

Doktori értekezés tézisei

Egy új fokális ischaemiás modell kialakítása és az oxálecetsav
hatásainak vizsgálata patkány központi idegrendszerén

Knapp Levente



Témavezetők:

Dr. Farkas Tamás
egyetemi docens

és

Dr. Toldi József
tanszékvezető egyetemi tanár

Biológia Doktori Iskola

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

2015

Szeged

Bevezetés

A stroke és a különböző cerebro-vaszkuláris megbetegedések világszerte előkelő helyet foglalnak el a halálozási statisztikákban. A magas mortalitási arány mellett a túlélők rehabilitációja is nagy anyagi terhet jelent a társadalom számára. Mivel jelenleg nem áll rendelkezésre széles körben alkalmazható beavatkozási lehetőség, emiatt a stroke-kal és az agyi ischaemia pathomechanizmusával kapcsolatos kutatások kiemelten fontosak és elengedhetetlenek az új neuroprotektív kezelések és terápiák kialakításához. Ezen vizsgálatokhoz rendelkezésre áll többféle állatkísérletes modell, melyek segítségével többféle aspektusból vizsgálhatók az agyi ischaemia molekuláris folyamatai, valamint segítségével tesztelhetők lehetséges neuroprotektív farmakonok hatásai is. Emellett azonban még mindig vannak olyan vizsgálati szempontok, melyekhez nincs ideális kísérleti modell. Ilyen pl. az ún. tranziens ischaemiás attack (TIA), mely során átmeneti funkcionális deficit lép fel a rövid idejű agyi ischaemia vagy ischaemiás periódusok hatására. Ebből kifolyólag elengedhetetlen további modellek létrehozása.

Az elégtelen agyi keringés, illetve vérellátási hiány következményeként számos káros folyamat indul be, melyek végeredményben az idegszövet sérüléséhez vezetnek. Az ischaemia alatt fellépő oxigén- és tápanyaghiány következtében felborul a sejtek energiaháztartása, amely rövid időn belül az ischaemiás kaszkád beindulását indukálja. A csökkent ATP szint miatt a sejtek depolarizálódnak, és az ionháztartásuk felborul. Ennek következtében egyrészt egy fokozott neurotranszmitter felszabadulás, másrészt pedig egy túlzott mértékű intracelluláris Ca^{2+} koncentráció-növekedés figyelhető meg. A glutamát (Glu) – mint az egyik legfontosabb serkentő neurotranszmitter – megemelkedett szintje rendkívül káros, hiszen súlyos, kiterjedt másodlagos sérüléseket von maga után. Az ischaemia nyomán fellépő Glu által mediált folyamatokat Glu excitotoxicitásnak hívjuk. A Glu szintjének csökkentése kivédheti, mérsékelheti a másodlagos károsodásokat, így ez az egyik központi támadáspontja számos neuroprotektív stratégiának. Az egyik ígéretes metodika a Glu scavenging, mely során az emelkedett agyi Glu szint lecsökkenthető a Glu agyból vérbe történő transzportjának fokozásával, melyet a vér Glu szintjének redukálásával idézhetünk elő. Ehhez a folyamathoz felhasználhatjuk a vérben lévő GOT enzim (Glu-Oxálcetsav-Transzamináz) által katalizált egyensúlyi enzimreakciót, mely során a Glu az oxálcetsavval (OxAc) együtt aszpartáttá (Asp) és 2- α -ketoglutaráttá (AKG) alakul. Az OxAc intravénás alkalmazásával az egyensúly eltolható és a vér Glu koncentrációja lecsökkenthető, ezzel megerősítve az agyból a vér irányába zajló Glu-effluxot. Ez a technika már több

állatkísérletben bizonyult neuroprotektívnek, azonban a pontos mechanizmus, illetve az OxAc-hoz köthető további hatások részleteiben nem teljesen ismertek.

