

Oxidatív stressz és antioxidáns kezelési stratégiák kísérletes agyi iszkémiában

Dr. Mracskó Éva

**Szegedi Tudományegyetem, Általános
Orvostudományi Kar, Élettani Intézet**

Témavezetők:

Prof. Bari Ferenc és Dr. Farkas Eszter

2011

Szeged

BEVEZETÉS

1. Cerebrovaszkuláris kórképek és állatmodelljeik

A cerebrovaszkuláris betegségek mind az akut ellátás, mind a hosszú távú gondozás szempontjából jelentős kihívást jelentenek az egészségügyi rendszer számára. Ezen kórképek modellezéséhez számos állatmodell áll rendelkezésünkre, melyek jól jellemzik a morfológiai változásokat és funkcionális károsodásokat, és fontos információkkal szolgálnak a neuronkárosodás patomechanizmusával kapcsolatban.

A krónikus agyi hipoperfúzió az agyi vérátáramlás mérsékelt, de tartós csökkenését jelenti, melynek bizonyítottan szerepe van a kognitív funkciók hanyatlásában. A krónikus agyi hipoperfúzió modellezésére alkalmas módszer a két arteria carotis communis permanens lekötése patkányban (2 vessel occlusion = 2VO). Ebben a modellben az okklúziót követő akut fázisban hirtelen perfúzió csökkenés figyelhető meg, egy héttel a beavatkozás után lassú áramlásnövekedés kezdődik, majd a hatodik hónapra az agyi perfúzió visszatér a kontroll szintre.

Szívinfarktus és szívritmuszavar talaján fejlődő hipotenzió, illetve nagyobb szívűtét során a műtéti eljárás részeként történő időleges keringésleállítás tranziens globális agyi iszkémiát (TGI) hoz létre. A perfúziós rendellenesség 2VO-val kombinált tranziens hipovolémiás hipotenzióval modellezhető patkányban, mely átmeneti, de a 2VO modellhez képest nagyobb mértékű perfúzió csökkenést okoz.

Az összes stroke esemény 80%-a iszkémiás eredetű, melyet a fő agyi artériák és közvetlen ágaik trombotikus vagy embóliás elzáródása okoz. Kísérletesen az arteria cerebri media (medial cerebral artery MCA) permanens vagy – a rekanalizáció modellezésére - tranziens okklúziójával (MCA occlusion = MCAO) hozható létre patkányban és egerben. Az MCAO modellben az agyi perfúzió csökkenése és a következményes neuronkárosodás alapján megkülönböztetünk egy iszkémiás magot, illetve a penumbra területét.

A hipoperfúzió mind a 2VO, mind a TGI modellben globális, és ugyanakkor elsősorban az agy iszkémiára legérzékenyebb területeinek körülírt sejtpopulációit károsítja. Mindkét modellre jellemző morfológiai elváltozás a hippokampusz CA1-es régiójában a piramissejtek pusztulása, mely a hippokampuszhoz kapcsolódó térbeli tanulási képesség romlásában nyilvánul meg. Ezzel ellentétben, a fokális agyi iszkémia következményeként egy nekrotikus szövetmassza, az infarktus jön létre. Az infarktus a kortexben az MCA ellátási területén fejlődik és ennek megfelelően a szenzomotoros funkciókat károsítja.

2. Iszkémia-indukált oxidatív stressz

A reaktív oxigén- (reactive oxygen species = ROS) és nitrogén származékok (reactive nitrogen species = RNS) a sejtek anyagcseréje során fiziológiás körülmények között is képződnek. Ez történhet prooxidáns enzimek segítségével, illetve nem enzimatis úton, mint a mitokondriális elektron transzport lánc szivárgása vagy a Fenton-reakció. A keletkező ROS/RNS eliminálásában részt vesznek antioxidáns enzimek, enzim függő antioxidánsok, és enzim független antioxidáns molekulák. A pro- és antioxidáns rendszer működése közötti egyensúly eredményeképpen létrejövő alacsony ROS/RNS koncentráció fontos a fiziológiás folyamatokhoz. Ezzel szemben, iszkémiás körülmények között ez az egyensúly felborul, és oxidatív stressz lép fel, amely a makromolekulák (lipidek, fehérjék, DNS) oxidációjával, illetve a sejt jelátviteli útjain keresztül vezethet neuronkárosodáshoz.

