

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**GLOBÁLIS AGYI ISCHAEMIA HATÁSA KÜLÖNBÖZŐ  
PATKÁNYTÖRZSEK KÉRGI AKTIVITÁSÁRA ÉS EGY  
LEHETSÉGES NEUROPROTEKTÍV STRATÉGIA  
TESZTELÉSE**

**Fuzik János**



Témavezető:  
Dr. Farkas Tamás  
egyetemi docens

**Biológia Doktori Iskola**

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR  
ÉLETTANI SZERVEZETTANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI TANSZÉK

2013  
SZEGED

## Rövidítések jegyzéke

- 4VO: 4 ér elzárás, a két arteria vertebralis elzárása és a két arteria carotis leszorítása (4-vessel occlusion)
- BSR: csendes és tüzelő ECoG szakaszok aránya (burst suppression ratio)
- CA1: Ammon szarv 1-es régió (cornu ammon 1)
- CBF: nagyagyvi vérellátottság (cerebral blood flow)
- CCA: arteria carotis communis (common carotid artery)
- DHEA: dehidroepiandrosteron (dehydroepiandrosterone)
- EAAT: excitatórikus aminosav transzporterek (excitatory amino acid transporter)
- ECoG: elektrokortikogram
- fEPSP: mező-serkentő posztszinaptikus potenciál (field-excitatory postsynaptic potential)
- FJ-C: Fluoro Jade C
- FB: az első megjelenő tüzelés (first burst)
- Glu: glutamát (glutamate)
- GOT: glutamát-oxalacetát transzamináz (glutamate-oxaloacetate transaminase)
- I/O: bemenet/kimenet (input/output)
- ISF: intersticiális folyadék (interstitial fluid)
- LTP: a szinaptikus áttevődés hatékonyságának tartós megnövekedése (long term potentiation)
- NF- $\kappa$ B: („nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”)
- NMDA: N-metil-D-aszpartát
- SD: Sprague-Dawley
- TBS: theta ritmussal való ingerlés (theta burst stimulation)
- TNF $\alpha$ : tumor nekrozis faktor- $\alpha$

## 1. Bevezetés

A halálesetek évenkénti száma 60 millióhoz közelít a világon, amelyek 60 %-át valamilyen nem fertőző, például daganatos vagy neurodegeneratív betegség okozza. Ezeknek felét a kardiovaszkuláris rendszer megbetegedései teszik ki. Az agyi vérellátás zavara ischaemiás vagy haemorrhagiás sztrók esetében egy adott központi idegrendszeri területet érint, míg a szív megállásból adódó globális ischaemia bekövetkeztekor a teljes szervezet, és vele együtt az idegrendszer valamennyi területe oxigén- és szubsztráthiányban szenved. Az agyérkatasztrófákkal, hipoperfúziós patológiás állapotokkal foglalkozó kutatásokban többféle ischaemiás állatmodellt is kialakítottak annak érdekében, hogy a különböző kóros állapotokat minél jobb közelítéssel reprodukálják az állatkísérletek során. A teljes, globális agyi ischaemia kialakítására alkalmas az úgynevezett 4 ér-elzárás módszere (4VO, 4-vessel-occlusion), amelyben a nagyagy vérellátása meghatározott időre megszűnik. Több, egymástól független kutatócsoport is leírta már az emberben kialakuló ischaemiás állapotokból és a kísérleti állatokban előidézett, hasonló körülményeket kialakító ischaemiás beavatkozásokból származó adatok jelentős eltéréseit. Az irodalomból tudhatjuk azt, hogy vaszkuláris anatómiai különbségek nemcsak a különböző fajok között, hanem az eltérő törzsek között, de akár állattörzseken belül is felfedezhetők. A Wistar és a Sprague-Dawley (SD) patkánytörzsek élettani folyamatai számos tekintetben eltérnek egymástól. A két törzs közötti különbségeket leírták már a magatartás szintjén, a tanulás és memória folyamataiban, az enzimatikus aktivitás és a génexpresszió szintjén, valamint fokális ischaemiás inzultus hatásának, kimenetelének tekintetében is. Mind a Wistar, mind az SD széles körben alkalmazott patkánytörzsek az agyi ischaemia kutatásában, mindkettőt gyakran használják globális ischaemiás modellek kialakításához is, mint amilyen a 4VO modell. Ezidáig azonban összehasonlító jelleggel nem írták le a Wistar és az SD patkánytörzsekben a globális ischaemia hatását.