Célkitűzések

1) Kísérleteink során elsőként célul tűztük ki egy saját ötleten alapuló új fokális ischaemiás modell kialakítását és vizsgálatát, mely során a középső agyi artériát (MCA) a felszíntől elemelve hozhatjuk létre az ér elzárását. A műtéti és technikai eljárások megvalósítása után vizsgáltuk a módszer alkalmazhatóságát, reprodukálhatóságát, valamint a repetitív ischaemia-reperfúzió kialakításának lehetőségét is. További célunk volt az ischaemia hatásának detektálása elektrofiziológiai és szövettani módszerekkel, valamint vizsgáltuk, hogy modellünk segítségével nyomon követhető-e a neuromodulátoros, neuroprotektív farmakonok hatása. Utóbbi vizsgálathoz – a laborunk által korábban már alkalmazott – OxAc hatását tanulmányoztuk.

2) Az OxAc általános anyagcsere intermedierként többféle metabolikus folyamatban is részt vesz, így Glu scavengerként való alkalmazása során egyéb (nem scavenger) hatást is kifejthet. Kísérleteink során célul tűztük ki az OxAc neuronális aktivitásra gyakorolt, valamint ischaemiás körülmények között kifejtett hatásának vizsgálatát *in vitro* körülmények között.

3) Kísérleteink során célul tűztük ki az OxAc agyi aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálatát *in vivo* körülmények között szomatoszenzoros kérgi kiváltott potenciálok (SEP) keresztül. Továbbá tanulmányoztuk az esetleges hatás dóziszfüggését, illetve hogy ez közvetlen összefüggésben lehet-e az OxAc hatására lecsökkenő vér Glu szinttel.

Anyagok és módszerek

Felhasznált állatok

Kísérleteinkhez 200-300 g tömegű hím Wistar patkányokat használtunk, amelyeket szabványos ketrecben, külön erre a célra kialakított állatházban tartottunk. Az állatok számára 12-12 órás világos illetve sötét periódus volt biztosítva $22\pm 1^\circ\text{C}$ -os hőmérséklet mellett. Az állatoknak korlátlan hozzáférése volt a vízhez és a táplálékhoz.

Fokális ischaemiás modell

A fokális ischaemia kialakítását Nembutal altatásban végeztük. A fej rögzítését követően a bőrt megnyitottuk, majd a rágóizom tompa preparálása után a koponyán fogászati fúró segítségével egy 2-3 mm átmérőjű szakaszt tártunk fel. A csont eltávolítása után láthatóvá vált az MCA első felszíni elágazás előtti szakasza. A kemény és a lágy agyhártya megnyitása után mikromanipulátorok segítségével egy mikro-sebészeti kampót helyeztünk óvatosan az ér alá. Az MCA elzárását az ér megemelésével váltottuk ki (kb. 1100-1200 μm), mely során az ér kifehéredett és a perfúzió lecsökkent. Az ischaemiás periódus végén a kampót óvatosan visszaengedtük, eltávolítottuk az ér alól, majd visszahelyeztük a kemény agyhártyát, és összevarrtuk a sebet. A különböző kísérleti csoportoknál 2 x 15 és 30 perces ischaemiás periódust alkalmaztunk.

In vivo elektrofiziológiai vizsgálatok

Az EEG elvezetést az altatott állat megtisztított koponyafelületéről, szomatoszenzoros területéről (Br -3 mm, antero-laterálisan 2 mm) gömbfejű ezüst elektródával végeztük. Az EEG vizsgálatához teljesítmény spektrum analízist végeztük. Az elvezetett jeleket 2-20 Hz-es frekvencia tartományra szűrtük, a további elemzést ebben a tartományban végeztük.