Jelen tézisben a prooxidánsok közül a ciklooxygenáz-2 (COX-2) és a 3 nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) izoforma, míg antioxidánsként a mangán-szuperoxid-dizmutáz (MnSOD) enzim szintjének változását vizsgáltuk.

A COX enzimek az arachidonsavból prosztaglandinokat állítanak elő, melyeknek - vazodilatátoros hatásuknak köszönhetően - szerepük lehet az agyi perfúzió fenntartásában,

ugyanakkor a melléktermékként képződő szuperoxid anion oxidatív károsodáshoz vezethet.

A NOS enzimnek 3 izoformája ismert: az endoteliális NOS (eNOS), a neuronális NOS (nNOS) és az indukálható NOS (iNOS). Az általuk termelt nitrogén-monoxid (NO) potens vazodilatátorként javíthatja az agyi perfúziót, ugyanakkor szuperoxid anionnal való reakciójából peroxinitrit keletkezhet, amely a makromolekulák oxidatív károsodásához vezet. Így az NO agyi iszkémiában betöltött jótékony vagy kártékony szerepét valószínűleg termelésének mennyisége, időbeli dinamikája és helye határozza meg.

A MnSOD a sejtek mitokondriumában helyezkedik el, a szuperoxid anion molekuláris oxigénre és hidrogén-peroxidra történő dizmutációját katalizálja. Mivel a mitokondriumok képezik a szuperoxid anionok fő forrását, a MnSOD-nak kiemelt szerepe lehet a sejtek antioxidáns védelmében.

3. Antioxidáns kezelési stratégiák agyi iszkémiában

Az oxidatív stressz agyi iszkémiában betöltött szerepének vizsgálatára számos antioxidáns stratégiát teszteltek az agyi iszkémia különböző modelljeiben. Jelen tézisben a következő antioxidánsokat vizsgáltuk:

α -Tokoferol: Az α -tokoferol a vérplazmában legnagyobb koncentrációban jelen levő E-vitamin-komponens, a sejtek enzim független antioxidánsai közé tartozik. Zsíroldékony lévén az α -tokoferol főként a szervezet hidrofób partikulumaiba épül be, és az oxidatív láncreakciók megszakítása révén csökkenti a makromolekulák oxidációját. Protéktív és antioxidáns hatása bizonyított kardiovaszkuláris kórképekben és MCAO-val indukált fokális iszkémiában.

Hidrogén: A hidrogén egy élettanilag inert gáz, kis méretének és semleges töltésének köszönhetően könnyen penetrál a sejtek és sejtorganellumok membránján keresztül, így bejuthat a mitokondriumokba is. Idegsejt-kultúrán végzett

kísérletek során a hidrogén szelektíven csökkentette a hidroxil gyök mennyiségét, de nem befolyásolta egyéb ROS koncentrációját. Antioxidáns és egyéb citoprotektív hatásainak köszönhetően a hidrogén terápia jótékony hatású az iszkémia/reperfúziós, gyulladáso, mérgező és traumás kórképekben.

Rosiglitazon: A rosiglitazon egy PPAR γ (peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor-gamma) agonista, 2-es típusú diabetes mellitus kezelésében alkalmazzák. Csökkenti a COX-2 expressziót és a ROS-termelést, mely hatások eredményeként TGI patkány modelljében bizonyítottan neuroprotektív.

4. Célkitűzés

Kísérleteink során különböző agyi iszkémia modellekben vizsgáltuk egyes pro- és antioxidáns enzimek szintjének változásait illetve jellemeztük különböző antioxidáns kezelési stratégiák hatékonyságát.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Pro- és antioxidáns enzimszintek változása krónikus agyi hipoperfúzió különböző szakaszaiban

A kísérletes krónikus agyi hipoperfúziót az arteria carotis communis-ok permanens okklúziójával hoztuk létre patkányban. Klorál-hidrátal történő altatás után a nyakon ventrális középvonali metszést ejtettünk és mindkét oldalon kipreparáltuk az arteria carotis communis-t. Az állatok egyik csoportjában az ereket lekötöttük (2VO), míg a patkányok másik csoportjánál az erek elkötése nélkül zártuk a nyakon ejtett metszést. Utóbbi állatok szolgálták áloperált kontrollként (SHAM).