A 4VO műtét alkalmazása során jelentős eltéréseket fedeztünk fel a Wistar és az SD patkánytörzsek között. Korábbi tanulmányok megerősítették azt, hogy a citoszolban tartósan megnövekedett  $Ca^{2+}$  koncentráció kiemelkedő szerepet játszik a funkciókárosodás és a

sejtpusztulás kialakulásában. Az ischaemiás inzultus után egy második  $Ca^{2+}$  koncentrációnövekedés történik, amely a későbbi apoptotikus folyamatokért felelős. A lecsökkent áramlású ischaemiás periódusban szabadgyökök keletkezhetnek, amelyek befolyásolják az idegsejtekből történő serkentő aminosav felszabadulást, ez pedig visszahat a szabadgyökök képződésének folyamataira. Így tehát ha a Wistar és az SD patkánytörzsek között különbségek mutatkoznak a 4VO ischaemiás periódus alatti nagygyű vérellátottságban (CBF, cerebral blood flow), akkor ez magyarázatul szolgálhat az általunk tapasztalt különbségek mibenlétére.

Második kísérleti sorozatunkban egy lehetséges neuroprotektív stratégia tesztelését végeztük el a hippocampus CA1-es régiójában, két endogén természetű anyaggal 4VO modellben. Az ischaemiás inzultus hatására beinduló folyamatok pontos időbeli behatárolása kiemelten fontos a hatásos sztrókerápiák megtervezésekor. Rögtön az ischaemiás állapot következtében megjelenő nagy mennyiségű glutamát (Glu) az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorokon keresztül fokozza az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentrációt, és egy öngerjesztő folyamat beindításával további Glu felszabadulást eredményez, felszabadítva további  $Ca^{2+}$ -ot az intracelluláris raktárakból. A glia sejteken lévő serkentő neurotranszmitter transzporterek (EAAT, excitatory amino acid transporter) aktiválódnak ugyan, működésük azonban „fordított” irányúvá válik a magas Glu szint miatti tartós depolarizáció következtében. Az EAAT-k ugyanakkor megtalálhatók az agyi endothel sejtek membránjában, melyek membránpotenciálja sokkal stabilabb ischaemiás állapotban. A Glu koncentrációja az ischaemia következményeként fellépő depolarizációból adódóan tovább nő az intersticiális folyadékban (ISF, interstitial fluid), és a sejtek túlserkentésével percekben mérhető idő alatt excitotoxikus állapotot hoz létre. Feltehetően az ISF extrém módon magas Glu koncentrációjának csökkentése egy lehetséges neuroprotektív stratégia hatékony támadási pontja lehet. A vérplazma Glu koncentrációjának csökkentésével növelhető a gradiens az ISF és a vér között, ezzel egy agyból a vérplazma felé irányuló netto Glu-efflux hozható létre, amely Glu koncentrációcsökkenést okoz az ISF-ben. A vér Glu szintjét tehát csökkenthetjük a glutamát-oxalacetát transzamináz (GOT) enzim aktivitásán keresztül. Oxálecetsavat adva a GOT enzim által mediált biokémiai átalakításhoz, melynek során az

enzim a glutamátot 2- $\alpha$ -ketoglutaráttá, az oxálecetsavat pedig aszpartáttá alakítja, lecsökken a vérplazma Glu koncentrációja. Ezen a jelenségen alapul a Glu-scavenging módszere. A sejtek károsodott funkciói, és a magas intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció miatt bekapcsol az apoptotikus kaskád, melynek lefutása, és az ezzel egy időben kialakuló gyulladásos folyamatok megindulása órákkal az ischaemiás periódus után kezdődik meg. Lefolyásuk az ischaemia mértékétől függően napokig, hetekig tarthat. Az inflammatorikus folyamatok során az ischaemia érintette agyi régióban jellemzően megemelkedik az interleukin-1 és az interleukin-6 koncentrációja. Fokozódik továbbá a tumor nekrozis faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) által kiváltott NF- $\kappa$ B („nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”) transzkripció faktor kifejeződése, amely a gyulladás, az autoimmun válasz, a sejtsztódás és az apoptózis folyamataiban is központi szerepet játszik, az ezeket a mechanizmusokat irányító gének szabályzásával. Ezek a gyulladásos folyamatok mérsékelhetők egy endogén neurosteroid, a dehidroepiandrosteron (DHEA) neuroprotektív hatásának köszönhetően, amely képes gátolni az NF- $\kappa$ B aktivációját és csökkenti az interleukinok mennyiségét. A DHEA egy másik fontos neuroprotektív aktivitása, a  $Ca^{2+}$  ionok túlzott mértékű, mitokondriális mátrixba való beáramlásának megakadályozása, az extrém módon megemelkedett intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció kialakulásakor, amely az ischaemiás állapotok jellegzetes körülménye. A DHEA ezen kívül működésbe hozza az Akt kinázt, egy szerin-threonin protein kinázt, amely aktív formájában bizonyítottan gátolja az ischaemiás állapotot követő apoptotikus folyamatokat.