A SEP-ek vizsgálatához megnyitottuk a fejbőrt, és megtisztítottuk a baloldali parietális koponyaszakaszt. Sztereomikroszkóp alatt, fogászati fúró segítségével távolítottuk el a koponyacsontot az adott területen, vigyázva, hogy a kemény agyhártya ne sérüljön. Az előkészítő műtét után az ingerlő elektródákat (bipoláris tüelektródák) a jobb oldali bajuszpárnán, a C4-es és a D4-es bajuszszőr folliculusába szűrtük. Az ingerlést 0,1 Hz-s frekvenciájú, 0,2 ms-os jelszélességű és 3,4-4 V-os amplitúdójú négyszög árammal hajtottuk végre. Az amplitúdókat a negatív (N1) és a pozitív (P1) csúcs között (peak to peak)

regisztráltuk. Az elvezetés során, 1000-szeres erősítést és 1024 Hz-es mintavételezési frekvenciát használtunk.

Az *in vivo* kísérletek során az anyagokat a laterális farokvénán keresztül 1 ml végtérfogatban és semleges pH mellett ($7,41 \pm 0,05$) juttattuk a keringésbe. A beadáshoz mikroinjekciós pumpát használtunk, az injektálás sebessége $66,7 \mu\text{l/perc}$ (15 perc/1 ml) illetve $33,3 \mu\text{l/perc}$ volt (30 perc/1 ml) volt.

In vitro elektrofiziológia

Túlélő agyszelet preparátum készítéséhez a patkányokat i.p. uretán (1.3 g/ttk) injekcióval elaltattuk, dekapitáltuk, és a koponya megnyitása után szike segítségével koronális síkban kimetszettük a hippocampust tartalmazó régiót. Ezt követően jéghideg ($1-4^\circ\text{C}$), oxigenáltatott, alacsony Ca^{2+} tartalmú mesterséges agy-gerincvelői folyadékban (artificial CerebroSpinal Fluid, aCSF; összetevők mM-ban: 130 NaCl; 3,5 KCl; 1 NaH_2PO_4 ; 24 NaHCO_3 ; 1 CaCl_2 ; 3 MgSO_4 és 10 D-glükóz) $350 \mu\text{m}$ vastag szeleteket készítettünk vibratóm segítségével. Az agyszeleteket egy óráig inkubáltuk aCSF-ben 30°C -on, ezt követően $17 \pm 2^\circ\text{C}$ -on tartottuk a mérés megkezdéséig. Az inkubáláshoz illetve regisztráláshoz oxigenált normál aCSF oldatot használunk, melyben a CaCl_2 és MgSO_4 koncentrációja 3, illetve 1,5 mM volt.

Az elektrofiziológiai méréseket Haas típusú interface regisztráló kamrában végeztük. Ennél az elrendezésnél a szeletek az átfolyó aCSF, valamint a fölötte kialakuló oxigéndús párás közeg határán helyezkednek el. Kísérleteinkben az *in vitro* ischaemia, valamint az alkalmazott anyagok hatását kiváltott, serkentő posztszinaptikus mezőpotenciálok (Excitatory PostSynaptic Potential, fEPSP) segítségével vizsgáltuk a hippocampusz CA1-es régiójában. Méréseinket szobahőmérsékleten végeztük, az ingerléshez bipoláris koncentrikus fémelektrodát használtunk. A fEPSP-k elvezetése a CA1 es régió startum radiatum rétegéből $1,5-2 \text{ m}\Omega$ ellenállású üvegapillárisok segítségével történt.

In vitro ischaemiás modell

Az *in vitro* ischaemiás állapotot az oxigén-glükóz deprivációs modell (ODG) segítségével idéztük elő. Az OGD alatt az oxigén helyett nitrogénnel dúsítottuk az aCSF-et, amelyben a glükózt szacharózra cseréltük. Az OGD ezen aCSF segítségével az agyi ischaemia alatt fennálló hipoxiás és hipoglikémiás állapot jól modellezhető. Méréseinknél – előzetes kísérletek alapján meghatározott – 15 perc hosszúságú ODG-t alkalmaztunk. A vizsgálatok

során az OxAc-ot a normál aCSF-ben, illetve az OGD aCSF oldatban feloldva alkalmaztuk. A kísérletek alatt felhasznált oldatokat minden esetben 7.3-7.4-es pH-ra állítottuk be.

