicle).

### **3.2.3. Alfa/delta arány (alpha-to-delta ratio: ADR)**

ECoG teljesítményt számoltunk az alfa és delta frekvencia sávokra nézve és kifejeztük arányukat (ADR) a kísérleti protokoll négy kiválasztott időpontjában. Az iszkémia indukció és AL-8810 kezelés előtt mért ADR a két csoportban megegyezett ( $0,67\pm 0,20$  és  $0,63\pm 0,29$ ; AL-8810 és kontroll) és hasonló maradt a két csoportban fél órán keresztül az iszkémiát és az AL-8810 adminisztrációt követően ( $0,81\pm 0,36$  és  $0,65\pm 0,26$ ; AL-8810 és kontroll). A két kontrolláltan kiváltott SD-t követően az ADR lecsökkent mindkét kísérleti csoportban



( $0,45\pm 0,23$  és  $0,36\pm 0,22$ ; AL-8810 és kontroll). Öt perccel a reperfüzió kezdete után az ADR emelkedett az AL-8810-zel kezelt csoportban ( $0,66\pm 0,29$  vs.  $0,35\pm 0,17$ ; AL-8810 vs. kontroll).

#### **3.2.4. AL-8810 indukálta neuroprotekción**

CC3+ sejteket figyeltünk meg a striatális, hippokampális és kortikális területeken mindkét csoportban, jóllehet a CC3 jelölt sejtek száma jóval kisebb volt az AL-8810 kezelt állatokban. A CC3 kolokalizációja NeuN-nel és GFAP-val bizonyította, hogy a megfigyelt apoptózis a neuronokat és az asztrocitákat is érintette. Mivel kifejezettebb apoptózist vártunk az SD által érintett agyféltekében, ezért a CC3+ sejt számokat a kontralaterális oldalhoz normalizáltuk. Az AL-8810 neuroprotektív hatását jelezte, hogy a kezelt csoportban a CC3+ sejtek aránya az ipszilaterális kéregben alacsonyabbnak bizonyult (pl. szomatoszenzoros és occipitális kortex:  $94,4\pm 12,6\%$  vs.  $112,9\pm 7,0\%$ ;  $104,3\pm 17,6\%$  vs.  $125,7\pm 17,7\%$ , AL-8810 vs. kontroll).

A mikroglia aktiváció az iszkémiás sérülésre adott gyors gyulladáshozos válaszreakció. Korábban leírták, hogy napokkal a kísérletesen előidézett agyi sérülés után az AL-8810 gátolta a mikroglia-aktivációt. Szövetmintáinkban igen intenzív Iba-1 jelölődést figyeltünk meg. Bár a két agyféltekében a mért mikroglia sejtszám a farmakológiai kezeléstől függetlenül hasonló volt ( $31\pm 7$  és  $28\pm 6$ , kontra- és ipszilaterális oldal) a mikroglia nyúlványok sűrűsége az ipszilaterális oldalon csökkent, ami kifejezettebb mikroglia-aktivációt jelez (ramifikációs index:  $112,7\pm 55,4$  vs.  $174,2\pm 73,8$ , ipszi- vs. kontralaterális oldal). Az AL-8810 kezelésnek nem volt hatása a mikroglia ramifikációjának mértékére (ramifikációs index:  $148,6\pm 63,8$  and  $138,3\pm 80,3$ , kontroll és AL-8810).

#### **3.2.5. FP receptor ko-lokalizáció**

Az FP receptort újszülött és felnőtt malacok szinaptoszóma-preparátumában és mikroereiben, valamint patkány asztrocita sejt kultúrában már azonosították. Célunk volt az FP receptorok kimutatása neuronon, glián (asztrocita és mikroglia) és az agyi érfalat alkotó sejteken (endotél és sima izom sejt), amelyeket az AL-8810 lehetséges célpontjainak tekintettünk. Az FP receptor lokalizációja NeuN-nel és GFAP-val feltárta, hogy az FP receptorok az idegsejtekben leginkább a magmembránban találhatóak, míg asztrocitákban a perikarionban és a végtalpakban lokalizáltak. Az FP receptor nagymértékű kolokalizációját figyeltük meg Iba-1 jelölt mikrogliaikkal. Az FP receptor megfigyeltük továbbá a claudin jelölt agyi mikrovaszkuláris endotél sejtekben. Azonban nem találtunk egyértelmű FP receptor lokalizációt a  $\alpha$ -aktin jelölt agyi mikrovaszkuláris simaizom sejtekben.