Az általunk alkalmazott kombinált kezelés képes lehet a jelentős sejtpusztulást és funkciókárosodást eredményező rövid távú, excitotoxikus, és hosszú távú poszt-ischaemikus folyamatok mérséklésére, egy kettős támadáspontú kombinált kezelés alkalmazásával.

## 2. Célkitűzés

1. A 4VO műtét alkalmazása során - nem várt módon - jelentős különbségeket fedeztünk fel a Wistar és az SD patkánytörzsek között. Ismert, hogy a két törzs között jelentős eltérések tapasztalhatók magatartás vizsgálatokban, a tanulás és memória folyamataiban, valamint az enzimatis aktivitás és a génexpresszió szintjén is. Feltevésünk szerint, a két törzs agyi vaszkuláris anatómiája is jelentős mértékben különbözik, ebből adódóan a 10 perc globális agyi ischaemia más jellegű kérgi elektromos aktivitást és eltérő mértékű sejtszintű károsodást eredményez a két törzs idegrendszerében. **A műtéti beavatkozások során tapasztalt különbségek tisztázására ezért *in vivo* elektrofiziológiai méréseket (elektrokortikogram regisztrálása) és hisztológiai festéseket (Fluoro Jade C, Evans Blue és Cresil-ibolya) végzünk.**

2. Az oxálecetsav neuroprotektív hatásának vizsgálatát Wistar 4VO modellen végezzük. A védő hatást a 4VO ischaemiás inzultus következtében lecsökkenő szinaptikus plaszticitás révén követjük figyelemmel. Korábbi eredményeink alapján ismert az, hogy az oxálecetsav képes mérsékelni az ischaemiás inzultust követő plaszticitáscsökkenést. Az LTP kiválthatóságát és fenntarthatóságát figyeljük meg *in vitro* elektrofiziológiai kísérleteink során. Az oxálecetsav dózisának csökkentése érdekében egy másik endogén természetű anyag, a dehidroepiandrosteron neuroprotektív hatását is teszteljük, és a két endogén természetű anyaggal kombinált kezelést adunk a 4VO műtétet elszenvedett kísérleti állatoknak. **Az oxálecetsav védőhatását *in vivo* elektrofiziológiai kísérletekkel (elektrokortikogram regisztrálása) is vizsgáljuk, a kombinált kezelés alkalmazhatóságát *in vitro* elektrofiziológiai eredményekkel (LTP regisztrálása) támasztjuk alá.**

## Anyagok és módszerek

### Felhasznált állatok

Kísérleteinkben felnőtt Wistar (N=80) és SD (N=20) patkányokat használtunk fel (Charles River Laboratories). Az állatok 200-300 g tömegűek voltak. Minden esetben betartottuk a laboratóriumi állatok gondozásával kapcsolatos alapelveket (NIH publikáció No. 85-23), az SZTE Etikai Bizottsága által jóváhagyott állatgondozással kapcsolatos protokollt (1998) és az Európai Közösségek Tanácsának 1986. nov. 24-i rendeletét (86/609/EEC).

### Globális ischaemiás modell

*Kétoldali arteria carotis communis és kétoldali arteria vertebralis okklúzió (4VO):*

A 4VO műtét segítségével 10 perces globális agyi ischaemiát idéztünk elő. Az első napon kauter segítségével irreverzibilisen ronsoltuk mindkét arteria vertebralist. A második nap a kétoldali carotis communis (CCA, common carotid artery) preparáláshoz az állatokat Napentobarbitallal elaltattuk. A CCA-kat sérülést nem okozó csipesszel 10 percre elszorítottuk. Az álműtött állatok esetében sem a vertebralis ronsolása, sem a CCA leszorítás nem történt meg.