Szövetteni vizsgálatok

TTC festést alkalmaztunk a 2 x 15 perces dMCAO-t követően 1 nap túlélési idő után, mely során vibratóm segítségével 500 µm vastagságú koronális szeleteket készítettünk. Ehhez a szeleteket szobahőmérsékleten, 15 percig 1%-os TTC (2, 3, 5-trifeniltetrazolium klorid) oldatban inkubáltuk.

Fluoro Jade C festés a dMCAO-t követően 1 nap -, a 30 perces ischaemiás csoport esetében 5 nap - túlélési idő után végeztünk. Az állatokat az altatást követően jéghideg 0,1 M-os foszfát pufferrel, majd 4%-os paraformaldehiddel (pH 7,4) transzkardiálisan perfundáltuk. Az agyat eltávolítottuk, majd egy napon keresztül utófixáltuk. Vibratóm segítségével 20 µm-es koronális szeleteket készítettünk, melyeket 2%-os zselatinózott tárgylemezre húztunk fel. A metszeteket szárítás után, szobahőmérsékleten leszálló alkoholsorral rehidráltuk, majd 10 percig 0,06%-os kálium-permanganát oldatban, 20 percig 0,004%-os FJC festőoldatban inkubáltuk. Mosás és szárítás után a metszeteket xilol bázisú fedőanyaggal fedtük.

A szabadon úszó szeleteket 0.1 M PB-ben mostuk, majd az endogén Fc receptorokat 10 %-os normál szamar szérumban (NDS) blokkoltuk. Az antitesteket (S100, CD11b) 0,1 M PB, 2% NDS, 0,4 % Tx100 és 0,01% Na-Azid tartalmú oldatban vettük fel. A metszeteket az elsődleges antitestben 4°C-on 24 óráig, a megfelelő másodlagos antitestben (Jackson Immunoresearch) szobahőmérsékleten 2 óráig inkubáltuk. Mosást követően a szeleteket fent már említett módon rögzítettük a tárgylemezre.

Kvantitatív elemzést végeztünk a 2 x 15 perces ischaemiás, valamint az OxAc-kezelt csoportnál is. FJC+ degenerálódó sejteket meghatározott kérgi területen számoltuk a koronális metszeteken (a corpus callosum magasságában az ipszilaterális féltekén 20x-os objektív látóterében, 500 µm oldalhosszúságú négyzetek területén). Rosztro-kaudális síkban 4 mm hosszan (Br. -2 mm-től -6 mm-ig) elemeztünk ki minden tizedik 20 µm-es szeletet. A manuális sejtszámolást 3 személy párhuzamosan, „vakon” végezte.

Statisztikai analízis

Az ischaemiás modell vizsgálata során az EEG és a SEP-ek adatainak analízisét „General Linear Model\Repeated measures” modellben végeztük. EEG esetén a teljesítmény

spektrumot 1 Hz-es intervallumokra bontottuk fel (2-20 Hz). Az egyes frekvenciákhoz tartozó teljesítményt egyedi adatként kezeltük. A SEP-ek elemzéséhez a normalizált amplitúdó értékeket használtuk. Az oszlop- és vonaldiagrammokon az átlagot és a hozzá tartozó szórást tüntettük fel.

Az intakt állatokon végzett *in vivo* elvezetések, valamint az OxAc-kezelt és a kontroll ischaemiás csoport normalizált amplitúdó értékeit nem-parametrikus „Related-Samples Friedman’s Two-Way Analysis of Variance by Ranks” modellel hasonlítottuk össze.

A FJC+ sejtek mennyiségi összehasonlításánál kevert lineáris modellt használtunk. Az analízis során a Poisson hibaeloszlást, az állatok random hatását és a kezelések fix hatását építettük be. A vonaldiagrammokon az átlagot és a hozzá tartozó szórást ábrázoltuk, míg a box-diagrammokon az adatok mediánját, az interkvartilis tartományt és a szélső értékeket jelöltük.