### **3.3. A Sig-1R agonizmusa DMT-vel**

#### **3.3.1. Fiziológiai paraméterek**

A vérgáz értékek a fiziológiás tartományban mozogtak végig a kísérleti protokoll során, habár szignifikánsan eltértek a reperfúzió alatt mért értékek a kezdeti és az iszkémia/hipoxia alatt mért értékektől. Leginkább a vér pH szintje mutatott csökkenést a reperfúzió alatt (pH  $7,27\pm 0,17$  vs.  $7,31\pm 0,11$  and  $7,30\pm 0,12$ , reperfúzió vs. alapvonal és iszkémia/hipoxia;  $F=2,525$ ,  $p<0,085$ ), a  $p\text{CO}_2$  szintje növekedett ( $42,3\pm 13,6$  vs.  $33,2\pm 7,6$  and  $34,3\pm 10,5$  Hgmm, reperfúzió vs. alapvonal és iszkémia/hipoxia;  $F=9,102$ ,  $p<0,0003^{**}$ ) és a  $p\text{O}_2$  szintje csökkent ( $99,6\pm 24,3$  vs.  $111,2\pm 17,0$  and  $108,4\pm 26,6$ ;  $F=3,534$ ,  $p<0,033^*$ ).

A mért MABP értékek az altatás megfelelő mélységét bizonyították. A MABP kicsit emelkedett iszkémia alatt ( $83\pm 8$  vs.  $77\pm 4$  Hgmm, iszkémia vs. alapvonal) és lesett a tranziens hipoxiának köszönhetően ( $66\pm 8$  Hgmm-re). A DMT-nek nem volt hatása a MABP-ra ( $F=0.125$ ,  $p<0.738$ ). A pulzus stabil volt végig a kísérleti protokoll alatt (pl. kontroll csoport:  $331\pm 27$ ,  $327\pm 41$  és  $319\pm 43$  bpm, alapvonal, iszkémia és reperfúzió;  $F=0.012$ ,  $p<0.918$ ). A DMT enyhén növelte a pulzust, de nem szignifikáns módon (pl. reperfúzió:  $344\pm 19$  vs.  $319\pm 43$  bpm, DMT vs. kontroll;  $F=1.290$ ,  $p<0.307$ ).

Az iszkémia indukció után a CBF nagymértékben csökkent majd az első SD előtt  $40,3\pm 4,8$  %-on stabilizálódott. A rövid hipoxiát megelőzően a CBF  $34,2\pm 10,1$  % körül mozgott a kontroll csoportban. A hipoxia után a perfúzió tovább csökkent ( $28,3\pm 5,4$  %-ra). A visszafogott reaktív hiperémia reperfúziót követő csúcsa  $70,1\pm 17,8$  % volt. A CBF alapvonal változását a DMT nem befolyásolta egyik kiválasztott időpontban sem.

### **3.3.2. A DMT hatása a terjedő depolarizációra**

A DMT kezelés hatására szignifikánsan csökkent az SD amplitúdója ( $-16,5\pm 4,1$  vs.  $-20,1\pm 1,3$  mV, DMT vs. kontroll), a depolarizáció meredeksége ( $-2,62\pm 1,28$  vs.  $-3,48\pm 0,94$  mV/s, DMT vs. kontroll), és az SD-k kumulatív időtartama ( $140\pm 38$  vs.  $191\pm 42$  s, DMT vs. kontroll).