### *In vitro* elektrofiziológia

Az *in vitro* elektrofiziológiai mérések 8 nappal a 4VO műtét után történtek. A hippocampus középső részéből 350 µm vastagságú koronális szeleteket készítettünk. Ingerlő elektródnak egy koncentrikus bipoláris fém elektródot használtunk, amelyet a CA1 és CA2 régió határán a stratum radiatum rétegbe helyeztünk. A kiváltott serkentő posztszinaptikus mezőpotenciálok (fEPSP, field-excitatory postsynaptic potential) regisztrálása a CA1 régió stratum radiatum rétegéből történt. A CA1 piramisjelek és a Schaffer-kollaterálisok szinapszisaiban a hosszú távú potenciózódás (LTP, long term potentiation) indukciójához

theta burst ingerlést (TBS, theta burst stimulation) alkalmaztunk. Az LTP kiváltása után a megnövekedett fEPSP amplitúdókat 60 percen keresztül követtük figyelemmel.

Az alapvető glumáterg szinaptikus funkció vizsgálatára szolgált az input/output (I/O) görbék felvétele, amelyek értékelésekor a különböző ingerlési áramerősségek függvényében ábrázoltuk a kapott válaszok amplitúdó értékeit.

## ***In vivo* elektrofiziológia**

Az állatokat sztereotaxiás készülékben rögzítettük, szabaddá tettük a koponya felszínét. Sztereomikroszkóp alatt fűrés segítségével megnyitottuk a koponyát a primer motoros kéreg és a primer szomatoszenzoros kéreg fölött. A dura mater megsértése nélkül mind a négy furatba gömb fejű ezüst elektródokat helyeztünk. Az elektródok egy 8 csatornás elektroencefalográfhoz voltak csatlakoztatva, ahol egy közös referencia elektróddal szemben folyt a mérés, amely a koponya középvonalán volt elhelyezve 5 mm távolságra a bregmától, anterior irányban. A 15 perc kontroll periódus rögzítése után 10 perc 4VO-t alkalmaztunk, majd a reperfüzió során további 50 percet regisztráltunk. A mintavételezési frekvencia 200 Hz volt, az aluláteresztő szűrő 70 Hz-re, a felüláteresztő szűrő pedig 1 Hz-re volt állítva. A regisztrált epidurális elektrokortigram (ECoG) adatait több adatelemzési módszernek vetettük alá. Elemzésre került a burst suppression ratio (BSR), számszerűsítettük a kérgi tüzeléseket, valamint megvizsgáltuk az ECoG frekvenciakomponenseinek arány-eltolódását.

## **Adatelemzés**

### **BSR analízis**

Az ischaemiás állapotban jelentkező "szakaszos" kérgi aktivitást alternáló, tüzeléstől mentes, azaz csendes (suppression), és aktív (burst) szakaszok alakítják ki. Az eltérő karakterű szakaszok 10 másodperces periódusokon belüli százalékos arányát, a BSR%-ot, a csendes szakaszok százalékos előfordulásával adtam meg. A metódus "0"-át, vagy "1"-et rendel az ECoG minden pontjához. Az ECoG-ból így egy bináris adatot hoztunk létre, amelyen már a

BSR analízis elvégezhető volt. A reperfüzió kezdete után általában 10-15 perccel megjelenő első tüzeléstől (FB, first burst) kezdve vetettük össze az oxálecetsavval kezelt és a kontroll állatok ECoG-ját.

### **Küszöb feletti kérgi aktivitás számszerűsítése**

A globális cerebrális ischaemiát követően a többnyire 10-15 perces izoelektromos ECoG szakasz után egy poszt-ischaemikus burst periódus következik, amelynek lefutási ideje körülbelül 30 perc. Ebben a szakaszban nagyobb amplitúdóval és nagyobb gyakorisággal fordulnak elő ECoG tuskék. Az analízis során az FB-t követő minden 5 perc tuskeszámát meghatároztuk, és elosztottuk az FB utáni 30 - 35 perces szakaszon kapott ECoG tuskeszámmal.