Az *in vitro* kísérletek során elvezett fEPSPk normalizált amplitúdó és slope értékeinek statisztikai analíziséhez Mann-Whitney U-tesztet használtunk. A vonaldiagrammokon az átlagot és a hozzá tartozó szórást tüntettük föl.

Minden esetben a $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) és a $P < 0,001$ (***) értéket tekintettük szignifikáns különbségnek.

Eredmények és megbeszélés

Ischaemiás modell kialakítása és vizsgálata

A kialakított fokális ischaemiás modellnél a műtéti eljárás kivitelezése egyszerű és jól reprodukálható volt. Ezen metodika segítségével az ér emelésével kiváltott okklúzió mértéke finoman szabályozható, és a perfúzió egyedülálló módon könnyen adott szintre állítható be. A kísérletekben a modellel sérülésmentesen tudtunk létrehozni tetszőleges hosszúságú ischaemiás periódust, illetve periódusokat. Ezáltal alkalmasnak bizonyulhat a TIA modellezésére és jelenségkörének vizsgálatára.

A kialakított ischaemia hatásának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy jelentős mértékben megváltozott az EEG teljesítmény spektruma, főként a 2-20 Hz-es tartományban. Továbbá a trigeminális rendszer ingerlésével kiváltott potenciálok amplitúdói szinte azonnal teljesen lecsökkentek az ischaemiás periódus alatt. A 2 x 15 perces paradigmát alkalmazva a SEP-ek amplitúdói a reperfúziós időszak alatt nem tértek vissza a kontroll szintre.

1 nap túlélést követően, a 2 x 15 perc MCAO hatása nem volt kimutatható TTC festéssel. Ez azt jelzi, hogy a detektált funkcionális változások nem vezettek nagymértékű szövetelhaláshoz. Ennek ellenére a FJC festés során – mellyel a degenerálódó neuronok detektálhatók – intenzív jelölődést tapasztaltunk az ipsilaterális oldalon. A modellünkben előidézett ischaemia későbbi, elhúzódó károsító folyamatait is vizsgáltuk a 30 perces MCAO esetén, 5 nap túlélést követően. Ezen vizsgálati csoportnál a FJC+ degenerálódó neuronok mellett megnövekedett mennyiségű S100 pozitív asztrocita, valamint aktivált mikroglia sejt volt látható az érintett szomatoszenzoros kérgi területeken. A fenti eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a modell alkalmazásával létrehozott ischaemia funkcionális és struktúrális sérülésekhez vezet, melyek nyomon követhetők különböző vizsgálati módszerekkel.

Mivel általunk felállított kísérletes metodika több szempontból is alkalmasnak bizonyult az ischaemia modellezésére, ezért a kísérletek következő fázisában ezen MCAO modell segítségével vizsgáltuk az OxAc, mint Glu scavenger potenciális neuroprotektív hatását. A 2 x 15 perces kísérleti elrendezésnél az állatok keringésébe juttatott OxAc hatása azonnal tükröződött a SEP-ek változásában. Szemben a kezelésben nem részesülő ischaemiás csoporttal, ez esetben már az ischaemia alatt megfigyelhető volt az amplitúdók növekedése, majd az MCAO-t követően egy-két perc elteltével teljesen rendeződött az agykérgi aktivitás,

és az amplitúdók kontroll szintre tértek vissza. 1 nap túlélést követően ez esetben is intenzív FJC festődést tapasztaltunk, azonban az is megfigyelhető volt, hogy az OxAc hatására jelentős mértékben csökkent a FJC pozitív sejtek száma. A kialakított modell segítségével tehát nyomon tudtuk követni OxAc hatását mind elektrofiziológiai, mind hisztológiai módszerekkel, mely során újabb bizonyítékot kaptunk a Glu scavenging neuroprotektív hatásáról.