A pro- és antioxidáns enzimszintek időbeli változásának jellemzéséhez az állatokat különböző időintervallumokkal (1 ill. 3 nappal, 1 ill. 2 héttel, 3, 6 ill. 12 hónappal) a műtétet követően

klorál-hidrátal túlaltattuk majd fizioiogiás sóoldattal perfundáltuk. Az agyakat eltávolítottuk és mintát vettünk a kortex és a hippokampusz területéről. A minták COX-2, eNOS, nNOS, iNOS és MnSOD szintjének meghatározásához Western blot technikát alkalmaztunk.

2. Az α -tokoferol kezelés hatása krónikus agyi hipoperfúzióban

A kísérletes krónikus agyi hipoperfúziót – a fent leírtaknak megfelelően – 2VO-val hoztuk létre patkányban, kontrollként áloperált állatokat használtunk (SHAM).

Mind a 2VO, mind a SHAM csoporton belül az állatokat a kezelés szempontjából további két alcsoportra osztottuk. Eszerint az állatok egyik csoportja szójaolajban oldott α -tokoferolt kapott 100 mg/kg dózisban i.p., míg a kezelés szempontjából kontroll csoport tagjait ekvivalens térfogatú szójaolajjal kezeltük i.p. A leírt kezelést a műtétet megelőző (előkezelés) vagy követő (utókezelés) 5 napon keresztül naponta egyszer alkalmaztuk.

Egy héttel a műtétet követően, a hippokampuszhoz kapcsolódó térbeli tanulási képességet 5 napon keresztül a Morris water maze tesztben vizsgáltuk. A teszt során az állatoknak egy kör alakú medencében kellett 2 percen belül megtalálniuk a vízfelszín alá rejtett platót. A plató megtalálásáig megtett úszási távolságot illetve a sikertelen próbák százalékos arányát értékeltük.

Két héttel a műtétet követően a patkányokat klorál-hidrátal túlaltattuk és 4%-os paraformaldehid oldattal transzkardiálisan perfundáltuk. Az agyakat eltávolítottuk, majd fagyasztó mikrotómon 20 μ m vastagságú koronális metszeteket készítettünk a hippokampusz szintjében. A metszetek egyik részét a neuronpusztulás mértékének meghatározásához krezil-ibolyával festettük. A metszetek másik részén a mikroglia-aktiváció jellemzésére OX-42 immuncitokémiai jelölést

végeztünk, majd meghatároztuk az OX-42 jelölődés által lefedett terület százalékos arányát.

3. A hidrogén és a rosigitazon terápia hatása TGI-ben

A TGI-t 2VO-val kombinált hipovolémiás hipotenzióval hoztuk létre halotánnal altatott spontán légző patkányban. A műtét során kipreparáltuk az arteria carotis communis-okat valamint megkanüláltuk a bal arteria és vena femoralis-t. A globális iszkémia indukálásához a carotis artériákat klipp segítségével leszorítottuk, és egyidejűleg vénás vérvétellel az artériás vérnyomást 40 Hgmm-re csökkentettük (TGI). Tíz perc elteltével felengedtük a carotisokat és vénásan visszaadtuk a levett vérmennyiséget. Az áloperált állatok (SHAM) minden műtéti beavatkozáson átestek a carotis artériák leszorítása és hipovolémia indukálása nélkül.

Mind a TGI, mind a SHAM csoporton belül az állatokat a kezelés szempontjából további 4 alcsoportra osztottuk. Az első csoport nem részesült kezelésben; a második csoportban a reperfúzió kezdetekor a halotánt vivő gázkeveréket 2,1% hidrogén tartalmú szobalevegőre cseréltük és 30 percig alkalmaztuk; a harmadik csoport az RSG oldószereként szolgáló ekvivalens térfogatú dimetil-szulfoxidot (DMSO); míg a negyedik csoport 6mg/ttkg rosigitazont kapott DMSO-ban oldva i.v.