A Sig-1R részvételét a DMT SD-re gyakorolt gátló hatásában úgy mértük fel, hogy a kísérleteinket megismételtük a magas szelektivitású Sig-1R agonista PRE-084-el, és a Sig-1R antagonistá NE-100 és DMT kombinált használatával. PRE-084 kezelés hatására is csökkent az SD amplitúdója és a depolarizáció meredeksége a DMT kezeléssel megegyező módon (pl. amplitúdó:  $-16,2\pm 5,6$  vs.  $-20,1\pm 1,3$  mV, PRE-084 vs. kontroll; depolarizáció meredeksége:  $-2,26\pm 1,06$  vs.  $-3,48\pm 0,94$  mV/s, PRE-084 vs. kontroll), illetve rövidült az SD-ék kumulatív időtartama ( $149\pm 31$  vs.  $191\pm 42$  s, PRE-084 vs. kontroll). Az NE-100 önmagában alkalmazva nem okozott semmilyen változást az SD paramétereiben (pl. amplitúdó:  $-18,7\pm 2,6$  vs.  $-20,1\pm 1,3$  mV, NE-100 vs. kontroll). A DMT-vel összehasonlítva az NE-100 és DMT együttes adása nem okozott változást az SD amplitúdójában ( $-19,2\pm 4,5$  vs.  $-20,1\pm 1,3$  mV, NE-

100+DMT vs. kontroll) a depolarizáció meredekségében ( $-3,06 \pm 1,18$  vs.  $-3,48 \pm 0,94$  mV/s, NE-100+DMT vs. kontroll) és a kummulatív időtartamban sem ( $220 \pm 12$  vs.  $191 \pm 42$  s, NE-100+DMT vs. kontroll).

Ellenőriztük azt a lehetőséget is, hogy a DMT esetleg az 5-HT receptorokat (is) aktiválja és így blokkolja az SD-t. Ennek vizsgálatára a széles spektrumú 5-HTR antagonistá az enapint használtuk önmagában vagy DMT-vel kombinálva. Az SD amplitúdója szignifikánsan megnövekedett az enapin kezelés hatására a kontroll csoporthoz viszonyítva ( $-22,6 \pm 2,6$  vs.  $-20,1 \pm 1,3$  mV, az enapin vs. kontroll). Az enapin és a DMT együttes alkalmazása visszaállította az amplitúdó mértékét a kontroll szintre ( $-19,1 \pm 1,3$  vs.  $-22,6 \pm 2,6$  mV, az enapin+DMT vs. az enapin). Ez az eredmény azt mutatja, hogy a DMT SD csökkentő hatása, legalábbis részben, a Sig-1R-on keresztül valósul meg.

A CBF válasz négy elemét tekintve az analízisnél a csúcs hiperémia fázisra helyeztük a hangsúlyt, amely minden SD esetén megfigyelhető volt. Az analízist a második és harmadik SD-hez köthető hiperémiás válaszokra szűkítettük le, mivel lefutásában az első SD-re adott CBF válasz eltér többitől. Kísérletünkben az SD-ket követő hiperémia egyik farmakológiai kezelés hatására sem változott, beleértve a DMT vagy a PRE-084-el kezelt csoportokat is. Ahogy más paraméterek (pl. amplitúdó vagy időtartam), úgy a hiperémiás válasz mértéke a görbe alatti területet alapul véve hasonló maradt az összes csoportban.

### **3.3.3. A DMT hatásának és a Sig-1R kifejeződésének szövettani jellemzése**

Az idegsejtek túlélését a NeuN jelölt idegsejtek terület-arányával jellemeztük a szomatoszenzoros kéregben és a hippocampusban. A naiv állatokhoz viszonyítva semmilyen különbséget nem találtunk az iszkémia/hipoxia/reperfúzió átesett állatokban (pl. szomatoszenzoros kortex:  $19,9 \pm 1,9$  vs.  $19,3 \pm 1,4\%$ , kontroll vs. naiv). SD-vel járó idegsejt pusztulást sem figyeltünk meg (e.g. somatosensory cortex:  $19,5 \pm 3,1$  vs.  $20,2 \pm 3,2\%$ , ipszi- vs. kontralaterális oldal az SD-hez képest). Végezetül a DMT kezelésnek sem volt semmilyen hatása a NeuN jelölődésre (pl. kontralaterális szomatoszenzoros kéreg:  $17,4 \pm 2,0$  vs.  $19,9 \pm 1,9\%$ , DMT vs. kontroll).