OxAc vizsgálata *in vitro* körülmények között

Kísérleti eredményeink azt mutatták, hogy az OxAc egyik alkalmazott koncentrációban (0,1, 1 mM) sem volt hatással a kiváltott fEPSP-kre. Az OGD-s kísérletek esetén az ischaemiás inzultus első perceiben megfigyelhető kismértékű amplitúdó-növekedés után az fEPSP-k eltűntek, és a 15 perces ischaemiás periódus után sem jelentek meg. A 0,1 mM OxAc hatására az OGD-t követően átmenetileg megjelentek az fEPSP-k. Ez a jelenség azonban csak rövid ideig állt fenn, majd a regisztrált jelek ismét csökkenni kezdtek, majd pedig véglegesen eltűntek. Az 1 mM-os koncentráció – mely önmagában szintén nem volt hatással a kiváltott aktivitásra – alkalmazásával az fEPSP-k kontroll szintre tértek vissza az OGD periódust követően, ami jól mutatja az OxAc-hoz köthető neuroprotektív hatást. Az OxAc ezen ischaemiás modellben feltehetően metabolikus és antioxidáns úton fejtette ki jótékony hatását.

OxAc hatása a szomatoszenzoros kiváltott potenciálokra

Következő kísérletsorozatunkban vizsgáltuk az OxAc agyi aktivitásra gyakorolt hatását a SEP-eken keresztül. Az elvezetések során a legkisebb alkalmazott dózis (1,25 mg/100 g) nem befolyásolta a SEP-ek amplitúdóját, míg OxAc nagyobb dózisban alkalmazva (2,5 és 5 mg/100 g) jelentős mértékben növelte az amplitúdókat. A dóziszfüggő amplitúdó-növekedés a kezelés után 10-20 perc elteltével jelentkezett, és 1, 1-5 órát követően stabilizálódott az adott, akár 180 %-os szinten. Ezen jelenség magyarázata nem tűnik egyszerűnek, és számos kérdést vet fel. A kéregről elvezetett SEP-et több – különböző szinten elhelyezkedő – idegi elem együttesen alakítja ki, így az amplitúdó-növekedés hátterében húzódó konkrét neuronális változások nehezen azonosíthatók. Emellett azonban kísérletesen vizsgálható, hogy a vér glutamát koncentrációjának változása összefüggésben áll-e a SEP-ek amplitúdó-növekedésével. Ismert tény, hogy az intravénásan alkalmazott OxAc jelentősen lecsökkenti a vér Glu koncentrációját. Ha ugyanilyen körülmények között OxAc helyett AKG-t alkalmazunk, akkor a GOT enzimreakció segítségével csökkentés helyett növelhetjük a vér Glu koncentrációját. Kísérleteink során az ekvimoláris koncentrációjú AKG, valamint az 50-

50 % arányú OxAc-ÁKG keverék, az OxAc-hoz hasonlóan megnövelte a SEP-ek amplitúdóit. A növekvő tendencia rendkívül hasonló volt a különböző kezelt csoportoknál, 1 órával a kezelést követően minden esetben szignifikáns különbséget tapasztaltunk a kontroll periódushoz képest. Ezen eredmény azt sugallja, hogy valószínűleg nem a vér Glu szint változása áll a SEP-ek amplitúdónövekedésének hátterében. Az i.v. injekálás során a keringésbe juttatott molekulák összetett változást okozhatnak a GOT enzim termékeinek (Glu, OxAc, ÁKG és Asp) arányában és koncentrációjában. Feltételezhetően ezen anyagok fiziológiai hatásai eredményezik a tapasztalt változást. A molekulák széles hatásspektrummal rendelkeznek, így a jelenség pontos magyarázata nem egyszerű. A hatásmechanizmus részletes ismeretének hiányában is kijelenthetjük, hogy az alkalmazott OxAc és ÁKG hatására nagymértékű változás történt egy fontos szomatoszenzoros rendszerben, mely utalhat a Glu scavenging eddig nem ismert esetleges mellékhatására is, ami hozzájárul ezen neuroprotektív stratégiával kapcsolatos ismereteink bővítéséhez.