Három nappal a műtétet követően az állatokat klorál-hidrátal túlaltattuk majd fiziológiai sóoldattal transzkardiálisan perfundáltuk. Az agyakat eltávolítottuk és mintát vettünk a kortex és a hippokampusz területéről. A minták COX-2, eNOS, nNOS és MnSOD szintjének meghatározásához Western blot technikát alkalmaztunk.

4. A CD8+ T limfociták szerepe fokális agyi iszkémiában

A fokális iszkémiát a bal MCA transztemporális elektrokoagulációjával hoztuk létre halotánnal altatott spontán

légző egérben. Bőrmetszést követően eltávolítottuk a temporális izomzatot, majd a temporális koponyacsonton fűrt lyukon keresztül koaguláltuk a bal MCA-t.

Az egerek egyik csoportjában 24 órával a műtétet megelőzően anti-CD8 antitestek i.p injekciójával depletáltuk a CD8⁺ T limfocitákat, míg a kontroll csoport tagjait izotípus antitesttel kezeltük i.p.

A szenzomotoros aszimmetriát a sarok-tesztben vizsgáltuk 1 nappal MCAO előtt, valamint 1, 3 ill. 7 nappal a műtét után. A teszt során a sarokban felágaskodó egér jobbra fordulásainak arányát értékeltük a műtét előtti teljesítmény függvényében.

Az infarktus méretének meghatározásához az egereket 1, 3 ill. 7 nappal az MCAO-t követően túlaltattuk és fiziológiás sóoldattal transzkardiálisan perfundáltuk. Az eltávolított agyakból 20 μm vastag kriometszeteket készítettünk egymástól 400 μm távolságban, majd a metszeteket ezüsttel impregnáltuk. Az infarktus térfogatát az egyes metszeteken mért infarktus-alapterületből kalkuláltuk a metszetek közötti távolság figyelembevételével.

A fehérvérsejt-infiltráció jellemzéséhez az eltávolított agyakból 12 μm vastag koronális kriometszeteket készítettünk. A metszetek egy részén a T sejtek detekciójához CD3-jelölést végeztünk, míg a granulociták jelölésére mieloperoxidáz-festést alkalmaztunk. Ezt követően az iszkémiás hemiszfériumban számoltuk a jelölődött sejteket.

A tumor nekrozis faktor-alfa (TNF α) és az iNOS agyi expressziójának vizsgálatához a műtétet követően 1 ill. 5 nappal RNS-t izoláltunk az agyi hemiszfériumokból, majd reverz transzkripciót követően kvantitatív polimeráz láncreakciót végeztünk.

EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

1. Pro-és antioxidáns enzimszintek változásai globális iszkémiában

Akut fázis: A 2VO és TGI modellek akut fázisában hasonló enzimszint-változásokat tapasztaltunk, melyek főleg a hippocampuszt érintették.

A COX-2 enzim mindkét modell akut fázisában emelkedett a hippocampuszban míg nem változott a kortexben. A COX-2 upregulációja 3 nappal 2VO-t követően kezdődött és 1 héttel az iszkémia-indukciót követően szignifikáns szintet ért el. TGI-t követően azonban az enzim szintjének emelkedése már a 3. napon nagyobb volt, mint a maximális upreguláció a 2VO modellben. Feltehetőleg a COX-2 upregulációjáért az agyi iszkémia során létrejövő glutamát excitotoxicitás felelős. Eredményeink alapján a COX-2 szintjének emelkedése kisebb mértékű és hosszabb latenciával jelentkezik 2VO-t követően a TGI modellhez képest, mely megfelel a TGI-ben bekövetkező súlyosabb perfúziós elégtelenségnek.

Az eNOS szintje 1 ill. 3 nappal 2VO-t követően emelkedett mind a hippocampuszban, mind a kortexben. Ezzel ellentétben, az enzim szintje változatlan volt 3 nappal TGI után, habár ez nem zárja ki az eNOS upregulációját egy korábbi időpontban. Az eNOS szintjének növekedéséért többek között a megváltozott keringési viszonyok lehetnek felelősek. Az eNOS által termelt NO vazodilatációt kiváltó hatása és a trombociták ill. neutrofil granulociták kitapadásának gátlása révén javíthatja az agyi perfúziót.