### **Frekvenciakomponensek teljesítményspektruma**

Az ECoG adatokon diszkrét Fourier transzformációt végeztünk, amely különböző frekvenciájú trigonometrikus függvényeket használ az időbeli összefüggések közelítésére. Welch metódussal periodogramot készítettünk az ECoG különböző frekvenciákra vonatkozó teljesítményspektrumának meghatározására. A Welch periodogram számolásához a szegment hosszúság 300 adatpont volt 50 %-os átfedéssel.

### **Statisztikai analízis**

Az LTP eredmények statisztikai analízisekor az indukció utáni 60 perces regisztrálás adatait a 10 perc kontroll mezőpotenciál amplitúdók értékeire normalizáltuk. A Shapiro-Wilk normalitás vizsgálat szignifikáns volt, vagyis az LTP adatok TBS utáni szakaszán nem mutattak normál eloszlást a fEPSP amplitúdó értékek, továbbá az elvégzett Levene-teszt alapján pedig a variancia homogenitás sem teljesült ugyanezen adathalmazra. A további elemzést ezért Kruskal-Wallis teszttel és két mintás nonparametrikus Mann-Whitney U-teszttel végeztük. Az I/O görbék statisztikai analízise során szintén nonparametrikus Kruskal-Wallis ANOVA tesztet végeztünk. A BSR adatokat Shapiro-Wilk tesztel vizsgáltuk

meg, melynek szignifikáns volt az eredménye, tehát az adatok szintén nem voltak normál eloszlásúak, emellett a Levene-teszt sem mutatott variancia homogenitást. Ennek megfelelően két független mintás non-parametrikus Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk a BSR adatok statisztikai analizésére. A feszültség küszöböt átlépő kérgi aktivitást számszerűsítő adatok normál eloszlást mutattak a Shapiro-Wilk teszt eredményei szerint, így az adatokra egy mintás T-próbát alkalmaztunk. Minden esetben \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  értékeket tekintettük szignifikánsnak.

## Szövettan

A szövettani vizsgálatokra szánt állatokat 4%-os paraformaldehiddel transzkardiálisan perfundáltuk. A 4VO állatoknál 20  $\mu\text{m}$  vastagságú koronális metszeteket készítettünk a fel, amelyek megszorítása után az artériákat a két kötés között elvágtuk, kizárva ezzel a szivárgás lehetőségét. Ezután perfundáltunk át 50 ml 3 %-os Evan Blue fluoreszcens festéket. Az agyat közvetlenül a festés után eltávolítottuk, és egy éjszakán át posztfixáltuk 4°C-on. Az agykból 20  $\mu\text{m}$  vastagságú szeleteket készítettünk az *in vivo* elektrofiziológiai mérés elektródáinak megfelelő sztereotaxikus koordináták helyéről. A metszeteket 2 %-os zselatinba mártott tárgylemezre húztuk, és lefedtük Fluoromount-tal, majd sötétben tároltuk. A fluoreszcens metszeteket fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk.

## Hatóanyagok dozírozása, kezelés

### Oxálecetsav

Az oxálecetsavat TBS-ben oldottuk fel és pH=7.3-ra 10 N nátrium hidroxiddal állítottuk be. A végtérfogat 1ml volt. Az oldatot egy mikrodialízis pumpa segítségével közvetlenül a reperfüzió kezdetétől számított 15 perc alatt adtuk be a farokvénába. Kétféle dózist alkalmaztunk. Az alacsony dózis 4 mg/100 ttg volt, a magas dózis pedig 20 mg/100 ttg.

### DHEA

A dehidroepiandrosteront (DHEA) 97 %-os abszolút alkoholban oldottuk fel, és diszpergáltuk kukoricaolajban, az oldat koncentrációja így 10 mg/ml lett. Ebből adtunk 2 mg/100 ttg mennyiséget, ami a 250 g testtömegű állatoknál 0.5 ml végtérfogatban került beadásra intraperitoneálisan 1 nappal a 10 perc tranziens globális ischaemia után. bregma -2,3 mm-től -4,3 mm-ig terjedő sztereotaxikus koordináták között.

### Fluoro Jade-C festés:

A Fluoro Jade-C (FJ-C) egy kifejezetten degenerálódott neuronok megfestésére alkalmas fluoreszcens festék. A FJ-C festett metszeteket fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk. A fluoreszcens fény gerjesztési hullámhossza of 470–490 nm, az emisszió hullámhossza 520 nm volt.