A neuronok a hippocampus CA1 és gyrus dentatus (GD) területén, melyeknek alacsony az iszkémiás toleranciája, olyan szorosan helyezkednek el, hogy a NeuN festés térbeli felbontása nem fedi fel a szórványos sejtkárosodást. Ezért az apoptotikus sejthalál vizsgálatára CC3 immunológiai festést végeztünk. Míg a naiv állatok agyszeleteiben gyakorlatilag nem volt számottevő CC3 jelölődés (pl. GD:  $163 \pm 14$  CC3+ sejt/mm<sup>2</sup>), az oldószerrel kezelt iszkémia/hipoxia/reperfúzió átesett állatok agykérgében, hippocampus CA1 régiójában és a

GD-ban a CC3+ sejtek egyértelműen kirajzolódtak (GD:  $1649 \pm 278$  CC3+ sejt/mm<sup>2</sup>). Feltételeztük, hogy az SD kiváltás hatására az apoptózis az ipszilaterális féltekén kifejezettebb, de sejtésünk nem igazolódott (kontroll csoport:  $106 \pm 46$  vs.  $104 \pm 67$  CC3+ sejt/mm<sup>2</sup>, ipszi- vs. kontralaterális). A két agyféltekében számolt sejt számokat ezért régióként átlagoltuk. Szignifikánsan kevesebb CC3+ sejtet számoltunk a DMT kezelt állatokban a kontroll csoporthoz viszonyítva a szomatoszenzoros kortexben ( $66 \pm 33$  vs.  $105 \pm 56$  CC3+ sejt/mm<sup>2</sup>, DMT vs. kontroll), a hippocampus CA1 régiójában ( $532 \pm 268$  vs.  $893 \pm 249$  CC3+ sejt/mm<sup>2</sup>, DMT vs. kontroll) és a GD-ben ( $1367 \pm 311$  vs.  $1649 \pm 278$  CC3+ sejt/mm<sup>2</sup>, DMT vs. kontroll). Az apoptózis mellett az iszkémiás/hipoxiás inzultus az oxidatív stresszel kapcsolatos ferroptózist okozhat, mely a programozott sejthalál alternatív útvonala. A ferroptózis tipikus jellemzője a vas-függő lipid hidroperoxid akkumuláció, így a folyamat vizsgálható 4-HNE immunohisztokémiával. Reprezentatív vizsgálattal azt találtuk, hogy a kísérleti protokollunk bizonyíthatóan ferroptózist okozott egyes idegsejtekben, leginkább a hippocampusban, melyet a DMT kezelés csökkentett.

Az asztrocitákról ismert, hogy iszkémia alatt az idegsejteket támogatják, illetve a GFAP+ protoplazmás asztrociták kifejezetten érzékenyek az iszkémiás inzultusra. Kísérleteinkben értékeltük a DMT hatását a GFAP jelölt asztrocitákra. A GFAP jelölt területarány nagymértékben csökkent iszkémia/hipoxia/reperfúzió előidézése után a naiv állatokhoz viszonyítva. A DMT kivédte a GFAP jel iszkémiával kapcsolatos gyengülését a kortexben és a striátumban (kortex  $3,2 \pm 1,9$  vs.  $1,5 \pm 0,3$  vs.  $4,7 \pm 0,9\%$ , striátum:  $2,3 \pm 1,1$  vs.  $0,9 \pm 0,2$  vs.  $3,2 \pm 0,6\%$ , DMT vs. kontroll vs. naiv), de a hippocampusban nem (pl. CA1 stratum oriens  $10,6 \pm 4,9$  vs.  $11,1 \pm 5,8$  vs.  $15,5 \pm 2,7\%$ , DMT vs. kontroll vs. naiv).