Mindkét modellben 3 nappal az iszkémia-indukciót követően csökkent nNOS szintet detektáltunk a hippocampuszban. Ez a downreguláció TGI-ben jelentősebb volt a 2VO modellhez képest. Irodalmi adatok alapján a neuronkárosodás következtében az nNOS enzimszint a kezdeti

upregulációt követően csökkenni kezd, és a csökkent enzimszint a neuronpusztulás markerévé válik. A TGI modellben leírt jelentősebb neuronpusztulás magyarázatul szolgálhat az nNOS TGI-ben megfigyelt nagyobb mértékű downregulációjára.

A MnSOD enzim szintjét sem a 2VO sem a TGI nem befolyásolta. Eredményeink alapján globális iszkémiában a MnSOD valószínűleg nem játszik jelentős szerepet az oxidatív folyamatok szabályozásában.

Krónikus fázis: A krónikus hipoperfúzió későbbi fázisában – két héttel ill. 3 hónappal 2VO-t követően – a vizsgált enzimszintek csökkenését figyeltünk meg, mely jelezhet energiahányt és/vagy neuronpusztulást. Egy évvel az okklúzió után, amikor az agyi vérátáramlás – irodalmi adatok alapján – már visszatért a kontroll szintre, emelkedett eNOS enzimszintet találtunk a hippokampusz és a kortex területén, mely hozzájárulhat az agyi perfúzió kompenzációjához.

2. Antioxidáns kezelési stratégiák

α -tokoferol: Az α -tokoferol elő- és utókezelés hatásait 2VO-val kiváltott krónikus agyi hipoperfúzióban vizsgáltuk 2 héttel a beavatkozást követően.

A Morris maze térbeli tanulási tesztben a plató megtalálásáig megtett úszási távolságok a szójaolajjal előkezelt 2VO csoportban szignifikánsan hosszabbak voltak az áloperált kontrollokhoz képest. Ezzel szemben, az α -tokoferollal előkezelt csoportnál nem volt szignifikáns különbség a 2VO és SHAM állatok teljesítménye között. Az utókezelt csoportok közötti különbségek kisebbnek adódtak. A sikertelen próbák százalékos arányát az α -tokoferol mind elő-, mind utókezelésben csökkentette. Eredményeinkhez hasonlóan, az α -tokoferol antioxidáns tulajdonságai révén csökkentette a beta-amiloid indukált tanulási diszfunkciót patkányban.

A hippokampusz CA1-es régiójának piramissejt-rétege az áloperált patkányokban intakt maradt, míg a 2VO állatok egy

részénél dezorganizálódott: a szójaolajjal kezelt 2VO patkányok 22%-a, míg az α -tokoferollal kezelt 2VO állatoknak csak 7,5%-a mutatott CA1-léziót. Hasonlóan, korábbi tanulmányok alapján az α -tokoferol csökkenti az infarktus méretét egér MCAO modellben.

Az áloperált állatokban a mikroglia-aktivációt jelző OX-42 jelölődés alacsony volt. A szójaolajjal elő- vagy utókezelt 2VO patkányokban a mikroglia-aktiváció nőtt, míg az α -tokoferol mind elő- mind utókezelésben alkalmazva a SHAM kontrollhoz közeli értékre csökkentette az OX-42 jelölődést. Ezen hatása megfeleltethető korábbi megfigyeléseknek, miszerint az α -tokoferol csökkentette in vitro aktivált mikroglia citokin-expresszióját és neurotoxicitását.

Hidrogén és rosiglitazon: Kísérleteink során a 2,1% hidrogén tartalmú szobalevegő belégzésének a TGI-indukált enzimszint-változásokra kifejtett hatásait vizsgáltuk 3 nappal az iszkémiát követően. Összehasonlításra a TGI-ben bizonyítottan neuroprotektív rosiglitazon kezelést alkalmaztuk.