Összefoglalás

Kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy kidolgoztunk egy új, egyszerűen kivitelezhető és jól reprodukálható fokális ischaemiás modellt, melynek alkalmazásával lehetőség nyílik a TIA modellezésére. Ezen metodika alkalmazásával újabb bizonyítékot adtunk a Glu scavenging és az OxAc neuroprotektív hatására. *In vitro* kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy az OxAc metabolikus és antioxidáns tulajdonságai révén neuroprotektívnek bizonyult a globális ischaemiával szemben. Végül kijelenthetjük, hogy az intravénásan alkalmazott OxAc jelentősen befolyásolta a SEP-eket, ami jelzi a Glu scavenging mellett jelentkező további hatások vizsgálatának szükségességét.

Publikációs lista

(MTMT azonosító: 10029451)

Knapp L, Gellért L, Kocsis K, Kis Z, Farkas T, Vécsei L and Toldi J. **Neuroprotective effect of oxaloacetate in focal brain ischemic model in the rat.** Cellular and Molecular Neurobiology 2015 Jan;35(1):17-22.

IF.: 2,201

Knapp L, Gellért L, Herédi J, Kocsis K, Oláh G, Fuzik J, Kis Z, Vécsei L, Toldi J and Farkas T. **A simple novel technique to induce short-lasting local brain ischaemia in the rat.** Neuropathology and Applied Neurobiology 2014 Aug;40(5):603-9.

IF.: 4,970

Gellért L, **Knapp L**, Németh K, Herédi J, Varga D, Oláh G, Kocsis K, Menyhárt Á, Kis Z, Farkas T, Vécsei L, Toldi J. **Post-ischemic treatment with L-kynurenine sulfate exacerbates neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion.** Neuroscience 2013 Sep 5;247:95-101.

IF.: 3,327

Nagy D, **Knapp L**, Farkas T, Kis Z, Vécsei L, Teichberg VI, Toldi J. **Effects of blood glutamate scavenging on cortical evoked potentials.** Cellular and Molecular Neurobiology 2010 Oct;30(7):1101-6.

IF.: 2,423

Kocsis K, **Knapp L**, Mészáros J, Kis Z, Farkas T, Vécsei L and Toldi J. **Acetyl-L-carnitine and oxaloacetate in post-treatment against LTP impairment in a rat ischemia model. An in vitro electrophysiological study.** Journal of Neural Transmission (közlésre elfogadva, doi: 10.1007/s00702-014-1343-7)

IF.: 2,871

Kocsis K, **Knapp L**, Gellért L, Oláh G, Kis Z, Takakuwa H, Iwamori N, Ono E, Toldi J and Farkas T. **Acetyl-L-carnitine normalizes the impaired LTP and spine density in a rat model of global ischaemia.** Neuroscience 2014 Jun 6;269:265-72.

IF.: 3,327

Demeter I, Nagy K, Farkas T, Kis Z, Kocsis K, **Knapp L**, Gellert L, Fülöp F, Vecsei L, Toldi J. **Paradox effects of kynurenines on LTP induction in the Wistar rat. An in vivo study.** Neuroscience Letters 2013 Oct 11;553:138-41.

IF.: 2,055

Oláh G, Herédi J, Menyhárt Á, Czinege Z, Nagy D, Fuzik J, Kocsis K, **Knapp L**, Krucsó E, Gellért L, Kis Z, Farkas T, Fülöp F, Párdutz Á, Tajti J, Vécsei L, Toldi J. **Influence of endogenous and synthetic NMDA receptor antagonists on cortical spreading depression and related blood-brain barrier permeability changes.** Drug design and development 2013 Sep 16;7:981-7.

IF.: 3,026

Fuzik J, Gellért L, Oláh G, Herédi J, Kocsis K, **Knapp L**, Nagy D, Kincses T, Kis Z, Farkas T, Toldi J. **Fundamental interstrain differences in cortical activity between Wistar and Sprague-Dawley rats during global ischemia.** Neuroscience 2013 Jan 3;228:371-81.

IF.: 3,327