Az iszkémiás inzultus mikroglia aktivációt és neuroinflammációt okoz, melynek szabályozásában a Sig-1R is részt vehet. A kraniotómiához és az SD kiváltáshoz viszonyítva ipszilaterálisan csökkenő mikroglia arborizáltságot vártunk az agykéregben, amely magasabb fokú mikroglia aktivációt jelez. Korábbi eredményeinkkel összhangban, a mikroglia nyúlványozottsága nagyobb mértékű volt az ipszilaterális oldalon a kontralaterálishoz képest (kontroll csoport:  $106,6 \pm 50,5$  vs.  $194,3 \pm 95,6$ , ipszi- vs. kontralaterális). A DMT kezelésnek nem volt hatása a mikroglia-aktivációt jellemző ramifikációs indexre (pl. ipszilaterális kortex:  $89,5 \pm 37,4$  vs.  $106,6 \pm 50,5$  DMT vs. kontroll).

Végezetül, hogy azonosíthassuk azokat a sejteket, amelyek a DMT hatásmechanizmusában szerepet játszhatnak, a Sig-1R-t fluoreszcens immuncitokémiai módszerrel ko-lokalizáltuk neuronokkal, asztrocitákkal és mikrogliaival naiv állatokban. A Sig-1R kifejeződése jelentősnek bizonyult a neuronokban, asztrocitákban és nyugvó mikrogliaiban.

## **4. Diszkusszió**

### **4.1. Az új dihidropiridin-származék LA1011 vizsgálata**

#### **4.1.1. Az LA1011-nek nem volt hatása a CBF alapvonal változására és a kiváltott potenciálra**

A hagyományos dihidropiridin származékok (pl. nifedipin, nimodipin) növelik az CBF-et. Ezzel szemben az LA1011 kezelés alatt a CBF alapvonal változatlan maradt. Eredményeink szerint az LA1011 a neuronok ingerlékenységét nem befolyásolta az intakt kéregben, iszkémiás körülmények között nem állította helyre az EFP-ék amplitúdóját és a szomatoszenzoros ingerléssel járó hiperémiát sem rendezte. Eredményeink azt bizonyítják, hogy az iszkémia korai fázisában az LA1011 kezelés nem őrzi meg a neuronok ingerelhetőségét, és a neurovaszkuláris csatolás hatékonyságát.

#### **4.1.2. Az LA1011 növelte az SD amplitúdóját, de nem volt hatással a CBF válaszra**

Az LA1011 kezelés nagymértékben növelte az SD amplitúdóját minden kísérletes kondícióban. Az SD amplitúdójának mértéke erős pozitív korrelációban áll az extracelluláris kálium koncentrációval, mely arra enged következtetni, hogy a Hsp ko-induktor LA1011 az SD-vel történő sejtes (valószínűleg neuronális) kálium effluxot fokozhatja. Valóban, a magas hőmérséklettel történő prekondicionálás visszafordította a depolarizációk anoxia okozta kálium csúcsának eltűnését, továbbá a Hsp70 expresszió szabályozta a kálium homeosztázisát drosophila agyban oxigén megvonásakor. A TNF $\alpha$  dóziszfüggő módon csökkent a SD amplitúdóját. Érdekes módon kimutatták, hogy a Hsp70 overexpressziója – mely az LA1011 egyik célpontja –csökkenti a TNF $\alpha$  mRNS szintjét oxigén-glükóz megvonásnak (oxygen–glucose deprived: OGD) kitett asztrocita kultúrában. Feltételezhető, hogy az LA1011 által megnövelt SD amplitúdót valószínűleg a Hsp70 ko-indukciója eredményezte, mivel csökkentette a TNF $\alpha$  szintjét, amely az SD amplitúdóját csökkentené.

Az SD-re adott CBF válasz esetében elmondható, hogy a különféle kísérleti kezeléseket a késői hiperémia előfordulását növelték. Az SD-vel kapcsolatos késői hiperémiáról leírták, hogy megjelenését az L-arginine adása elősegítette, így a késői hiperémia NO-függő lehet. Érdekes módon a Hsp-ék, leginkább a Hsp90, szerepet játszanak az értónus kialakításában a vazodilatátor NO keletkezésének szabályozásán keresztül. A közelmúltban kimutatták, hogy az LA1011 kötődik a Hsp90-hez és aktiválja az ATPáz aktivitását. Egy lehetséges kölcsönhatás az LA1011 és az NO között magyarázná a késői hiperémia fokozott megjelenését, amely talán a Hsp90 által szabályozott.