A TGI COX-2 upregulációt okozott a hippocampusban, mely excitotoxicitásra utal. Mind a hidrogén, mind a rosiglitazon kezelés megelőzte a COX-2 upregulációját, valamint a rosiglitazon a bazális COX-2 szintet is csökkentette. Korábbi tanulmányokban a rosiglitazon-indukált COX-2 downregulációval párhuzamosan csökkent az agyi infarktus mérete. Ugyanakkor a COX-2 gátlók vagy a rosiglitazon krónikus alkalmazása humánban – valószínűleg a prosztanoidok jótékony hatásának csökkentésével – emeli a kardiovaszkuláris történések gyakoriságát.

A TGI-okozta nNOS csökkenés a hippocampusban neuronális károsodásra utal. Az enzim szintjének csökkenését mind a hidrogén, mind a rosiglitazon kezelés kivédte, utalva ezen anyagok TGI-ben kifejtett neuroprotektív tulajdonságára. Ezt bizonyítandó, a hidrogén in vivo és in vitro kivédte az iszkémia/reperfúziós sejtkárosodást, míg a rosiglitazon

csökkentette a TGI által indukált neuronpusztulást a hippocampális CA1-es régióban.

3. A CD8+ T limfociták szerepe fokális agyi iszkémiában

Kísérleteink során a fokális agyi iszkémiát követően az agyba infiltráló CD8+ T limfociták neuronkárosodásban és oxidatív stresszben betöltött szerepét vizsgáltuk.

A szenzomotoros funkciókat a sarok-tesztben jellemeztük. Az MCAO – irodalmi adatoknak megfelelően – károsította a szenzomotoros funkciókat, míg a CD8+ T limfociták műtét előtti depléciója 7 nappal az iszkémia-indukciót követően, szignifikáns javulást eredményezett a kezelésre nézve kontroll állatokhoz képest. Ezzel párhuzamosan, az agyi infarktus mérete is szignifikánsan kisebb volt a CD8+ T limfocita depletált egerekben 7 nappal a műtétet követően.

A granulociták inváziója már az MCAO-t követő első napon jelentős volt, és számuk az iszkémiás hemiszfériumban az első hét végéig magas maradt. Ezzel szemben a T limfociták inváziója a műtétet követő 3. napon kezdődött, és az infiltráló sejtek száma az első hét végéig tovább nőtt. A CD8+ T sejtek depléciója nem befolyásolta a granulociták infiltrációját, míg – a depléciónak megfelelően – a T sejtek inváziója csökkent.

A TNF α expressziója az MCAO hatására a kezelésre nézve kontroll csoportban a műtétet követő 1. ill. 5. napon emelkedett. Utóbbi időpontban a CD8+ T sejtek depléciója csökkentette a citokin upregulációját. A TNF α expressziójának emelkedése az első napon a mikroglia korai aktivációját jelzi, míg a CD8+ T sejt depléció a TNF α termelő CD8+ T sejtek számának csökkentésével enyhíti a citokin upregulációját 5 nappal az MCAO után.

A TNF α -val szemben az iNOS expressziója 1 nappal MCAO-t követően változatlan volt, majd a műtét utáni 5. napon expressziója emelkedett. Az enzim upregulációját a CD8+ T sejtek depléciója enyhítette. Valószínűleg a mikroglia nem játszanak jelentős szerepet az iNOS termelésében, minthogy az

MCAO-t követő első napon a TNF α upregulációjával jelzett mikroglia-aktiváció nem nyilvánult meg az iNOS expresszió emelkedésében. Ezt megerősítendő, a 2VO modellben 2 héttel a műtétet követően az OX-42-vel jelzett mikroglia-aktiváció ellenére enyhén csökkent iNOS enzimszintet detektáltunk.

KONKLÚZIÓ

A 2VO-val kiváltott krónikus enyhe előagyi iszkémiában az enzimszint-változások főleg a hipoperfúzió korai fázisában jelentkeztek. A késői fázisban (egy évvel 2VO után) jelentkező eNOS upreguláció pedig hozzájárulhat az agyi perfúzió kompenzációjához. A 2VO és a TGI modellek akut fázisában hasonló enzimszint-változásokat detektáltunk: COX-2 upregulációja excitotoxicitásra, míg a csökkent nNOS szint neuronpusztulásra utal. Ezen enzimszint-változások főleg a hippokampuszt érintették, és kifejezettebbek voltak TGI-ben.