### Cresil-ibolya festés

A Cresil-ibolya festés a kóros folyamatokon át nem esett, intakt sejteket képes megfesteni.

### Evan Blue festés

Permanens 4VO műtétet hajtottunk végre azokon az állatokon, melyeket később Evans Blue-vel megfestettünk. A 4VO modell alkalmazásához képest annyi volt az eltérés, hogy az arteria vertebralisok elektroauterizációja után, 24 óra elteltével nélkül, azonnal elvégeztük a kétoldali CCA leztorítást is. Ennek során mindkét nyaki verőérre két ligatúrát helyeztünk

## Eredmények megbeszélése

1. Az *in vivo* elektrofiziológiai mérések, az ECoG regisztrátumok elemzésekor azt láttuk, hogy az SD patkányok kérgi aktivitása nem szűnik meg teljesen a 10 perc 4VO ideje alatt, és a reperfüzió fázisában nincs poszt-ischaemikus burst periódus sem. A Wistar patkányokban ezzel szemben izoelektromos ECoG-ot regisztráltunk a 4VO 10 perce és a reperfüzió első 10-15 perce alatt, amelyet egy 30 perces lefutású poszt-ischaemikus burst periódus követett. A BSR elemzés megmutatta azt, hogy ebben a burst periódusban az izoelektromos szakaszok aránya megnőtt a folyamatos tüzeléshez képest, vagyis szakaszosabbá vált a kérgi aktivitás. A BSR% 40-50% közötti értékeket mutatott a Wistar állatok FB utáni 25 percében. Az SD patkányok BSR%-a már a 4VO ideje alatt lecsökkent 5-10%-ra, és a reperfüzió kezdetekor 0%-ra, vagyis a 4VO-t megelőző kontroll szakaszhoz vált hasonlóvá az ECoG. A kérgi aktivitást az ECoG tüskék számának változásával is jellemeztük. Az SD állatoknál a 4VO utáni poszt-ischaemikus burst periódus hiányát a tüskeszámok változása is igazolta, míg a Wistar patkányokban a poszt-ischaemikus burst ideje alatt több mint 300%-os növekedést is tapasztaltunk az FB utáni 15. percben. A frekvenciakomponensek aránya mindkét patkányvonalban eltolódott a 10 perc 4VO hatására, azonban az SD állatokban már az FB utáni 30. percre az ECoG frekvenciák aránya visszaállt a 4VO előtti állapotban tapasztalható összetételre. A Wistar patkányok esetében az FB utáni 30. perc és a kontroll szakasz teljesítménygörbéje között még jelentős különbség mutatkozott. Az FJ-C és Cresil-ibolya festés eredményei azt igazolták, hogy az SD állatokban a 4VO beavatkozás jelentősen kisebb mértékű hippocampális sejtpusztuláshoz vezetett. Az ECoG regisztrálás koordinátáinak megfeleltethető kérgi területen található neuronok pedig nagyobb mértékű Evans blue jelölődést mutattak a permanens 4VO-t követő fluoreszcens festékkel történő transzkardiális perfundálás után, mint a Wistar állatok kortikális idegsejtjei. A nagyagykérgi területek átperfundáltságában is különbözik a két patkánytörzs, ezt makroszkópikus hisztológiai vizsgálataink is igazolták. A Wistar patkányok permanens 4VO-ja közben a kérgi artériákban és kapillárisokban rekedt vér sem mosódott ki teljesen, míg az SD állatok

nagyagykérgé csaknem teljesen vérmentes volt. A kérgi neuronok az ischaemiás állapot következtében felvehették az inzultus hatására a vér-agy-gáton átjutó Evans Blue-jelölt szérum albumint, így jól detektálható Evans blue jelölődést mutattak az SD állatokban. A neuroprotektív kísérletekhez olyan patkánymodellre volt szükségünk, amely a 10 perc 4VO következtében a neuroprotektív hatás kimutatásához megfelelő mértékű szinaptikus károsodást és sejtpusztulást okoz. A 4VO modellhez az ideális patkánytörzs kiválasztásakor a Wistar vonal bizonyult a legalkalmasabbnak.