### **4.2. Az FP receptor gátlása AL-8810-zel**

#### **4.2.1. Az FP receptor gátlása javította a perfúziót az iszkémiás agykéregben**

Eredményeink szerint az FP receptor agonizmusa gátolja az SD-t az iszkémiás patkány agykéregben: az AL-8810 a repolarizáció gyorsításával csökkentette az SD időtartamát, és a reperfúzió alatt fokozta az ECoG teljesítményének rendeződését. A periférián található FP receptorok az értónus szabályozásában játszanak szerepet. Az FP receptor gátlása a kísérleteinkben javította az iszkémiás agykéreg perfúzióját, így feltételeztük, hogy az SD-ék időtartama az AL-8810 kezelt állatokban a szöveti perfúzió javulása miatt rövidült.

A terjedő iszkémia, amely az alacsony iszkémiás toleranciával jellemezhető penumbra régión halad keresztül, kiváltképp károsnak tekinthető. A terjedő iszkémia kevésbé gyakori jelenség volt az AL-8810 kezelt csoportban, és a véráramlás esés mértéke is kisebbnek bizonyult a kezelés következményeként.

#### **4.2.2. Az FP receptor gátlása csökkentette az SD-t és az apoptózis mértékét, de nem volt hatással a mikroglia aktivációra**

Az FP receptor farmakológiai gátlása a kísérleteinkben közvetlenül a neuronokat célozva is hozzájárulhatott a neuroprotekciónak. Az idegsejtekben az FP receptor egyértelmű kifejeződését figyeltük meg hasonlóan korábbi munkákhoz, melyek az FP receptor jelenlétét szinaptoszóma preparátumban vagy idegsejt kultúrában igazolták. Az AL-8810 neuronokon kifejtett direkt protektív hatását támasztja alá, hogy az AL-8810 elősegítette az idegsejtek túlélését az OGD-nek kitett sejt kultúrákban.

Az AL-8810 hatását a mikroglia is vizsgáltuk, mivel a mikroglia FP receptorral gazdagon ellátott sejt. Korábbi kísérletekben patkány mikroglia sejt kultúrában nem figyeltek meg FP receptor mRNS expressziót, ám későbbi kutatások bizonyították működő FP receptorok jelenlétét humán agyi mikroglia sejteken. A kísérleteinkben mikroglia-aktivációt figyeltünk meg ipszilaterálisan az SD kiváltáshoz és a kranitómiahoz képest, mely hozzáadódik az önmagában az iszkémia okozta mikroglia-aktivitás növekedéshez. Előző kísérleteinkből tanúsága szerint a műtéti beavatkozás önmagában (kraniotómia) mikroglia aktivációt okoz és a kiváltott SD-k ezt tovább növelik, amely magyarázza a különbséget az ipszi- és kontralaterális oldal között a jelen kísérletben. Az AL-8810 nem volt hatással a mikroglia aktivációra a vizsgált időpontban (5 órával az iszkémia kezdete után).