Fokális iszkémiában az infiltráló CD8⁺ T limfociták hozzájárulnak a neuronpusztuláshoz. Az iNOS fokális iszkémiában upregulálódik, expressziójáért főleg az infiltráló fehérvérsejtek, mint a CD8⁺ T limfociták felelősek, expressziójának csökkenése kisebb infarktus mérettel és enyhébb szenzomotoros diszfunkcióval jár együtt.

Az α -tokoferol csökkenti a térbeli tanulási képesség romlását és a neuronpusztulást 2VO-val kiváltott krónikus agyi hipoperfúzióban patkányban. A hidrogén terápia a TGI-ben bizonyítottan neuroprotektív rosiglitazonhoz hasonlóan, kivédi a TGI által indukált COX-2 upregulációt és nNOS szint csökkenést, ugyanakkor nem befolyásolja a COX-2 bazális szintjét. Ezek alapján az α -tokoferol eredményes lehet krónikus agyi hipoperfúziós kórképek terápiájában a kognitív tünetek megelőzésében. A hidrogén pedig gyors diffúziója révén akut kardiovaszkuláris történések következtében kialakuló globális agyi iszkémiás komplikációk megelőzésében kaphat szerepet.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok Prof. Bari Ferenc témavezetőmnek, hogy lehetőséget biztosított munkám sikeres elvégzéséhez és dolgozatom megírásához. Hálás vagyok nem csak szakmai tanácsaiért de egyéb útmutatásaiért is.

Ezúton is szeretném megköszönni Dr. Farkas Eszter témavezetőmnek, hogy diákkörös tevékenységemtől kezdve mind módszertani mind elméleti téren bevezetett a tudományos életbe, és munkámat a későbbiek során is tanácsaival és építő kritikáival segítette.

Hálás vagyok Dr. Domoki Ferencnek szakmai tanácsaiért és a PhD dolgozatom elkészítésében nyújtott önzetlen segítségéért.

Köszönetem fejezem ki Prof. Roland Veltkamp-nak, hogy a Heidelbergi Egyetemen a laborjában töltött másfél éven keresztül munkámat szakmailag és emberileg is támogatta.

Köszönettel tartozom a munkacsoport tagjainak, különösen Hugyecz Mariettának, akivel a tézisben ismertetett munkák többségét közösen végeztem, és akinek nem csak kollegiális, de baráti segítsége is hozzájárult a sikeres munkához. Köszönöm Tóth-Szúki Valériának a labormunka megszervezésében és végrehajtásában nyújtott segítségét. Köszönetet mondok Dr. Annaházi Anitának és Hertelendy Péternek a kísérletekben végzett munkájukért.

Köszönetem fejezem ki az Anatómia Intézet munkatársainak, Mátyás Adriennek az immunhisztokémia, Dr. Süle Zoltánnak a tanulási tesztek és Batki Máriának a Western blot során nyújtott segítségükért.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönetet mondok családomnak és barátaimnak PhD tanulmányaim során nyújtott szerető támogatásukért.

Tézishez kapcsolódó közlemények listája

- I. Annaházi A, Mracskó E, Süle Z, Karg E, Penke B, Bari F, Farkas E. (2007) Pre-treatment and post-treatment with alpha-tocopherol attenuates hippocampal neuronal damage in experimental cerebral hypoperfusion. *Eur J Pharmacol.* 571(2-3):120-128.
Impakt faktor: 2,376 Idézettség: 8

- II. Mracskó E, Hügyecz M, Institóris A, Farkas E, Bari F. (2010) Changes in pro-oxidant and antioxidant enzyme levels during cerebral hypoperfusion in rats. *Brain Res.* 1321:13-19.
Impakt faktor: 2,623 Idézettség: 3

- III. Hügyecz M, Mracskó E, Hertelendy P., Farkas E, Domoki F, Bari F. (2011) Hydrogen supplemented air inhalation reduces changes of prooxidant enzyme and gap junction protein levels after transient global cerebral ischemia in the rat hippocampus. *Brain Res.* 1404:31-38.
Impakt faktor: 2,623

- IV. Mracskó E, Liesz A, Karcher S, Bari F, Veltkamp R. (2011) The role of CD8+ cytotoxic T cells in acute experimental cerebral ischemia. *Előkészületben.*