2. Az *in vitro* kísérletek során a hippocampális agyszeleteken végzett LTP mérésekben a 4VO csoport maximálisan 130%-os potenciózódást mutatott, amely a 60 perces monitorozás ideje alatt folyamatosan csökkent, de nem érte el a 10 perc kontroll szakasz szintjét. A negatív kontroll csoportban 150%-os LTP-t mértünk, amely stabil volt az egy órás regisztrálás teljes ideje alatt. A kisebb, azaz 4 mg/100 g oxálecetsav dózissal kezelt csoport a 4VO állatokhoz hasonló eredményt adott: nem láttunk növekedést az LTP kiváltás utáni fEPSP amplitúdók értékein. A magasabb, 20 mg/100g oxálecetsav azonban jelentős javulást okozott az LTP kiválthatóságában is, 135%-os LTP-t kaptunk, amely stabil maradt a 60 perces követés teljes ideje alatt. Az eredmények az LTP kiváltás utáni 23. perctől jelentősen különböztek a pozitív kontroll, és a 4. perctől szignifikánsan eltértek a negatív kontroll eredményeitől. A DHEA mutatott neuroprotektív hatást a 10 perc tranziens globális ischaemián átesett állatok szinaptikus plaszticitásán, de az LTP nem tért el jelentősen a 4VO csoport eredményeitől. A 20 mg/100 g oxálecetsavval és 2 mg/100 g DHEA-val kombináltan kezelt csoport esetében erőteljes neuroprotektív hatást láttunk. Az oxálecetsav nagymértékben kivédte az excitotoxikus állapotot a glutamát-elszívó hatásán keresztül, a DHEA pedig sikeresen csökkentette az ischaemiás inzultus után órákkal, napokkal később meginduló gyulladási folyamatokat, ezzel csökkentve a sejt- és funkcióvesztést. Az LTP eredményekben a kombinált kezelést kapott csoport esetében nem láttunk szignifikáns eltérést a negatív kontroll eredményeitől, azaz a neuroprotektív hatás jelentős mértékű volt, a kontroll csoport értékeihez közel hozta a 4VO-n átesett állatok megnövekedett fEPSP amplitúdóit, amely tekintve az ischaemiás inzultus idejét és mértékét, nagyon erős neuroprotektív hatásként könyvelhető el.

Az *in vivo* kísérletekben az oxálecetsav kérgi aktivitásra gyakorolt hatását is meg vizsgáltuk közvetlenül a 4VO után. Az ECoG BSR analizisének segítségével láthatóvá vált, hogy a 4VO-t követő reperfúzió 15. percétől körülbelül a 35. percéig egy poszt-ischaemiás burst zajlik le. Az elemzés megmutatta azt, hogy ebben a 20 perces periódusban az izoelektromos szakaszok aránya megnőtt a folyamatos tüzeléshez képest, vagyis szakaszosabbá vált a kérgi aktivitás. A BSR% 40-50% között volt az FB utáni 25 percben. Az oxálecetsav 20 mg/100 g dózisa rögtön a 4VO után beadva csökkentette a BSR% értékeket, vagyis a fiziológiához hasonlóbbá tette az ECoG-ot. Az FB utáni 30 percben az ECoG túske szám változását is nyomon követtük. Azt tapasztaltuk, hogy az oxálecetsavval kezelt állatokban a poszt-ischaemikus periódusnak megfelelő időszakban kevesebb kérgi tüzelést láttunk, vagyis az oxálecetsav glutamát-elszívó aktivitásán keresztül csökkentette az ischaemiás inzultust közvetlenül követő excitotoxicitás mértékét. Az ECoG frekvenciakomponens arányának 4VO utáni visszaállítását is segítette az oxálecetsav. A 4VO után a magasabb frekvenciák tűnnek el először, az ECoG teljesítményspektruma pedig a reperfúziós idő elteltével egyre inkább visszaáll a kontroll szakaszban látható összetételre. A kezeletlen csoport esetében jelentős eltérés volt látható a kontroll és a 4VO-t követő FB utáni 30. perc teljesítményspektruma között, az oxálecetsavval kezelt állatokban azonban ez a két teljesítménygörbe összefeküdt, vagyis a kezelés hatására gyorsabban visszaállt a kontroll szintre a frekvenciakomponensek aránya a 10 perc globális ischaemia után.