### **4.3. A Sig-1R agonizmusa DMT vel**

#### **4.3.1. A DMT csökkentette az SD-ét a Sig-1R aktiválásán keresztül, de nem volt hatással a CBF válaszra**

Kísérleteinkben a DMT intravénás infúziója mellett csökkent az SD amplitúdója, a depolarizáció meredeksége és a kumulatív SD időtartam. Eredményeink bizonyítják a DMT SD gátló hatását. A szelektív Sig-1R agonista PRE-084 kezeléssel igazoltuk, hogy a DMT SD-t gátló hatása a Sig-1R keresztül valósulhatott meg. A Sig-1R antagonistá NE-100 a DMT hatását ellensúlyozta, ami további bizonyíték a Sig-1R részvételére a DMT hatásmechanizmusában. Eredményeinket igazolják azok a munkák, melyek patkány élő agyszelet preparátumon az SD gátlását érték el két Sig-1R agonistával dextrometorfánnal vagy karbetapentánnal. Ismert, hogy a Sig-1R agonizmusa korlátozza az NMDA receptor aktiválásához köthető kalcium választ idegsejtkultúrában, és a neuronális feszültség-függő kalcium csatornák inaktiválásával lassítja a kalcium áramokat. Feltételezzük, hogy a DMT a kísérleteinkben a Sig-1R-hoz kötött intracelluláris kalcium homeosztázis szabályozásán keresztül gátolta az SD-ét.

Értékeljük azt a lehetőséget is, hogy a DMT esetleg 5-HT receptorok aktivációja révén éri el az SD gátlását. Eredményeink szerint azonban valószínűtlen az 5-HT receptor alapú mechanizmus, mert a DMT ellensúlyozta a széleskörű 5-HT receptor antagonistá azenapin SD-t fokozó hatását. Érdeemes megjegyezni, hogy az 5-HT receptor antagonistá növelte az SD amplitúdóját, mely összhangban áll azokkal a korábbi adatokkal, hogy a szerotonerg rendszer aktiválása csökkenti, gátlása potenciózza az SD-ét.

Végül értékeltük a farmakológiai kezelések hatását az SD-hez kötődő CBF válaszra. Az analízist lényegesnek tartottuk, mert a DMT hatása a neurovaszkuláris csatolásra nem volt ismert. A DMT kezelés kísérleteinkben nem befolyásolta az SD-re adott hiperémiás választ. Továbbá egyik használt anyag (a Sig-1R agonista PRE-084, a Sig-1R antagonistá NE-100 vagy az 5-HTR antagonistá azenapin) sem módosította a hiperémiát. A kezelések hatástalanságának oka lehet, hogy az iszkémia önmagában károsítja a neurovaszkuláris csatolást, melyet a farmakológiai kezelések nem tudtak felülmúlni.

#### **4.3.3. A DMT kivédte az iszkémiás sejtkárosodást**

Számos kutatócsoport leírta, hogy Sig-1R aktiválás csökkenti az iszkémiás infarktus méretét 24 órával vagy akár napokkal a kísérletesen előidézett fokális iszkémia után. Kutatásaink során 2 órával az iszkémia és 1 órával a reperfüzió után vizsgáluk szövettani módszerekkel a DMT neuroprotektív hatását. A kísérleteinkben a NeuN festés nem mutatott szignifikáns idegsejt károsodást valószínűleg azért, mert a vizsgálat időpontja túl korai volt ahhoz, hogy kifejezett neurodegenerációt figyelhessünk meg. Azonban a GFAP+ asztrociták hálózata jelentősen gyérült iszkémia/reperfüziót követően a naiv állatokhoz képest. Eredményünk összhangban áll

azzal a korábbi megfigyeléssel, hogy a kísérletes fokális iszkémia kezdetét követő első pár órában GFAP kifejeződése csökken a duzzadt protoplazmás asztrocitákban. Az elváltozás asztrocita diszfunkciót feltételez. A DMT kezelés hatására erősödött a GFAP kifejeződése, továbbá a Sig-1R-t kolokalizáltuk asztrocitával. Eredményeink megerősítik és kiegészítik azt a korábbi megfigyelést, hogy a Sig-1R aktiválása elősegíti az asztrociták túlélését 96 órával az iszkémia kezdete után. Összefoglalva, a DMT kezelés megőrzi az asztrocita hálózat integritását – és valószínűleg funkcióját – a Sig-1R aktiválásán keresztül.

A mikroglia-aktiváció jellemzésével korábbi eredményeinket igazoltuk, miszerint az SD mikroglia-aktivációt okoz. Ismert, hogy a DMT a gyulladásos válaszreakciókat gyengíti, melyet igazol a pro-inflammatorikus citokin szint csökkenése DMT kezelés következtében. Ezzel ellentétben, kísérletünkben a DMT-nek nem volt hatása a mikroglia-aktivációra. Hasonlóképp, egy korábbi tanulmányban a Sig-1R aktiválása nem befolyásolta az Iba-1 jelölődést és az agyi citokin termelésre fokális agyi iszkémia modellben. Mindent összevetve, a DMT a közvetlen gyulladásos stimulussal kiváltott dentritikus sejt- vagy mikroglia-aktivációt gátolja, de az iszkémia vagy az SD indukálta mikroglia aktivációt nem módosítja.

Az apoptotikus sejthalál vizsgálata kísérletünkben helytálló, hiszen a Sig-1R aktiválása elnyomja az ER stressz indukálta apoptózist. A DMT kezelés csökkentette a CC3+ apoptotikus sejtek számát, legfőképp a hippocampusban. Továbbá a DMT kezelés gátolta a ferroptózis jelenségét is, melyet alátámaszt, hogy a Sig-1R aktivációja vagy overexpressziója gátolja az oxigén szabadgyökök keletkezését.



## Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek Dr. Farkas Eszternek, aki lehetővé tette, hogy csatlakozzak a kutatócsoportjához és a vezetésével és tanácsaival nagyon sokat segített nekem, hogy befejezhessem a kísérletes projektjeimet és a tézisem.

Köszönettel tartozom kollegáimnak és egyúttal barátaimnak a sok segítségért és támogatásért a laborban: Frank Ritának, Dr. Varga Dánielnek, Dr. Menyhárt Ákosnak, Ivánkovitsné Kiss Orsolyának, dr. M. Tóth Orsolyának és Makra Péternek.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Bari Ferenc Professzor Úrnak, hogy lehetővé tette és támogatta a munkámat az Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézetben. Szintén szeretném megköszönni Dr. Peták Ferenc Professzor Úrnak, hogy lehetővé tette a munkámat az Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézetben. Dr. Jancsó Gábor Professzor Úrnak köszönöm, hogy elfogadta jelentkezésem az Elméleti Orvostudományok Doktori Iskolába.

Hálásan köszönöm Borbély Emőkének és Szilágyi-Szögi Titanillának, hogy bevezettek a tudomány és a labormunka világába.

És végül, de nem utolsósorban teljes szívemből köszönöm családomnak a kifogyhatatlan szeretetüket és támogatásukat. Szívemből köszönöm a páromnak, Máténak és a legjobb barátomnak, Ildinek, hogy sosem hagytak cserben és mindig támogattak.

## A tézis alapjául szolgáló publikációk

1. **Írisz Szabó**, Orsolya M. Tóth, Zsolt Török, Dániel Péter Varga, Ákos Menyhárt, Rita Frank, Dóra Hantosi, Ákos Hunya, Ferenc Bari, Ibolya Horváth, László Vigh, Eszter Farkas The impact of dihydropyridine derivatives on the cerebral blood flow response to somatosensory stimulation and spreading depolarization. *Br J Pharmacol* 2019 May;176(9):1222-1234. **IF: 7.73**

2. Dániel P. Varga\*, **Írisz Szabó\***, Viktória É. Varga, Ákos Menyhárt, Orsolya M. Tóth, Mihály Kozma, Armand R. Bálint, István A. Krizbai, Ferenc Bari, Eszter Farkas The antagonism of prostaglandin FP receptors inhibits the evolution of spreading depolarization in an experimental model of global forebrain ischemia. *Neurobiol Dis* 2020 Apr;137:104780. **IF: 5.33**

\*a szerzők egyenlő részben járultak hozzá a munkához

3. **Írisz Szabó**, Viktória É. Varga, Szabolcs Dvorácskó, Attila E. Farkas, Tímea Körmöczi, Róbert Berkecz, Ákos Menyhárt, Rita Frank, Dóra Hantosi, Ede Frecska, Csaba Tömböly, István A. Krizbai, Ferenc Bari, Eszter Farkas N,N-dimethyltryptamine attenuates spreading depolarization and restrains neurodegeneration by sigma-1 receptor activation in the ischemic rat brain. Submitted: *Sci Rep* **IF: 3.99**