## Konklúzió

Eredményeink alapján elmondható az, hogy a megfelelő ischaemiás modell megválasztása és a modell alkalmazásának időbeli elrendezése mellett elengedhetetlenül fontos a kutatásban használni kívánt legalkalmasabb állattörzs kiválasztása. A 4VO globális ischaemiás állapot kimenetelét a Wistar és az SD törzsek esetében elektrofiziológiai és hisztológiai kísérletekkel hasonlítottuk össze. Eltérő kérgi aktivitást tapasztaltunk a két állattörzs 4VO periódusában. Az ischaemiás ECoG adatok elemzése megmutatta, hogy a BSR% értéke, az ischaemiás tüzelések száma, az FB jellege és a frekvenciakomponensek aránya is eltér a két patkánytörzsben 4VO ischaemiában. Az FJ-C és cresil-ibolya festések szórványos sejtpusztulást mutattak az SD patkányok, és jóval nagyobb mértékű sejtvészteséget a Wistar állatok esetében. Az eredményeink összességében azt mutatták, hogy a 4VO modell alkalmazására az SD-vel szemben a Wistar patkánytörzs messzemenően alkalmas, főleg abban az esetben, ha kísérleteinkben neuroprotektív stratégiák hatásosságát szeretnénk igazolni.

Egy endogén természetű anyagokkal végzett kombinált kezelést, mint lehetséges neuroprotektív stratégiát is teszteltünk. Az oxálecetsav neuroprotektívnek bizonyult a 4VO Wistar modellen. A DHEA alkalmazott dózisa önmagában csak tendenciaszerű javulást okozott a CA1 régió plaszticitásában 1 nappal a 4VO után. A kombinált kezelés azonban erős neuroprotektív eredményezett. Az *in vivo* mérések is azt igazolták, hogy az oxálecetsav védő hatása már fél órával a 10 perc 4VO után is egyértelműen tapasztalható. Eredményeinkből az is látszik, hogy elegendő egyszeri kezelést alkalmazni, rövid idővel az inzultus után. A DHEA a kései ischaemiás eseményeknek, a gyulladásos folyamatoknak állja útját, az oxálecetsav pedig az ischaemiát követő korai excitotoxicitás kivédésével fejti ki neuroprotektív hatását. Mindkét vegyület endogén, azaz természetes körülmények között is előfordul a szervezetben, így a két anyag kombinált kezelése jóval biztonságosabb lehet bármilyen tervezett vagy tervezés alatt álló szintetikus molekulák alkalmazásával szemben. A kombinált kezelés a klinikumi alkalmazásban is megállhatja a helyét, és egy hatékony neuroprotektív kezelést jelenthet a jövőben.



## Az értekezés alapjául szolgáló publikáció

**Neuroscience** 2012 Oct 25. pii: S0306-4522(12)01057-3. **impakt faktor: 3,380**

*Fundamental interstrain differences in cortical activity between Wistar and Sprague-Dawley rats during global ischemia*

**Fuzik J.**; Gellért L.; Oláh G.; Kocsis K.; Knapp L.; Nagy D., Z Kincses T.Z., Kis Zs., Farkas T., Toldi J.

## Egyéb publikációk

**Neuropharmacology** 2011 Oct-Nov;61(5-6):1026-32. **impakt faktor: 4,677**

*Kainate postconditioning restores LTP in ischemic hippocampal CA1: Onset-dependent second pathophysiological stress.*

Nagy D, Kocsis K, **Fuzik J.**, Marosi M, Kis Z, Teichberg VI, Toldi J, Farkas T.

**European Journal of Pharmacology** 2011 Sep 30;667(1-3):182-7. **Impakt faktor: 2, 587**

*Neuroprotection with a new kynurenic acid analog in the four-vessel occlusion model of ischemia.*

Gellért L, **Fuzik J.**, Göblös A, Sárközi K, Marosi M, Kis Z, Farkas T, Szatmári I, Fülöp F, Vécsei L, Toldi J.

**European Journal of Pharmacology** 2009 Feb 14;604(1-3):51-57. **impakt faktor: 2,587**

*Oxaloacetate restores the long-term potentiation impaired in rat hippocampus CA1 region by 2-vessel occlusion*

Marosi M, **Fuzik J.**, Nagy D, Rákos G, Kis Z, Vécsei L, Toldi J, Ruban-Matuzani A, Teichberg VI, Farkas T.

**Összesített impakt faktor: 13,231**